

学 位 論 文 題 名

Cross-talk between Wnt and BMP-2 signaling
in osteoblastic differentiation

(骨芽細胞分化における Wnt と BMP-2 のクロストーク)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

骨組織において、骨形成は骨芽細胞によって担われている。骨芽細胞は、いわゆる間葉系の未分化な細胞から分化すると考えられており、その分化機構に関する研究が進展してきた。近年、全身の骨量が低下する遺伝性疾患の一つである osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) の原因遺伝子として、LRP (LDL receptor-related protein)-5 が同定された。また、全身の骨量が増加する疾患において LRP-5 遺伝子の機能獲得型変異が見出された。同様の変異マウスでも、骨量の変化が報告された。LRP-5 は、Wnt と呼ばれる一種の細胞成長因子の受容体 Frizzled と会合する膜タンパク質であり、Wnt の co-receptor 分子である。Wnt は、胚発生に伴う形態形成における分泌性シグナル分子として同定された。現在まで Wnt ファミリーには 19 種以上のメンバーが知られ、線虫、昆虫からマウス、ヒトに至るまでの動物において発生のさまざまな局面で時間的・位置的に特異的な発現を示し、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能している。LRP-5 が骨量調節に機能していることは、Wnt を介した情報伝達が哺乳類の骨形成において重要であることを示している。しかしながら、一体どのような分子メカニズムによって、この Wnt/LRP シグナルが骨形成を調節しているのか、その機構については明らかではない。

そこで、本研究では、未分化な筋芽細胞である C2C12 細胞を用い、古典的 Wnt シグナルを促進する Wnt3a ならびにこのシグナルを抑制する Wnt5a をそれぞれ過剰発現させた stable な細胞株を作製し、骨芽細胞分化における Wnt/LRP シグナルの役割と、異所性骨形成誘導作用を有し骨芽細胞の分化を誘導する細胞成長因子である BMP-2 との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法、結果および考察】

C2C12 細胞に Wnt3a もしくは Wnt5a の発現プラスミドを導入し Genestein/G418 で選択し、stable に発現する細胞株 (Wnt3a-C2C12 cells, Wnt5a-C2C12 cells) を作製した。Wnt3a-C2C12 cells において Wnt3a mRNA が発現することならびに Wnt 応答領域 (Tcf/Lef 結合領域) を含む TopFLASH レポーターのルシフェラーゼ活性が増加することを確認した。この細胞では、アルカリフォスファターゼ活性染色法によってその活性が検出された。C2C12 細胞に BMP-2 を作用させると、オステオカルシン等が産生され、

骨芽細胞分化を誘導することが知られている。そこでこれらの細胞株に BMP-2 を作用させ 24 時間後の RNA を回収し、RT-PCR 法を用いて種々の mRNA の発現を調べた。骨芽細胞と骨細胞が特異的に産生する骨基質タンパク質の一つである MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) の mRNA は、C2C12 細胞に BMP-2 を添加しても発現は誘導されなかったが、Wnt3a-C2C12 細胞では BMP-2 によって発現が誘導された。また、RT-PCR 法ならびにリアルタイム PCR 法で、Wnt3a-C2C12 細胞では骨芽細胞や骨細胞が産生することが知られている細胞外基質分解酵素の一つである MMP (matrix metalloproteinases)-13 の発現が BMP-2 によって誘導され、MMP の阻害物質である TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases)-1 の発現が抑制された。これらの発現の誘導と抑制は、BMP-2 の用量依存的であった。以上の結果から、C2C12 細胞において Wnt3a と BMP-2 の組み合わせによって、骨芽細胞特異的な mRNA の発現が調節されていることが明らかになった。

C2C12 細胞は、低増殖培地で培養すると筋管細胞に分化するが、BMP-2 存在下では筋分化が抑制され骨芽細胞へ分化することが知られている。この実験モデルを利用し、Wnt シグナルの BMP-2 の作用に対する効果を検討した。BMP-2 の筋管細胞への分化の阻害効果が、Wnt3a-C2C12 細胞においては減少した。すなわち、古典的 Wnt シグナルが BMP-2 シグナルを制御していることを示唆する結果を得た。

この両者のシグナルにおける相互作用を調べるため、BMP-2 によって誘導されるヘリックス・ループ・ヘリックス型転写調節因子の一つである inhibitor of DNA binding/differentiation (Id) 1 の発現について調べた。BMP-2 によって誘導された Id1 mRNA は、Wnt3a-C2C12 細胞では C2C12 細胞と比べて低下した。そこで、この Wnt3a による Id mRNA の発現低下の機構について明らかにするために、ヒト Id1 遺伝子プロモーターを用いた解析を行った。転写開始点上流 985-bp を含む Id985WTLuc の転写活性は BMP-2 によって増大したが、Wnt3a を発現させるとこの転写活性は抑制された。この Wnt3a の抑制は、29-bp の GC リッチ領域を含む BMP-2 応答領域 (BRE) が関与していることを示した。4つの BRE を含む IdWT4FLuc レポーターを用いたところ、Wnt3a による抑制は Dkk1 によって阻害された。一方、構成的活性型 β -catenin による抑制は Dkk による阻害は受けなかった。また、この IdWT4FLuc において Smad1/4 によるプロモーター活性の上昇が、構成的活性型 β -catenin によって抑制された。BRE をプローブとした EMSA (Electrophoresis mobility shift assay) 法で、BRE に対する核抽出物中の結合活性は BMP-2 によって増加したが、Wnt3a-C2C12 細胞では C2C12 細胞と比べて減少した。これらの結果から、骨芽細胞分化に機能する BMP-2 に応答する Id1 遺伝子の BRE において、Wnt シグナルが BMP-2 のシグナルを修飾しており、これら 2つのシグナルにクロストークがあることが考えられた。

他方、Wnt シグナルの応答領域を含むレポーター TopFLASH を C2C12 細胞にトランスフェクトした実験から、BMP-2 は単独では β -catenin を介する古典的 Wnt シグナルの応答を増強させなかった。しかし、Wnt3a もしくは構成的活性型 β -catenin によって誘導された転写活性を、BMP-2 は促進し、BMP-2 は古典的 Wnt シグナル応答の活性化を引き起こした。

【結語】

本研究から、骨芽細胞分化において古典的 Wnt シグナルと BMP-2 は協調して MEPE,

MMP-13ならびにTIMP-1の発現を調節していることが示された。また、Wnt と BMP-2 はそれぞれのシグナル伝達分子である β -catenin ならびに Smad の2つの分子間相互作用によって、お互いのシグナルの抑制や促進を介して協調しながら機能的に制御していることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

Cross-talk between Wnt and BMP-2 signaling in osteoblastic differentiation

(骨芽細胞分化における Wnt と BMP-2 のクロストーク)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

骨芽細胞は、いわゆる間葉系の未分化な細胞から分化すると考えられており、その機構に関する研究が進展してきた。近年、全身の骨量の調節に機能する遺伝子として、LRP (LDL receptor-related protein)-5 が同定された。LRP-5 は、Wnt の受容体と会合する膜タンパク質であり Wnt の co-receptor 分子である。LRP-5 が骨量調節に機能していることは、Wnt を介した情報伝達が哺乳類の骨形成において重要であることを示している。しかし、一体どのような分子メカニズムによって、この Wnt/LRP シグナルが骨形成を調節しているのか、その機構については明らかではない。そこで、本研究では、未分化な筋芽細胞である C2C12 細胞を用い、古典的 Wnt シグナルを促進する Wnt3a ならびにこのシグナルを抑制する Wnt5a をそれぞれ過剰発現させた stable な細胞株を作製し、骨芽細胞分化における役割と、異所性骨形成誘導作用を有する細胞成長因子である BMP-2 との関連を明らかにすることを目的とした。

C2C12 細胞に Wnt3a もしくは Wnt5a の発現プラスミドを導入し、stable に発現する細胞株 (Wnt3a-C2C12 cells, Wnt5a-C2C12 cells) を作製した。Wnt3a-C2C12 cells では、アルカリフォスファターゼ活性が検出された。これらの細胞株に BMP-2 を作用させ 24 時間後の RNA を回収し、RT-PCR 法を用いて種々の mRNA の発現を調べた。骨芽細胞が特異的に産生する骨基質タンパク質の一つである MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) の mRNA は、C2C12 細胞に BMP-2 を添加しても発現は誘導されなかったが、Wnt3a-C2C12 細胞では BMP-2 によって発現が誘導された。また、Wnt3a-C2C12 細胞では骨芽細胞が産生することが知られている細胞外基質分解酵素の一つである MMP (matrix metalloproteinases)-13 の発現が BMP-2 によって誘導され、TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases)-1 の発現が抑制された。以上の結果から、Wnt3a と BMP-2

の組み合わせによって、骨芽細胞特異的な mRNA の発現調節が明らかになった。

C2C12 細胞は、低増殖培地で培養すると筋管細胞に分化するが、BMP-2 存在下では筋分化が抑制され骨芽細胞へ分化する。この BMP-2 の筋管細胞への分化の阻害効果が Wnt3a-C2C12 細胞においては減少し、古典的 Wnt シグナルが BMP-2 シグナルを制御していることを示唆する結果を得た。

この両者のシグナルにおける相互作用を調べるため、inhibitor of DNA binding/differentiation (Id) 1 の発現について調べた。BMP-2 によって誘導された Id1 mRNA は、Wnt3a-C2C12 細胞では C2C12 細胞と比べて低下した。そこで、ヒト Id1 遺伝子プロモーターを用いた解析を行った。この Wnt3a による抑制は、BMP-2 応答領域 (BRE) が関与し、この抑制は Dkk による阻害は受けなかった。また、BRE をプローブとした EMSA (Electrophoresis mobility shift assay) 法で、BRE に対する核抽出物中の結合活性は BMP-2 によって増加したが、Wnt3a-C2C12 細胞では C2C12 細胞と比べて減少した。これらの結果から、骨芽細胞分化に機能する BMP-2 に応答する Id1 遺伝子の BRE において、Wnt シグナルが BMP-2 のシグナルを修飾しており、これら 2 つのシグナルにクロストークがあることが考えられた。他方、TopFLASH を用いた実験から、BMP-2 は単独では古典的 Wnt シグナルの応答を増強させなかったが、古典的 Wnt シグナル応答の活性化を引き起こした。

本研究より、骨芽細胞分化において古典的 Wnt シグナルと BMP-2 は協調して MEPE, MMP-13 ならびに TIMP の発現を調節していることが示された。また、Wnt と BMP-2 はそれぞれのシグナル伝達分子である β -catenin ならびに Smad の 2 つの分子間相互作用によって、お互いのシグナルの抑制や促進を介して協調しながら機能的に制御していることが明らかになった。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、MMP-13 と TIMP-1 との関係、Wnt の BMP-2 応答性の低下と骨芽細胞分化について、Wnt3a と Wnt5a の生理的機能について、Id1 プロモーターの Wnt 応答領域について、Smad と β -catenin の分子間相互作用について、LRP-5 と脂質代謝について、LRP-5 の変異部位について、p300 の機能について、等であった。また、関連する遺伝子発現制御法についても多岐にわたる関連事項の質問を行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られ、研究の立案と進行、結果の解析について十分な能力を有していると考えられた。更に、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された。

本論文は、骨芽細胞分化における BMP-2 シグナルと Wnt シグナルの相互作用を解明し、これらの制御により骨形成を調節する可能性を明らかにした点が評価され、この業績は、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。また、試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士 (歯学) の学位を授与されるにふさわしいと認められた。