

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	岡本正則
論文審査担当者	主査 本田孝行 副査 栗田浩・中山淳
論文題目 Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during osteoblastogenesis (骨芽細胞分化において、非古典的 Wnt リガンドである Wnt5a は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を促進する)	
<p>【研究の背景】 Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖蛋白質で、哺乳類では 19 種類が同定されている。Wnt は初期の発生や器官形成、細胞増殖や分化などを制御する。Wnt シグナルには、<math>\beta</math> カテニンを介する古典経路とそれを介さない非古典経路とが存在する。Wnt3a などの古典的 Wnt が受容体 Frizzled と共受容体 Low-density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) 5/6 の複合体に結合すると、<math>\beta</math> カテニンが細胞内に蓄積する。その後核内に移行した <math>\beta</math> カテニンは、転写因子 T cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer factor (Lef) とともに、標的遺伝子の発現を促進する。</p> <p>骨芽細胞分化においては古典経路により Runx2 の発現が促進され、骨芽細胞分化が促進し、脂肪細胞分化を抑制する。一方、非古典経路を活性化する Wnt5a は、脂肪細胞への分化を促進する Ppar <math>\gamma</math> の機能を抑制することで、脂肪細胞分化を抑制し、その結果骨芽細胞分化を促進する。これらの結果は両経路が協調し、骨芽細胞の分化を調節することを示唆する。しかし、両経路がどのように協調して骨芽細胞分化を調節するかは明らかでない。そこで本研究では、骨芽細胞分化における Wnt5a の古典経路への作用に着目し検討した。</p> <p>【方法・結果】 ST2 細胞を Wnt3a で刺激すると、古典経路活性を示す Tcf/Lef 転写活性が上昇するが、Wnt5a による刺激では変化がみられなかった。しかし ST2 細胞を Wnt5a で前処理した後に Wnt3a で刺激すると、Wnt3a 単独刺激と比べ、Tcf/Lef 転写活性、細胞内 <math>\beta</math> カテニンの蛋白量はさらに上昇した。この結果から、Wnt5a が古典経路を促進する可能性が示唆された。</p> <p>野生型マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞 (WT-POB) を石灰化培地で培養し、Wnt リガンドと受容体の発現を解析した。Wnt5a や Wnt10b の発現上昇とともに、Lrp5/6 の発現は骨芽細胞分化に伴い経時的に増加した。このことは Wnt シグナルそのものが Lrp5/6 の発現を制御する可能性を示唆した。しかし、古典経路特異的な阻害分子である Dkk1 は Lrp5/6 の発現を抑制しなかった。また、shRNA を用い Wnt5a を knockdown すると、Lrp5/6 の発現が低下した。これらの結果は、Wnt5a が Lrp5/6 の発現を誘導することを示唆した。</p> <p>Wnt5a による Lrp5/6 の発現誘導を確認するため、Wnt5a 欠損マウス由来の骨芽細胞様細胞 (Wnt5aK0-POB) の解析を行った。WT-POB に比べ、Wnt5aK0-POB では、Lrp5/6 の発現が有意に低く、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化能も低下した。また、転写因子 Sp7 の発現が低く、古典経路の標的遺伝子である Axin2 の発現、Tcf/Lef 転写活性、細胞内の <math>\beta</math> カテニンレベルも低下した。そして Wnt5a 欠損マウスの骨組織における、<math>\beta</math> カテニンレベルも低下した。</p> <p>次に外因性 Wnt5a の作用を検討した。Wnt5a 存在下で Wnt5aK0-POB を培養すると、低下した Lrp5/6 の発現が増加し、Tcf/Lef 転写活性および石灰化能が回復した。</p> <p>Lrp5 の発現効果を検討するため、Wnt5aK0-POB に Lrp5 を過剰発現すると、低下した Tcf/Lef 転写活性および石灰化能が回復した。また、Wnt5aK0-POB では脂肪細胞への分化が促進するが、Wnt5aK0-POB に Lrp5 を過剰発現させると、その脂肪細胞分化は抑制された。</p>	

Lrp5/6 のプロモーター解析を行い、Lrp5/6 に共通する領域として Sp1 結合サイトに着目した。Sp1 結合サイトには、Sp7 も結合することが報告されている。また、Wnt5aKO-POB では Sp7 の発現は有意に低下する。このことは Sp7 が Lrp5/6 の発現を誘導することを示唆した。Wnt5a は BMP2 と協調して、Sp7 の発現を誘導した。そして Sp7 を過剰発現すると、Lrp5 の発現が上昇した。Wnt5a のシグナルには共受容体である Ror2 が関与することが多く報告されているが、Ror2 欠損マウス由来の骨芽細胞では Lrp5/6 の発現に変化を認めなかった。

**【考察・結論】**Wnt5a は HeLa 細胞や HEK293 細胞において、Wnt3a と Frizzled の結合に競合し古典経路を抑制する。また、Wnt5a は Ca<sup>2+</sup>経路を介して Tcf/Lef 転写活性を抑制することが報告されている。しかし骨芽細胞分化においては、Wnt5a は Sp7 の発現を誘導し、Lrp5/6 の発現を促進した。そしてその結果、古典経路による骨芽細胞分化を促進することが示唆された。