

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861686

研究課題名(和文) Wnt阻害因子による骨分化調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of bone differentiation by Wnt inhibitory factor

研究代表者

小野寺 晶子 (onodera, shoko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90637662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はBMPにおける骨芽細胞分化のメカニズムの一端を解明するためにWNTシグナル経路、特にWNT阻害因子群に注目し、詳細な分化メカニズムの解明を行うことを目的とした。ヒト歯周靭帯繊維芽細胞hPDLFを使用した骨芽細胞分化では骨形成に重要な経路であるWNT経路の阻害因子のうちスクレロスチンが強く関わっていることが示唆された。スクレロスチンは骨粗鬆症のターゲットであることから骨形成の治療薬としての発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the relationship between WNT signaling pathway, especially WNT inhibitors, and osteoblasts to elucidate the mechanism of BMP related osteoblast differentiation. Osteoblast differentiation using human periodontal ligament fibroblasts hPDLF was suggested that one of the inhibitor of WNT pathway sclerostin worked strongly in bone formation. Sclerostin is expected as a therapeutic agent for bone formation from being a target of osteoporosis.

研究分野：生化学

キーワード：骨芽細胞分化 Wnt経路 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

Wnt とその情報伝達経路は近年骨芽細胞分化機構、骨形成機構の中心的存在であることが明らかとなっている (Mikami Y et al, J Cell Physiol. 2010)。また以前より骨形成において重要な働きを持つとされる BMP は Wnt 経路と密接な関係を持ち、Wnt 経路の調節あるいは Wnt 経路からの BMP 情報経路の調節により、骨リモデリングを調節されていることが示唆されている。近年、BMP 受容体 null マウスにおける骨形成の亢進が Wnt 経路の阻害群、SOST、DKK1 の発現低下によることが明らかにされた (kamiya N et al, J Bone Miner Res. 2010)。このように BMP と Wnt 経路の相互作用は注目される重要な課題である。

2. 研究の目的

骨粗鬆症、歯周病など骨に関わる生活習慣病が増加しており、骨再生医療の必要性は高い。本研究では WNT 経路の阻害因子である DKK, Sclerostin (SOST), SFRP に関与する情報伝達経路を明らかにし、より高度な骨芽細胞分化の誘導を行うことを目的としている。WNT 阻害因子群の骨芽細胞分化への関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では 1) BMP2/7 による骨芽細胞分化調節のメカニズム、特に Wnt シグナル経路に焦点を当てた解析 2) Wnt 阻害因子を用いたヒト iPS 細胞から骨芽細胞への効率的な分化誘導条件の検討の以上 2 つの研究を並行して行った。

(1)- 正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞 hPDLF を骨芽細胞分化誘導培地 (OBM) に交換し誘導を開始する。このとき OBM に、BMP2/7、DEX を添加する。リアルタイム PCR 法にて Wnt シグナル関連遺伝子の発現量を解析する。

(1)- 正常ヒト歯周靭帯線維芽細胞 hPDLF を骨芽細胞分化誘導培地 (OBM) に交換し誘

導を開始する。このとき OBM に WNT3A 単回投与群と複数回投与群を作成し、リアルタイム PCR 法にて Wnt シグナル関連遺伝子の発現量を解析する。

(2) フィーダー細胞上で培養したヒト iPS 細胞を回収後、ペトリディッシュ上で培養し胚様体 (以下、EB) を形成させる。EB を回収しゼラチンコートプレート上に播種し、OBM で 10 日間培養後、ALP 染色で骨芽細胞分化の検討を行い、Wnt 経路の発現を PCR array により検討する。

4. 研究成果

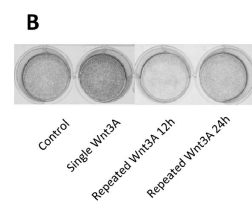
(1)- ヒト歯根膜細胞における BMP、デキサメタゾン (DEX) の同時投与の実験において ALP 活性及びリアルタイム PCR 法において ALP の誘導が認められた。そこ

表1

| WNT関連遺伝子 | | |
|-------------------|-------|-------|
| | gene | fold |
| inhibitory factor | SFRP1 | 2.6 |
| | SFRP2 | -34.4 |
| | SFRP4 | -8.3 |
| | DKK1 | 7.4 |
| | DKK2 | -10.3 |
| | SOST | -20.4 |
| target gene | WISP1 | 2.6 |
| receptor | FRZB | 4.4 |
| | LRP2 | 7.3 |
| co-receptor | LRP8 | 2.1 |
| | LRP12 | 2.2 |
| | WNT9A | -2.5 |
| WNTsignal | WNT2 | -2.6 |
| | WNT11 | -33.3 |
| | WNT16 | -2.9 |
| | | |

で BMP と BMP、DEX 同時投与時を比較した網羅的解析を行った。マイクロアレイ法を用いた網羅的解析では骨芽細胞分化に重要である Wnt 関連遺伝子群が変動していることが確認された。Wnt 阻害因子である SFRP1, SFRP2, DKK1, DKK2, SOST について詳細な検討を行うと SFRP1, SFRP2 と DKK1, DKK2 の発現が拮抗するように動くことを見出した。このことより Wnt 阻害因子群が互いに制御をしつつ、Wnt 経路を制御している可能性が示唆された。また骨粗鬆症ターゲットとして注目される SOST の投与で BMP2/7 と DEX の同時投与による ALP 発現の上昇が抑制されたことより、骨芽細胞分化が誘導する BMP-Wnt 経路において重要な働きをする可能性が示唆された。

(1)- Wnt3A を用いた反復投与に

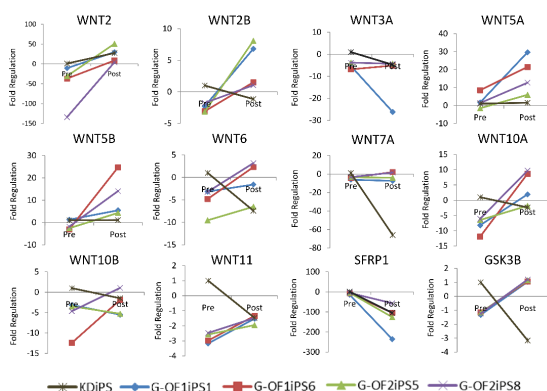
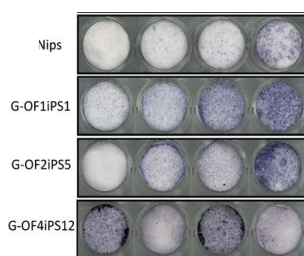
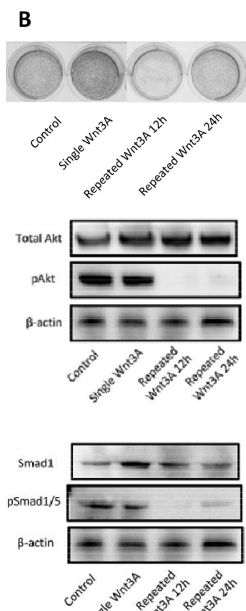


よる検討において Wnt3A は HPDL を用いた骨芽細胞分化において単回投与群では増強した ALP の活性化は複数回投与群で減弱された。

Wnt の活性化剤である CHIR99021 においても同様の結果を示した。複数回投与群においてリン酸化 AKT とリン酸化 Smad は抑制されていた。このこと

より Wnt3A の投与により Wnt 経路だけでなく Smad 経路と PI3K/AKT 経路を介していることが分かった。以上のことより Wnt 経路における Smad 経路と IGF/AKT 経路とのクロストークが骨芽細胞分化に重要であることが示唆された。

(2) ヒト iPS 細胞を用いて、FIT 法¹⁾で骨芽細胞分化を行い、初期分化における検討を行った。10 日間培養後の PCR array の検討では WNT3A, WNT6, WNT7A で減少を示した。さらに GSK3beta と SFRP1 も減少を示した。このことより iPS 細胞においては WNT 経路が阻害因子である SFRP1 により制御されている可能性が示唆さ



れた。ヘッジホッグ経路が骨芽細胞分化に重要であることをふまえ、変異によりヘッジホッグに活性化が起きている疾患 iPS 細胞 (G-iPS) において、同様の検討を行ったところ、G-iPS 細胞では正常 iPS 細胞より優位に骨芽細胞分化が起きることが分かった。またこの際、正常 iPS 細胞と比べ、Wnt 経路の発現が異なることが分かった。以上のことより hiPS 細胞においては早期骨芽細胞分化において Wnt 経路の他にヘッジホッグ経路が重要であることが考えられた。

< 引用文献 >

1) H Ochiai-Shino et al. J.Biol.Chem.287 (27) 2012, PLoS One. 2014 9(6):e99534

2)

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 4 件)

1, Tsukinowa T, Onodera S, Yoshizawa Y, Saito A, Muramatsu T, Furusawa M, Azuma T. Synergistic and Mutual antagonistic Regulations of Wnt Inhibitors Play an Important Role in Osteoblast Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. Journal of Hard Tissue Biology 2015 vol: 24 (4) pp: 311-318 DOI: 10.2485/jhtb.24.311

2, Yoshizawa Y, Ochiai-Shino H, Tsukinowa T, Onodera S, Muramatsu T, Furusawa M, Azuma T. The comparison between single vs repeated administration of Wnt3A of HPDL cells Journal of Hard Tissue Biology 2015 vol: 24 (4) pp: 331-340 DOI: 10.2485/jhtb.24.331

3, Kato H, Ochiai-Shino H, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Promoting effect of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells. Open Biol. 2015 Feb;

5(2):140201.DOI:10.1098/rsob.140201

4, Hayashi K, Ochiai-Shino H, Shiga T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Transplantation of human-induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. *BDJ Open* 2016 vol: 2 pp: 15007. DOI :10.1038/bdjopen.2015.7

〔学会発表〕(計 3 件)

1, 小野寺 晶子

Gorlin 症候群患者由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立および骨芽細胞分化

第 33 回日本骨代謝学会学術集会

日時：2015 年 7 月 23 日(木)

会場：京王プラザホテル(東京)

2, 小野寺 晶子

患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立

第 57 回歯科基礎医学会学術大会

日時：2015 年 9 月 11 日(金)

会場：朱鷺メッセ(新潟)

3, 小野寺 晶子

BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会)

日時：2015 年 12 月 3 日(木)

会場：神戸ポートアイランド(兵庫)

Characterization of iPS cells derived from basal cell nevus syndrome primary oral tissue fibroblast.

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺 晶子(Onodera Shoko)

東京歯科大学・生化学講座・助教

研究者番号：90637662