

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2015

課題番号：25221310

研究課題名(和文)骨代謝を制御するWntシグナルネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of Wnt signaling network controlling bone metabolism

研究代表者

高橋 直之(Takahashi, Naoyuki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90119222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 101,400,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞が古い骨を吸収し、その部位に骨芽細胞が新しい骨を作るため、骨組織は生涯作りかえられている。破骨細胞が担う骨吸収と骨芽細胞が担う骨形成は厳格に共役しているが、分子機構は不明である。一方、Wntシグナル系は骨代謝を調節する重要なシグナルである。本研究において、(1)破骨細胞と骨芽細胞が分泌するWnt分子種が、骨代謝を厳格に調節していること、(2)破骨細胞はWntシグナルの制御を通して骨芽細胞の機能を制御していること、を明らかにした。さらに(3)Wntシグナルを標的とした骨粗鬆症治療薬の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts resorb old bone, and osteoblasts make new bone at the resorption site. Therefore, bone tissue is re-formed throughout the life. Although bone formation by osteoblasts is tightly coupled with bone resorption by osteoclasts, the molecular mechanism of the coupling phenomena is unknown. Wnt signaling is an important signal that regulates bone metabolism. In the present study, we showed that (1) Wnt molecules, which osteoclasts and osteoblasts secrete, strictly regulate bone metabolism, (2) osteoclasts regulates osteoblast function through the control of the Wnt signaling, and (3) Wnt signal regulatory agents will become good drugs for osteoporosis treatment.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 Wnt RANKL OPG 骨代謝共役

1. 研究開始当初の背景

骨吸収と骨形成は厳格に共役している。骨代謝共役因子の存在が示唆されているが、その分子機構は不明である。Wnt は β -catenin を介する古典経路とそれを介さない非古典経路を活性化する。2001年、骨芽細胞における Wnt 古典経路は骨形成を促進することが報告され(Cell 16:513, 2001)、骨における Wnt シグナルの重要性が注目された。我々は、Wnt-非古典経路は破骨細胞の分化を促進することを見出した(Nature Med 18:405, 2012)。さらに、骨代謝共役を Wnt シグナルが担う可能性を示す知見が得られた。一方、高齢化社会を迎えた日本では、歯周病における歯槽骨吸収の防止は急務である。骨吸収抑制薬は顎骨壊死の問題が指摘されるため使用しにくいため、歯槽骨の量を増やす治療法の確立は重要である。また、医科においては、老化に伴う骨量減少は重要問題であり、同様に骨吸収抑制ではなく骨形成を促進する治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

骨吸収と骨形成は厳格に共役しているが、分子機構は不明である。骨芽細胞における Wnt 古典経路は骨形成を促進する。一方我々は、Wnt 非古典経路は破骨細胞の分化を促進することを見出した。最近我々は、破骨細胞は、(1)骨芽細胞の分化を誘導する Wnt を発現する可能性、(2)骨細胞が分泌する骨形成阻害因子 Sclerostin (Wnt 抑制因子) の産生を抑制する可能性を見出した。また、(3)閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスにおいて、Wnt 非古典経路が活性化されることを見出した。これらの知見は、Wnt シグナルは互いに連関して骨代謝を調節していることを示す。本研究では、骨代謝を調節する Wnt シグナルネットワークの全容解明を目指す。これより、骨代謝共役の分子機構が明らかにされる。さらに Wnt シグナルを標的とした骨量を増やす治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

骨代謝を調節する Wnt シグナルネットワーク解明を目的に、(1) Ryk シグナル解析:骨芽細胞特異的 Ryk-KO マウスを作製し、解析する。Ryk と相互作用する因子を同定する。(2) Ror2 シグナル解析:破骨細胞特異的 Ror2-KO マウスを作製し、Ror2 シグナルを解析する。(3) 破骨細胞の分泌する Wnt 同定:Wnt 発現量を定量的 RT-PCR と Western blot 法で解析する。(4) Sclerostin 抑制因子:破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子を同定する。さらに Sclerostin 抑制因子の作用を解明する。(5) 歯周病モデルマウス解析:OPG 欠損 (KO) マウスの歯槽骨の骨量減少に関わる Wnt シグナルを解明する。さらに、W9 ペプチドを OPG-KO マウスに投与し、歯槽骨現象を防御する W9 ペプチドの効果を解析する。

4. 研究成果

(1) Osterix-Cre Tg マウスを交配させ、骨芽細胞特異的 Ryk 欠損 (Ob-Ryk-cKO) マウスを作製した。Ob-Ryk-cKO マウスは、骨形成が著しく低下しており、Ryk シグナルは骨芽細胞の機能に重要であることが示された。

(2)破骨細胞特異的 Ror2 欠損 (Oc-Ror2-cKO) マウスを作製した。Oc-Ror2-cKO マウスの骨量は有意に増加していた。Wnt5a Ror2 Daam2 RhoA Pkn3 c-Src というシグナル

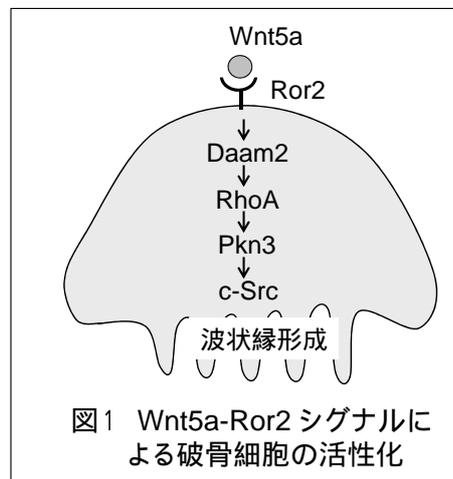
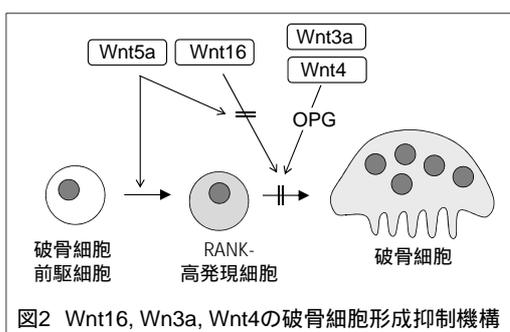


図1 Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞の活性化

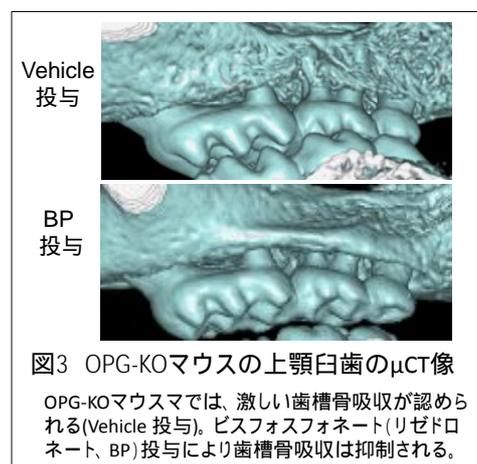
系が破骨細胞の骨吸収活性には必須であることを証明した(図1)。一方、天然物をスクリーニングする過程で、リグナン誘導体である Arctigenin が強力に破骨細胞の骨吸収を抑制することを見出した。Arctigenin は RhoA-PKN3 シグナル系を調節する可能性が示唆された。

(3)破骨細胞への分化に伴い、Wnt5aの発現が急上昇することを見出した。破骨細胞特異的 Wnt5a 欠損 (Oc-Wnt5a-cKO) マウスを作製したところ、骨形成が抑制されていた。また、Wnt5aは骨芽細胞のLrp5の発現を促進することで、骨芽細胞の分化を促進した。Wnt16、Wnt4およびWnt3aは破骨細胞形成を抑制した。Wnt4とWn3aはOPGの産生亢進を介して破骨細胞形成を抑制したのに対し、Wnt16による破骨細胞形成抑制はWnt5aシグナルで調節されていた(図2)。



(4) OPG-KO マウスと RANKL 強発現 (RANKL-Tg) マウスの Sclerostin の発現は低下していた。OPG-KO 及び RANKL-Tg マウスに骨吸収抑制剤 (抗 RANKL 抗体、bisphosphonate) を投与したところ、骨吸収抑制と同時に、Sclerostin の発現が増加した。骨肉腫細胞株 UMR106 細胞に、破骨細胞の培養上清を添加すると、UMR106 細胞の Sclerostin 発現を強力に抑制した。以上より、破骨細胞は骨細胞の Sclerostin 発現を抑制する未知因子 (Factor X) を産生することが明らかとなった。

(5) OPG-KO マウスに著しい歯槽骨吸収像が認められたが、RANKL-Tg マウスの歯槽骨吸収は軽度であった。骨細胞が強力に OPG を発現していることを見出した。OPG-KO マウスに骨吸収抑制剤 (ビスフォスフォネート, BP) を投与したところ、歯槽骨吸収はほぼ完全に抑制できた(図3)。以上、骨細胞の産生する OPG が、歯槽骨の防御に重要な役割を演じていること、そして骨吸収抑制剤は歯周病治療薬に



なりえることが示された。

(6) 破骨細胞が Sclerostin 分泌を抑制する因子を産生していることを突き止めた。新規骨形成薬を探索する過程で、TNF 受容体を模倣した W9 ペプチドが骨形成を促進することを明らかにした。OPG-欠損マウスに W9 ペプチドを投与したところ、W9 ペプチドは骨量減少を防止できることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15件)

- Thirukonda GJ (1), Takahashi N (7), Udagawa N (9), Kobayashi Y (10) 他6人: The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. J Bone Miner Metab in press, 2016. 査読有
Kobayashi Y (1), Takahashi N (4) 他2人: The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. Bone Key Rep 4:713, 2015. doi: 10.1038/bonekey.2015.82. 査読有
Kobayashi Y (1), Udagawa N(8),

Takahashi N(9)他6人: Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun*, 463:1278-83, 20115. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102. 査読有 Kanemoto S (1), Kobayashi Y (2), Takahashi N (12) 他10人: Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *J Cell Sci*. 128(23):4353-4365, 2015, doi: 10.1242/jcs.176057. 2015 査読有 Okamoto M (1), Udagawa N (2), Takahashi N (10), Kobayashi Y (11) 他7人: Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep* 4:4493, 2014. doi: 10.1038/srep0449. 査読有 Watanabe C (1), Kobayashi Y (7), Takahashi N (8) 他10人: Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnot3. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:2692-2697, 2014. doi: 10.1073/pnas.1316932111. 査読有 Nakayama T (1), Udagawa N (5), Takahashi N (11) 他8人: Polarization of osteoclasts on dental implant materials is similar to that observed on bone. *J Oral Biosci* 56:136-142, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.06.005>. 査読有 Nakamichi Y, Horibe K, Udagawa N, Takahashi N: Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology* 102:137-46, 2014. doi: 10.1007/s10266-014-0167-0. 査読有 Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y: Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med* 91:15-23, 2013. doi: 10.1007/s00109-012-0974-0. 査読有 Takahashi N: Mechanism of inhibitory action of Eldecalcitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:171-174, 2013. doi:pii: S0960-0760(12)00243-9. 査読有 Koide M (1), Kobayashi Y (2), Takahashi N (9), Udagawa N (10) 他6人: Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154(2):773-782, 2013. doi: 10.1210/en.2012-1928. 査読有 Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N: IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* 31: 486-495, 2013. doi:

10.1007/s00774-013-0476-3. 査読有 Horibe K (1), Kobayashi Y (6), Takahashi N (7), Udagawa N (8) 他4人: Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology* 140(3):344-351, 2013. doi: 10.1111/imm.12146. 査読有 Yamashita T (1), Udagawa N (3), Kobayashi Y (7), Takahashi N (8) 他4人: Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. *PLOS ONE* 9: e85878. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0085878. 査読有 Takahashi N, Udagawa N, Suda T: Vitamin D endocrine system and osteoclasts Vitamin D and Bone, *Bone Key*, 3:495. doi: 10.1038/bonekey.2013.229. 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

高橋直之:破骨細胞の研究からわかってきたこと. 歯科基礎平成 27 年度社員総会生化学分野分科会講演会, 日本歯科大学富士見ホール, 東京都千代田区, (招待講演) 2015年4月25日

高橋直之: 破骨細胞の分化と機能を調節する RANKL-RANK シグナル. 第一回日本骨免疫会議, 沖縄万国津梁館, 沖縄 (招待講演) 2014年7月5日

高橋直之: 歯周病において破骨細胞はどのように誘導されるか. 第57回春季日本歯周病学会, 長良川国際会議場, 岐阜 (招待講演) 2014年5月23日

Naoyuki Takahashi: Mechanism of anti-bone resorptive action of eldecalcitol. Advisory meeting of active vitamin D, Kobe Convention Center, Kobe (invited) May 28, 2013

〔その他〕

ホームページ等

松本歯科大学大学院歯学独立研究科 HP
<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 直之 (Takahashi Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 90119222

(2)研究分担者

宇田川 信之 (Udagawa Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

小林 泰浩 (Kobayashi Yasuhiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：20264252

中村 浩彰 (Nakamura Hiroaki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50227930

田口 明 (Taguchi Akira)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70243582