

抗Dkk1抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介してアルカリフォスファターゼの発現を促進する

小林, 茉莉
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21987>

出版情報：九州大学，2011，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



抗 Dkk1 抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を

介してアルカリフォスファターゼの発現を促進する

2011 年

小 林 茉 莉

九州大学大学院歯学府歯学専攻

口腔機能修復学講座 歯周病学分野

指導教員 前田 勝正 教授

対 象 論 文

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

Dkk1 inhibition induced osteoblast differentiation and bone formation.

Mari Kobayashi, Etsuko Matsuzaki, Takafumi Hamachi, Fumi
Takahashi-Yanaga, Shunji Hitratsuka, Yoshitomi Aida, Takao Hirofuji, and
Katsumasa Maeda.

Journal of Dental Research, 2011, submitted

略 語 一 覧

ALP : alkaline phosphatase
ANOVA : analysis of variance
APC : adenomatous polyposis coli
BMP : bone morphogenetic protein
CKI α : casein kinase I α
COL I : type I collagen
DEPC : diethyl pyrocarbonate
Dkk1 : Dickkopf1
Dvl : Dishevelled
EDTA : ethylenediamine teraacetic acid
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 β
LEF : lymphoid enhancer-binding factor
LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein
mRNA : messenger RNA
 μ CT : micro-computed tomography
OCN : osteocalcin
PBS : phosphate-buffered saline
PVDF : poly vinylidene difluoride
qRT-PCR : quantitative real-time PCR
RANKL : receptor activator of NF-kappaB ligand
RNAi : RNA interference
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
Runx2 : runt-related transcription factor 2
SD rat : Sprague-Dawley rat
SEM : standard error of the mean
SDS : sodium dodecyl sulfate
siRNA : small interfering RNA
TCF : T-cell factor
TCF7L2 : T-cell-specific transcriptional factor 7-like 2
TBS-T : Tris buffered saline with Tween 20
UV : ultraviolet

目 次

要 旨	1
緒 言	3
材 料 と 方 法	6
結 果	13
考 察	29
謝 辞	31
引 用 文 献	32

要 旨

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化に重要なシグナルである。Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の阻害分子の1つに、Dickkopf1 (Dkk1)がある。Dkk1の発現が減少すると、骨量が増加することが報告されている。Dkk1の中和抗体である抗Dkk1抗体が、骨芽細胞の数を増加させると同時に、破骨細胞の数を減少させることで多発性骨髄腫などの溶骨性の骨病変の治療に効果的であると前臨床試験において示されている。しかしながら、抗Dkk1抗体が骨芽細胞の分化や遺伝子の発現に及ぼす影響については明らかとなっていない。そこで、本研究では、骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞およびSaOS-2細胞を用いて、抗Dkk1抗体が骨芽細胞の分化および骨形成に及ぼす影響について、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現への影響について、さらにラット脛骨に作製した骨欠損部においての抗Dkk1抗体の効果について検討した。

抗Dkk1抗体は、骨芽細胞の増殖には影響しなかったが、ALPの活性、ALPのmRNA・タンパク質の発現を増加させた。ALPと同じく骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシン (OCN)、runt-related transcription factor 2 (Runx2)も、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子に含まれているが、抗Dkk1抗体は、OCN、Runx2の発現も増加させた。さらに、抗Dkk1抗体は骨芽細胞の石灰化を促進させた。また、抗Dkk1抗体は、 β -カテニンの発現、T-cell-specific transcriptional factor 7-like 2 (TCF7L2)の発現、TCF転写活性を増加させた。このことから、抗Dkk1抗体の添加により、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が促進されることが示唆された。さらに、抗Dkk1抗体はT-cell factor (TCF)結合部位を介してALPプロモーター活性を増加させ、ALPの発現を増加させることが明らかとなった。次に、Dkk1 siRNAを導入してDkk1の発現を抑制した。Dkk1 siRNAは、抗Dkk1抗体と同様、コントロール群のALPプロモーター活性を増加させた。Dkk1 siRNAとともに抗Dkk1抗体を作用させても、さらなるALPプロモーター活性の増加は認められなかった。以上の結果から、骨芽細胞分化において、Dkk1の阻害は、Wnt/ β -カテニンシグ

ナル伝達経路を促進し、ALP の発現を増加させること、また、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介した ALP の発現は、Dkk1 によって抑制され、骨量の恒常性が維持されていることが明らかとなった。

さらに、ラット脛骨に作製した骨欠損部において、局所投与した抗 Dkk1 抗体が、新生骨の形成を促進させたことから、抗 Dkk1 抗体の骨形成への効果が確認された。したがって、抗 Dkk1 抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化薬、すなわち骨再生薬としての可能性が示唆された。

緒 言

Wnt タンパクは、分泌型でシステインに富む糖タンパクである[1-3]。現在、Wnt ファミリー遺伝子は 19 種類が同定されている[4,5]。Wnt タンパクによって活性化される細胞内シグナルカスケードのなかで、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は古典経路として知られ、遺伝子発現、細胞の増殖・分化、細胞接着、細胞の極性を制御している[6,7]。Wnt タンパクは、受容体 frizzled と協働レセプターで構成される複合受容体に結合する[8]。この複合受容体は、frizzled の 10 種類のうち 1 つと、協働レセプターである low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRP)5/6 からなる。

β -カテニンは、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路で、中心的な役割を果たしている。通常、 β -カテニンは細胞質内で glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)、Axin、adenomatous polyposis coli (APC)、casein kinase 1 α (CK1 α)と複合体を形成し、GSK-3 β によりリン酸化を受ける。GSK-3 β によってリン酸化された β -カテニンは、ユビキチン化されて、プロテアソームによって分解される。Wnt タンパク質が受容体に結合すると、Dishevelled (Dvl)が活性化され、Axin を複合体から引き離し、GSK-3 β が β -カテニンをリン酸化するのを阻害する。その結果、 β -カテニンは分解されず、安定化した β -カテニンは細胞質内で蓄積され、核内に移行する。その後、 β -カテニンは、核内で転写因子である T-cell factor (TCF) / lymphoid enhancer-binding factor (LEF)ファミリーと結合し、標的遺伝子の発現を調節する[9-14]。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨の形成や恒常性の維持に重要である。したがって、その破綻は骨の病態に影響し、骨芽細胞の増殖・生存の重要な因子と機能的に関係する[15]。ヒトにおいて LRP5 の機能喪失型変異は骨粗鬆症・偽性神経膠腫症候群 (osteoporosis-pseudoglioma syndrome) を引き起こし[16]、LRP5 の機能獲得型変異は骨量が多い表現型を呈する[17]。Wnt-3a は、骨芽細胞前駆細胞 (C2C12, C3H10T1/2, ST2) において骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を増加させることが示されている[18,19]。加えて、ALP の発現はプロモーター領域にある TCF 結合

部位を介して調節されていることが、すでに報告されている[20]。さらに、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞分化の必須の遺伝子である runt-related transcription factor 2 (Runx2)プロモーター中の TCF 結合部位を介して、Runx2 の発現を直接的に増強するという報告がある[21]。それゆえに、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は骨芽細胞の分化に必須であるといえる。

Dickkopf1 (Dkk1)は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の阻害分子の1つで、協働受容体 LRP5/6 に結合する[22-24]。Dkk1 は、胎生期での骨の形成、成人期での骨リモデリングに重要な役割を果たすとされている[25]。Dkk1 の発現減少の表現型を呈する Doubleridge マウスでは、骨量は増加し[26,27]、反対に骨芽細胞に Dkk1 を過剰発現させると、骨減少症になる。また、マウスを使用した研究にて Dkk1 は Wnt シグナル伝達経路を阻害することで骨折の治癒を遅延させることも確認されている[28]。エストロゲン欠乏性骨粗鬆症を呈する卵巣摘出ラットにおいて Dkk1 の発現を抑制させると、receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)陽性破骨細胞が減少することで骨粗鬆症が抑制されることが確認されている[29]。したがって、Dkk1 の制御がエストロゲン欠乏性骨粗鬆症において重要であるといえる。加えて、Dkk1 は、びらん性関節炎[30]、多発性骨髄腫の溶骨[31,32]、転移性乳癌[33,34]、前立腺癌の骨転移[35-37]の発生に関係しており、骨芽細胞の分化を抑制することで溶骨性の骨病変を進行させる重要な分子であることが知られている[31]。多発性骨髄腫において、Dkk1 は骨髄腫細胞から過剰に分泌されており、Dkk1 タンパク質の発現が多く、多発性骨髄腫の細胞株や臨床サンプルで検出される[38-42]。前臨床試験において、Dkk1 の中和抗体である抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の数を増加させると同時に、破骨細胞の数を減少させることで多発性骨髄腫などの溶骨性の骨病変の治療に効果的であると示されている[43,44]。しかしながら、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の分化や遺伝子の発現に及ぼす影響については明らかとなっていない。

この研究では、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の分化や遺伝子の発現に及ぼす影響について明らかにし、骨再生治療薬としての抗 Dkk1 抗体の可能性を探ることを目的とし、抗 Dkk1 抗体

が骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞および SaOS-2 細胞の分化および骨形成に及ぼす影響について調べた。ALP は、代表的な骨芽細胞の分化マーカーであり、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子のひとつである。前述したように、骨芽細胞前駆細胞において、Wnt タンパク質により ALP の活性は増加すること[18,19]、ALP 遺伝子発現は、プロモーター領域にある Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の転写因子である TCF 結合部位を介して調節されることが示されている[20]。このことから、抗 Dkk1 抗体の ALP 発現への影響について特に着目したところ、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞において Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化し、ALP 発現を増加させ、骨芽細胞の分化を促進させることを見出した。さらに、抗 Dkk1 抗体は分化した骨芽細胞における石灰化を促進させた。また、ラット脛骨骨欠損部位において新生骨の形成を促進させることも明らかとなった。

材 料 と 方 法

1. 細胞培養

細胞は、37℃、5%CO₂濃度のインキュベーター中で培養した。MC3T3-E1 細胞は 10%ウシ胎児血清 (Invitrogen 社)、100 U/ml ペニシリン G (明治製菓)、100 µg/ml ストレプトマイシン (明治製菓) 存在下の α -Minimum Essential Medium Eagle (Sigma 社)、SaOS-2 細胞は 10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン G、100 µg/ml ストレプトマイシン存在下の Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma 社)にて培養した。細胞の培地は、3 日毎に交換した。

2. 細胞数の計測

MC3T3-E1 細胞は 3.6×10^4 個/well、SaOS-2 細胞は 1.8×10^4 個/well で、24 穴プレートに播種した。翌日、1 µg/ml の抗 Dkk1 抗体 (R&D Systems 社)、50 ng/ml の Wnt-3a (R&D Systems 社)、10 ng/ml の BMP-2 (R&D Systems 社)を添加し、この時を time0 とした。培養した細胞は、PBS (Invitrogen 社)にて洗浄後、トリプシン/EDTA (Invitrogen 社)処理で回収した。MC3T3-E1 細胞は time0 と 3 日目と 5 日目に、SaOS-2 細胞は time0 と 3 日目と 7 日目に回収を行った。回収した細胞は、ワンセルカウンター (和研薬株式会社) を用いて計数した。

3. ALP 活性の測定

MC3T3-E1 細胞は 3.6×10^4 個/well、SaOS-2 細胞は 1.8×10^4 個/well で、24 穴プレートに播種した。翌日、抗 Dkk1 抗体 (1 µg/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、BMP-2 (10 ng/ml)、1 µg/ml のマウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を添加し、この時を time0 とした。培養した細胞は、PBS にて洗浄後、トリプシン/EDTA 処理で回収した。MC3T3-E1 細胞は time0 と 3 日目と 5 日目に、SaOS-2 細胞は time0 と

3 日目と 7 日目に ALP 活性を測定した。ALP 活性の測定には、基質として p-ニトロフェニルリン酸 (Wako) を用いた[45]。回収した細胞を、0.1 M エタノールアミン (pH10.5)、150 mM 塩化ナトリウム (Wako)、2 mM 塩化マグネシウム (Wako)、2.5 mg/ml p-ニトロフェニルリン酸を含む溶液で溶解し、37°C で 30 分保温した後、波長 414 nm で吸光度を測定した。ALP 活性測定の結果は、各タンパク質濃度で補正し、グラフ化した。

4. ウェスタンブロッティング法

MC3T3-E1 細胞を 1.8×10^5 個/well で、6 穴プレートに播種した。翌日、抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、BMP-2 (10 ng/ml)、IgG (1 μ g/ml) を添加し、この時を time0 とした。培養した細胞は time0 と 3 日目に、PBS にて洗浄後、調製した lysis buffer で溶解し、サンプルとして用いた。回収したサンプルは、Quick Start Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad 社) を用いて濃度測定し、各タンパク質濃度が一定になるように調整した。2 $\times$ loading buffer と混合したサンプルは、SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、PVDF メンブレンにセミドライ式でトランスファーを行った (1 時間、16V)。ゲル濃度は、ALP、 β -カテニン、TCF7L2 の検出時には 10 %、Dkk1 の検出時には 12 %、OCN の検出時には 15 %にした。モノクローナル抗 ALP 抗体 (AbD Serotec 社)、ポリクローナル抗 OCN 抗体 (LSL 社)、ポリクローナル抗 Dkk1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) は 1:500、モノクローナル抗 GAPDH 抗体 (Abcam 社) は 1:1000、モノクローナル抗 β -カテニン抗体 (BD Biosciences 社)、モノクローナル抗 TCF7L2 抗体 (Millipore 社) は 1:2000 の倍率になるように Can Get Signal Solution1 で希釈して用いた。モノクローナル抗 ALP 抗体、モノクローナル抗 GAPDH 抗体、モノクローナル抗 β -カテニン抗体、モノクローナル抗 TCF7L2 抗体にはメンブレンを室温で 1 時間浸漬し、ポリクローナル抗 OCN 抗体、ポリクローナル抗 Dkk1 抗体には、メンブレンを 4°C で一晩浸漬した。その後、TBS-T で 15

分のメンブレンの洗浄を 4 回繰り返した後、2 次抗体として使用した抗マウス IgG 抗体または抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling 社) を TBS-T で 1:4000 に希釈し、メンブレンを 1 時間浸漬した。次に TBS-T で 15 分のメンブレンの洗浄を 4 回繰り返し、メンブレン上の免疫反応タンパク質の検出を検出試薬 LumiGLO (Cell Signaling 社)を用いて行った。結果は、バンドをスキヤナで読み込み定量化し、グラフ化した (ImageJ)。

5. RNA の抽出

MC3T3-E1 細胞を 10cm の dish に 1.14×10^6 個播種した。翌日、抗 Dkk1 抗体 (1 $\mu\text{g/ml}$)、Wnt-3a (50 ng/ml)、IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、この時を time0 とした。培養した細胞は time0 と 3 日目に、トリゾール試薬 (Invitrogen 社) を用いてトータル RNA の抽出を行った。トリゾール 1 ml にて溶解した細胞に 200 μl のクロロホルムを加えて転倒混和し、遠心した (4°C、14000 rpm、15 分)。分離した上清に、500 μl のイソプロピルアルコールを加え、室温に 10 分置いた後、遠心した (4°C、14000rpm、10 分)。上清を捨て、エタノール 1 ml を入れて攪拌し、遠心した (4°C、14000rpm、5 分)。上清を捨て、沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理水 20 μl を加え、濃度を測定した。

6. ノーザンブロッティング法

ALP の mRNA の発現は、ノーザンブロット法を用いて検出した [46,47]、1.2 % 変性アガロースゲルで、5 μg の RNA を電気泳動し、Turbo Blotter Rapid Dnwnward Transfer System (Scleicher&Schuell 社) を使用してナイロントランスファーメンブレンである Hybond N⁺ (GE Healthcare 社) に転写した。転写したメンブレンに Random Primer DNA Labeling Kit (Takara Bio 社) を用いて、付属プロトコール通りに 50°C でプローブのハイブリダイゼーションを行った。標識として、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$

(パーキンエルマージャパン社)を使用した。翌日、メンブレンを洗浄後、バンドを検出した。

7. RT-PCR 法

OCN、Runx2、type I collagen (COLI)の mRNA の発現は RT-PCR 法を用いて検出した。1 µg のトータル RNA から 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 社)を用いて付属プロトコール通りに cDNA を合成した。その後、Go taq Flexi DNA Polymerase (Promega 社)を用いて、RT-PCR 法を行った。PCR プライマーは、GenBank のデータベースに基づいて合成し、Sigma 社から購入した。使用したプライマーの配列と、反応条件は以下に記載の通りである。

OCN : F 5'-CTTTGGGTAACCTACCCTCCT-3'

(566 bp) R 5'-GAGGCTCTGAGAAGCATAAA-3'

(熱変性 94°C, 30 秒 : アニーリング 55°C, 45 秒 : 伸長反応 72°C, 30 秒)

30 サイクル

Runx2 : F 5'-TCCTATCTGAGCCAGATGACATCC-3'

(480 bp) R 5'-CCGGTCTCCCCCGGGTACC-3'

(熱変性 95°C, 20 秒 : アニーリング 52°C, 10 秒 : 伸長反応 72°C, 30 秒)

30 サイクル

COLI : F 5'-CTGACCTTCCTGCGCCTAATGTC-3'

(300 bp) R 5'-GTCTGGGGCACCAATGTCCAA-3'

48°C, 30 分 → 95°C, 10 分 →

(熱変性 94°C, 15 秒 : アニーリングおよび伸長反応 60°C, 45 秒)

30 サイクル

GAPDH : F 5'-GAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3'

(982 bp) R 5'-CATGTAGGCATGAGGTCCACCAC-3'

(熱変性 94°C, 30 秒 : アニーリング 55°C, 45 秒 : 伸長反応 72°C, 30 秒)

30 サイクル

8. qRT-PCR 法

ALP の mRNA の発現は real-time RT-PCR 法を用いて検出した。1 μ g のトータル RNA から 1st Strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した後、SYBR Green RT-PCR kit (Takara Bio 社)を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio 社)にて real-time RT-PCR 法を行った。GAPDH を内部コントロールとして使用し、ALP の値はデルタデルタ Ct 法を用いて算出した。PCR プライマーは、GenBank のデータベースに基づいて合成し、Sigma 社から購入した。使用したプライマーの配列と、反応条件は以下に記載の通りである。

ALP : F 5'-GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC-3'

(121 bp) R 5'-CCCACCCCGCTATTCCAAAC-3'

(熱変性 94 °C, 5 秒 : アニーリング 60 °C, 30 秒 : 伸長反応 72 °C, 30 秒)

40 サイクル

GAPDH : F 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

(138 bp) R 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

(熱変性 94 °C, 5 秒 : アニーリング 60 °C, 30 秒 : 伸長反応 72 °C, 30 秒)

40 サイクル

9. von Kossa 染色

24 穴プレートに播種した細胞がコンフルエントに達した後、骨芽細胞分化メディアウム (β -グリセロリン酸 2 mM、アスコルビン酸 (50 μ g/ml) に抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、BMP-2 (10 ng/ml) を各々添加して 21 日間培養した。細胞は、10%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 30 分間固定し、5%硝酸銀水溶液を入れて 10 分間 UV 下に曝して銀を黒色化させ、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で 2 分間処理した。

1 0. ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性測定

MC3T3-E1 細胞を、 5.5×10^4 個/well で 24 穴プレートに播種した。翌日、プラスミド DNA である TOPflash、FOPflash (Upstate Biotechnology 社)、野生型 ALP pGL-3、変異型 ALP pGL-3、および遺伝子導入の効果をみるためのコントロールとなる海シイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pRL-SV40 (Promega 社)を、Lipofectamine 試薬および Lipofectamine plus 試薬 (Invitrogen 社) を用いて付属プロトコールに従って導入した。なお、ヒト ALP 遺伝子のプロモーター領域には TCF 結合部位 (-1023/-1017) が存在しており、野生型 ALP レポータープラスミドの TCF 結合部位 (ATCAGAG) に変異を加えたものが、ネガティブコントロールである変異型 ALP レポータープラスミド (ATGGGAA) である[20]。導入の翌日、抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、IgG (1 μ g/ml)を添加し、この時を time0 とした。細胞は、time0 と 24 時間後に、PBS にて洗浄後、回収した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社)およびルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold Technologies 社) を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ活性測定の結果は、海シイタケルシフェラーゼ活性測定の結果と比較し、補正した。

1 1. RNA 干渉 (RNAi)

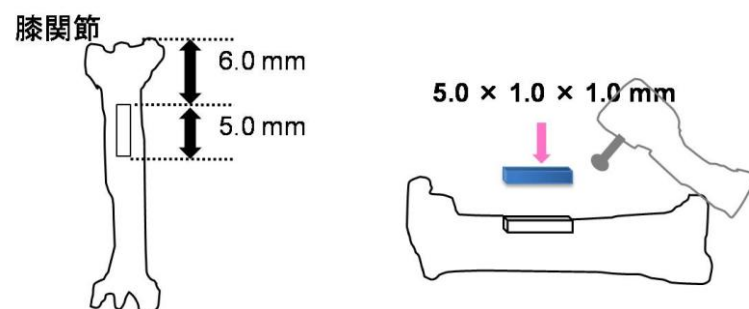
MC3T3-E1 細胞 8.0×10^4 個/well に、Dkk1 の Stealth™ RNAi および Stealth™ RNAi のネガティブコントロール (Invitrogen 社) と野生型 ALP pGL-3、変異型 ALP pGL-3 [20]、および遺伝子導入の効果をみるためのコントロールとなる海シイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pRL-SV40 を同時に導入し、24 穴プレートに細胞を播種した。導入には Lipofectamine™ 2000 試薬または Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen 社) を用いて、付属プロトコール通りに行った。導入の翌日、抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、IgG (1 μ g/ml)を添加し、こ

の時を time0 とした。細胞は、time0 と 24 時間後に、PBS にて洗浄後、回収した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System およびルミノメーターを用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ活性測定の結果は、海シイタケルシフェラーゼ活性測定の結果と比較し、補正した。

1 2. μ CT を用いた新生骨形成の解析

SD rat (12 週齢、♂) に吸入麻酔および静脈内麻酔を施した後、脛骨を露出させた。下図のように、ラット(12 週齢、♂)の脛骨において、膝関節から 6 mm 下方に、長さ 5 mm、幅 1 mm、深さ 1 mm の骨欠損部をラウンドバーおよび歯科用ファイルを用いて作製した。骨欠損部のサイズは、予め同じサイズに作製しておいたレジンのパターンを指標にして一定になるようにした。作製した骨欠損部に、抗 Dkk1 抗体 (100 μ g/ml) を染み込ませたテルプラグ (TERUMO 社) を填入して縫合した (day0)。反対側には、同様に作製した骨欠損部にコントロールとして PBS を染み込ませたテルプラグを填入した。day0、day7 に μ CT (SKYSCAN) を撮影し、新生骨の形成量を解析した。

ラット(12週齢、♂)脛骨

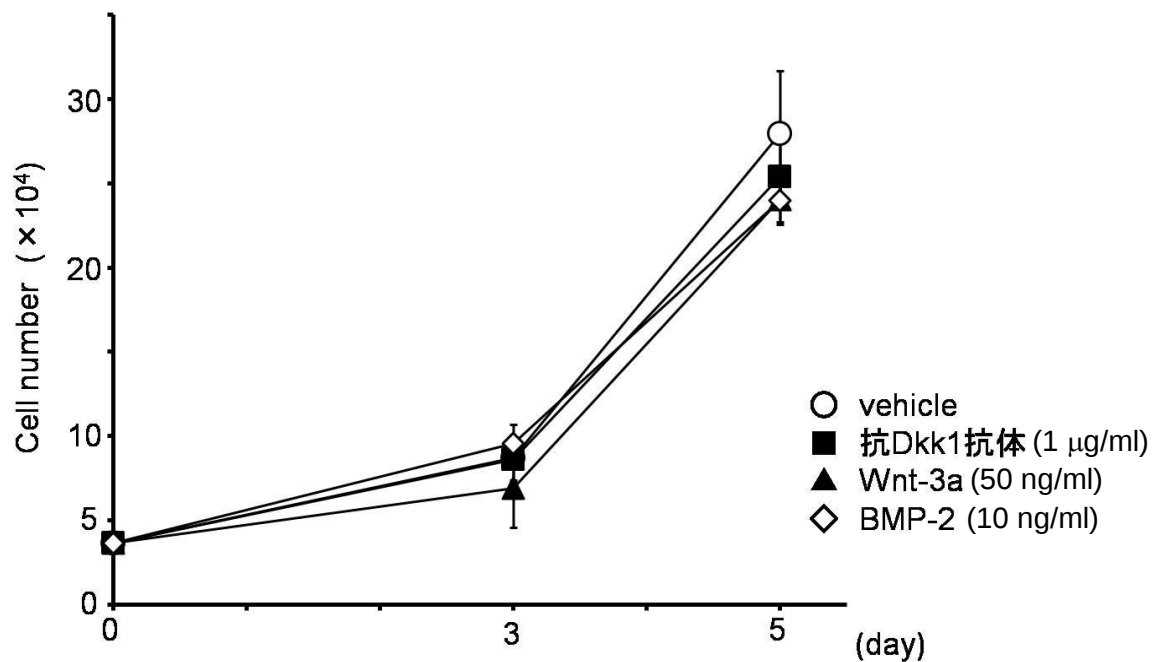


結 果

1. 抗 Dkk1 抗体の細胞増殖への影響

始めに、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 とヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 を使用して、抗 Dkk1 抗体が細胞増殖に及ぼす影響について検討した。図 1 に示すとおり、抗 Dkk1 抗体は両細胞において、全ての時点で細胞増殖に影響を与えなかった。Wnt-3a、BMP-2 も同様の結果であった。

A



B

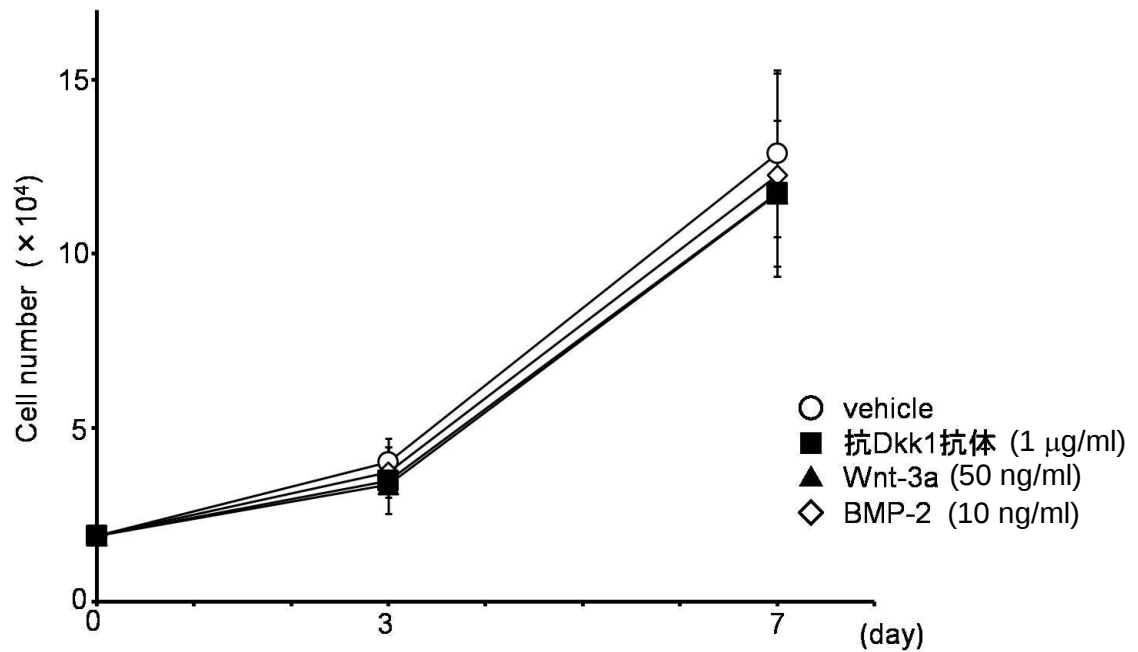


図1 抗 Dkk1 抗体が細胞増殖に与える影響

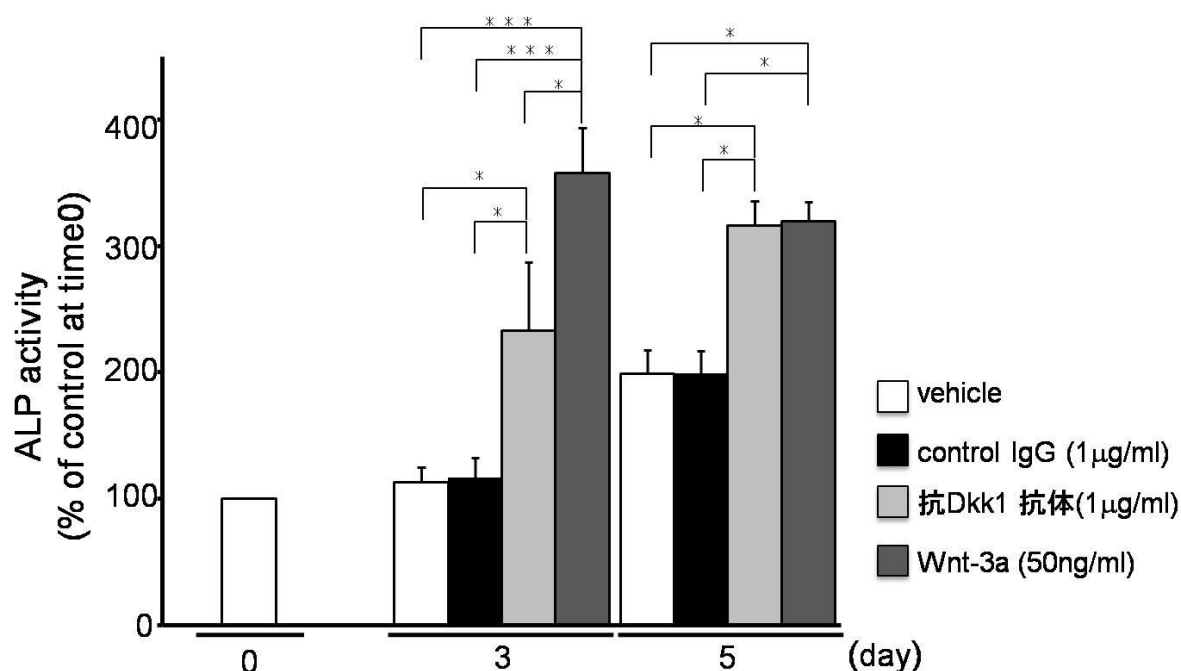
抗 Dkk1 抗体の MC3T3-E1 細胞 (A) と SaOS-2 細胞 (B) の細胞増殖に与える影響。24 穴プレートに MC3T3-E1 細胞は 3.6×10^4 個/well、SaOS-2 細胞は 1.8×10^4 個/well で準備し、抗 Dkk1 抗体 (1 μg/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)、BMP-2 (10 ng/ml)を加えて培養した。図に示した日数でトリプシン/EDTA 処理で細胞を回収し、セルカウンターを用いて計数した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値±SEM で示した。

2. 抗 Dkk1 抗体の ALP 活性への影響

次に、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討した。ALP は、骨芽細胞の代表的な分化マーカーである。そこで、抗 Dkk1 抗体の ALP 活性に対する影響を検討した。図 2A に示すように、抗 Dkk1 抗体は、MC3T3-E1 細胞における 3、5 日目の ALP 活性をコントロールに比べて有意に増加させた。3 日目における抗 Dkk1 抗体の ALP 活性は、Wnt-3a と比較するとやや低かったものの、5 日目には同程度に及んでいた。同じく、SaOS-2 細胞において、抗 Dkk1 抗体は、3、7 日目の ALP 活性をコントロールに比べて有意に増加させた（図 2B）。抗 Dkk1 抗体を添加した ALP 活性は、3 日目から増加しており、7 日目で Wnt-3a の ALP 活性をわずかに上回っていた。MC3T3-E1 細胞と SaOS-2 細胞とで、抗 Dkk1 抗体と Wnt-3a の結果に違いが生じたのは、MC3T3-E1 細胞と使用した Wnt-3a が共にマウス由来のものであること、同じく SaOS-2 細胞と抗 Dkk1 抗体がヒト由来であることが起因であると考えられる。

以上のことから、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞の増殖には影響せずに、分化を促進することが示唆された。

A



B

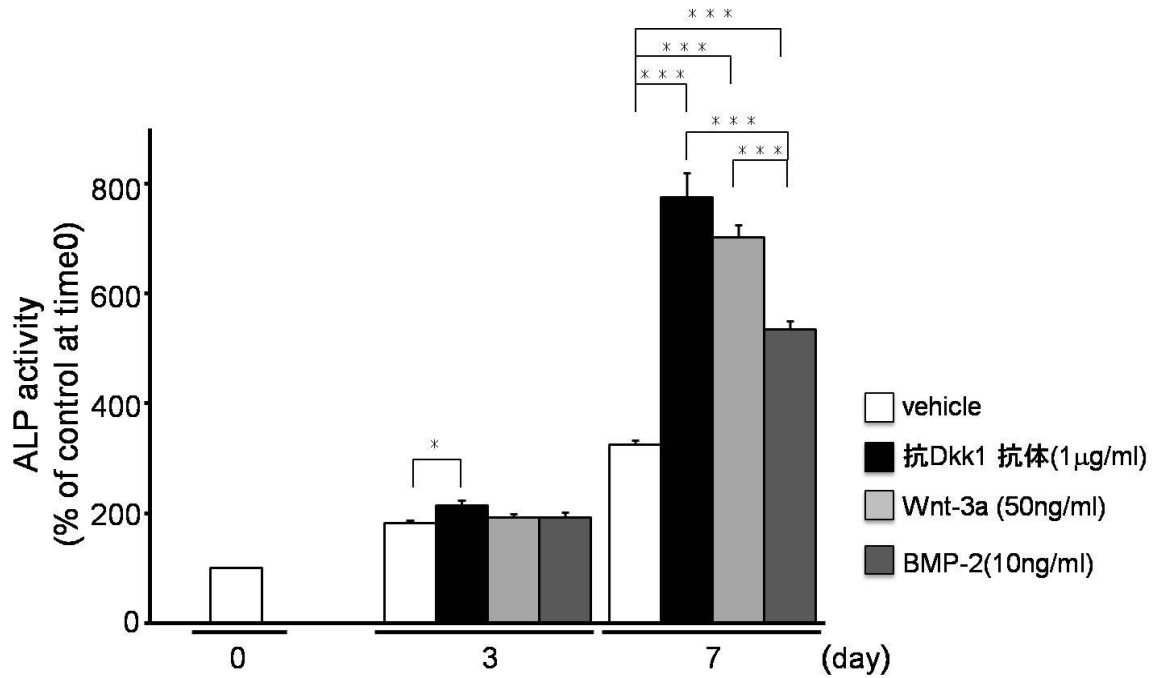


図2 抗Dkk1抗体のALP活性への影響

抗Dkk1抗体のMC3T3-E1細胞(A)とSaOS-2細胞(B)のALP活性に与える影響。細胞は、抗Dkk1抗体(1μg/ml)、Wnt-3a(50ng/ml)、BMP-2(10ng/ml)を加えて培養し、ALP活性を測定した。ALP活性はtime0の値と比較したパーセンテージで示した。3回の独立した実験を行い、データは平均値±SEMで示した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVAで検定した。)

3. 抗 Dkk1 抗体 の ALP 発現 (mRNA、タンパク質) への影響

抗 Dkk1 抗体が ALP 活性を増加させたので、次に、抗 Dkk1 抗体が ALP 発現に及ぼす影響を検討した。まず、抗 Dkk1 抗体の ALP の mRNA 発現に対する影響について検討した。図 3A、B に示すように、抗 Dkk1 抗体は ALP の mRNA 発現を増加させた。次に、抗 Dkk1 抗体の ALP のタンパク質発現に及ぼす影響について検討したところ、抗 Dkk1 抗体は ALP のタンパク質発現を Wnt-3a と同様に増加させた (図 3C)。

以上のことから、抗 Dkk1 抗体は MC3T3-E1 細胞において、ALP の mRNA 発現を増加させることにより、ALP のタンパク質発現の増加を引き起こし、ALP 活性を増加させることが示唆された。

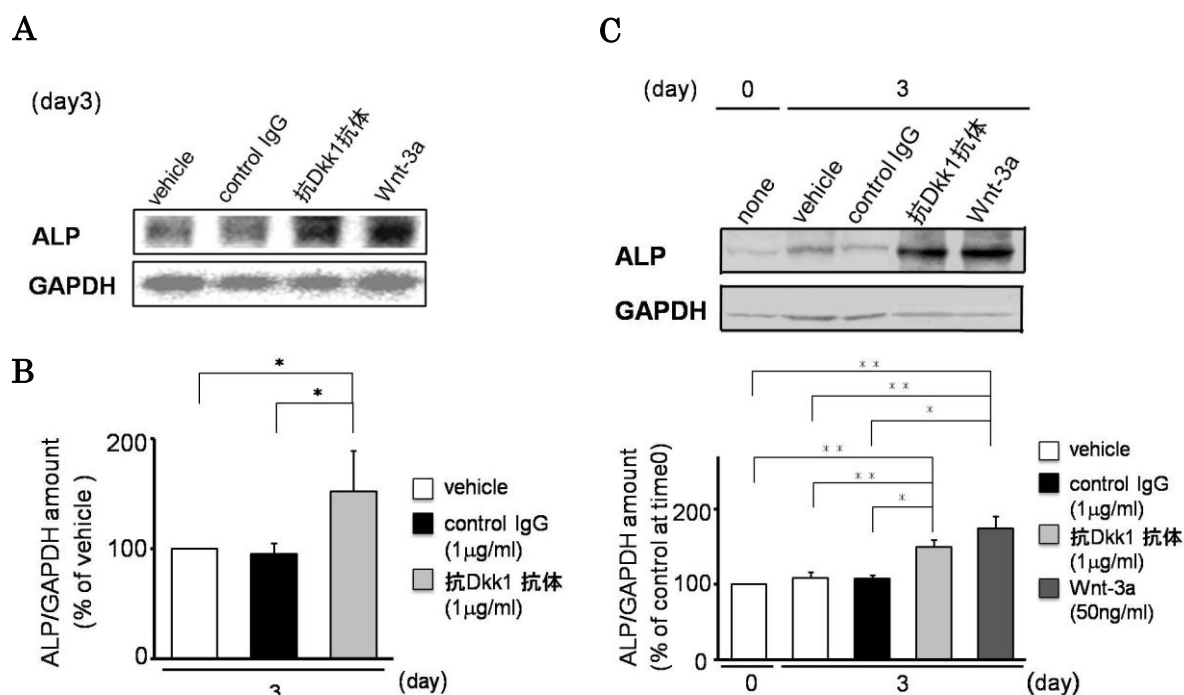


図 3 抗 Dkk1 抗体 の ALP 発現に対する影響

MC3T3-E1 細胞に抗 Dkk1 抗体 (1 μg/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)を加えて 3 日間培養し、サンプルを回収した。A : mRNA 発現。トータル RNA を抽出し、ALP に対するプローブを用いてノーザンブロット法による解析を行った。メンブレンは、GAPDH に対するプローブにてリプローブした。B : ALP の mRNA の発現は、トータル RNA から cDNA を作製し、qRT-PCR を用いて解析した。3 日目の vehicle の測定値を基準として定量化し、グラフ化した。C : タンパク質発現。タンパク質のサンプルは 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗 ALP 抗体に対してウエスタンブロット法による解析を行った。メンブレンは抗 GAPDH 抗体にてリプローブした。time0 の値を基準として定量化し、グラフ化した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値±SEM で示した。*, p<0.05, **, p<0.01 (one-way ANOVA で検定した。)

4. 抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞分化マーカー (OCN、Runx2) の発現への影響

骨芽細胞の分化マーカーの中には、OCN、Runx2 のように Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子に含まれることが知られているものが存在する。抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞分化に対する影響をさらに検討するため、抗 Dkk1 抗体が OCN、Runx2 の発現に及ぼす影響についても検討した。

OCN は後期の分化マーカーである。抗 Dkk1 抗体の OCN の mRNA およびタンパク質発現に対する影響について検討したところ、抗 Dkk1 抗体の添加で OCN の mRNA の発現は Wnt-3a ほどの増加を示さなかったものの、タンパク質の発現は Wnt-3a と同程度に増加していた (図 4A、B)。

また、初期の分化マーカーである type I collagen (COL I)、骨芽細胞分化の全ての段階で発現されている必須のマーカーである Runx2 の mRNA 発現に対して、抗 Dkk1 抗体が及ぼす影響について検討した。抗 Dkk1 抗体を添加して 3 日目に、COL I の mRNA 発現は、vehicle とほとんど変わらなかったが、Runx2 の mRNA 発現は vehicle に比較して増加していた (図 4C)。Wnt-3a も抗 Dkk1 抗体と同様の結果を示した。

以上のことから、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞分化マーカーの発現を増加させることが示唆された。

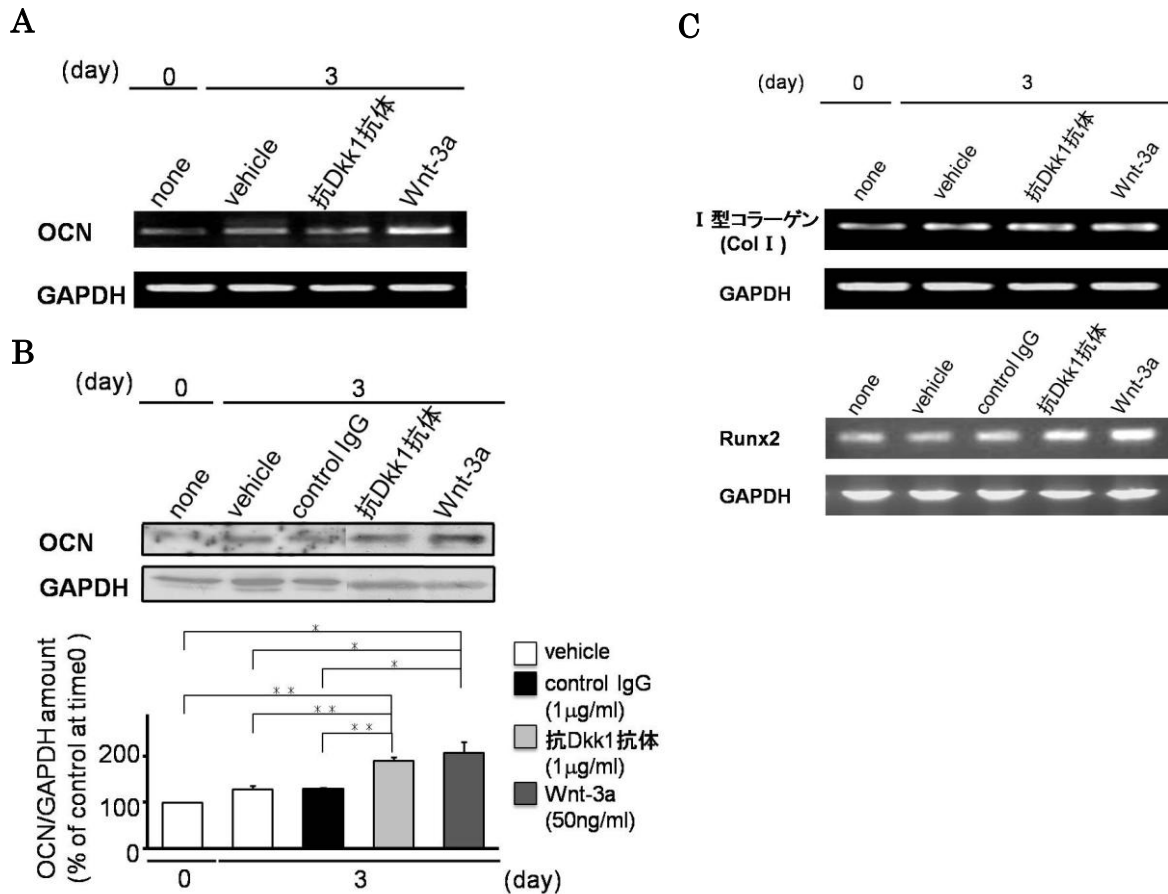


図 4 抗 Dkk1 の他の骨芽細胞分化マーカーの発現に対する影響

MC3T3-E1 細胞に抗 Dkk1 抗体 (1 µg/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)を加えて 3 日間培養し、サンプルを回収した。

A : OCN の mRNA の発現は、トータル RNA から cDNA を作製し、RT-PCR を用いて解析した。
B : OCN のタンパク質発現レベル。サンプルは 15 %SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗 OCN 抗体に対してウェスタンブロット法による解析を行った。メンブレンは抗 GAPDH 抗体にてリプローブした。time0 の値を基準として定量化し、グラフ化した。C : COL I、Runx2 の mRNA 発現は、トータル RNA から cDNA を作製し、RT-PCR を用いて解析した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値±SEM で示した。*, p<0.05, **, p<0.01 (one-way ANOVA で検定した。)

5. 抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞の石灰化への影響

抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、von Kossa 染色を用いて検討した。抗 Dkk1 抗体はコントロール（骨芽細胞分化培地のみ）に比べて骨芽細胞の石灰化を促進した（図 5）。その効果が Wnt-3a および BMP-2 と同等であったことから、MC3T3-E1 において抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞の石灰化を促進することが示唆された。

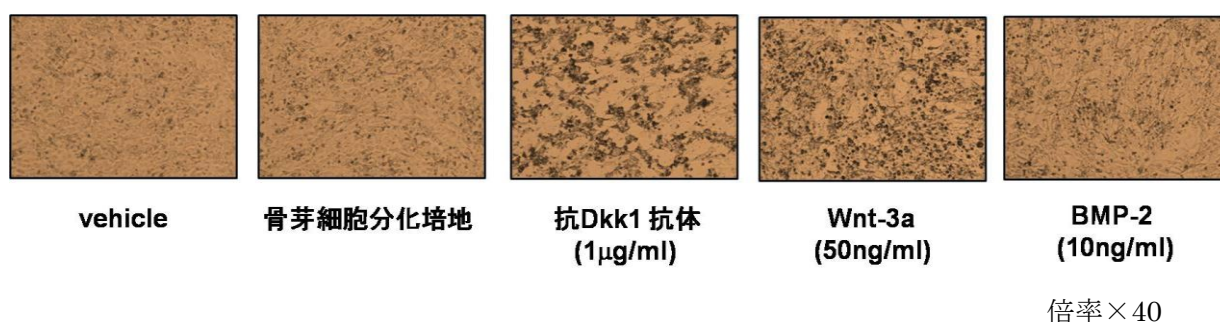


図 5 抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞の石灰化への影響

von Kossa 染色。24 穴プレートに播種した細胞がコンフルエントに達した後、骨芽細胞分化メディウム（ β -グリセロリン酸 2 mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml）に抗 Dkk1 抗体（1 μ g/ml）、Wnt-3a（50 ng/ml）、BMP-2（10 ng/ml）を各々添加して 21 日間培養した。培養した細胞は、10 %パラホルムアルデヒドを用いて室温で 30 分間固定し、5 %硝酸銀を入れて 10 分間 UV 下に曝して銀を黒色化させ、5 %チオ硫酸ナトリウムで 2 分間処理した。

6. 抗 Dkk1 抗体の Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路への影響

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化を促進することが報告されている。 β -カテニンは、このシグナルにおいて重要な役割を担っている。シグナルが活性化されて β -カテニンが細胞質内で蓄積されると、核内に移行し、転写因子 TCF/LEF と結合することで標的遺伝子の発現を促す。そこで、抗 Dkk1 抗体が β -カテニンおよび TCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現に及ぼす影響について検討した。図 6 に示す通り、抗 Dkk1 抗体は、 β -カテニンおよび TCF7L2 のタンパク質の発現を Wnt-3a と同様に増加させた。

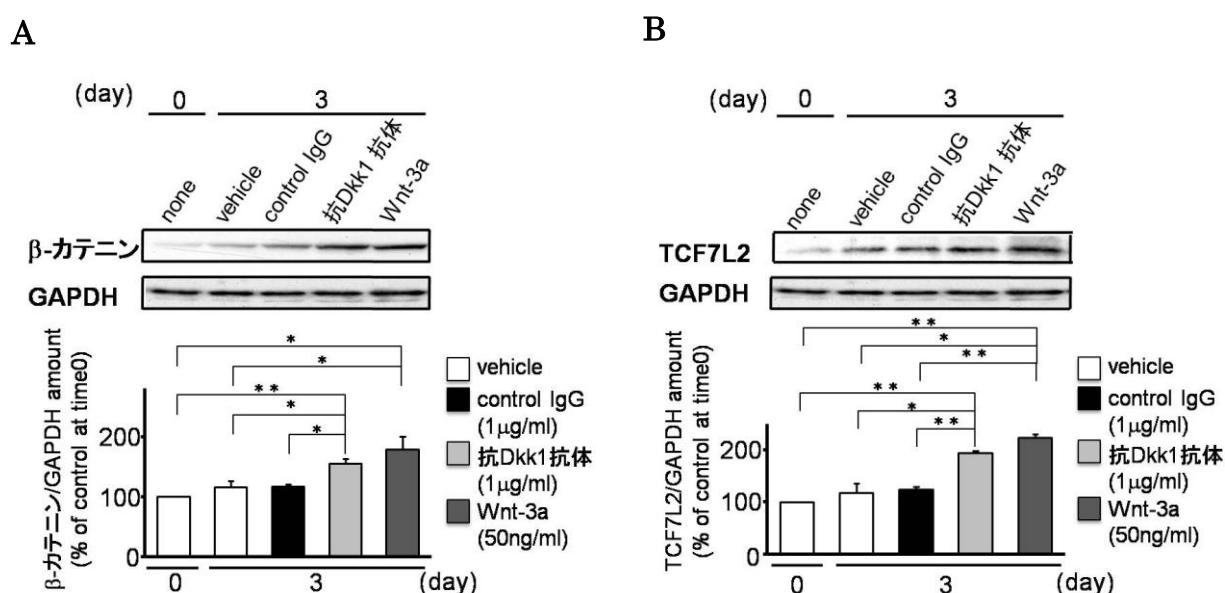


図 6 抗 Dkk1 抗体が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響 (1)

抗 Dkk1 抗体の β -カテニン (A)、TCF7L2 (TCF-4) (B) のタンパク質発現。細胞に抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)を加えて 3 日間培養し、サンプルを回収した。サンプルは 10 %SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗 β -カテニン抗体および抗 TCF7L2 抗体に対してウェスタンブロット法による解析を行った。メンブレンは抗 GAPDH 抗体にてリプローブした。time0 を基準として定量化し、グラフ化した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値 $\pm$ SEM で示した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ (vehicle と比較して one-way ANOVA で検定した。)

次に、抗 Dkk1 抗体が TCF/LEF 転写活性に及ぼす影響を検討した。実験には、TCF 結合部位を含むルシフェラーゼレポータープラスミドである TOPflash および、TCF 結合部位に変異を加えた FOPflash をネガティブコントロールとして使用した。図 7 に示すように、抗 Dkk1 抗体は TOPflash の活性を有意に増加させた。一方、FOPflash の活性には影響を及ぼさなかった。

以上のことから、抗 Dkk1 抗体は β -カテニンおよび TCF7L2 の発現を増加させることにより、TCF/LEF 転写活性を増加させることが示された。すなわち、抗 Dkk1 抗体は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化させることが示唆された。

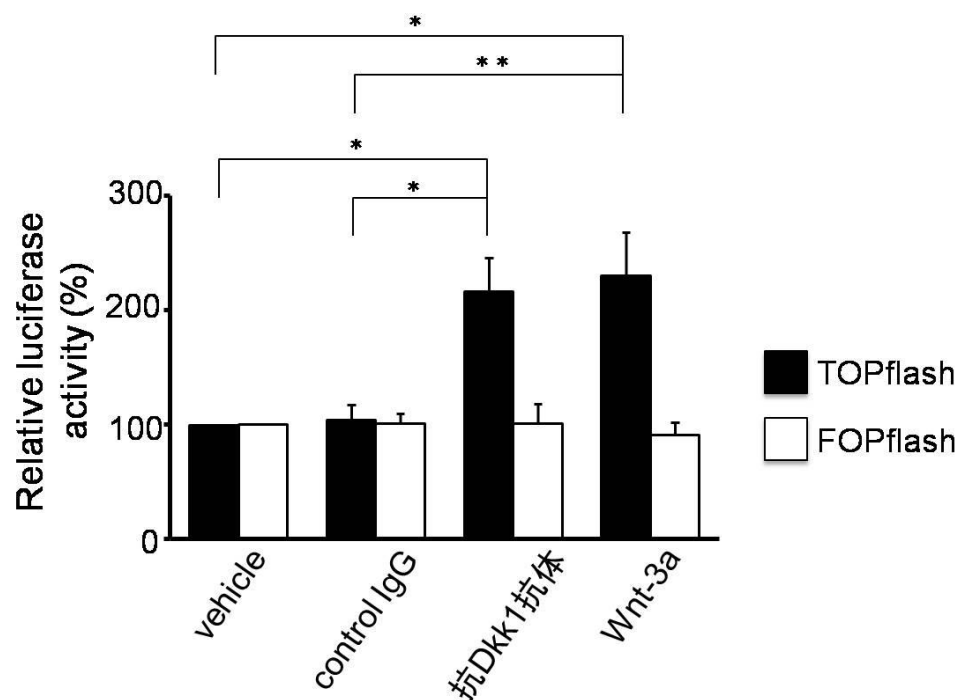


図 7 抗 Dkk1 抗体が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響 (2)

TOPflash、FOPflash を pRL-SV-40 とともに MC3T3-E1 細胞に導入した。24 時間後、抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)を添加し、さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、プラスミドの導入から 48 時間後の vehicle と比較したパーセンテージで示した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値 $\pm$ SEM で示した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ (vehicle と比較して one-way ANOVA で検定した。)

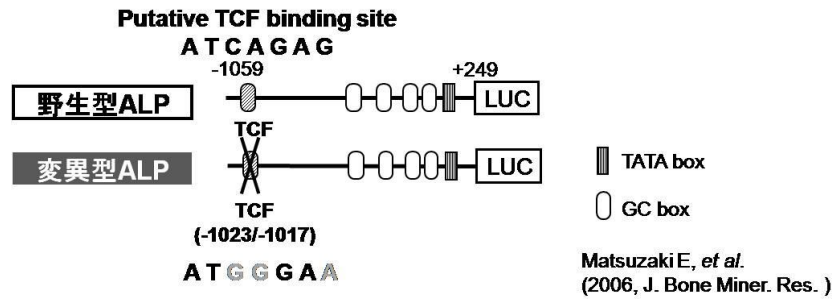
7. 抗 Dkk1 抗体の TCF/LEF 結合部位を介した ALP プロモーター活性に及ぼす影響

ヒト ALP 遺伝子のプロモーター領域に存在する TCF 結合部位 (-1023/-1017) が、ALP の発現に重要であるという知見がある[20]。本研究において、図 2、3 の結果から、抗 Dkk1 抗体が ALP 発現を増加させることが確認された。そこで、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化因子としての抗 Dkk1 抗体が、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響をさらに検討するため、ALP の TCF 結合部位を含んだレポーター遺伝子を用いてその転写活性を解析した。図 8A に使用した ALP レポータープラスミド[20]の構造を示した。図 8B に示すように、Wnt-3a と同様、抗 Dkk1 抗体により野生型 ALP プロモーター活性は、コントロールに比べて増加した。また、Wnt-3a と抗 Dkk1 抗体を同時に添加しても、野生型 ALP プロモーター活性の値は Wnt-3a を単独で添加したものとはほぼ同程度であった。このことから、Wnt-3a と共に抗 Dkk1 抗体を加えても、相加または相乗作用を示さないことが示唆された。

一方、ALP プロモーター領域に含まれる TCF 結合部位に変異を加えた変異型 (ATCAGAG→ATGGGAA) ALP プロモーター活性は抗 Dkk1 抗体の添加により増加しなかった。Wnt-3a の添加でも同様の結果であった。

以上の結果から、抗 Dkk1 抗体は TCF/LEF 結合部位を介して ALP プロモーター活性を増加させることが示唆された。すなわち、図 3 に示した抗 Dkk1 抗体による ALP 遺伝子発現の増加は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化によるものであることが明らかとなった。また、ALP が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であることも再確認された。

A



B

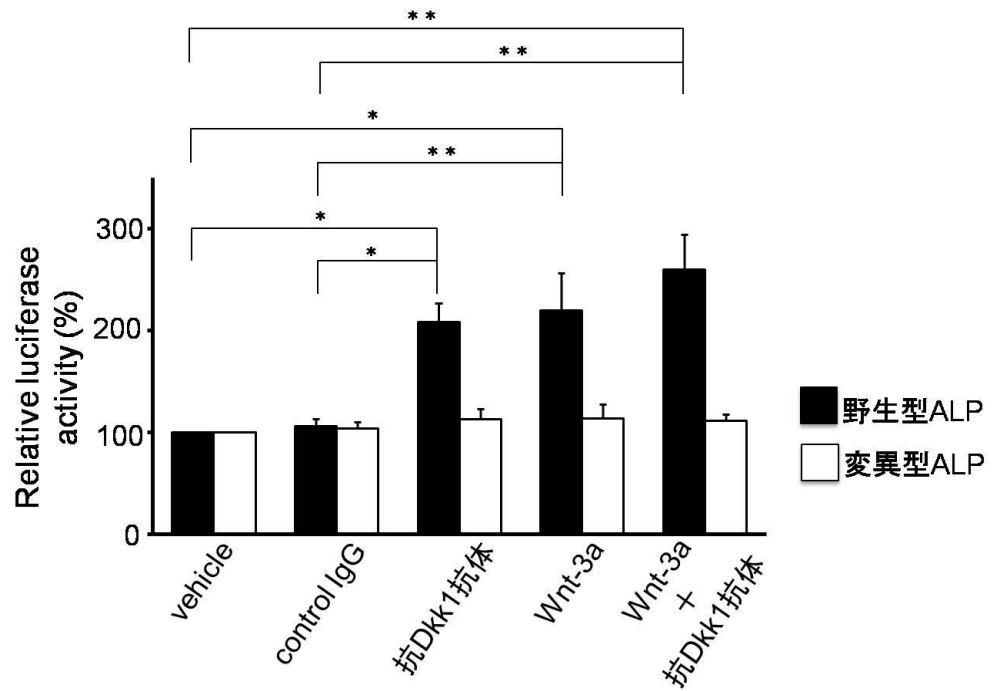


図8 抗 Dkk1 抗体の ALP プロモーター活性に及ぼす影響

A : 野生型および変異型 ALP プロモーターを組み込んだ pGL-3 ベーシック・ベクターの構造。

B : 抗 Dkk1 抗体の ALP プロモーター活性に対する影響。野生型 ALP プロモーターまたは変異型 ALP プロモーターと pRL-SV40 を MC3T3-E1 細胞に導入した。24 時間後、抗 Dkk1 抗体 (1 μ g/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml) を添加し、さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、プラスミドの導入から 48 時間後の vehicle と比較したパーセンテージで示した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値 $\pm$ SEM で示した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ (vehicle と比較して one-way ANOVA で検定した。)

8. Dkk1 siRNA を導入した細胞における Dkk1 抗体の ALP プロモーター活性への影響

次に、抗 Dkk1 抗体の効果をさらに検討するために、MC3T3-E1 細胞への Dkk1 siRNA の導入により内在性の Dkk1 の発現を抑制した。siDkk1 を導入した骨芽細胞が、ALP プロモーター活性に及ぼす影響を検討した。siDkk1 の導入により、MC3T3-E1 細胞の Dkk1 のタンパク質発現が約 70 %に減少した (図 9A)。次に、siDkk1 と ALP レポーターベクターを、MC3T3-E1 細胞に同時導入し、抗 Dkk1 抗体が ALP プロモーター活性に及ぼす影響を検討した。図 8B に示すように、MC3T3-E1 細胞において抗 Dkk1 抗体は野生型 ALP プロモーター活性を増加させたが、siDkk1 の導入により、コントロールである vehicle および IgG、抗 Dkk1 抗体を添加した野生型 ALP プロモーター活性は同程度となった (図 9B)。

さらに、MC3T3-E1 細胞に siDkk1 と ALP レポーターベクターを同時導入し、Wnt-3a 単独または Wnt-3a と抗 Dkk1 抗体の両方を添加し、ALP プロモーター活性を検討した (図 10)。図 8B の結果と同様、MC3T3-E1 細胞において Wnt-3a は野生型 ALP プロモーター活性を増加させた。しかしながら、Wnt-3a と抗 Dkk1 抗体を同時に添加しても、野生型 ALP プロモーター活性は Wnt-3a を単独で添加したものと同程度であった。siDkk1 を導入した野生型 ALP プロモーター活性は vehicle において増加し、Wnt-3a または、Wnt-3a と抗 Dkk1 抗体を同時に添加した野生型 ALP プロモーター活性はさらに増加した (図 10A)。一方、変異型 ALP プロモーター活性はどの条件においても増加しなかった (図 9C、図 10B)。

以上の結果から、siDkk1 の導入は、抗 Dkk1 抗体を添加したものと同様に ALP プロモーター活性を増加させる作用を示すこと、すなわち、抗 Dkk1 抗体は Wnt/ β -カテニン シグナル伝達経路を介して、ALP プロモーター活性を増加させることがわかった。また、siDkk1 の導入と共に抗 Dkk1 抗体を加えても、相加または相乗作用を示さなかった。したがって、抗 Dkk1 抗体の作用は内在性の Dkk1 に特異的に作用していることが示唆された。

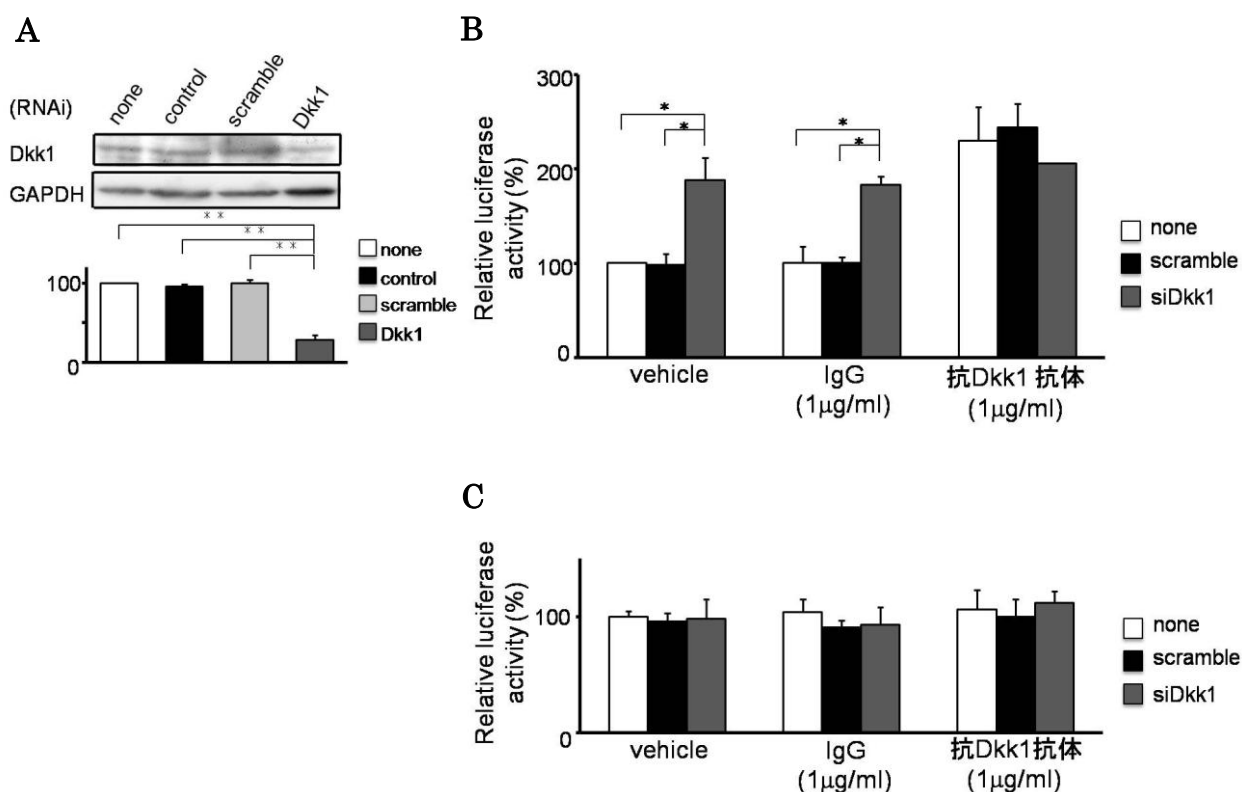
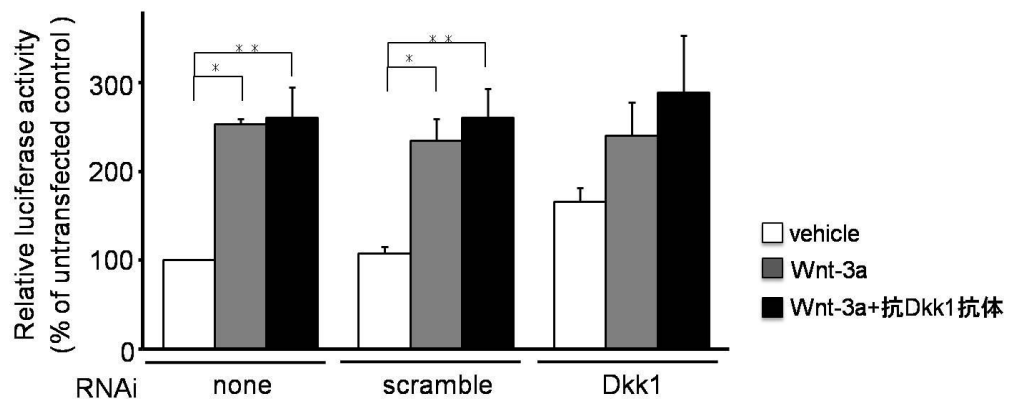


図9 siDkk1を導入した細胞における抗Dkk1抗体のALPプロモーター活性への影響

A : Dkk1 タンパク質発現。siDkk1を導入した細胞を3日後にサンプルとして回収した。サンプルは12 %SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、抗Dkk1抗体に対してウェスタンブロット法による解析を行った。メンブレンは抗GAPDH抗体にてリプローブした。B、C : ALPプロモーター活性。野生型ALPプロモーター (B) または変異型ALPプロモーター (C) とpRL-SV40およびsiDkk1またはscrambleをMC3T3-E1細胞に同時導入した。24時間後、細胞に抗Dkk1抗体 (1 μg/ml)、Wnt-3a (50 ng/ml)を添加し、さらに24時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、プラスミドの導入から48時間後のvehicleと比較したパーセンテージで示した。3回の独立した実験を行い、データは平均値±SEMで示した。*, $p<0.05$, **, $p<0.01$ (one-way ANOVAで検定した。)

A



B

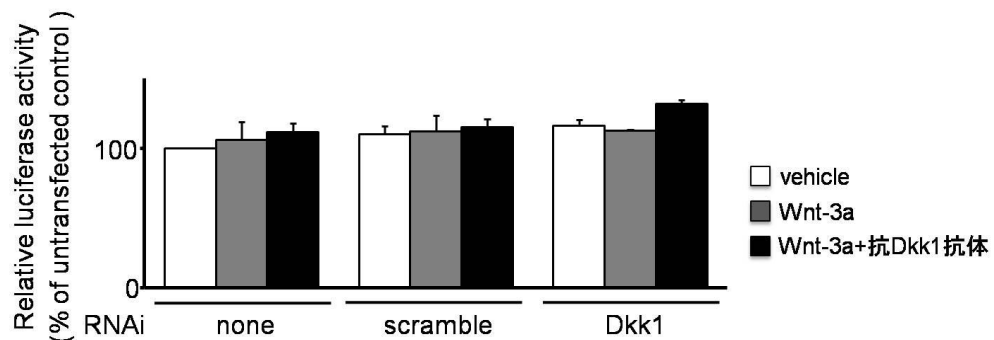


図 10 siDkk1 を導入した細胞における Wnt-3a および抗 Dkk1 抗体の ALP プロモーター活性への影響

A、B：ALP プロモーター活性。野生型 ALP プロモーター（A）または変異型 ALP プロモーター（B）と pRL-SV40 および siDkk1 または scramble を MC3T3-E1 細胞に同時導入した。24 時間後、細胞に Wnt-3a (50 ng/ml)のみ、または Wnt-3a (50 ng/ml)と抗 Dkk1 抗体(1 µg/ml)の両方を添加し、さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、プラスミドの導入から 48 時間後の vehicle と比較したパーセンテージで示した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値±SEM で示した。*, $p<0.05$, **, $p<0.01$ (one-way ANOVA で検定した。)

9. ラット脛骨骨欠損部における抗 Dkk1 抗体の骨形成への影響

骨芽細胞において、抗 Dkk1 抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化して、骨芽細胞分化・石灰化を促進することが見出された。したがって、次に *in vivo* において抗 Dkk1 抗体が骨形成に及ぼす影響について検討した。本実験では、抗 Dkk1 抗体の局所投与を行うこととした。ラット脛骨に作製した骨欠損部に抗 Dkk1 抗体を添加し、新生骨の形成を μ CT で解析した。図 11 に示すように、抗 Dkk1 抗体はコントロールに比べて新生骨の骨形成を促進させた。

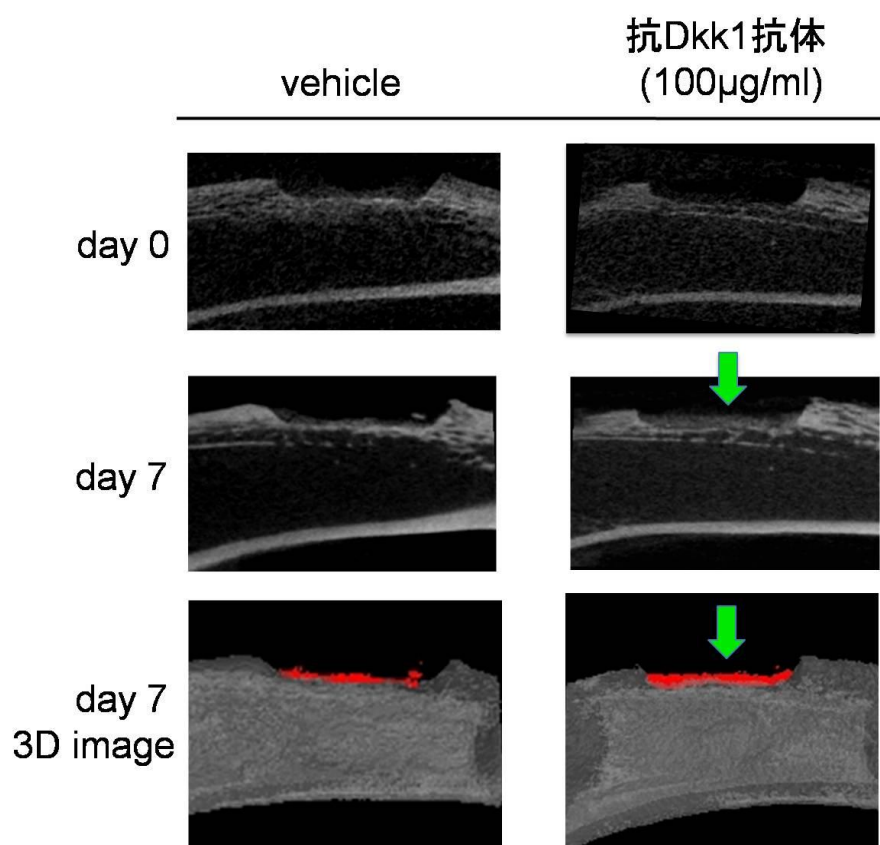


図 11 ラット脛骨骨欠損部における抗 Dkk1 抗体の骨形成への影響

SD ラットの脛骨に作製した骨欠損部に、抗 Dkk1 抗体（100 μ g/ml）を染み込ませたテルプラグを填入して縫合した（day0）。day0、day7 に μ CT を撮影し、新生骨の形成量を解析した。

↓は骨添加部位

考 察

この研究において、抗 Dkk1 抗体が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化により ALP 発現を増加させることを見出した。その結果、骨芽細胞の分化と石灰化が促進されることが明らかとなった。さらに、*in vivo*において、抗 Dkk1 抗体が新生骨の形成を促進させることも確認された。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が ALP 発現を増加させることはすでに知られている[18,19]。Matsuzaki らは、ALP プロモーター領域にある TCF 結合部位が、ALP の発現を調節していることを見出している[20]。それゆえ、抗 Dkk1 抗体の Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響を検討するため、TCF 結合部位を含む ALP レポーター遺伝子を用いて実験を行った。その結果、MC3T3-E1 細胞において、抗 Dkk1 抗体による ALP プロモーター活性の増加に TCF 結合部位が重要な役割を果たしていることを見出した。つまり、抗 Dkk1 抗体が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化し、ALP 発現が増加した。

また、抗 Dkk1 抗体の作用機序をより明らかにするため、抗 Dkk1 抗体と同様の作用、すなわち Dkk1 siRNA を用いた内在的な Dkk1 の発現抑制を試みた。Dkk1 の抑制は、抗 Dkk1 抗体と同様に、ALP プロモーター活性を増加させる作用を示した。また、抗 Dkk1 抗体は、Dkk1 siRNA の導入に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、Dkk1 の阻害は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して ALP の発現を増加させること、また、抗 Dkk1 抗体が Dkk1 に特異的に作用することが明らかとなった。

また、抗 Dkk1 抗体は、MC3T3-E1 細胞において、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子である骨芽細胞分化マーカー (Runx2、OCN) の発現も増加させ、骨芽細胞の石灰化結節形成を促進した。今回の結果と異なり、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、COL1、OCN、Runx2 を含む骨芽細胞の分化マーカーの発現に影響しないとする報告も存在する[18,19,48,49]。しかしながら、Hongling らは、C3H10T1/2 細胞において Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路のアゴニストである Wnt-3a が ALP と同様に COL1 と OCN の

mRNA 発現を増加させると報告している[50]。さらに、Gaur らも、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が TCF 構造を介して Runx2 のプロモーターを活性化すると報告した[21]。加えて、Matsuzaki らの報告から、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の抑制により、COL1、OCN、Runx2 の発現レベルが抑制されることが確認されている[20]。以上の報告は、今回の結果を支持するものである。したがって、抗 Dkk1 抗体は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して、Runx2 と OCN の発現を増加させる可能性があると考えられる。

抗 Dkk1 抗体は、前臨床研究において、多発性骨髄腫における溶骨性骨病変の骨破壊の抑制に効果的であることが示されており[43,44]、抗 Dkk1 抗体は骨再生薬としての可能性を秘めているといえる。しかしながら、Dkk1 は骨組織以外にも発現があり、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化は同時にがんの成長への影響もある。したがって、抗 Dkk1 抗体の臨床応用は、局所投与が望ましいと考えられる[46,47]。骨再生薬は骨組織特異的に Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化するのが理想的である。現在、骨細胞によって分泌され、主に骨組織に発現している Wnt 阻害因子スクレロスチンの中和抗体や低分子阻害剤の開発も行われており、抗 Dkk1 抗体と同じく前臨床治験の結果も得られている。今回の実験において、7 日間の抗 Dkk1 抗体の局所投与により、新生骨の形成が促進されることが確認された。しかしながら、抗 Dkk1 抗体を長期的に局所投与したときの新生骨の形成への影響は検討できていない。抗 Dkk1 抗体の安全性と骨形成効果をより確かにするようなさらなる研究が必要である。

抗 Dkk1 抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して ALP 遺伝子の発現を増加させた。また、抗 Dkk1 抗体は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化することで骨芽細胞の分化、分化した骨芽細胞の石灰化を促進させた。さらに、抗 Dkk1 抗体は、*in vivo* における新生骨の形成を促進させた。今後、歯周疾患等で生じた骨欠損に対して、抗 Dkk1 抗体を骨再生治療薬として臨床応用するために、さらなる研究が必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導ご校閲をいただいた、歯周病学分野 前田 勝正教授に深い感謝の意を表します。

また、実験に際しまして様々なご助言、ご援助いただきました、歯周病学分野 濱地 貴文 講師、松崎 英津子 助教に深く感謝いたします。

さらに、研究生活のご指導、ご助言いただき、あたたかく見守ってくださいました、歯周病学分野の皆様、および研究生活を支えて下さったすべての皆様に心から感謝いたします。

引 用 文 献

- [1] Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N, The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296(5573):1644-1646.
- [2] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303(5663):1483-1487.
- [3] Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* 2007;104(4):293-302.
- [4] Pandur P, Maurus D, Kuhl M. Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *BioEssays* 2002;24:881-884.
- [5] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
- [6] Moon RT, Brown JD, TorresM WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 1997;13:157-162.
- [7] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469-480.
- [8] Bejsovec A. Wnt signaling: An embarrassment of receptors. *Curr Biol* 2000;10:R919-R922.
- [9] Nusse R. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* 1999;15:1-3.
- [10] Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996;10(12):1443-1454.
- [11] Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382(6592):638-642.

- [12] Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86(3):391-399.
- [13] Miller JR, Moon RT Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J Cell Biol* 1997;139(1):229-243.
- [14] Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/b-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 1999;18:7860-7872.
- [15] Balemans W, Van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology* 2007;148(6):2622-2629.
- [16] Bollerslev J, Steiniche T, Melsen F, Mosekilde L. Structural and histomorphometric studies of iliac crest trabecular and cortical bone in autosomal dominant osteopetrosis: a study of two radiological types. *Bone* 1989;10:19-24.
- [17] Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346(20):1513-1521.
- [18] Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, La Combe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. LDL

receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513-523.

[19] Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003;18(10):1842-1853.

[20] Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, Morimoto S, Hirofuji T, Maeda K, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res* 2006;21(8):1307-1316.

[21] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005;280(39):33132-33140.

[22] Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, De Robertis EM. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 1997;88(6):747-756.

[23] Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391(6665):357-362.

[24] Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280(20):19883-7.

[25] Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Izpisua Belmonte JC, Westphal H. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 2001;1(3):423-434.

- [26] MacDonald BT, Adamska M, Meisler MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* 2004;131(11):2543-2552.
- [27] MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, Sharma P, Goldstein SA, He X, Hauschka PV. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone* 2007;41(3):331-339.
- [28] Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med.* 2007;4:e249.
- [29] Wang FS, Ko JY, Lin CL, Wu HL, Ke HJ, Tai PJ. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss: a histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone* 2007;40:485-492.
- [30] Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13:156-163.
- [31] Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2483-2494.
- [32] Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, Shaughnessy JD Jr. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone* 2008;42:669-680.
- [33] Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* 2007;97:964-970.
- [34] Bu G, Lu W, Liu CC, et al. Breast cancer-derived Dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: implication for breast cancer osteolytic bone metastases. *Int J Cancer* 2008;123:1034-1042.

- [35] Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 2005;65:7554-7560.
- [36] Hall CL, Kang S, MacDougald OA, Keller ET. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* 2006;97:661-672.
- [37] Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate* 2008;68:1396-1404.
- [38] Qian J, Xie J, Hong S, et al. Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood*. 2007;110:1587-1594.
- [39] Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007;7:585-598.
- [40] Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood* 2008;112:196-207.
- [41] Giuliani N, Colla S, Morandi F, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood* 2005;106:2472-2483.
- [42] Giuliani N, Rizzoli V. Myeloma cells and bone marrow osteoblast interactions: role in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2007;48:2323-2329.
- [43] Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* 2007;109:2106-2111.

- [44] Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 2009;114:371-379.
- [45] Uehara R, Suzuki Y, Ichikawa Y. Methotrexate (MTX) inhibits osteoblastic differentiation in vitro. *J Rheumatol* 2001;28:251-256.
- [46] Sasaguri T, Ishida A, Kosaka C, Nojima H, Ogata J Phorbol ester inhibits the phosphorylation of the retinoblastoma protein without suppressing cyclin D-associated kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:8345-8351.
- [47] Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Sdi1/Cip1/Waf1} by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997;272:10050-10057.
- [48] Bain G, Muller T, Wang X, Papkoff J. Activated b-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:84-91.
- [49] Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, Rawadi G. Gene array analysis of Wnt regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005;36:585-598.
- [50] Hongliang H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 2005;132:49-60.
- [51] Glantschnig H, Hampton RA, Lu P, Zhao JZ, Vitelli S, Huang L, Haytko P, Cusick T, Ireland C, Jarantow SW, Ernst R, Wei N, Nantermet P, Scott KR, Fisher JE, Talamo F, Orsatti L, Reszka AA, Sandhu P, Kimmel D, Flores O, Strohl W, An Z, Wang F. Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J Biol Chem* 2010;285(51):40135-40147.
- [52] Glantschnig H, Scott K, Hampton R, Wei N, McCracken P, Nantermet P, Zhao JZ, Vitelli S, Huang L, Haytko P, Lu P, Fisher JE, Sandhu P, Cook J, Williams D, Strohl W,

Flores O, Kimmel D, Wang F, An Z. A rate-limiting role for Dickkopf-1 in bone formation and the remediation of bone loss in mouse and primate models of postmenopausal osteoporosis by an experimental therapeutic antibody. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338(2):568-578.