

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462904

研究課題名(和文) Wnt5a-Ror2シグナルによる破骨細胞極性化における分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms for osteoclast polarization through Wnt5a-Ror2 signaling

研究代表者

上原 俊介 (Uehara, Shunsuke)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90434480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨を吸収する際、細胞骨格および膜構造を変化させ、極性化する。我々は、サイトカインWnt5aが破骨細胞に発現する共受容体Ror2を介して、破骨細胞の極性化と骨吸収活性を制御する分子機構について調べた。

平成25年度から27年度の研究により、Wnt5a-Ror2シグナルが、アダプター分子Daam2を介して、Rho-Pkn3シグナル経路を活性化することで、破骨細胞の骨吸収を正に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polarization of osteoclasts (formation of actin rings and ruffled borders) is necessary to resorb bone. We examined the molecular mechanisms regulating osteoclast polarization through the cytokine Wnt5a and co-receptor Ror2 in osteoclasts.

We revealed that Wnt5a-Ror2 signaling regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts through the activation of Rho-Pkn3 pathways, and that Daam2, an adaptor molecule, is involved in activation of Rho under the Ror2 signaling.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 Wnt 非古典経路 骨吸収 Rho

1. 研究開始当初の背景

(1) 破骨細胞の骨吸収には、アクチン細胞骨格の再編成と膜構造の変化を伴う極性化が必要である。この極性化には、細胞接着によるシグナルが必要であること、低分子量 G タンパク質やチロシキナーゼである c-Src が関与することが知られていたが、その分子機構には不明な点が多く残されていた。

(2) サイトカイン Wnt のシグナルは、b-カテニンを介する古典経路と介さない非古典経路に分けられる。骨代謝において、Wnt 古典経路が骨芽細胞の分化を促進すること、破骨細胞の分化と機能を抑制する OPG の産生を亢進することが報告されていた。しかし、Wnt 非古典経路が破骨細胞においてどのような役割を果たすかは不明であった。

(3) 我々は、骨芽細胞が Wnt 非古典経路を活性化するリガンドである Wnt5a を分泌すること、Wnt5a は、破骨細胞前駆細胞に発現している共受容体 Ror2 に結合し、JNK を介して、RANK の発現を亢進させることで、破骨細胞分化を正に制御することを見出していた。共受容体 Ror2 は成熟した破骨細胞にも発現していたが、Wnt 非古典経路の破骨細胞機能に対する役割は不明であった。

2. 研究の目的

破骨細胞の機能(極性化)を Wnt 非古典経路がどのような分子機構で制御するか、を解明することを目的とした。その目的を達成するため、(1) Wnt5a-Ror2 シグナルの in vivo における重要性、(2) Ror2 の下流で活性化される分子(群)、(3) それら分子が in vivo において破骨細胞機能に関与するか、を明らかにすることを計画した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の形成

6-8 週齢のマウス大腿骨より骨髓細胞を回収し、M-CSF 存在下 16-18 時間培養した。その時点で浮遊している細胞を破骨細胞前駆細胞(BMM)とした。BMM を M-CSF 存在下で 3 日、その後、M-CSF+RANKL 存在下で 3 日間培養し、成熟した破骨細胞を得た。

(2) 遺伝子発現

BMM および破骨細胞を TRIzol で処理し、通法に従い、RNA を抽出した。逆転写により cDNA を生成した。それを用いて、リアルタイム PCR (RT-PCR) 法により各種の遺伝子発現を調べた。

(3) 破骨細胞特異的 Ror2 欠損 (Ror2 cKO) マウス

当研究室で作製した Ror2 floxed マウスを、カテプシン K Cre マウス(常磐会ときわ病院の加藤茂明先生および慶応大学の中村貴先生より供与いただいた)を掛け合わせ、破骨

細胞で特異的に Ror2 を欠損しているマウスを作製した。

(4) μ CT と骨形態計測

8週齢のオスのマウスに 48 時間の間隔を空けてカルセインを 2 回投与したのち、大腿骨および血清を採取した。大腿骨を、4%パラホルムアルデヒドで固定後、 μ CT を用いて撮影した。再構成後の三次元画像を用いて、骨量(BV/TV)を測定した。大腿骨をピラヌエバ骨染色により染色後、樹脂包埋して切片を作成した。骨形態計測は通法に従い実施した。

(5) 血清 CT-X と血清 ALP

上記マウスより採取した血清を用いて、骨吸収マーカーである血清 CT-X 濃度を ELISA 法により、骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ活性(ALP)を測定キットにより、測定した。

(6) Rho および Rac 活性測定

破骨細胞を低栄養(2% FBS)かつサイトカインフリー(M-CSF と RANKL を含まない)条件下で 6-8 時間培養し、リコンビナントの Wnt5a で 5 分刺激した後、サンプルを調製した。低分子量 G タンパク質である Rho および Rac の活性測定は、活性型特異的抗体を用いた G-LISA 法により実施した。

(7) アクチンリングおよび吸収窩形成

BMM を象牙切片上に播種し、M-CSF と RANKL を用いて破骨細胞へと分化させた。アクチンリングの染色は、ローダミン結合ファロイジンを用いて行なった。蛍光顕微鏡を用いて、アクチンリングの数を計数した。破骨細胞を除去後、象牙切片をマイヤーのヘマトキシリン液で染色し、吸収窩を可視化した。吸収窩の面積を、画像解析ソフトである Image J により定量した。

(8) アデノウイルスによる遺伝子導入

GFP、恒常活性型(CA)-RhoA および、CA-Rac1 を発現するためのアデノウイルスは購入した。遺伝子をノックダウンするための shRNA 発現のために、必要な配列を組み込んだアデノウイルスを作成した。Pkn3 に Venus(GFP の変異体:遺伝子は理研から供与された)タグを付けた融合タンパク質およびアクチンに DsRed のタグを付けた融合タンパク質を発現するために、それぞれの遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作成した。

BMM を M-CSF で 3 日間培養後、M-CSF+RANKL で 60 時間培養した。アデノウイルスを含む培養液で 2 時間振盪培養後、新鮮な培養液に交換し、36 時間後に実験に用いた。

(9) Pkn3 遺伝子欠損 (Pkn3 KO) マウス

Pkn3 KO マウスは神戸大学の向井秀幸先生より供与された。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞における Wnt の発現

マウスにおいて、リガンドである Wnt は 19 種類存在することが知られている。そこで、それらの Wnt の破骨細胞における発現を、RT-PCR 法により調べた。破骨細胞分化に伴い最も高発現するのは、Wnt5a であった。すなわち、骨芽細胞だけでなく、破骨細胞も Wnt5a を分泌することが明らかになった。興味深いことに、Wnt5a 遺伝子欠損マウスから調製した破骨細胞は、アクチンリング形成および吸収窩形成が低下していた。すなわち、破骨細胞は自身が分泌する Wnt5a により、オートクライン的に極性化と骨吸収活性を制御していると考えられる。

(2) 破骨細胞に発現する Ror2 の in vivo における役割

Ror2 cKO マウスの大腿骨を μ CT を用いて解析したところ、コントロールマウスに比べて骨量が増加していた。骨形態計測により、破骨細胞の数には有意な差が認められなかったが、骨面に占める骨吸収面の割合が顕著に低下していた。骨吸収マーカーである血清 CT-X は有意に低下していたが、骨形成マーカーである血清 ALP には差が認められなかった。すなわち、Ror2 cKO マウスは、骨吸収の低下により、骨量が増加していると考えられる。

(3) Wnt5a-Ror2 シグナルによる低分子量 G タンパク質の活性化

コントロールマウスおよび Ror2 cKO マウスから調製した破骨細胞を Wnt5a で刺激し、活性化 Rho および Rac を定量した。コントロール破骨細胞では、Rho も Rac も活性化されたが、Ror2 cKO 破骨細胞では、活性化が認められなかった。すなわち、Wnt5a は Ror2 を介して Rho および Rac を活性化していることが明らかになった。

Wnt5a-Ror2 シグナルによる Rho および Rac の活性化が破骨細胞の極性化および機能に果たす役割を明らかにするため、Ror2 cKO 破骨細胞にアデノウイルスを用いて CA-RhoA または CA-Rac1 を発現した。コントロール破骨細胞と比べて Ror2 cKO 破骨細胞は、アクチンリングと吸収窩の形成が低下していた。CA-RhoA を発現させるとどちらも回復したが、CA-Rac1 を発現させても回復しなかった。すなわち、Wnt5a-Ror2 シグナルは、Rho の活性化を介して、骨吸収を正に制御していると考えられる。

(4) Ror2 の下流で Rho 活性化に関与するアダプター分子

Wnt 非古典経路において、Rho が活性化される際には、Daam1 というアダプター分子が必要だということが報告されている。そこで、破骨細胞における、Daam1 遺伝子の発現を RT-PCR で調べたところ、発現が認められなかった。しかし、同じファミリーに属する Daam2

は、破骨細胞分化に伴い高発現することが明らかとなった。アデノウイルスを用いて、Daam2 に対する shRNA を破骨細胞に導入し、Daam2 の発現をノックダウンしたところ、Wnt5a 刺激による Rho の活性化が抑制された。また、Daam2 のノックダウンにより、破骨細胞のアクチンリングおよび吸収窩形成は顕著に低下した。これらの低下は、CA-RhoA を同時に発現させることで回復した。すなわち、Wnt5a-Ror2 シグナルは、Daam2 を介して、Rho を活性化することで、破骨細胞の骨吸収活性を正に制御していると考えられる。

(5) Rho の下流で働く分子

Wnt 非古典経路において、Rho の下流で働く分子として Rock が知られている。しかし、Rock の阻害剤を破骨細胞に添加してもアクチンリングおよび吸収窩の形成は抑制されなかった。Rho の下流で働く報告されている分子 (Rho エフェクター) は、Rock も含めて 13 種類ある。そこで、それらの遺伝子発現を BMM と破骨細胞で調べたところ、protein kinase N3 (Pkn3) が分化に伴い高発現することが明らかになった。

Venus-Pkn3 と DsRed-アクチンを破骨細胞に発現し、Pkn3 の局在を調べたところ、Pkn3 はアクチンリングに局在していた。

Pkn3 KO 破骨細胞は、アクチンリング形成および吸収窩形成が低下していた。これらの低下は、CA-RhoA を発現しても回復しなかったが、Venus-Pkn3 を発現すると回復した。

(6) Pkn3 の in vivo における役割

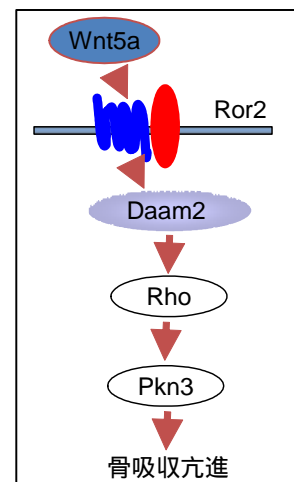
Pkn3 KO マウスの大腿骨を μ CT を用いて解析したところ、野生型マウスに比べて骨量が増加していた。骨形態計測により、破骨細胞の数には有意な差が認められなかったが、骨面に占める骨吸収面の割合が顕著に低下していた。骨形成パラメーターである骨芽細胞数や石灰化速度には差が認められなかった。

すなわち、Pkn3 KO マウスは、骨吸収の低下により、骨量が増加していると考えられる。

Pkn3 の骨吸収における重要性が in vivo においても確認された。

(7) まとめ

本研究成果の概略を図に示す。Wnt5a が Ror2 を介して、破骨細胞の骨吸収活性を正に制御する分子機構を明らかにした。Wnt5a-Ror2 シグナルは、アダプター分子である Daam2 を介して Rho を活性化する。Rho の下流で



は、Pkn3 が働いて、骨吸収活性を正に制御している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. J Biochem (査読有) 159: 387-392, 2016

DOI: 10.1093/jb/mvv124.

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. J Bone Miner Metab (査読有) オンライン版が 2015 年 6 月 11 日に掲載 URL:<http://link.springer.com/article/10.1007/s00774-015-0683-1>

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. Biochem Biophys Res Commun (査読有) 463: 1278-1283, 2015 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.

Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N. The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. BoneKey rep (査読有) 4: 713, 2015 DOI: 10.1038/bonekey.2015.82.

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N. Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. PLoS ONE (査読有) 9:e85878, 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.0085878.

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/-catenin signaling during osteoblastogenesis. Sci Rep (査読有) 4:4493, 2014 DOI: 10.1038/srep04493.

[学会発表](計 7 件)

上原俊介 Pkn3 は Ror2-Rho シグナルの下流で破骨細胞の骨吸収を制御する 第 1 回日本骨免疫学会ウインターセミナー 2016 年 1 月 29 日 ホテルマロウド軽井沢(長野県・軽井沢町)

Uehara S, Mukai H, Yamashita T, Nakamura T, Kato S, Kikuchi A, Nishita M, Minami Y,

Udagawa N, Takahashi N, Kobayashi Y Rho-Pkn3 pathway regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts under Wnt5a-Ror2 signaling. 37th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2015年10月10日 シアトル(アメリカ)

上原俊介, 山下照仁, 中村貴, 加藤茂明, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩 Wnt5a-Ror2 シグナルの下流で骨吸収機能を調節する PKN3 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 23 日 京王プラザホテル(東京都・新宿)

上原俊介, 山下照仁, 中村貴, 加藤茂明, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩 Wnt5a-Ror2 シグナルは Daam2-Rho を介して骨吸収機能を促進する 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

Uehara S, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Nakamura T, Kato S, Kikuchi A, Nishita M, Minami Y, Udagawa N, Takahashi N, Kobayashi Y Wnt5a-Ror2 signal regulates function of osteoclasts through Daam2-Rho pathway. 5th International conference on osteoimmunology 2014 年 6 月 17 日 コス島(ギリシャ)

Uehara S, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Nakamura T, Imai Y, Kato S, Kikuchi A, Nishita M, Minami Y, Udagawa N, Takahashi N, Kobayashi Y Wnt5a-Ror2 signal regulates osteoclast polarization through Daam2 and Rho. 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第 2 回合同学術集会 2013 年 5 月 29 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

上原俊介 Wnt5a-Ror2 シグナルは Daam2 と Rho を介して破骨細胞機能を制御する 松本ポーンフォーラム(招待講演) 2013 年 5 月 18 日 信州大学医学部(長野県・松本市)

[その他]

ホームページ等

学会発表の模様について、大学の広報誌である Campus Today (2015 年 10 月号) に掲載されている。URL:

http://www.mdu.ac.jp/dbps_data/_material/_files/000/000/004/408/382_new.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 俊介 (UEHARA, Shunsuke)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 9 0 4 3 4 4 8 0

(2) 研究分担者

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: 2 0 2 6 4 2 5 2