

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 25 年度採択分
平成 27 年 4 月 9 日現在

骨代謝を制御する Wnt シグナルネットワークの解明
Elucidation of Wnt signaling network controlling
bone metabolism

課題番号：25221310

高橋直之（TAKAHASHI NAOYUKI）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授



研究の概要

骨吸収と骨形成は厳格に共役しているが、その分子機構は不明である。一方、Wnt シグナルは骨代謝調節に密接に関わる。本研究は、破骨細胞が分泌する未知因子は Wnt シグナルを活性化すること、すなわち Wnt シグナルが骨代謝共役の本体であることを示す。さらに Wnt シグナルネットワークを構築して、破骨細胞と骨芽細胞の機能を厳格に調節していることを示す。

研究分野：機能系基礎歯科学、生化学、骨代謝学

キーワード：骨代謝共役、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、Wnt シグナル、Sclerostin

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 (Cell 16:513, 2001)。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 (Nature Med 18:405, 2012)。また我々は、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。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。

2. 研究の目的

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。骨代謝共役の分子機構が明らかにされることが期待される。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

(1) Ryk シグナルの解析

Ryk-floxed マウスと骨芽細胞特異的に Cre を発現する Osx-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、その骨組織を解析した。

(2) Ror2 シグナルの解析

Ror2-floxed マウスとカテプシン K-Cre マウスと掛け合わせて、破骨細胞特異的 Ror2 欠損 (Oc-Ror2-cKO) マウスを作製した。その骨組織と破骨細胞を解析した。破骨細胞における Wnt5a-Ror2 シグナルを解析した。また、

リグナン誘導体である Arctigenin の破骨細胞分化と機能に対する作用を解析した。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt 解析

破骨細胞は分化に伴い Wnt5a を高発現することが認められた。そこで、Wnt5a の骨芽細胞に対する作用を解析した。破骨細胞特異的 Wnt5a 欠損 (Oc-Wnt5a-cKO) マウスを作製し骨組織を解析した。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

OPG-KO マウスと RANKL 強発現 (RANKL-Tg) マウスの Sclerostin の発現を解析した。また、これらのマウスに抗 RANKL 抗体を投与し、歯槽骨の骨吸収状態を評価した。破骨細胞培養上清を UMR106 細胞培養に添加して、Sclerostin の発現を解析した。

(5) OPG-欠損マウスと RANKL-Tg マウス解析

骨吸収が亢進している OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの歯槽骨を解析した。骨組織における OPG 発現細胞を調べた。また、OPG-KO マウスに骨吸収抑制薬である抗 RANKL 抗体を投与し、歯槽骨の骨吸収状態を評価した。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療

UMR106 細胞培養を用いて破骨細胞の分泌する Sclerostin 抑制因子を解析した。W9 ペプチドの骨形成促進作用を解析した。

4. これまでの成果

(1) Ryk シグナルの解析

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。Ob-Ryk-cKO マウスの骨髄間葉細胞を解析したところ、骨芽細胞

への分化が障害されていた。

(2) Ror2 シグナルの解析

Oc-Ror2-cKO マウスの骨量は増加していた。Oc-Ror2-cKO マウスから調製した破骨細胞は骨吸収活性が低下していた。シグナル解析より、Disheveled-associated activator of morphogenesis 2 (Daam2)と Protein kinase N3 (PKN3)の関与が示された。Ror2-Daam2-RhoA-PKN3 経路が破骨細胞の骨吸収に重要であることを明らかにした(論文執筆中)。Arctigenin は破骨細胞の分化と機能を強力に抑制した(PLOS ONE 9: e85878, 2014)。最近、Arctigenin は PKN3 経路を阻害する可能性が示唆された。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt 解析

破骨細胞への分化に伴い Wnt5a の発現が上昇することを見出した。Oc-Wnt5a-cKO マウスを作製したところ、骨芽細胞による骨形成が減少していた。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することが示された(Sci Rep 4:44193, 2014)。関節炎の関節組織での Wnt 関連因子の発現を解析した。Wnt5a 阻害因子 Secreted Frizzled-related protein 5 (Sfrp5) の発現が顕著に減少することを見出した。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの骨組織の Sclerostin の発現を解析した。ともに Sclerostin の発現は低下していた。OPG-KO マウスおよび RANKL-Tg マウスに抗 RANKL 抗体を投与したところ、骨吸収抑制とともに、Sclerostin 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、Sclerostin 発現は抑制された。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(論文執筆中)。

(5) OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウス解析

骨吸収が亢進した OPG-KO マウスの歯槽骨を解析した。OPG-KO マウスに著しい歯槽骨吸収像が認められた。歯槽骨の OPG 産生細胞を調べたところ、骨細胞は OPG を強く発現していた。OPG-KO マウスに抗 RANKL 抗体を投与したところ、歯槽骨吸収はほぼ完全に抑制された。以上より、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が示された(Endocrinology 154: 773, 2013)。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療

破骨細胞が Sclerostin 分泌を抑制する因子 (Factor X) を産生していることを明らかにした。Factor X の同定を行っている。新規骨形成薬を探索する過程で、TNF 受容体の構造を模倣した W9 ペプチドが骨形成を促進することを明らかにした (J Biol Chem 288:5562, 2013)。W9 ペプチドは RANKL シグナルを止めるとともに、骨形成を促進した。W9 ペプチドが骨形成促進薬になる可能性が示された。

5. 今後の計画

(1) Ryk シグナルの解明

Ryk に結合するリガンドを同定する。骨芽細胞における Ryk シグナルを解析する。

(2) Ror2 シグナルの解析

PKN3 が結合する分子の同定と PKN3 の下流シグナルを解析する。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt の解析

Oc-Wnt5a-cKO マウスの破骨細胞の Wnt シグナルを解析する。また、Sfrp5^{-/-}マウスおよび Sfrp5-Tg マウスを作製し、その骨組織を解析する。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

Sclerostin-EGFP マウスを作製する。そのマウスを用い、破骨細胞が分泌する未知因子 (Factor X) を同定する。Factor X の作用機構を解明する。

(5) OPG 欠損マウスと RANKL-Tg マウスの解析

OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの骨量減少に関わる Wnt と Sclerostin 発現を解析する。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療 Sclerostin 抑制因子 Factor X と W9 ペプチドの臨床応用を模索する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takahashi N, Udagawa N, Suda T: Vitamin D endocrine system and osteoclasts Vitamin D and Bone, Bone Key, 3:495, 2014

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/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. Sci Rep 4:4493, 2014

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 9: e85878, 2014

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

高橋直之: 破骨細胞はどのようにして骨組織にのみ形成されるか 実験医学 23:1031-1037, 2014

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/about/index.html>