The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PTH/cAMP/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Via Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3β in Osteoblastic Saos-2 Cells
Author(s)	鈴木, 朗
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48917
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【27】

氏　　名	鈴　木　　朗（すず き　あきら）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１６６３　号
学位授与年月日	平成 20 年２月 20 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学　位　論　文　名	PTH/cAMP/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Via Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3β in Osteoblastic Saos-2 Cells （PTH/cAMP/PKA シグナルは GSK3β を不活性化することによって Wnt シグナル経路を活性化する。）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　大薗　恵一 （副査） 教　授　吉川　秀樹　　教　授　高井　義美

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

血中 Ca 濃度調節に主要な役割を果たす副甲状腺ホルモン（PTH）は、骨から Ca を遊離させ血中 Ca 濃度を上昇させる働きを持つが、PTH を間欠的に投与すれば、逆に骨形成を促進する作用を持つことが知られている。しかし、骨芽細胞における細胞内分子メカニズムについては詳細に解明されていない。一方、細胞間シグナル分子である Wnt は、胚の発生や初期の形態形成において重要な働きを持つだけでなく、成体における骨量の維持においても、重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきた。我々は PTH の骨形成促進作用メカニズムに古典的 Wnt シグナル経路が関わっている可能性を考え、ヒト骨芽細胞系細胞株である Saos-2 細胞において、PTH シグナルの中心的な経路である cAMP/PKA シグナルと、Wnt シグナル経路のクロストークについて検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

PTH や adenylate cyclase の活性化剤である forskolin の添加により、Wnt シグナル経路の TCF 依存性転写活性化が PTH、forskolin の濃度依存的に促進された。この TCF 依存性の転写活性化は PKA 阻害剤（H89）の前処理によりブロックされた。また、Wnt3a と forskolin の同時添加により、TCF 依存性転写活性化は相乗的に増大した。forskolin の添加により核内のβカテニンの蓄積が増加していることも western blotting により確認した。これらの結果から、PTH/cAMP シグナルが PKA 依存的に Wnt シグナル経路を活性化していると考えられた。また、PTH を間欠的に添加すると、継続添加の時に比べて TCF 依存性の転写活性化は増大したことから、PTH は継続添加よりも間欠添加の方がより Wnt シグナル経路を活性化すると考えられた。さらに、PTH や forskolin は Wnt の内在的な標的遺伝子である Wisp2、NKD2 の発現を PKA 依存的に促進し、Wnt のアンタゴニストである DKK1 の発現を抑制したことからも、PTH/cAMP シグナルが Wnt シグナル経路に影響を与えることが明らかになった。次に我々は、PTH/cAMP シグナルが Wnt シグナル経路に及ぼす作用点について検討した。まず PTH/cAMP シグナルによる DKK1 の発現低下によって TCF 依存性転写活性化が惹起される可能性を考え、DKK1 の過剰発現細胞によるレスキュー実験を行った。

DKK1 の過剰発現細胞は forskolin を添加しても TCF 依存性転写活性化が惹起されたため、PTH/cAMP シグナルによって起こる DKK1 の発現低下が TCF 依存性転写活性化の大きな理由ではないと考えられた。次に我々は Glycogen Synthase Kinase-3β（GSK3β）の関与について検討した結果、PTH/cAMP シグナルは GSK3β をすみやかにリン酸化（Ser9）し、GSK3β を不活性化することが明らかになった。リン酸化を受けない変異型 GSK3β の過剰発現細胞においては、PTH/cAMP シグナルによる TCF 依存性転写活性化が阻害されたことから、GSK3β のリン酸化（Ser9）を介した GSK3β の不活性化が重要であると考えられた。加えて、骨芽細胞における RANKL の発現は PTH/cAMP シグナルによって誘導されるが、Wnt3a との同時添加により、RANKL の発現誘導は阻害された。この結果は、Wnt シグナルが、骨芽細胞の RANKL の発現を抑制することで、骨吸収を抑制している可能性を示唆する。

〔 総　　括 〕

以上の結果から、骨芽細胞系細胞株において、cAMP/PKA シグナルと古典的 Wnt シグナル経路との間にクロストークが存在し、PTH の骨形成促進作用には Wnt シグナル経路が関与している可能性が示された。また、そのクロストークには GSK3β のリン酸化（Ser9）による不活性化を介していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

副甲状腺ホルモン（PTH）は、間欠的に投与すれば骨形成を促進する作用を持つことが知られているが、その細胞内メカニズムについては詳細に解明されていない。申請者は PTH の骨形成促進作用に古典的 Wnt シグナル経路が関わっている可能性を考え、ヒト骨芽細胞系細胞株である Saos-2 細胞において、PTH シグナルの中心的な経路である cAMP/PKA シグナルと、Wnt シグナル経路のクロストークについて検討した。PTH や adenylate cyclase の活性化剤である forskolin の添加により、Wnt シグナル経路の TCF 依存性転写活性化が促進された。この TCF 依存性の転写活性化は PKA 阻害剤（H89）の前処理によりブロックされた。また、Wnt3a と folskolin の同時添加により、TCF 依存性転写活性化は相乗的に増大した。PTH を間欠的に添加すると、継続添加の時に比べて TCF 依存性の転写活性化は増加した。さらに、PTH や forskolin は Wnt の内在的な標的遺伝子である Wisp2、NKD2 の発現を PKA 依存的に促進した。次に申請者は、PTH/cAMP シグナルが Wnt シグナル経路に及ぼす作用点について検討したところ、PTH/cAMP シグナルは GSK3β をすみやかにリン酸化（Ser9）し、GSK3β を不活性化することが明らかになった。リン酸化を受けない変異型 GSK3β の過剰発現細胞においては、PTH/cAMP シグナルによる TCF 依存性転写活性化が阻害された。加えて、骨芽細胞における RANKL の発現は PTH/cAMP シグナルによって誘導されるが、Wnt3a との同時添加により、RANKL の発現誘導は阻害された。以上の結果から、cAMP/PKA シグナルは GSK3β をリン酸化して不活性化することにより、古典的 Wnt シグナル経路を活性化することが明らかになった。すなわち PTH の骨形成促進作用には Wnt シグナル経路が関与している可能性が示唆された。

以上のように申請者は、PTH の骨形成促進メカニズムの解明において、新しい細胞内シグナルメカニズムの可能性を示した。申請者による本研究は、骨形成促進剤としての PTH の最適な使用法の開発、骨粗鬆症治療薬の新しい創薬ターゲットの研究など、今後の研究開発の基礎となる成果であり、申請者の資質とともに学位の授与に値すると考えられる。