

| | |
|--------------|---|
| 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 | https://doi.org/10.18910/56122 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

(顎口腔機能再建学)

木田 淳平

緒言

骨組織は、運動器および骨格の維持のみならず、造血機能やカルシウム・リン代謝の恒常性など様々な生命活動に関与することが明らかにされており、臓器としての役割も注目されている^{1,2}。骨組織の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収の両者のバランスが緻密に保たれることにより維持されている³。骨粗鬆症をはじめとする骨代謝疾患では、骨形成と骨吸収の均衡が崩れ、骨量および骨質の病的変化が引き起こされる⁴。骨形成を担う骨芽細胞は、未分化間葉系細胞を起源としており、その分化および成熟には BMP (bone morphogenetic protein)⁵、Ihh (Indian hedgehog)⁶、Wnt など様々なサイトカインや、その下流で機能する Runx2 (runt-related transcription factor 2)⁷、Osterix⁸、Msx2 (msh homeobox homolog 2)⁹などの転写因子により調節されている。

近年 Wnt シグナルをターゲットとした、骨形成を促進する骨粗鬆症治療薬の開発治療が進められ、高い骨形成促進効果が報告されている^{10,11,12}。Wnt は分子量約 4 万の分泌糖タンパクで、種を超えてよく保存されており、初期発生、形態形成、細胞の増殖・分化および癌化など様々な生命現象の制御に関与している。Wnt シグナル伝達経路には、 β -catenin を介する古典的経路と、 β -catenin 非依存的にシグナルを伝達する非古典的経路が存在する。古典的 Wnt の受容体構成分子である LRP5 (low density lipoprotein

receptor-related protein 5)の遺伝子変異が骨粗鬆症を伴う偽神経こう腫症候群の原因であることが明らかにされ、骨形成及び骨芽細胞分化において古典的 Wnt シグナルの重要性が注目される契機となった¹³。その後、古典的 Wnt シグナルが骨形成および骨芽細胞分化に重要な役割を担うことを示す多くの研究結果が報告されている^{14,15}。しかし、古典的 Wnt シグナルによる骨芽細胞分化および骨形成誘導の分子メカニズムについてはいまだ不明な点が数多く残されている。

古典的 Wnt シグナル伝達経路の解明は、分子生物学的解析および発生工学的アプローチにより、飛躍的に進展している。古典的 Wnt が存在しない状態では、細胞質内の β -catenin はユビキチン化-プロテオソーム経路により分解され、そのシグナルは伝達されない。一方、古典的 Wnt が Frizzled と Lrp5/6 の受容体複合体に結合すると、 β -catenin の分解が抑制され、 β -catenin が安定化する。その結果、 β -catenin は、核内に移行し、転写因子 LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor 1)あるいは TCF(T-cell factor)と結合し、骨芽細胞分化を促すと考えられている^{16, 17, 18}。 β -catenin シグナルの骨形成における重要性は、骨および軟骨特異的 β -catenin コンディショナルノックアウトマウスが骨の低形成を示すこと、 β -catenin の分解複合体構成分子である Axin2 (axis inhibition protein 2)のノックアウトマウスが骨量増加を示すこと、および骨芽細胞分化における関与に関する報告により示されている^{19,20,21}。LEF1 は B 細胞前駆細胞で発現している遺伝子として見出され、LEF1 ヘテロ接合体のメスマウスは、ハプロ不全による骨量の

低下を示す²²。また LEF1 が Runx2 を介して FGF18 の発現を誘導し、骨芽細胞分化を促進すると報告されている²³。しかし一方で、LEF1 は骨芽細胞分化に必須である転写因子 Runx2 と結合して骨芽細胞分化を抑制する実験結果も示されている^{24, 25}。したがって、骨形成に対する LEF1 の機能については、さらなる検討が必要と考えられている。

近年、古典的 Wnt シグナルに転写制御因子 TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)が関与しているという報告がある^{26, 27}。TAZ は、14-3-3 結合モチーフ、WW ドメイン、転写活性化部位および PDZ (post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)) ドメイン結合モチーフを持ち、Hippo シグナルの標的分子であることが明らかにされている²⁸。Hippo シグナルは細胞増殖や細胞死などの様々な作用を有し、器官の大きさやがんの抑制などに関与することが知られている^{29, 30}。Hippo シグナルが活性化されると、TAZ はリン酸化され、14-3-3 タンパク質と結合し核内への移行が阻害される。一方、Hippo シグナルが活性化されていない状態では、TAZ は核内に移行し、標的遺伝子の転写を活性化し、細胞増殖を促進する³¹。TAZ は、Runx2 と結合し、その転写活性を促進することが示されている^{27, 32}。また TAZ は、骨芽細胞の分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制することにより未分化間葉系細胞の分化方向を制御することも明らかにされている³³。近年、古典的 Wnt シグナルが作動していない状態では、 β -catenin がリン酸化を受け、 β -catenin と結合している TAZ が分解されること、Wnt シグナルが機能して

いる状態では β -catenin および TAZ が安定化し、TAZ が核移行して転写活性を促進し³⁴、骨芽細胞分化を誘導することが報告されている^{26,27}。この報告に反して、非古典的 Wnt シグナルが Hippo シグナルを抑制することにより β -catenin 非依存的に TAZ を活性化させ、骨芽細胞分化を促進するとの研究成果が報告された³⁵。したがって、Wnt シグナルならびに骨芽細胞分化過程における TAZ の活性化機構およびその役割は、未だ混沌としている。

そこで本研究においては、古典的 Wnt シグナルによる骨形成作用の分子メカニズムの理解を深めることを目的とし、骨芽細胞分化過程における TAZ と LEF1 の役割を明らかにし、古典的 Wnt シグナルにおける転写制御メカニズムの解明を目指した。

方法

1. 細胞培養

293細胞、マウス未分化間葉系細胞株C3H10T1/2およびマウス間質細胞株ST2は、理化学研究所 (埼玉)より購入した。293FT細胞は、Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)より購入した。C3H10T1/2細胞およびST2細胞は、10 %ウシ胎仔血清 (Cell Culture Bioscience, St. Louis, MO, USA)およびペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液(x100) (和光純薬工業,大阪)を含む α -MEM培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)にて37 °C、5 % CO₂気相下で培養した。293細胞および293FT細胞は、10 %ウシ胎仔血清および硫酸カナマイシン125 mg/l (ファルマ株式会社,東京)を含むD-MEM培地 (Sigma-Aldrich)にて37 °C、5 % CO₂気相下で培養した。

2. プラスミドの作製

LEF1反応性ルシフェラーゼレポーター遺伝子Top-Flash、TAZ反応性ルシフェラーゼレポーター遺伝子8xGTIIC、LEF1 発現ベクター、TAZ 発現ベクターは、addgene (Cambridge, MA, USA)より供与を受けた。Flag-Dominant-Negative LEF1は、LEF1のC末端部位 (アミノ酸残基 118-400)をコードする領域を³⁶、Flag-Dominant-Negative TAZは、TAZのN末端部位 (アミノ酸残基 2-165)をコードする領域を³²PCRで増幅し、これ

らPCR産物をEcoRIおよびXbaで制限酵素処理し、pcDNA3 (Life Technologies)にライゲーションし作製した。Runx2反応性ルシフェラーゼレポーター遺伝子6xOSE2および3xFlag-Runx2発現ベクターは、過去の論文と同様に実験に用いた³⁷。Venus cDNAは宮脇敦博士 (理化学研究所)より恵与を受けた。全てのプラスミドは、NucleoBond Midi Kit (Takara, 京都)により精製し、実験に用いた。

3. ウェスタンブロッティング法

細胞をリン酸緩衝生理的食塩水 (以下 PBS) (和光純薬工業)にて2回洗浄後、細胞溶解液 (20 mM HEPES緩衝液 (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム (NaCl)、1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、1.5 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂)、10 %グリセロール、1 % Triton X-100、0.1 mM オルソバナジン酸ナトリウム、10 µg/ml アプロチニン、10 µg/ml ロイペプチン、1 mMベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩)にて溶解した。この細胞溶解溶液を遠心分離し (15,000 g、4 °C、20 分)、その上清に0.5 M メルカプトエタノール含有ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーを添加し熱溶解後 (95 °C、5 分)、サンプルとした。サンプルを10 %もしくは7.5 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体として、抗TAZ抗体 (#8418, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、抗LEF1抗体 (#2286, Cell Signaling)あるいは抗Flag抗体 (Sigma)と反応させた。TBS-T (Tris Buffered

Saline-Triton X-100)およびTBS (Tris Buffered Saline)にて洗浄後、西洋わさび過酸化酵素を付与した抗マウス IgG 抗体あるいは抗ウサギ IgG 抗体 (MBL, 名古屋)と反応させた。ImmunoStar LD (和光純薬工業)を用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム (Kodak, New York, NY, USA)に現像した。

4. アデノウイルスの作製

アデノウイルスは Saito らの方法に従って作製した³⁸。IRES2 (Internal Ribosome Entry Site)および Venus cDNA を組み込んだアデノウイルスベクター-pAxCawt に Wnt3a、LEF1、TAZ、Flag-Dominant-Negative LEF1、Flag-Dominant-Negative TAZ の cDNA を挿入し、組み換え型アデノウイルスベクターを作製した。組み換え型アデノウイルスベクターと Adenovirus genome DNA-TPC (Takara)を 293 細胞にトランスフェクションし、7~14 日間培養後、アデノウイルスを回収した。目的遺伝子が相同組換えしたアデノウイルスは、ウエスタンブロッティング法による目的遺伝子の発現を指標に選別した。BMP2 アデノウイルスおよび Runx2 アデノウイルスは、過去の論文と同様に実験に用いた^{39,40}。

5. RT-qPCR (Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction)

細胞をPBSにて洗浄後、Nucleo Spin RNAII (Macherey Nagel, Düren, Germany)を用

いて全RNAを精製した。回収した全RNAをReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡, 大阪)により逆転写反応を行い、cDNAを合成した。遺伝子発現の定量は、Taqman PCR protocolにしたがってFastStart TaqMan Probe Master (Roche)ならびにStep One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)を用いて行った。使用したTaqman プローブおよびプライマーは表1に示す。

6. アルカリフォスファターゼ (ALP)染色

細胞をPBSにて洗浄後、3.7 %ホルマリン溶液 (和光純薬工業)にて固定し、330 ng/ml Nitro blue tetrazolium (Sigma)、165 ng/ml Bromochloroindolyl phosphate (Sigma)、100 mM NaClおよび5 mM MgCl₂を含む100 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 9.5)で37 °Cにて反応させ、染色を行った。

7. トランスフェクション

培養細胞へのトランスフェクションは、リポフェクション法によって行った。リポフェクションには、X-treme GENE 9 (Roche, Basel, Schweiz)もしくはLongoらの報告に従って作製したPEI 'Max' を用いて行った⁴¹。目的遺伝子を組み込んだプラスミドと X-treme GENE 9 溶液もしくはPEI 'Max' 溶液をウシ胎仔血清非含有 D-MEM中で15分間室温にて反応させ、DNA-リポソーム複合体の形成後、細胞培養液中にDNA-リポソ

ーム複合体を添加することによりトランスフェクションを行った。

8. ルシフェラーゼアッセイ

Top-Flash ルシフェラーゼレポーター遺伝子、8xGT1IC ルシフェラーゼレポーター遺伝子、または 6xOSE2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子を細胞にトランスフェクションし、48～72 時間培養後に細胞溶解液にて細胞を溶解した。アデノウイルスを用いて目的遺伝子を過剰発現場合は、レポーターベクターのトランスフェクションの 24 時間後に培地交換とウイルス添加を行い、さらに 48～72 時間培養した後に細胞を溶解した。溶解したサンプルをルシフェラーゼ基質液 (Luciferase Assay Substrate) (Promega, Madison, WI, USA)と混合した後、Glomax 96 microplate Luminomater (Promega)を用いて、単位時間当たりの相対発光強度(RLU)を計測した。

9. 免疫沈降

全細胞タンパク質抽出液に抗体を加え、4 °Cで一晩インキュベートした後、洗浄したDynabeads Protein G (Invitrogen, Waltham, MA, USA)と4 °Cで1 時間反応させた。Dynabeads Protein GをPBSにて5 回洗浄した後、SDSサンプルバッファーを添加し、95 °C、5 分間、熱溶解した。11,000 g、1 分間、遠心分離し、その上清をウエスタンブロッティング法にて解析した。

結果

1. 骨芽細胞分化に対する Wnt3a の効果

骨芽細胞分化に対する古典的 Wnt の効果を確認するため、代表的な古典的 Wnt である Wnt3a を⁴²、アデノウイルスにより、マウス間葉系細胞株 C3H10T1/2 ならびにマウス間質細胞株 ST2 に過剰発現させ、骨芽細胞マーカーの発現を検討した。骨芽細胞マーカーの発現は培養細胞から全 RNA を精製し、RT-qPCR により定量した。骨形成因子 BMP2 は、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (Osteocalcin)、Osterix および Msx2 の発現を強く増加させた。一方、Wnt3a は、C3H10T1/2 細胞において ALP の発現を顕著に増加させたが、他の骨芽細胞マーカーの発現に対して明らかな効果を示さなかった(図 1A)。また、ST2 細胞においては ALP および骨シアロタンパク質 (Bsp) の発現を著明に増加させたが、他の骨芽細胞マーカーの発現に対して明らかな効果を示さなかった (図 1B)。そこで以下の実験においては、C3H10T1/2 細胞および ST2 細胞ともに発現の増加を認めた ALP を指標に検討していくこととした。

2. TAZ の発現および機能に対する Wnt3a の効果

古典的 Wnt シグナルにおける TAZ の関与を検証するために、TAZ の発現および標的遺伝子に対する転写活性への Wnt3a の効果を検索した。過去の論文に一致して、

C3H10T1/2 細胞に BMP2 を作用させると TAZ の mRNA およびタンパク質の発現が増加した³³。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を増加させた²⁶(図 2)。次に、TAZ 特異的 8xGTIIC ルシフェラーゼレポーターを用いて、TAZ の転写活性に対する Wnt3a の効果を検討した。Wnt3a および BMP2 は TAZ 自身の転写活性を上昇させた (図 3)。以上の実験結果から、Wnt3a は、TAZ の mRNA の発現上昇を介さずに、TAZ のタンパク質の発現ならびに標的遺伝子に対する転写活性を促進することが確認された。したがって、Wnt3a による TAZ タンパク質の増加は、過去の報告で提唱されているように TAZ のタンパク質分解を抑制し、安定化を促進させる結果と考えられた。

3. 骨芽細胞分化に対する LEF1 および TAZ の役割

LEF1 および TAZ の発現ベクターの活性は、LEF1 特異的 Top-Flash および TAZ 特異的 8xGTIIC ルシフェラーゼレポーターを用いて確認した (図 4)。トランスフェクション効率の低い細胞においても LEF1 および TAZ を効果的に過剰発現させ、データの再現性を確保するために、LEF1 および TAZ アデノウイルスを作製した。作製した LEF1 および TAZ アデノウイルスの発現は、ウエスタンブロッティング法にて確認した (図 5)。そこで、作製したアデノウイルスを用いて、骨芽細胞分化に対する LEF1 および TAZ の効果を検討した。C3H10T1/2 細胞に Wnt3a アデノウイルスを感染させると、ALP 活

性の上昇を認めた。また、TAZ アデノウイルスあるいは LEF1 アデノウイルスを C3H10T1/2 細胞に感染させると弱いながらも ALP 活性の上昇が観察された (図 6)。したがって、LEF1 および TAZ が Wnt3a の骨芽細胞分化能に関与している可能性が示唆された。

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、Dominant-Negative LEF1 (DN-LEF1) および Dominant-Negative TAZ (DN-TAZ) の発現ベクターを作製した (図 7)^{32, 36}。DN-LEF1 および DN-TAZ の効果は、 β -catenin 誘導性 Top-Flash レポーター活性あるいは TAZ 誘導性 8xGTIIC レポーター活性に対する阻害作用にて確認した (図 8)。作製したコンストラクトの Dominant-Negative 効果を確認できたので、DN-LEF1 および DN-TAZ アデノウイルスを作製し、各々の発現をウエスタンブロッティング法にて確認した (図 9)。次に、C3H10T1/2 細胞に DN-LEF1 あるいは DN-TAZ のアデノウイルスを感染させ、古典的 Wnt の ALP 活性促進効果に対する DN-LEF1 および DN-TAZ の効果を検討した。その結果、DN-LEF1 および DN-TAZ の過剰発現は、Wnt3a 誘導性 ALP 活性促進効果を著明に阻害した (図 10)。従って、Wnt3a による ALP 活性誘導効果には、LEF1 および TAZ が必要であることが示された。

Wnt3a の骨芽細胞分化誘導過程において LEF1 および TAZ の双方が必要であることが示されたので、Wnt3a は生物学的作用を発揮する際に、LEF1 と TAZ が相互関係を有する可能性が考えられた。この可能性を検討するために、LEF1 および TAZ 各々の特異

的レポーター遺伝子である Top-Flash ならびに 8xGTIIC を C3H10T1/2 細胞にトランスフェクションし、LEF1 および TAZ アデノウイルスを感染させ、両者の相互関係を検討した。その結果、LEF1 と TAZ は、Top-Flash および 8xGTIIC のレポーター活性を相乗的に増加させた (図 11)。LEF1 と TAZ が、機能的に相互関係を有することが示されたので、両者の相互作用をさらに明らかにするために、LEF1 と TAZ の物理的結合を検討した。LEF1 および TAZ を 293FT 細胞に過剰発現させ、抗 LEF1 抗体で免疫沈降後、ウェスタンブロッティング法にて両者の結合を検討した (図 12)。その結果、LEF1 と TAZ が物理的結合することを見出した。以上の実験結果から Wnt3a の骨芽細胞分化誘導効果には LEF1 および TAZ が必要であり、両者は物理的結合し協調することによりその機能を発揮していると示唆された。

4. 骨芽細胞分化における Wnt3a と BMP2 の相互作用

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^{23,27,32}。そこで、LEF1、TAZ および Runx2 の三者の相互作用を検討した。まず、Runx2 反応性レポーター遺伝子 6xOSE2 を用いて、Runx2 の転写活性に対する LEF1 および TAZ の効果を検討した。LEF1 単独の過剰発現は、Runx2 の転写活性に効果を示さなかった。一方、TAZ あるいは Runx2 単独の過剰発現は、Runx2 の転写活性を上昇させた。興味あることに、LEF1 は、TAZ あるいは Runx2 を共発現した際に、Runx2

の転写活性を促進した (図 13B)。さらに LEF1 は、TAZ および Runx2 と共発現すると、Runx2 の転写活性は、著明に促進された (図 13A)。そこで Runx2 の骨芽細胞分化誘導作用に対する LEF1 および TAZ の関与を明らかにするために、DN-LEF1 および DN-TAZ のアデノウイルスを用いてその関与を検討した。DN-LEF1 あるいは DN-TAZ を過剰発現させると、Runx2 による ALP 活性促進作用は、著しく抑制された (図 14)。

すでに過去の報告により LEF1 あるいは TAZ と Runx2 との物理的結合が示されている^{23, 33}。さらに本研究により、LEF1 が TAZ と結合すること、LEF1、TAZ および Runx2 が相乗効果を有することを示した。したがって、LEF1 が、直接的あるいは TAZ を介して間接的に Runx2 に結合する可能性が考えられた。そこで、LEF1 と Runx2 の結合を免疫共沈降法にて検討した。その結果、LEF1 は、TAZ を介さずに直接 Runx2 と結合することが示された (図 15)。したがって、LEF1-TAZ-Runx2 の複合体形成が、骨芽細胞分化の誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Runx2の骨芽細胞分化誘導能には、BMP2が関与していることが明らかにされている^{39, 43, 44}ので、骨芽細胞分化における古典的WntシグナルとBMP2の相互作用を検討した。Wnt3aおよびBMP2アデノウイルスをC3H10T1/2細胞に感染させ、骨芽細胞マーカーの発現をRT-qPCRにより検討した。Wnt3aとBMP2を過剰発現すると、ALPの発現が相乗的に促進され、Runx2の発現も有意に促進された。一方で、他の骨芽細胞マーカーの発現に対してBMP2とWnt3aによる協調作用は認められなかった (図16A)。また、

ST2細胞で同様にWnt3aおよびBMP2を過剰発現させると、ALPそしてOsteocalcinの発現が相乗的に促進され、Runx2、Osterix、Msx2、Bspの発現も増加した (図16B)。したがって、Wnt3aがBMP2と協調的に骨芽細胞分化を促進することが明らかになった。以上の結果をまとめると、Wnt3aは、LEF1、TAZおよびRunx2の結合を介して、BMP2と協調し、骨芽細胞分化を強力に促進させることが示唆された (図17)。

考察

本研究では、古典的 Wnt シグナルの下流で機能するとされている転写因子 LEF1 および転写制御因子 TAZ の骨芽細胞分化過程における役割を検討し、Wnt3a の骨芽細胞分化誘導作用に LEF1 および TAZ が必須であることを明らかにした。また LEF1 と TAZ が結合し、転写活性を協調的に促進することを見出した。したがって、LEF1 と TAZ の協調作用が、骨芽細胞分化過程において重要な役割を担っていると示唆された。さらに、LEF1 および TAZ は、Runx2 と結合し、その転写活性を促進することを明らかにした。加えて、DN-LEF1 および DN-TAZ を用いた実験結果から Runx2 の骨芽細胞分化誘導能には LEF1 および TAZ が関与していることを見出した。Runx2 の発現および機能は、BMP2 シグナルによって制御されていることが明らかにされている^{39, 43, 44}。したがって Wnt3a と BMP2 が相乗的に骨芽細胞分化を促進する実験結果を併せて考慮すると、古典的 Wnt と BMP2 は、LEF1-TAZ-Runx2 の複合体形成を介してクロストークし(図 17)、骨形成を制御していると示唆された。

Wnt シグナルと TAZ の活性化に関しては、相反する報告がされている。Azzolin らは、古典的 Wnt が β -catenin を介して、ユビキチン化-プロテアソーム経路による TAZ の分解を抑制することにより、TAZ の転写活性と骨芽細胞分化を促進すると報告している^{26, 27}。これに対し Park らは、Wnt3a が、非古典的 Wnt シグナル経路を通じて Hippo シ

グナルを抑制し、TAZ タンパク質を安定化させ、TAZ 自身の転写活性を促進すると示している³⁵。本研究では、Wnt3a が転写を介さず TAZ のタンパク質の発現を増加させること、ならびに TAZ の転写活性を促進することを示した。したがって Wnt3a は、ユビキチン化-プロテアソーム経路によるタンパク質分解から回避することにより、TAZ を活性化していると考えられた。Wnt3a は、代表的な古典的 Wnt リガンドであることが知られている⁴²。また非古典的 Wnt リガンドである Wnt5a が β -catenin を介する古典的 Wnt シグナルに抑制的に作用することが知られている⁴⁵。一方、Park らの報告を支持する結果として、Wnt3a が非古典的 Wnt シグナル経路に関わる低分子量 G タンパク質の Rho を活性化する研究が示されている⁴⁶。しかしながら β -catenin の活性化が骨形成を促進することを考慮すると²¹、Wnt3a による TAZ の安定化と骨芽細胞分化促進作用が β -catenin 非依存的であるとする結論は、矛盾するようにも思われる。このように Wnt シグナルの活性化機構、そして骨芽細胞分化における Wnt シグナルの役割は依然として不明な点が多い。古典的 Wnt シグナル経路および非古典的 Wnt シグナル経路は、他のシグナル伝達経路と複雑なクロストークを構築していると予想されるが、TAZ と β -catenin との関係を詳細に検証することができれば、Wnt シグナルによる TAZ の活性化機構に対する適切な理解が得られると考えられる。

本研究により、骨芽細胞分化過程における LEF1 および TAZ の役割と相互関係の重要性が明らかになったが、in vivo におけるその役割は今後の検討課題である。TAZ ノッ

クアウトマウスの多くは周産期に致死であり、腎嚢胞の形成と肺気腫様病変を示すとともに、骨格系においては胎生 17.5 日齢で軽度の低身長を呈する^{47, 48, 49}。TAZ ノックアウトマウスにおいて重大な骨格系の表現型を示さない一因として、TAZ と同様の機能を有する YAP (yes-associated protein) が相補的に作用している可能性が考えられる。YAP は、マウスの胚において広く発現し、その発現時期は TAZ よりも早い⁵⁰。このため YAP のノックアウトマウスは、胎生期において卵黄嚢に異常を来し致死に至り骨組織の解析が困難とされている⁵⁰。また LEF1 ノックアウトマウスは、歯、毛、乳腺および三叉神経核の形成が障害され、出生前後に死亡すると報告されているが、骨格系に対する言及はない⁵¹。興味あることに、LEF1 ヘテロ接合体のメスマウスにおいて、ハプロ不全による骨量の低下を認めたとする報告があり²²、LEF1 ノックアウトマウスを詳細に解析することにより、骨形成に対する LEF1 の重要性が明らかになる可能性がある。ただし LEF1 のファミリーとして、TCF1、TCF3 および TCF4 が相補的に機能を代償している可能性も考慮して、慎重に検討する必要があると思われる。

古典的 Wnt シグナルが、Hippo シグナルにより負に制御されていることが明らかにされている^{52, 53}。また古典的 Wnt シグナルが脱リン酸化酵素 PP1A を介して TAZ を活性化し、骨芽細胞分化を促進すると報告されている²⁷。興味深いことに、PP1A は Hippo シグナルによりリン酸化された TAZ を脱リン酸化することにより TAZ を安定化すると示している²⁷。このように、古典的 Wnt シグナルと Hippo シグナルとの相互関係が示

されているが、Hippo シグナルによる骨芽細胞分化に関してはあまり報告がない。最近の報告では、哺乳類における Hippo のホモログである MST2 ノックアウトマウスが骨量の低下、骨芽細胞分化抑制および破骨細胞分化促進を示す⁵⁴。しかしながら、Hippo シグナルと TAZ との関係を考えると、この報告は本研究の結果および TAZ の骨芽細胞に対する報告^{26, 27, 35}と合致しない。したがって、骨芽細胞分化および骨形成過程における Hippo シグナルと TAZ の統合的な検討が必要であると思われる。

古典的 Wnt は、強い骨形成作用を有しているので¹⁵、骨芽細胞の分化に対しても多様な作用を有していると考えられる。しかしながら意外なことに、今回の研究では、Wnt3a は、ALP の活性と発現のみを促進し、他の骨芽細胞マーカーには効果を示さなかった。古典的 Wnt シグナルが、*in vivo* において Runx2 の発現を促進するとの報告がある⁵⁵。しかし古典的 Wnt シグナルによる Runx2 の転写活性の促進効果は顕著であったが、Runx2 の発現には効果を認めなかった。したがって、古典的 Wnt は、骨形成に重要な未知の遺伝子の発現を制御している可能性が推測される。この点を明らかにするためには、LEF1 あるいは TAZ の新たな転写標的遺伝子の探索が、重要な鍵になると思われる。

現在、Wnt アンタゴニストであるスクレロスチンに対する特異的なヒト型モノクローナル抗体が開発され、骨粗鬆症治療薬として臨床試験が進められている¹¹。スクレロスチンは、骨細胞に特異的に発現しており、LRP5/6 に結合することにより Wnt の受容体

への結合を阻害する⁵⁶。またスクレロスチンをコードする **SOST** 遺伝子の異常が、全身性進行性骨格過成長や高骨量を呈する硬結性骨化症や **van Buchem** 病を引き起こすことが知られている^{57,58}。抗スクレロスチン抗体は、動物実験ならびにヒトで強い骨形成作用を発揮することが報告されており^{12,59}、歯周疾患への有効性も示唆されているが⁶⁰、変形性関節症のリスク因子である古典的 **Wnt** シグナルの抑制を解除することにより、変形性関節症を惹起する可能性が指摘されている⁶¹。また古典的 **Wnt** シグナルは、腫瘍の発生や悪性化に関与しているため⁶²、腫瘍に対する抗スクレロスチン抗体の作用も懸念される。また抗スクレロスチン抗体は生物学的製剤であるため、医療経済的な観点においても課題を有している。本研究により、古典的 **Wnt** シグナルと **BMP2** シグナルがクロストークする作用点が明らかになったので、この知見を標的とした特異的な創薬開発が期待され、より有害事象が少なく、より安価な低分子化合物による骨粗鬆症治療薬の開発に貢献すると期待される。また歯周組織再生療法に **BMP2** などのサイトカインが応用されているが⁶³、本研究の知見に基づいた骨形成促進薬が開発されれば、歯周組織に局所投与することにより歯槽骨の形成あるいは再生を促し、義歯およびインプラント治療が困難な症例および歯周疾患に対しても新たな治療戦略を創出できる可能性が見込まれる。骨形成および骨芽細胞分化に対する古典的 **Wnt** シグナルの理解をさらに深め、骨粗鬆症に対する創薬および補綴前処置などへの応用に寄与したいと考えている。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座有床義歯補綴学・高齢者歯科学分野、前田芳信教授、ならびに、同口腔分子免疫制御学講座生化学教室、西村理行教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室、波多賢二准教授に心より感謝申し上げます。さらに、本研究を行うに際し、多大な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室、村上知彦講師ならびに高畑佳史助教に深く感謝します。最後にこの研究に対して多大なる御協力と御助言を戴いた大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室ならびに同顎口腔機能再建学講座の諸先生方に厚くお礼申し上げます。LEF1 発現プラスミド、TAZ 発現プラスミド、Top-Flash レポーターコンストラクトおよび TAZ レポーターコンストラクトの供与に関して、addgene に深謝します。

引用文献

1. Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. and Scadden, D. T. (2003) : Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425 841-846
2. Quarles, L. D. (2008) : Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest*. 118 3820-3828
3. Sims, N.A. and Martin, T.J. (2014) : Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 481
4. Parfitt, A. M. (1982) : The coupling of bone formation to bone resorption : a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res*. 4 1-6
5. Urist, M. R. (1965) : Bone ; Formation by Autoinduction. *Science*. 150 893-899
6. Murakami, S., Nifuji, A. and Noda, M. (1997) : Expression of Indian hedgehog in osteoblasts and its posttranscriptional regulation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 138 1972-1978

7. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T. (1997) : Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89 755-764
8. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. (2002) : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108 17-29
9. Ichida, F., Nishimura, R., Hata, K., Matsubara, T., Ikeda, F., Hisada, K., Yatani, H., Cao, X., Komori, T., Yamaguchi, A. and Yoneda, T., (2004) : Reciprocal roles of *MSX2* in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 279 34015-34022
10. Ke, H. Z., Richards, W. G., Li, X. and Ominsky, M. S. (2012) : Sclerostin and Dickkopf1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocrinology*. 33 747-783
11. Padhi, D., Jang, G., Stouch, B., Fang, L. and Posvar, E. (2011) : Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*. 26 19-26
12. Recker, R. R., Benson, C. T., Matsumoto, T., Bolognese, M. A., Robins, D. A., Alam,

J., Chiang, A. Y., Hu, L., Krege, J. H., Sowa, H., Mitlak, B. H. and Myers, S. L. (2015) : A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 30 216-224

13. Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W.N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J.A., Beighton, P., Black, G.C., Boles, R.G., Boon, L.M., Borrone, C., Brunner, H.G., Carle, G.F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M.L., Hall, B., Hennekam, R.C., Hirose, T., Jans, A., Jüppner, H., Kim, C.A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R.S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M.J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B.R. and Warman, M.L. (2001): LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell.* 107 513-523
14. Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S. P., Swain, P. M., Zhao, S. C., Eustace, B., Lappe, M. M., Spitzer, L.,

- Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M. G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K. M., Anisowicz, A., Morales, A. J., Lomedico, P. T., Recker, S. M., Van Eerdewegh, P., Recker, R. R. and Johnson, M. L. (2002) : A Mutation in the LDL Receptor–Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High–Bone-Mass Trait. *Am J Hum Genet.* 346 1513-1521
15. Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R. P. (2002) : High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 346 1513-1521
16. Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) : Funcional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382 638-642
17. Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D. and Moon, R. T. (1996) : The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10 1443-1454
18. Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999) : Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* 11 233-240

19. Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. and Yang, Y. (2005) : Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 8 739-750
20. Hill, T. P., Später, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C. (2005) : Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 8 727-738
21. Yu, H. M., Jerchow, B., Sheu, T. J., Liu, B., Costantini, F., Puzas, J. E., Birchmeier, W. and Hsu, W. (2005) : The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development.* 132 1995-2005
22. Noh, T., Gabet, Y., Cogan, J., Shi, Y., Tank, A., Sasaki, T., Criswell, B., Dixon, A., Lee, C., Tam, J., Kohler, T., Segev, E., Kockeritz, L., Woodgett, J., Müller, R., Chai, Y., Smith, E., Bab, I. and Frenkel, B. (2009) : Lef1 haploinsufficient mice display a low turnover and low bone mass phenotype in a gender- and age-specific manner. *PLoS One.* 4
23. Reinhold, M. I. and Naski, M. C. (2007) : Direct interactions of Runx2 and Canonical Wnt Signaling induce FGF18. *J Biol Chem.* 282 3653-3663
24. Kahler, R. A. and Westendorf, J. J. (2003) : Lymphoid Enhancer Factor-1 and β -Catenin Inhibit Runx2-dependent Transcriptional Activation of the Osteocalcin

Promoter. *J Biol Chem.* 278 11937-11944

25. Kahler, R. A., Galindo, M., Lian, J., Stein, G. S., van Wijnen, A. J. and Westendorf, J. J. (2006) : Lymphocyte Enhancer-binding Factor 1 (Lef1) Inhibits Terminal Differentiation of Osteoblasts. *J Cell Biochem.* 97 969-983
26. Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M. and Piccolo, S. (2012) : Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling. *Cell.* 151 1443-1456
27. Byun, M. R., Hwang, J. H., Kim, A. R., Kim, K. M., Hwang, E. S., Yaffe, M. B. and Hong, J. H. (2014) : Canonical Wnt signaling activates TAZ through PP1A during osteogenic differentiation. *Cell Death Differ.* 21 854-863
28. Lei, Q. Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z. Y., Bai, F., Pei, X. H., Zhao, S., Xiong, Y. and Guan, K. L. (2008) : TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol.* 28 2426-2436
29. Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A, Maitra, A. and Pan, D. (2007) : Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell.* 130 1120-1133
30. Pan, D. (2007) : Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.* 21 886-897
31. Pan, D. (2010) : The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.*

19 491-505

32. Cui, C. B., Cooper, L. F., Yang, X., Karsenty, G. and Aukhil, I. (2003) :
Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ.
Mol Cell Biol. 23 1004-1013
33. Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R.,
Mueller, E., Benjamin, T., Spiegelman, B. M., Sharp, P. A., Hopkins, N. and Yaffe, M.
B. (2005) : TAZ, a Transcriptional Modulator of Mesenchymal Stem Cell
Differentiation. *Science.* 309 1074-1078
34. Piersma, B., Bank, R. A. and Boersema, M. (2015) : Signaling in Fibrosis: TGF- β ,
WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front Med (Lausanne).* 2 59
35. Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J. S., Plouffe, S. W., Meng, Z., Lin,
K. C., Yu, F. X., Alexander, C. M., Wang, C. Y. and Guan, K. L. (2015) : Alternative
Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell.* 162 780-794
36. Hovanes, K., Li, T. W. H., Munguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Marsh, J. L.,
Holcombe, R. F. and Waterman, M. L. (2001) : β -catenin-sensitive isoforms of
lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet.*
28 53-57
37. Takigawa, Y., Hata, K., Muramatsu, S., Amano, K., Ono, K., Wakabayashi, M.,

- Matsuda, A., Takada, K., Nishimura, R. and Yoneda, T. (2010) : The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J Cell Sci.* 123 3780-3788
38. Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I (1996) : Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 1320-1324
39. Nishimura, R., Hata, K., Harris, S, E., Ikeda, F. and Yoneda, T. (2002) : Core-binding factor $\alpha 1$ (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone.* 31 303-312
40. Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Whitson, R, H., Nishimura, R. and Yoneda, T. (2013) : Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun.* 4 2850
41. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S. and Leahy, D. J. (2013):Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 529, 227–240

42. Kishida, M., Koyama, S., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S. and Kikuchi, A. (1999) : Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene*. 18 979-985
43. Lee, K. S., Kim, H. J., Li, Q. L., Chi, X. Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J. M., Kim, E. G., Choi, J. Y., Ryoo, H. M. and Bae, S. C. (2000) : Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. 20 8783-8792
44. Sowa, H., Kaji, H., Canaff, L., Hendy, G. N., Tsukamoto, T., Yamaguchi, T., Miyazono, K., Sugimoto, T. and Chihara, K. (2003) : Inactivation of menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, inhibits the commitment of multipotential mesenchymal stem cells into the osteoblast lineage. *J Biol Chem*. 278 21058-21069
45. Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J. and Yang, Y. (2003) : Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol*. 162 899–908
46. Rossol-Allison, J., Stemmler, L. N., Swenson-Fields, K. I., Kelly, P., Fields, P. E.,

- McCall, S. J., Casey, P. J. and Fields, T. A. (2009) : Rho GTPase activity modulates Wnt3a/beta-catenin signaling. *Cell Signal.* 21 1559-1568
47. Hossain, Z., Ali, S. M., Ko, H. L., Xu, J., Ng, C. P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W. and Hunziker, W. (2007) : Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 1631-1636
48. Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., Nakagawa, O., Small, E. V., Cobo-Stark, P., Igarashi, P., Murakami, M., Tominaga, J., Sato, T., Asano, T., Kurihara, Y. and Kurihara, H. (2008) : Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294 542-553
49. Tian, Y., Kolb, R., Hong, J. H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M. B., Zhou, J. and Benjamin, T. (2007) : TAZ promotes PC2 degradation through a SCFbeta-Trcp E3 ligase complex. *Mol Cell Biol.* 27 6383-6395
50. Morin-Kensicki, E. M., Boone, B. N., Howell, M., Stonebraker, J. R., Teed, J., Alb, J. G., Magnuson, T. R., O'Neal, W. and Milgram, S. L. (2006) : Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of *Yap65*. *Mol Cell Biol.* 26 77-87

51. van Genderen, C., Okamura, R. M., Fariñas, I., Quo, R. G., Parslow, T. G., Bruhn, L. and Grosschedl, R. (1994) : Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8 2691-2703
52. Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M. and Piccolo S. (2014) : YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell.* 158 157-170
53. Imajo, M., Miyatake, K., Imura, A., Miyamoto, A. and Nishida, E. (2012) : A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO J.* 31 1109-1122
54. Lee, J., Youn, B. U., Kim, K., Kim, J. H., Lee, D. H., Seong, S., Kim, I., Han, S. H., Che, X., Choi, J. Y., Park, Y. W., Kook, H., Kim, K. K., Lim, D. S. and Kim N. (2015) : Mst2 Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast and Osteoblast Differentiation. *J Bone Miner Res.* 30 1597-1607
55. Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. and Lian, J. B. (2005) : Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2

gene expression. *J Biol Chem.* 280 33132-33140

56. Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S. E. and Wu, D. (2005) : Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 280 19883-19887
57. Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyts, W., Van Den Ende, J., Willems, P., Paes-Alves, A. F., Hill, S., Bueno, M., Ramos, F. J., Tacconi, P., Dikkers, F. G., Stratakis, C., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foernzler, D. and Van Hul, W. (2001) : Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 10 537-543
58. Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., Dioszegi, M., Dikkers, F. G., Hildering, P., Willems, P. J., Verheij, J. B., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foernzler, D. and Van Hul, W. (2002) : Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet.* 39 91-97
59. Li, X., Ominsky, M. S., Warmington, K. S., Morony, S., Gong, J., Cao, J., Gao, Y., Shalhoub, V., Tipton, B., Haldankar, R., Chen, Q., Winters, A., Boone, T., Geng, Z., Niu, Q. T., Ke, H. Z., Kostenuik, P. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. and Paszty, C.

- (2009) : Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 24 578-588
60. Taut, A. D., Jin, Q., Chung, J. H., Galindo-Moreno, P., Yi, E. S., Sugai, J. V., Ke, H. Z., Liu, M. and Giannobile, W. V. (2013) : Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *J Bone Miner Res.* 28 2347-2356
61. Bouaziz, W., Funck-Brentano, T., Lin, H., Marty, C., Ea, H. K., Hay, E. and Cohen-Solal, M. (2015) : Loss of sclerostin promotes osteoarthritis in mice via β -catenin-dependent and -independent Wnt pathways. *Arthritis Res Ther.* 17 24
62. Giles, R. H., van Es, J. H. and Clevers, H. (2003) : Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1653 1–24
63. Wozney, J. M. (1995) : The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol.* 66 506-510

| Target cDNA | Probe and primer sequence (5'-3') | |
|-------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| β-Actin | probe: | 5'- TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT -3' |
| | sense primer: | 5'- ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC -3' |
| ALP | probe: | 5'- ATCTTTGGTCTGGCTCCCATG -3' |
| | sense primer: | 5'- TTTCCCGTTCACCGTCCAC -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- TGAGCGACACGGACAAGAAGCCCTT -3' |
| Runx2 | probe: | 5'- CTCCTTCCAGGATGGTCCCA -3' |
| | sense primer: | 5'- CTTCCGTCAGCGTCAACACC -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- CACCACCTCGAATGGCAGCACGCT -3' |
| Osx | probe: | 5'- AGCGACCACTTGAGCAAACAT -3' |
| | sense primer: | 5'- GCGGCTGATTGGCTTCTTCT -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- CCCGACGCTGCGACCCTCCC -3' |
| Msx2 | probe: | 5'- CCATATACGGCGCATCCTACC -3' |
| | sense primer: | 5'- CAACCGGCGTGGCATAGAG -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- AGACCTGTGCTCCCCATCCCGCC -3' |
| Ocn | probe: | 5'- GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC -3' |
| | sense primer: | 5'- GTTTGTAGGCGGTCTTCAAGC -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- TGGAGCCTCAGTCCCCAGCCCA -3' |
| Bsp | probe: | 5'- AAGCAGCACCGTTGAGTATGG -3' |
| | sense primer: | 5'- CTTGTAGTAGCTGTATTCGTCCTC -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- CGGTAAGTGTCGCCACGAGGCTCCC -3' |
| TAZ | probe: | 5'- CCTCCATGTGAAGTGGCCATTC -3' |
| | sense primer: | 5'- GTGGTTCATGTACTIONTGGTCCAGA -3' |
| | anti-sense primer: | 5'- ACCTGGACTCTAGCCAGCAGCGTCG -3' |

表 1. RT-qPCR に用いた Taqman プローブおよびプライマー

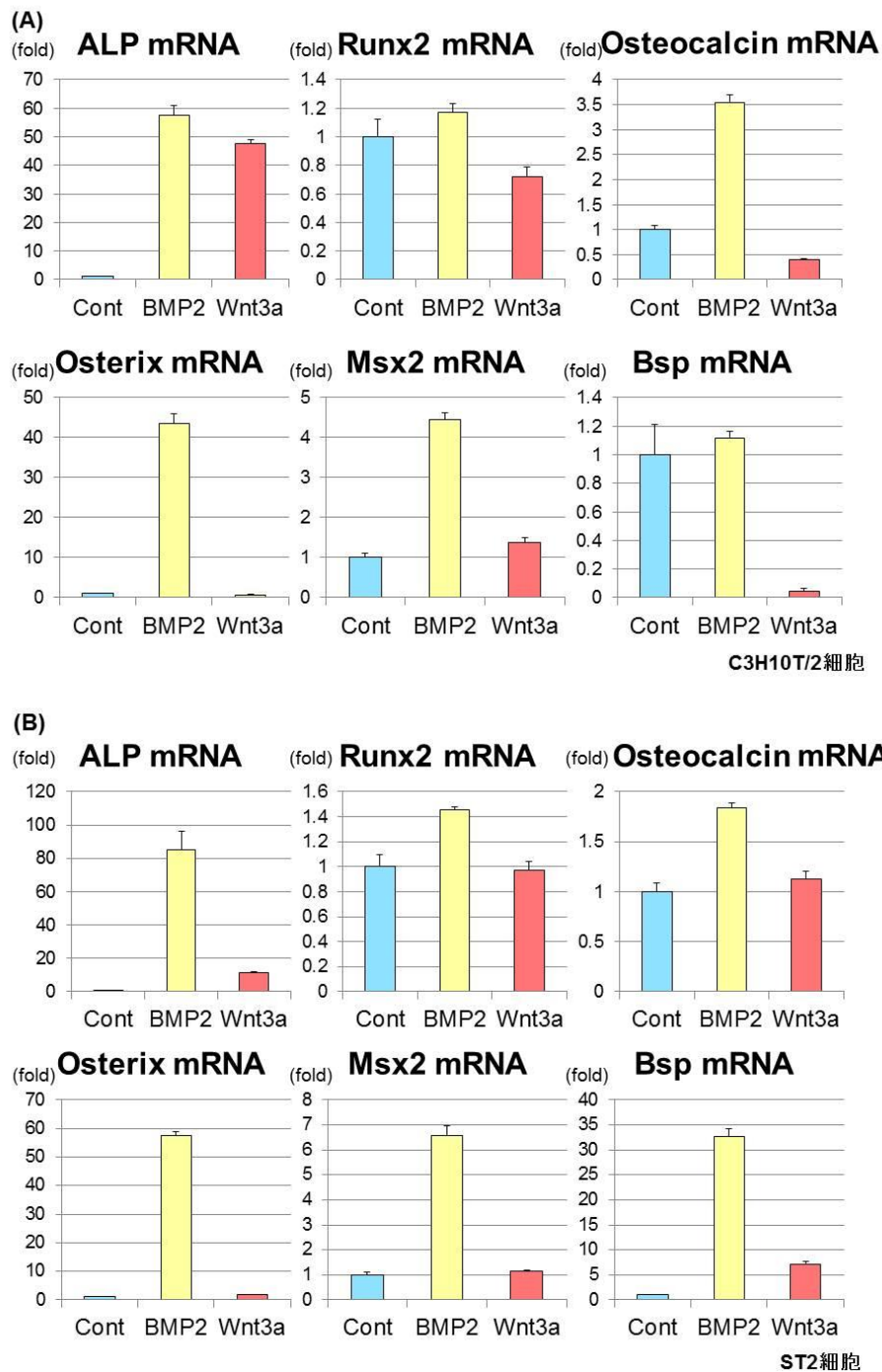


図 1. 骨芽細胞分化マーカーに対する Wnt3a の効果

C3H10T1/2 細胞 (A) または ST2 細胞 (B) に Venus アデノウイルス (Cont)、BMP2 アデノウイルスあるいは Wnt3a アデノウイルスを感染させ 4 日間培養した後、全 RNA を精製し、RT-qPCR により ALP、Runx2、Osteocalcin、Osterix、Msx2、および Bsp の発現を定量し、 β -actin の発現で標準化した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。

(n=3)

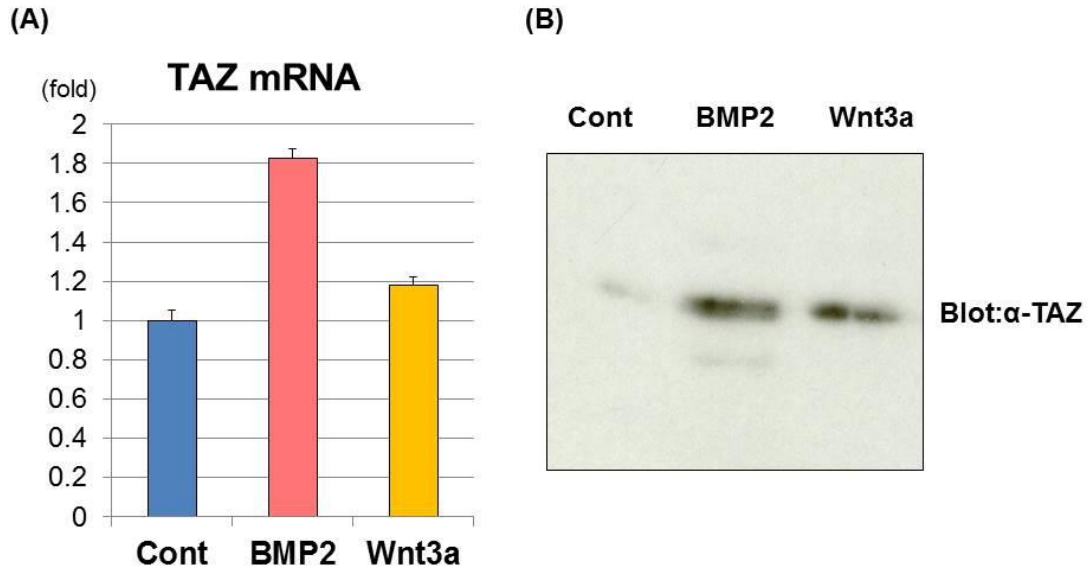


図 2. TAZ の発現に対する Wnt3a の効果

(A) C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)、BMP2 アデノウイルスあるいは Wnt3a アデノウイルスを感染させ、4 日培養した後、全 RNA を精製し、RT-qPCR により TAZ mRNA の発現を定量した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=3)

(B) C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)、BMP2 アデノウイルスあるいは Wnt3a アデノウイルスを感染させ、4 日後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 TAZ 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。

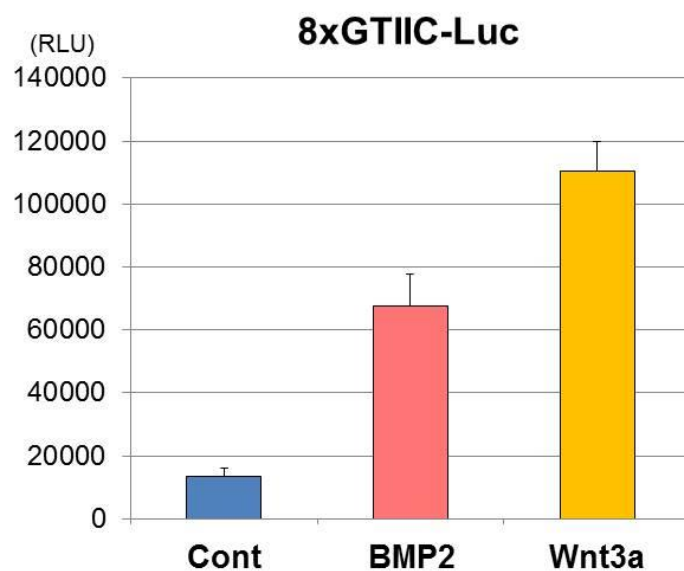


図 3. TAZ の転写活性に対する Wnt3a の効果

C3H10T1/2 細胞に 8xGTIIC ルシフェラーゼ遺伝子を遺伝子導入し、24 時間後に α -MEM を培地交換した。その後、Venus アデノウイルス (Cont)、BMP2 アデノウイルスまたは Wnt3a アデノウイルスを添加し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4)

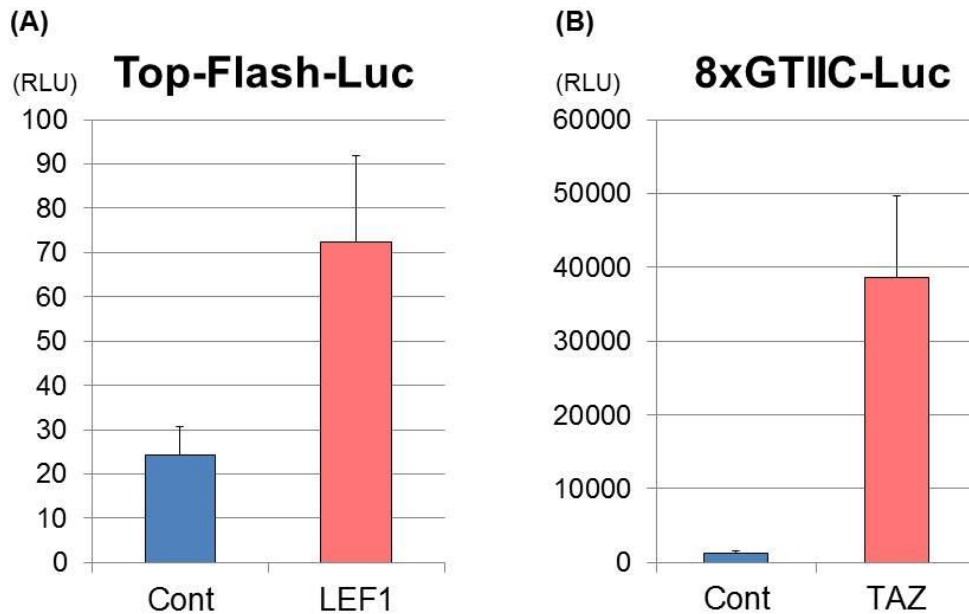


図 4. LEF1 および TAZ 発現ベクターの確認

(A) Top-Flash ルシフェラーゼレポーターに対する LEF1 の効果

293FT 細胞に Top-Flash ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに、コントロールベクター (Cont)あるいは LEF1 発現ベクターを遺伝子導入し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。 (n=4)

(B) 8xGTIIC ルシフェラーゼレポーターに対する TAZ の効果

293FT 細胞に 8xGTIIC ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに、コントロールベクター (Cont)あるいは TAZ 発現ベクターを遺伝子導入し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。 (n=4)

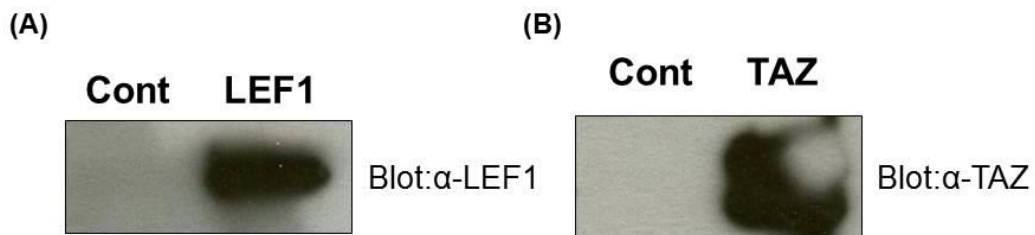


図 5. LEF1 および TAZ アデノウイルスによるタンパク質発現

(A) LEF1 アデノウイルスによる LEF1 タンパク質の発現

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)あるいは LEF1 アデノウイルスを感染させ、4 日後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 LEF1 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。

(B) TAZ アデノウイルスによる TAZ タンパク質の発現

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)あるいは TAZ アデノウイルスを感染させ、4 日後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 TAZ 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。

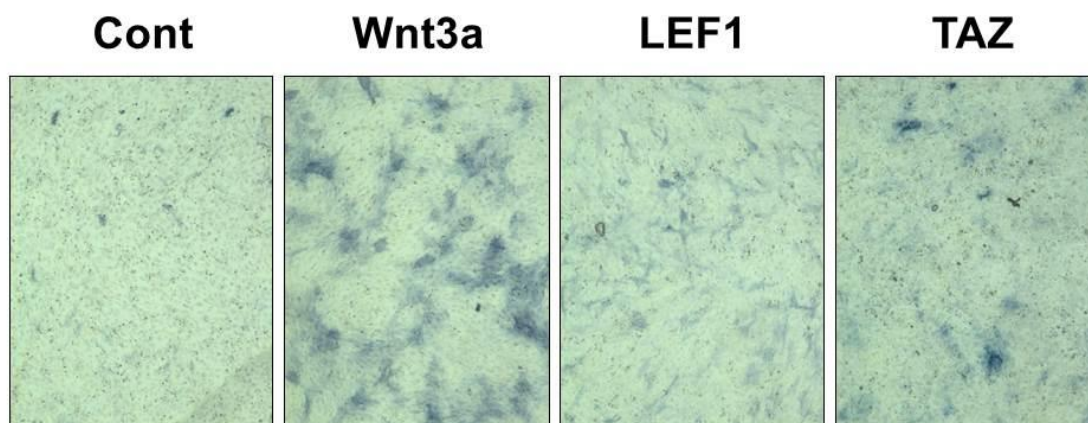


図 6. LEF1 および TAZ の ALP 活性に対する効果

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)、Wnt3a アデノウイルス、LEF1 アデノウイルスあるいは TAZ アデノウイルスを感染させ、7 日間培養後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で細胞を固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

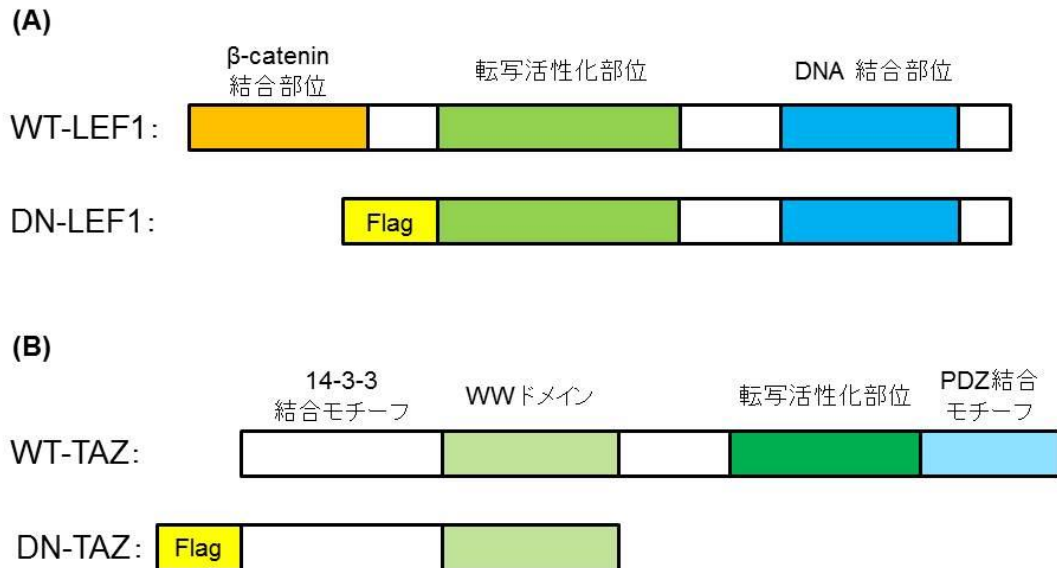


図 7. Dominant-Negative (DN)-LEF1 および Dominant-Negative (DN)-TAZ の一次構造

(A) DN-LEF1 の一次構造

DN-LEF1 は、C 末端部位 (アミノ酸残基 118-400)の β-catenin 結合部位を欠失する。

(B) DN-TAZ の一次構造

DN-TAZ は、N 末端部位 (アミノ酸残基 2-165)の転写活性部位および PDZ 結合モチーフを欠失する。

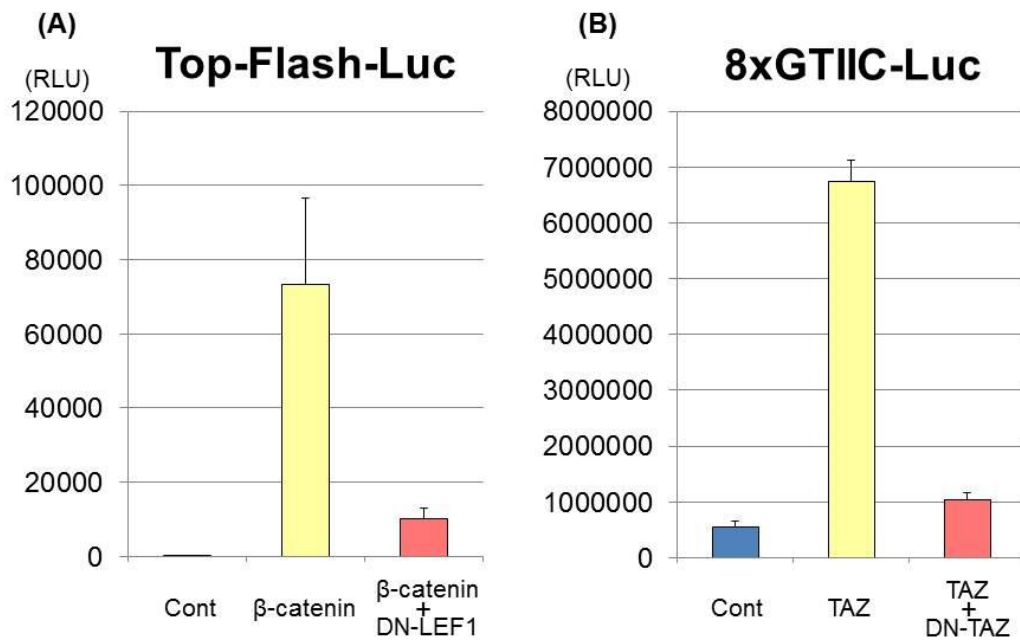


図 8. DN-LEF1 および DN-TAZ の Dominant-Negative 効果

(A) β -catenin 誘導性 Top-Flash レポーター活性に対する DN-LEF1 の Dominant-Negative 効果

293FT 細胞に Top-Flash ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに、 β -catenin 発現ベクターあるいは β -catenin 発現ベクターおよび DN-LEF1 発現ベクターを図のように遺伝子導入し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4)

(B) TAZ 誘導性 8xGTIIC レポーター活性に対する DN-TAZ の Dominant-Negative 効果
293FT 細胞に 8xGTIIC ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに、TAZ 発現ベクターあるいは TAZ 発現ベクターおよび DN-TAZ 発現ベクターを図のように遺伝子導入し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4)

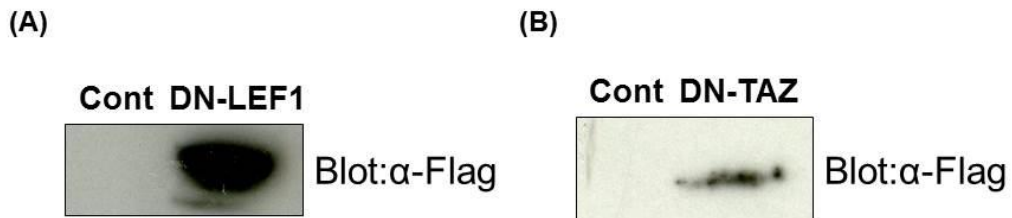


図 9. DN-LEF1 および DN-TAZ アデノウイルスによるタンパク質発現

(A) DN-LEF1 アデノウイルスによる Flag-DN-LEF1 タンパク質の発現

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)あるいは DN-LEF1 アデノウイルスを感染させ、4 日後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検索した。

(B) DN-TAZ アデノウイルスによる Flag-DN-TAZ タンパク質の発現

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)あるいは DN-TAZ アデノウイルスを感染させ、4 日後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検索した。

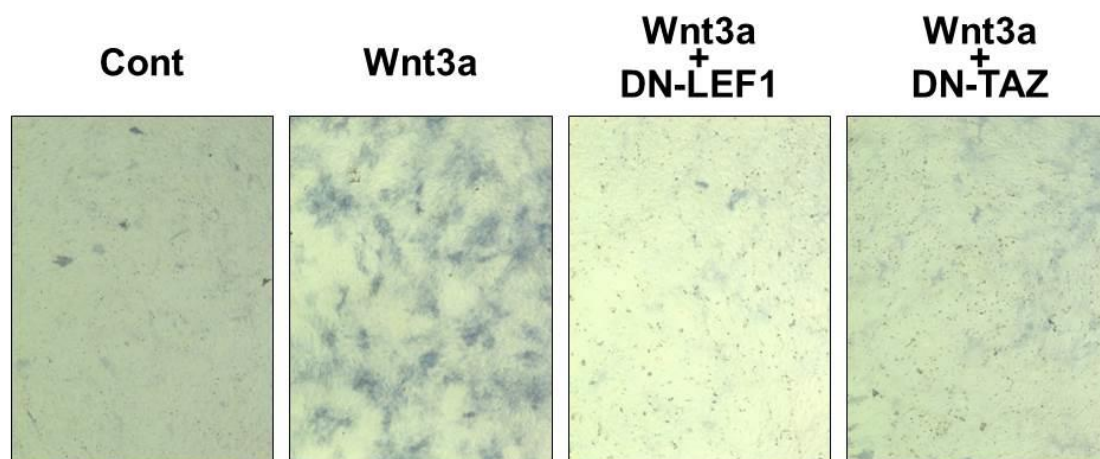


図 10. Wnt3a 誘導性 ALP 活性に対する DN-LEF1 および DN-TAZ の効果

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)、Wnt3a アデノウイルス、Wnt3a アデノウイルスおよび DN-LEF1 アデノウイルス、あるいは Wnt3a アデノウイルスおよび DN-TAZ アデノウイルスを感染させ、7 日間培養後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で細胞を固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

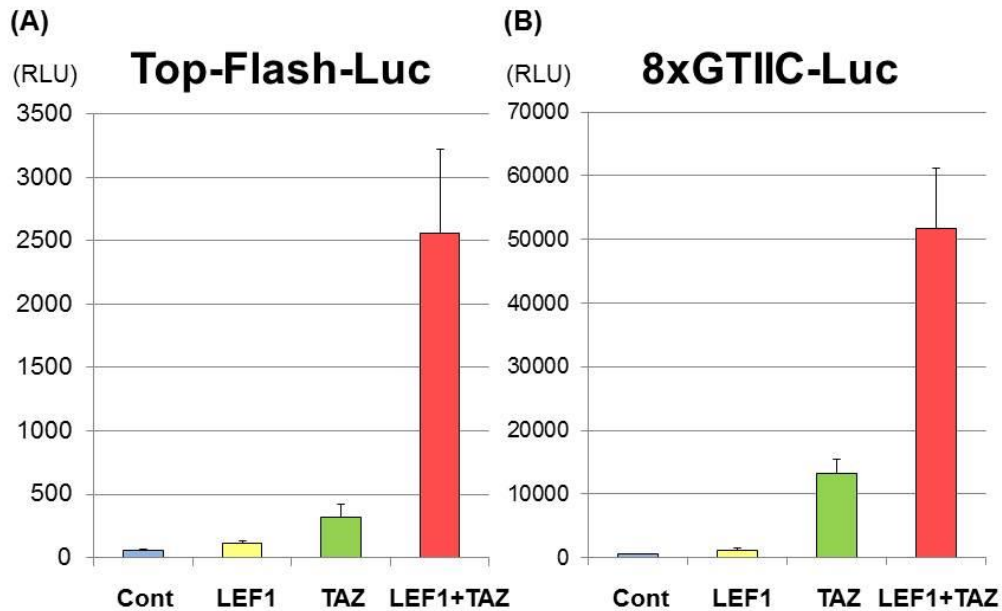


図 11. LEF1 および TAZ 協調的な転写活性

C3H10T1/2 細胞に Top-Flash (A) または 8xGTIIIC ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (B) を遺伝子導入し、24 時間後に α -MEM 培地交換した。その後、Venus アデノウイルス (Cont) および LEF1 アデノウイルス、TAZ アデノウイルスあるいは LEF1 アデノウイルス および TAZ アデノウイルスを感染させ、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4)

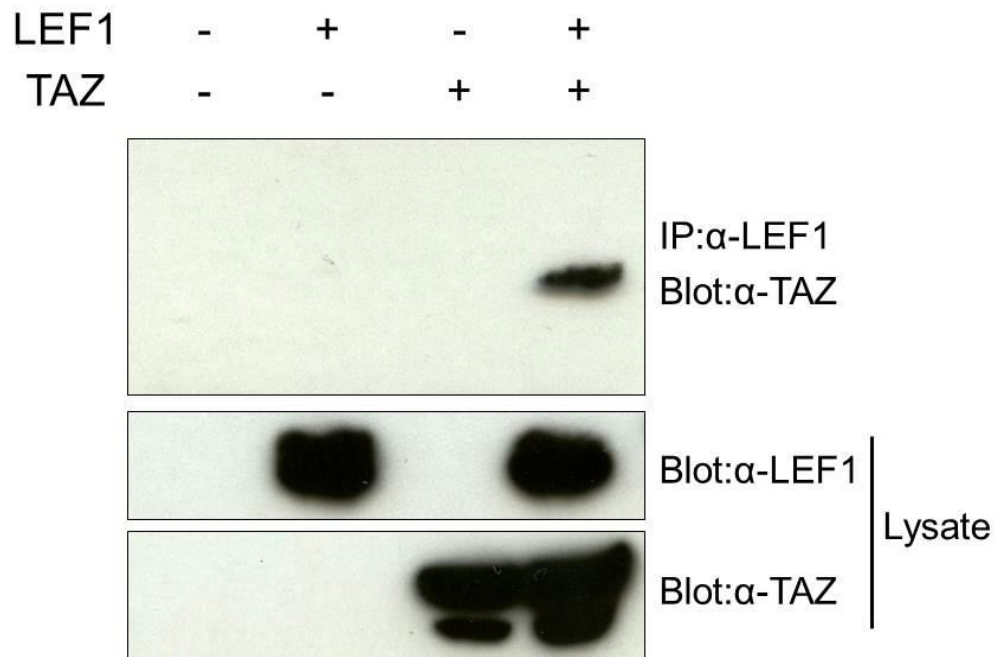


図 12. LEF1 と TAZ の物理的結合

293FT 細胞に LEF1 発現ベクター、TAZ 発現ベクター、あるいは LEF1 発現ベクターおよび TAZ 発現ベクターを遺伝子導入し、72 時間後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。細胞溶解液を抗 LEF1 抗体により免疫沈降後、抗 TAZ 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検索した (最上段)。また、回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 LEF1 抗体 (2 段目)ならびに抗 TAZ 抗体 (3 段目)を用いたウエスタンブロッティング法によりそれぞれのタンパク質の発現を確認した。

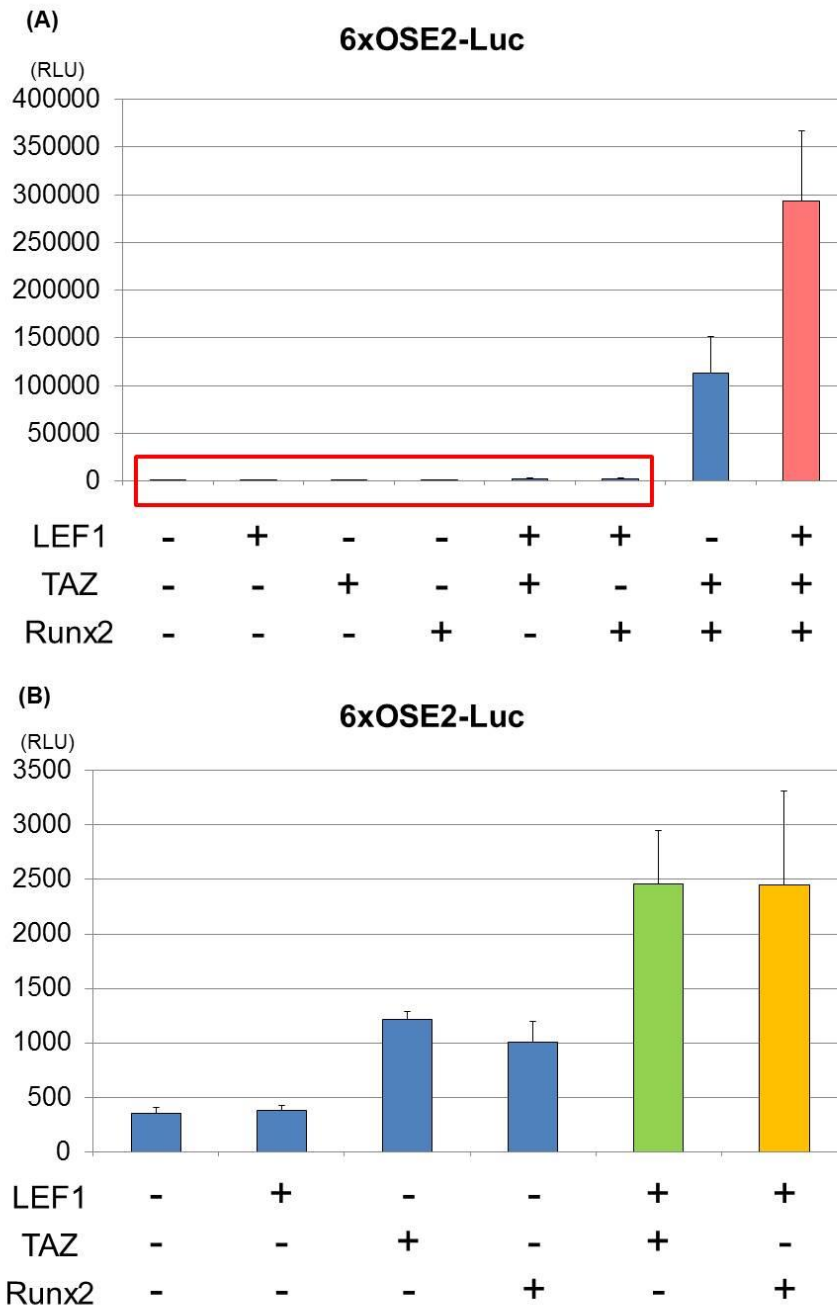


図 13. LEF1、TAZ および Runx2 の協調的な転写活性

(A) 293FT 細胞に 6xOSE2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子とともに、LEF1 発現ベクター、TAZ 発現ベクターあるいは Runx2 発現ベクターを図のように遺伝子導入し、72 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4)

(B) LEF1、TAZ および Runx2 の協調的な転写活性 (A)の赤枠内の拡大を示す。

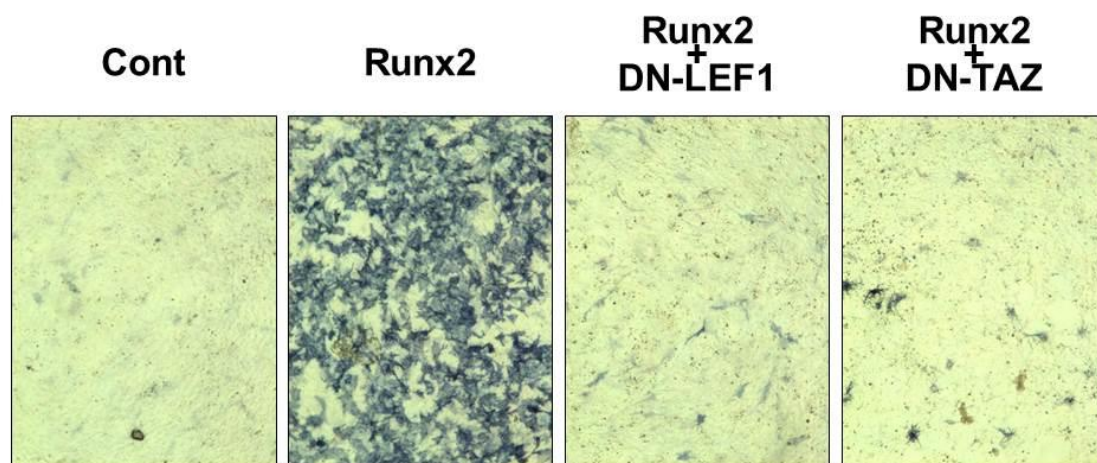


図 14. Runx2 誘導性 ALP 活性に対する DN-LEF1 および DN-TAZ の効果

C3H10T1/2 細胞に Venus アデノウイルス (Cont)、Runx2 アデノウイルス、Runx2 アデノウイルスおよび DN-LEF1 アデノウイルス、あるいは Runx2 アデノウイルスおよび DN-TAZ アデノウイルスを感染させ、7 日間培養後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で細胞を固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

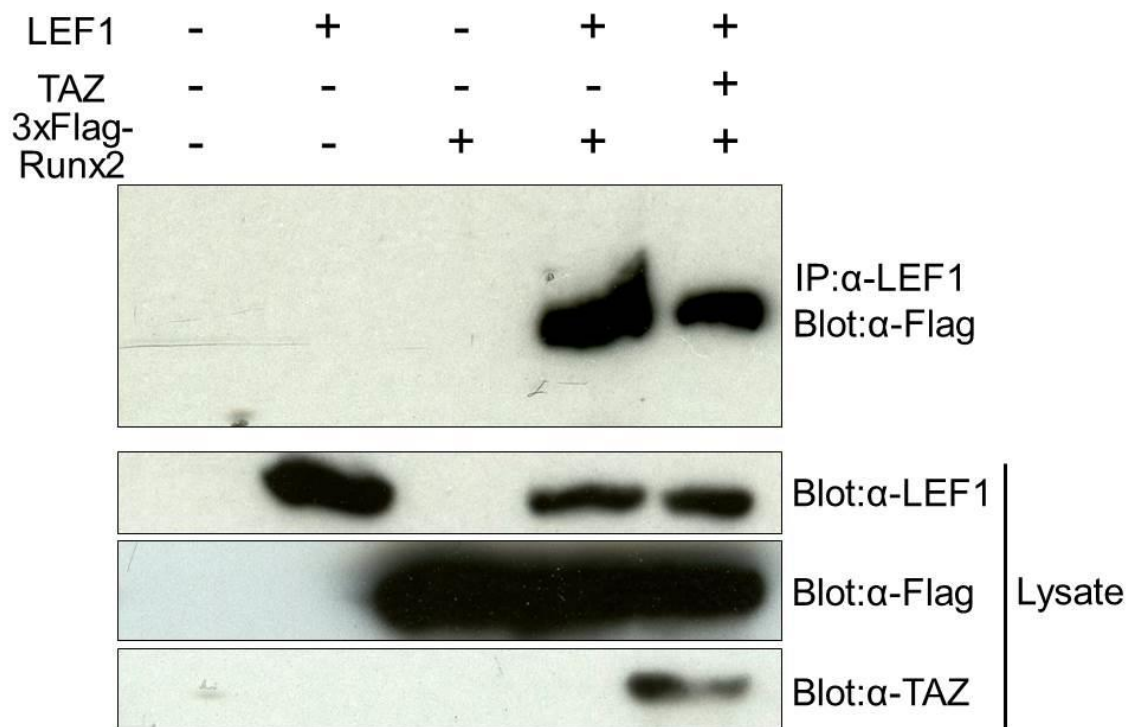


図 15. LEF1、TAZ および Runx2 の物理的結合

293FT 細胞に LEF1 発現ベクター、TAZ 発現ベクター、LEF1 発現ベクターおよび 3xFlag-Runx2、あるいは LEF1 発現ベクター、TAZ 発現ベクターおよび 3xFlag-Runx2 発現ベクターを遺伝子導入し、遺伝子導入後 72 時間後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。細胞溶解液を抗 LEF1 抗体により免疫沈降後、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検索した (最上段)。また、回収したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗 LEF1 抗体 (2 段目)、抗 Flag 抗体 (3 段目)ならびに抗 TAZ 抗体 (4 段目)を用いたウエスタンブロッティング法によりそれぞれのタンパク質の発現を確認した。

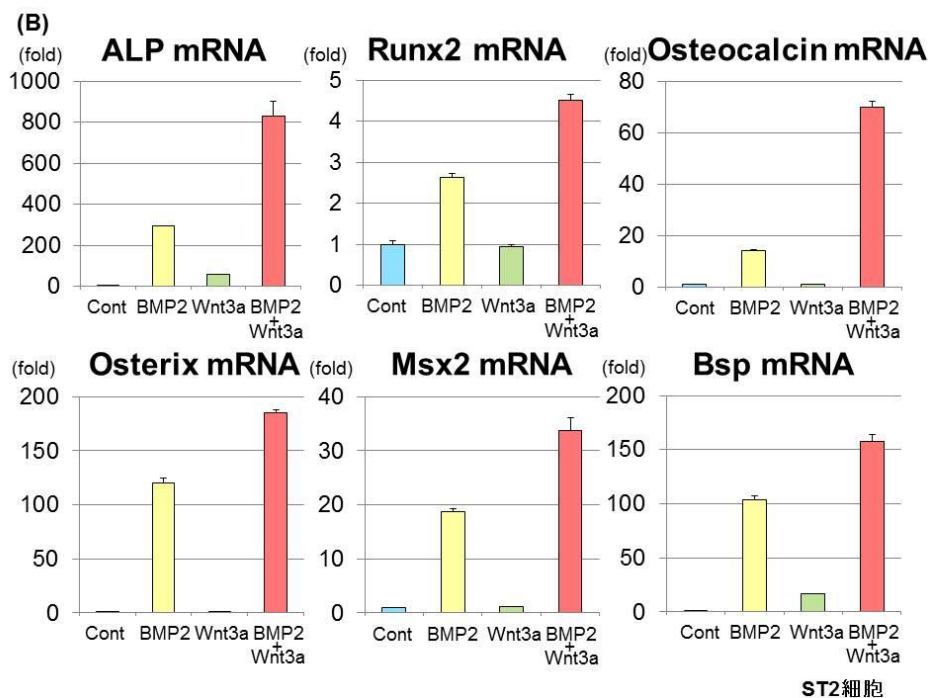
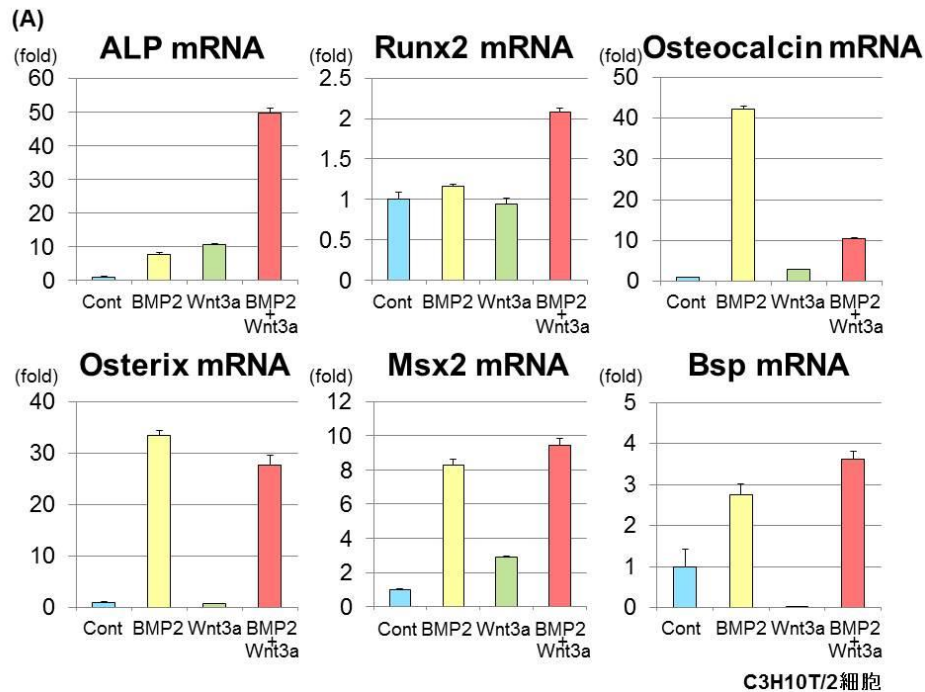


図 16. 骨芽細胞分化に対する Wnt3a および BMP2 の協調作用

C3H10T1/2 細胞 (A) または ST2 細胞 (B) に Venus アデノウイルス (Cont)、BMP2 アデノウイルス、Wnt3a アデノウイルス、あるいは BMP2 アデノウイルスおよび Wnt3a アデノウイルスを感染させ 4 日間培養した後、全 RNA を精製し、RT-qPCR により ALP、Runx2、Osteocalcin、Osterix、Msx2、Bsp の発現を定量し、 β -actin にて標準化した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=3)

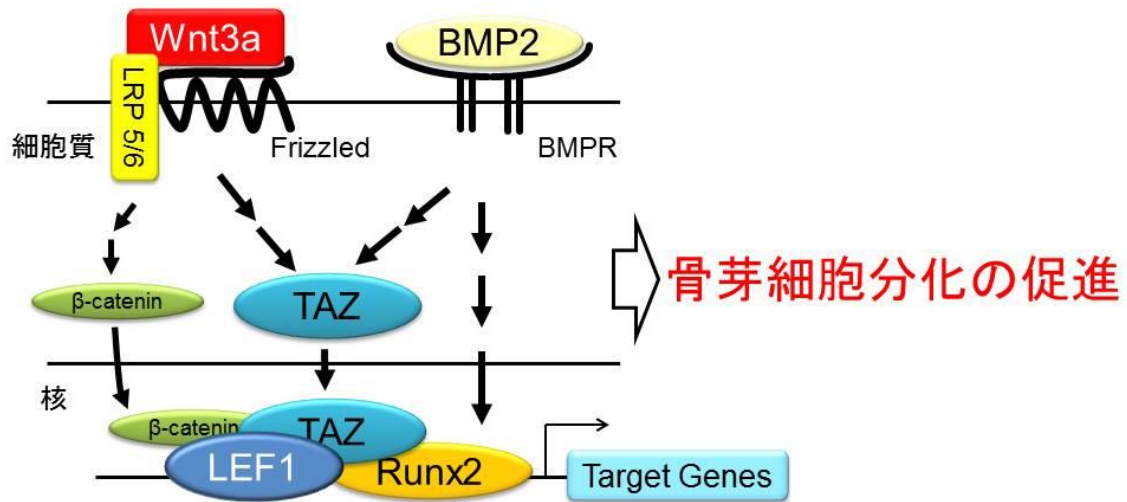


図 17. 古典的 Wnt による骨芽細胞分化促進作用の分子メカニズム

古典的 Wnt は、LEF1 と TAZ を介して骨芽細胞分化を制御する。さらに Wnt3a は、LEF1、TAZ および Runx2 の結合を介して、BMP2 と協調し、骨芽細胞分化を強力に促進させることが示唆された。