

学 位 論 文 題 名

Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/ β -catenin signaling-induced osteoprotegerin expression

(Wnt/ β -catenin と BMP-2 シグナルによる
OPG 遺伝子の発現調節機構の解析)

学位論文内容の要旨

【緒言】

Wnt は、発生初期における体節・体軸形成や器官形成、出生後の細胞の増殖・分化、造血幹細胞の維持など多様な生物活性を有する分泌性のシグナル分子である。Wnt ファミリーは哺乳類では 20 種類以上のメンバーが知られ、さらに 10 種類の Frizzled 受容体、アンタゴニストとして DKK, Sfrp, Wif1, Sost などが報告されている。近年、低比重リポ蛋白質受容体に構造が類似した膜貫通タンパク質のひとつである LRP (LDL receptor-related protein)-5 の遺伝子異常による疾患や種々のノックアウトマウスの解析などより、この Wnt シグナルの骨代謝における重要な役割が明らかになった。特に Wnt シグナルのなかでも β -catenin を介する古典的経路 (Wnt/ β -catenin シグナル) は、骨形成に必須であることが示されている。しかし、その分子メカニズムの詳細はいまだ明らかではない。既に、C2C12 細胞において BMP-2 誘導 Id-1 の発現が Wnt シグナルにより抑制されることや Wnt/ β -catenin で誘導される Top-flash レポーターの転写活性を BMP-2 が促進することから Wnt/ β -catenin シグナルと BMP シグナルが協調して骨芽細胞の分化を調節していることが報告されている。そこで、骨芽細胞における Wnt/ β -catenin の標的遺伝子を明らかにし、その発現調節機構を明らかにする目的で本研究を行った。

【方法、結果および考察】

未分化な筋芽細胞である C2C12 細胞に Wnt/ β -catenin 経路を活性化する Wnt3a もしくは非古典的経路を活性化させる Wnt5a 発現プラスミドをトランスフェクションし、stable に発現する細胞株 (Wnt3a-C2C12 細胞, Wnt5a-C2C12 細胞) を作製した。これらの培養上清中の Osteoprotegerin (OPG) の濃度を ELISA 法により測定した。C2C12 細胞では検出限界以下であったが、Wnt3a-C2C12 細胞では高い濃度の OPG が検出された。活性型 β -catenin 発現プラスミドもしくは Wnt3a 発現プラスミドを C2C12 細胞に transient にトランスフェクションしたもので、同様に OPG 量が増大した。また、骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に Wnt3a を stable にトランスフェクションした Wnt3a-MC3T3-E1 細胞を樹立し、培養上清中の OPG 濃度を測定したところ、OPG 量は、Wnt3a の導入により増大した。

これら OPG の産生誘導が Wnt/ β -catenin シグナルの活性化によるものであることを調べるた

めに、 β -catenin の分解と核内移行に関与している GSK-3 β を siRNA もしくは tRNaseZL による切断をガイドする sgRNA を用いて C2C12 細胞でノックダウンさせると、いずれの細胞においても OPG 産生が誘導された。

次に、OPG mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で調べた。C2C12 細胞では OPG mRNA の発現はほとんど見られなかったが、Wnt3a-C2C12 細胞では発現が増大していた。一方、破骨細胞の形成を誘導する RANKL mRNA の発現は OPG とは反対に Wnt3a-C2C12 細胞で減少していた。

この Wnt/ β -catenin による OPG の発現誘導についてさらに詳細に調べるため、約 1.5kb のマウス OPG 遺伝子プロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作成した。C2C12 細胞において、1478bp の OPG 遺伝子プロモーターを含む pOPG1.5-luc の転写活性は、活性型 β -catenin によって 10 倍以上上昇した。この領域には 4 つの Lef1/Tcf 認識候補部位 (site1-4) があることから、5 つの欠失レポーターおよび site 1-4 の single 並びに triple 変異レポーターを作成し、どの部位が活性型 β -catenin の応答に関与するのか調べた。これらの解析から、OPG 遺伝子プロモーターの β -catenin に対する応答には site 2 および 4 の領域が関与していることが明らかになった。

そこで、EMSA (Electrophoresis mobility shift assay) 法とクロマチン IP 法を用いて site 2 および 4 における転写因子の結合活性を調べた。Site 2 と 4 の部位をプローブとして用いた EMSA 法では、Wnt3a-C2C12 細胞の核抽出物で C2C12 細胞より強い結合活性が見られた。この結合活性は β -catenin 抗体もしくは Tcf1 抗体を加えることにより減少した。また、クロマチン IP 法では、Wnt3a-C2C12 細胞の β -catenin 抗体もしくは Tcf1 抗体を用い免疫沈降した DNA に site 2 および 4 を含む部位が検出された。これらの結果より、Wnt3a-C2C12 細胞では、OPG 遺伝子プロモーターの site2 および 4 の領域に β -catenin および Tcf1 を含む複合体が結合していることが明らかとなり、Wnt/ β -catenin による OPG の発現誘導に関与することが考えられた。

さらに、Wnt/ β -catenin シグナルと BMP-2 シグナルが協調して OPG の発現を調節しているかどうか調べた。Wnt3a-C2C12 細胞に BMP-2 を加えると、OPG の発現は BMP-2 の濃度ならびに培養時間依存的に増加した。ルシフェラーゼレポーターを用いた解析で、pOPG1.5-luc の活性型 β -catenin により増加した転写活性は、BMP-2 によってさらに増加した。この BMP-2 による作用は、site 2 または 4 を変異させたコンストラクトでは認められないことから、これらの領域が BMP-2 の応答にも関与していることが考えられた。BMP-2 の細胞内シグナルを伝達する分子である Smad1 は、BMP-2 と同様に転写活性を増大させた。また、クロマチン IP 法による解析から、BMP-2 を加えた Wnt3a-C2C12 細胞の Smad1 抗体もしくは Smad4 抗体を用い免疫沈降した DNA に site 2 および 4 を含む部位が検出された。また、IP-Western 法により、Smad1 と β -catenin の結合が示された。これらの結果より、BMP-2 を添加した Wnt3a-C2C12 細胞では、OPG 遺伝子プロモーターの site2 および 4 の領域において、BMP-2 シグナルの Smad1、Smad4 と Wnt/ β -catenin シグナルの β -catenin を含む複合体が結合し、Wnt/ β -catenin 誘導性の OPG の発現をさらに増強していることが考えられた。

【結語】

Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子が OPG であることが明らかとなり、その転写活性化機構として OPG 遺伝子プロモーターの 2 つの部位がこの発現誘導における応答部位であることが示

された。また、BMP-2 がこの発現誘導を増強すること、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 OPG 遺伝子プロモーターの 2 つの部位で協調して OPG の発現を調節していることが明らかになった。本研究より、骨芽細胞において Wnt/ β -catenin シグナルと BMP-2 シグナルが協調して OPG を介した破骨細胞の分化と機能を調節している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/ β -catenin signaling-induced osteoprotegerin expression

(Wnt/ β -catenin と BMP-2 シグナルによる
OPG 遺伝子の発現調節機構の解析)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下のとおりである。

Wnt ファミリーは哺乳類では 20 種類以上のメンバーが知られ、さらに 10 種類の Frizzled 受容体、アンタゴニストとして DKK、Sfrp、Wif1、Sost などが報告されている。近年、LRP (LDL receptor-related protein)-5 の遺伝子異常による疾患や種々のノックアウトマウスの解析から、Wnt シグナルの骨代謝における重要な役割が明らかとなった。しかし、その分子メカニズムの詳細はいまだ明らかではない。そこで、骨芽細胞における Wnt/ β -catenin の標的遺伝子を明らかにし、その発現調節機構を明らかにする目的で本研究を行った。

未分化な筋芽細胞である C2C12 細胞に Wnt/ β -catenin 経路を活性化する Wnt3a もしくは非古典的経路を活性化させる Wnt5a 発現プラスミドをトランスフェクションし、stable に発現する細胞株 (Wnt3a-C2C12 細胞、Wnt5a-C2C12 細胞) を作製した。これらの培養上清中の Osteoprotegerin (OPG) の濃度は Wnt3a-C2C12 細胞で増加していた。活性型 β -catenin 発現プラスミドもしくは Wnt3a 発現プラスミドを transient にトランスフェクションしたもので、同様に OPG 量が増大した。また、骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に Wnt3a を stable にトランスフェクションした Wnt3a-MC3T3-E1 細胞を樹立し、培養上清中の OPG 濃度を測定したところ、OPG 量は、Wnt3a の導入により増大した。

β -catenin の分解と核内移行に関与している GSK-3 β を siRNA もしくは tRNaseZL による切断をガイドする sgRNA を用いて C2C12 細胞でノックダウンさせると、いずれの細胞においても OPG 産生が誘導された。

次に、OPG mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で調べた。C2C12 細胞では OPG mRNA の発現はほとんど見られなかったが、Wnt3a-C2C12 細胞では発現が増大していた。

さらに約 1.5kb のマウス OPG 遺伝子プロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作成した。C2C12 細胞において、pOPG1.5-luc の転写活性は、活性型 β -catenin

によって10倍以上上昇した。この領域には4つのLef1/Tcf認識候補部位(site1-4)があることから、5つの欠失レポーターおよびsite 1-4のsingle並びにtriple変異レポーターを作成し、どの部位が活性型 β -cateninの応答に関与するのか調べた。これらの解析から、OPG遺伝子プロモーターの β -cateninに対する応答にはsite 2および4の領域が関与していることが明らかになった。

そこで、EMSA (Electrophoresis mobility shift assay) 法とクロマチン IP 法を用いて site 2 および 4 における転写因子の結合活性を調べたところ、Wnt3a-C2C12 細胞では、OPG 遺伝子プロモーターの site2 および 4 の領域に β -catenin および Tcf1 を含む複合体が結合していることが明らかとなり、Wnt/ β -catenin による OPG の発現誘導に関与することが考えられた。

さらに、Wnt/ β -catenin シグナルと BMP-2 シグナルが協調して OPG の発現を調節しているかどうか調べた。Wnt3a-C2C12 細胞に BMP-2 を加えると、OPG の発現は BMP-2 の濃度ならびに培養時間依存的に増加した。ルシフェラーゼレポーターを用いた解析で、pOPG1.5-luc の活性型 β -catenin により増加した転写活性は、BMP-2 によってさらに増加した。この BMP-2 による作用は、site 2 または 4 を変異させたコンストラクトでは認められないことから、これらの領域が BMP-2 の応答にも関与していることが考えられた。BMP-2 の細胞内シグナルを伝達する分子である Smad1 は、BMP-2 と同様に転写活性を増大させた。また、クロマチン IP 法と IP-Western 法により、BMP-2 を添加した Wnt3a-C2C12 細胞では、OPG 遺伝子プロモーターの site2 および 4 の領域において、BMP-2 シグナルの Smad1、Smad4 と Wnt/ β -catenin シグナルの β -catenin を含む複合体が結合し、Wnt/ β -catenin 誘導性の OPG の発現をさらに増強していることが考えられた。

本研究より、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 OPG 遺伝子プロモーターの 2 つの部位で協調して OPG の発現を調節していることが明らかになった。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

- ① LDL レセプターである LRP の種類と機能について
- ② Wnt シグナルによる骨関連遺伝子の発現変化について
- ③ 使用した活性型 β -catenin 発現プラスミドの構造と作用機序について
- ④ β -catenin 応答における site3 の役割について
- ⑤ Wnt シグナルにおける Lef1/Tcf 遺伝子の働きについて
- ⑥ 生体内での Wnt と BMP のバランス調節機構について
- ⑦ クロマチン IP 法について
- ⑧ アルカリフォスファターゼの変化との関連について
- ⑨ 実験系における筋芽細胞と骨芽細胞のちがいによる影響について
- ⑩ 最新の Wnt の研究動向について

など多岐にわたる内容であった。これらの質問に対し、申請者からいずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られた。さらに実験手技を含めた詳細な内容についても熟知していることが示され、申請者が関連する分野について幅広い知識を有しており、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ことが明らかになった。さらに、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が申請者から示された。

本研究は、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。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。