OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | βカテニン-ＬＥＦ/TCF依存性のWntシグナルと可溶型Wnt受容体Frzb-1の内軟骨性骨化における役割 |
| Author(s) | 北垣, 次郎太 |
| Citation | 大阪大学, 2003, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/43998 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

| | |
|---|---|
| 氏名 | 北垣次郎太（きたがきじろうた） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（歯学） |
| 学位記番号 | 第 17732 号 |
| 学位授与年月日 | 平成15年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科歯学臨床系専攻 |
| 学位論文名 | βカテニン-LEF/TCF依存性のWntシグナルと可溶型Wnt受容体Frzb-1の内軟骨性骨化における役割 |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 米田 俊之<br>（副査）<br>教授 村上 伸也　講師 永田 英樹　講師 豊澤 悟 |


## 論文内容の要旨

＜目的＞

生体の骨格形成、特に胎児期における骨格形成の大部分は内軟骨性骨化に依存する。内軟骨性骨化は骨、軟骨形成予定領域に、未分化間葉系細胞が凝集後、軟骨細胞に分化し、さらに一連の軟骨分化形質発現の変化をへて骨へと置換される過程である。したがって、内軟骨性骨化過程における軟骨細胞分化の調節は骨格形成制御の鍵となる。この調節には、多様な液性因子が関与することが判明している。最近の知見として、軟骨およびその周辺組織において、形態形成因子Wntの発現が時期、場所特異的に発現すること、Wnt分子の過剰発現が内軟骨性骨化の異常を誘導すること、さらにWnt分子の可溶型受容体であるFrzb-1タンパクが軟骨組織に発現することなどが報告されている。Wntファミリー分子は分泌性タンパクで、細胞膜上の受容体Frizzledに結合し、細胞内シグナルを活性化する。Wntシグナルの主要な伝達経路として、βカテニン依存性の経路がある。本シグナル伝達経路が活性化されると、プロテオソームによる細胞質内のβカテニンの分解が阻害され、安定化したβカテニンは核に移行し、転写因子LEF/TCFと結合後、標的遺伝子の転写を促進する。一方、Frzb-1はFrizzledと類似した、Wnt結合細胞外ドメインを保持しているが、膜貫通部位を欠失しているので、可溶型受容体としてWnt、とりわけWnt-1、-8のFrizzledへの結合を拮抗阻害し、βカテニン依存性のWntシグナル活性化を抑制することが知られている。これらの知見を総合すると、Wntシグナル経路とFrzb-1との相互関連が軟骨形成の制御において重要な役割を演じていると推察される。本研究においては、内軟骨性骨化の基盤である軟骨細胞分化を制御する分子メカニズムの解明を目的として、軟骨細胞分化形質発現におけるβカテニン-LEF/TCF依存性のWntシグナル伝達経路の役割、ならびにFrzb-1によるWntシグナル経路の活性化の調節機構について検討した。

＜実験方法＞

1．Frzb-1の軟骨での発現の検索

胎生6.5日齢および10日齢の鶏胚の肢芽におけるFrzb-1の発現を*in situ*ハイブリダイゼーション法により検索した。

2．Frzb-1の内軟骨性骨化に対する作用の検討

Frzb-1を組み込んだRCASレトロウイルスを胎生3.5日齢の鶏胚の発生肢芽に注入した。8.5日間孵卵させた後、鶏胚を取り出し、Frzb-1を過剰発現した軟骨の組織学的変化をHE染色およびアリザリンレッド染色により、遺伝子発現の変化を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索した。

3．Frzb-1とWnt-8の軟骨細胞分化における作用の検討

マウスFrzb-1およびマウスWnt8Aを組み込んだRCASレトロウイルスを胎生18日齢のニワトリ胸軟骨より採取した軟骨細胞に感染させた。軟骨細胞の肥大化および石灰化をアルカリフォスファターゼ（ALP）染色およびアリザリンレッド染色により検討した。

4．βカテニン-LEF/TCF依存性のWntシグナルの軟骨細胞における役割の検討

Frzb-1とWnt8Aを導入した軟骨細胞における細胞質のβカテニン量の変化をウエスタンブロッティング法、成長板軟骨でのβカテニンの局在を免疫染色法により検索した。転写因子 LEF1 の機能を阻害する支配的欠損型LEF1（DN-LEF1）とβカテニン-LEF/TCFシグナルを活性化させる構成的活性型LEF1（CA-LEF1）を軟骨細胞に導入し、軟骨細胞の肥大化、石灰化をALP染色、アリザリンレッド染色により検討した。

5．βカテニン-LEF/TCFシグナルの異所性内軟骨性骨化に対する役割の検討

DN-LEF1 と CA-LEF1 を導入した軟骨細胞を包埋したI型コラーゲンゲルを、4週齢のヌードマウスの四肢基部筋膜下に移植した。移植片を経時的に取り出し、HE染色、サフラニン-O染色により組織学的に検索した。

＜結果＞

1．軟骨組織におけるFrzb-1の局在

Frzb-1の発現は未分化間葉系細胞が凝集して軟骨の形成が開始される段階から観察された。発生段階の進んだ軟骨組織では、関節軟骨から成長軟骨板肥大化層初期において認められ、肥大化層後期で消失した。以上の結果より、Frzb-1の発現は軟骨発生および軟骨細胞の分化に伴い変化することが明らかになった。

2．内軟骨性骨化に対するFrzb-1の効果

Frzb-1を過剰に発現した軟骨組織においては、石灰化、血管侵入、骨髄形成が阻害され、また、軟骨細胞肥大化後期マーカーのMMP13、オステオポンチンの発現も大幅に抑制されていた。以上のことから、Frzb-1は内軟骨性骨化を強く阻害することが示唆された。

3．培養軟骨細胞におけるWntファミリーの発現

RT-PCR法により、培養軟骨細胞はWnt4、Wnt5B、Wnt7A、Wnt8Cを発現していることが判明した。これらのWntの中で、Frzb-1の標的分子としてはWnt8Cが考えられた。

4．培養軟骨細胞の分化に対するFrzb-1とWnt8Aの作用

軟骨細胞培養系において、軟骨細胞の肥大化、そして石灰化はFrzb-1により抑制され、Wnt8Aにより促進された。また、Frzb-1とWnt8Aの同時発現させた場合には、両者の作用は打ち消された。以上の結果から、Frzb-1は軟骨細胞の肥大化および石灰化を抑制し、一方、Wnt8Aは促進することが示された。

5．Frzb-1およびWnt8Aのβカテニン発現に対する影響

軟骨細胞質内のβカテニン量は、Frzb-1の強制発現により減少し、Wnt8Aの強制発現により増加した。また、両者を強制発現させた場合にはコントロール群と同程度であった。したがって、Frzb-1は細胞質内のβカテニン量を低下させ、Wnt8Aは増加させることが示された。

6．成長板軟骨におけるβカテニンの局在

βカテニンは静止軟骨細胞層から前肥大化層においては細胞質に存在したが、肥大化層後期では核に局在した。これに対して、Frzb-1を過剰発現した軟骨組織においては、βカテニンは細胞質に認められた。以上のことから、βカテニンはFrzb-1が消失する成長板軟骨肥大化層後期において核に移行し、Frzb-1はβカテニンの核移行を阻害することが示された。

7．βカテニン-LEF/TCFシグナルの軟骨細胞分化における作用

軟骨細胞の肥大化、石灰化はDN-LEF1により抑制され、CA-LEF1により促進された。この結果、軟骨細胞の肥大化、石灰化促進にはβカテニン-LEF/TCFシグナルが重要な役割を演じることが示唆された。

8．異所性内軟骨性骨化におけるβカテニン-LEF/TCF シグナルの役割

ヌードマウスに移植したニワトリ軟骨細胞はマウス由来の骨組織の形成を誘導した。本系における骨化誘導の時期は DN-LEF1 の発現により遅延され、CA-LEF1 の発現により加速された。よって、βカテニン-LEF/TCF シグナルが内軟骨性骨化を促進することが示された。

＜考察、結論＞

本研究結果より、βカテニン-LEF/TCF 依存性の Wnt シグナル経路が活性化される肥大化層後期においては、軟骨細胞の肥大化、石灰化が亢進し、内軟骨性骨化が促進されること、Frzb-1 はβカテニン-LEF/TCF 依存性の Wnt シグナル経路を阻害することにより、軟骨細胞の早熟な終末分化を抑制することが示唆された。したがって、βカテニン-LEF/TCF 依存性の Wnt シグナルは内軟骨性骨化の促進に関与し、そのシグナル活性化は Frzb-1 の発現制御により調節されているものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は内軟骨性骨化における軟骨細胞の分化の制御について、Wnt シグナルに焦点を合わせて解析を行ったものである。

本研究により、βカテニン-LEF/TCF 依存性の Wnt シグナルが内軟骨性骨化を促進し、Frzb-1 はそのシグナルを抑制することにより軟骨細胞の早熟な終末分化を制御することが明らかとなった。本研究は骨格形成の基盤をなす内軟骨性骨化のメカニズムを分子レベルで解明したものであり、ヒトの成長の制御を考える上で有用な科学的情報を提供する。よって本研究は博士（歯学）を授与するに値するものと認める。