

Title	骨芽細胞分化過程における古典的 Wntシグナル伝達経路の役割の解明
Author(s)	木田, 淳平
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/56122">https://doi.org/10.18910/56122</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 木 田 淳 平 )

論文題名

骨芽細胞分化過程における古典的 Wntシグナル伝達経路の役割の解明

## 論文内容の要旨

骨組織では、骨形成と骨吸収の絶妙なバランスを保つことにより、その恒常性が維持されている。骨形成を担う骨芽細胞の分化および機能は、様々のサイトカインやホルモンによって緻密に制御されている。サイトカインの一つであるWntの受容体構成分子、LRP5の遺伝子変異が骨粗鬆症を伴う偽神経膠腫症候群の原因であることが明らかになったことに端を発し、骨芽細胞分化および骨形成におけるWntの役割の重要性が注目されるようになった。古典的WntがLrp5/6と共受容体Frizzledの受容体複合体と結合すると、細胞内シグナル分子 $\beta$ -カテニンが安定化され、核内に移行し、転写因子LEF1/TCFと結合し、その結果、骨芽細胞分化を促進すると考えられている。近年、古典的Wntシグナルの下流で転写制御因子TAZが関与していることが報告された。またTAZは、骨芽細胞分化に重要な転写因子であるRunx2と結合し、骨芽細胞分化を促進することが知られている。しかし最近、TAZが非古典的Wntシグナルにより $\beta$ -カテニン非依存的に活性化されることが報告された。したがって、WntシグナルにおけるTAZの関与は混沌としており、骨芽細胞分化におけるWntシグナルの作用機序については不明な点が多く残されている。また古典的Wnt誘導性骨芽細胞分化におけるLEF1の役割に関しても相反する研究結果が報告されている。そこで本研究では、骨芽細胞の分化機構に対する理解を深めることを目的として、古典的Wntシグナルおよび骨芽細胞分化過程におけるLEF1とTAZの役割を明らかにすることを旨とした。

まず骨芽細胞分化に対する古典的Wntの作用を確認するため、マウス未分化間葉系細胞株C3H10T1/2またはマウス間質細胞株ST2に古典的Wntの代表であるWnt3aアデノウイルスを添加し、その効果を検索した。その結果、Wnt3aによりALPの活性およびmRNAの発現が誘導された。そこで本研究では、ALPを指標としてWnt3aによる骨芽細胞分化誘導効果の検討を進めた。次に、TAZの発現および標的遺伝子に対する転写活性へのWnt3aの効果を検索し、古典的WntシグナルにおけるTAZの関与を検証した。過去の報告に一致して、Wnt3aは、TAZのmRNAの発現に対しては効果を示さなかったが、TAZのタンパク質の発現ならびにその転写活性を顕著に促進した。そこで骨芽細胞分化に対するLEF1およびTAZの役割を検討するために、アデノウイルスを用いてC3H10T1/2細胞またはST2細胞にLEF1あるいはTAZを過剰発現させると、ALP活性の増加が認められた。古典的WntシグナルにおけるLEF1およびTAZの役割をさらに検討するために、C3H10T1/2細胞またはST2細胞に、Dominant-Negative LEF1あるいはDominant-Negative TAZアデノウイルスを感染させると、Wnt3aのALP活性誘導効果が阻害された。Wnt3a誘導性ALP活性においてLEF1とTAZの関与が明らかになり、LEF1とTAZが相互関係を有する可能性が考えられたため、LEF1およびTAZをLEF1反応性レポーター遺伝子Top-FlashおよびTAZ反応性レポーター遺伝子8xGTIICと共発現させたところ、各々のレポーター活性は、LEF1とTAZにより相乗的に促進された。さらに、免疫共沈降法によりLEF1とTAZが物理的結合することを見出した。以上の実験結果より、LEF1およびTAZは、Wnt3aにより活性化され、物理的結合することにより、協調的に作用する可能性が示唆された。

LEF1およびTAZは、各々Runx2と結合し、骨形成促進作用を発揮することが報告されている。そこでLEF1、TAZおよびRunx2の三者の相互関係を有する可能性が推測されたので、Runx2の転写活性に対するLEF1およびTAZの効果を検討した。LEF1、TAZおよびRunx2をRunx2反応性レポーター遺伝子6xOSE2と共発現したところ、そのレポーター活性は、相乗的に促進された。さらにLEF1、TAZおよびRunx2の相互関係を検討するためLEF1、TAZおよびRunx2の物理的結合について検討したところ、LEF1とRunx2が直接的に結合し、その結合に対するTAZの有無は影響しないことが見出された。LEF1、TAZおよびRunx2の三者の相互関係が明らかとなったので、Runx2の上流で機能するBMP2とWnt3aの骨芽細胞分化に対する協調作用の可能性を検討した。C3H10T1/2細胞またはST2細胞に、Wnt3aおよびBMP2アデノウイルスを感染させると、ALP mRNAの発現が相乗的に促進された。

以上の結果より、古典的Wntは、LEF1およびTAZの結合を介して、骨芽細胞分化や骨形成を促進することが示唆された。また、古典的WntとBMP2はLEF1、TAZおよびRunx2を介してクロストークし、骨芽細胞分化ならびに骨形成を強く促進する可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 木 田 淳 平 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 西 村 理 行
	副 査 教授 豊 澤 悟
	副 査 准教授 北 村 正 博
	副 査 講師 阿 部 真 土
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本研究は、骨芽細胞分化過程における古典的 Wnt シグナル伝達経路の役割を検討し、転写因子 LEF1 と転写制御因子 TAZ の役割について解析を行ったものである。</p> <p>その結果、古典的 Wnt ファミリーメンバーの一つである Wnt3a の骨芽細胞分化誘導作用には LEF1 および TAZ が必須であることを明らかにし、さらに LEF1 と TAZ が転写因子 Runx2 と相互関係を有していることを見出した。</p> <p>以上の知見は、骨芽細胞分化および骨形成の制御機構に関わる重要な分子メカニズムを提示するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものである。</p>	