

Sphingosine-1-phosphate induced osteoprotegerin gene expression through PI3K/Akt/GSK-3 β and Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteoblast-like cell lines

平塚, 俊志
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21991>

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：



S1P は PI3K/Akt/GSK-3 β 及び
Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して
OPG 遺伝子発現・骨芽細胞分化を促進する

2011 年

平 塚 俊 志

九州大学大学院歯学府歯学専攻

九州大学大学院歯学研究院

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。

**Sphingosine-1-phosphate induced osteoprotegerin gene
expression through PI3K/Akt/GSK-3 β and Wnt/ β -catenin
signaling pathway in osteoblast-like cell lines**

Shunji Hitratsuka, Etsuko Matsuzaki, Takafumi Hamachi,

Mari Kobayashi, Fumi Takahashi-Yanaga, Yoshitomi Aida, Takao Hirofuji,

and Katsumasa Maeda.

Bone, 2011, submitted

略 語 一 覧

α -MEM : α -minimum essential medium
ALP : alkaline phosphatase
BMP : bone morphogenetic protein
BSA : bovine serum albumin
cDNA : complementary DNA
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO : dimethyl sulfoxide
Dvl : dishevelled
EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β
HSP : heat shock protein
LEF : lymphoid enhancer-binding factor
LRP : low-density lipoprotein receptor-related protein
mRNA : messenger RNA
OPG : osteoprotegerin
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PVDF : polyvinylidene difluoride
RANKL : receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS : sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
S1P : sphingosine-1-phosphate
TCF : T-cell factor
TCF7L2 (TCF4) : T-cell-specific transcriptional factor-7 like 2
TNF : tumor necrosis factor

目 次

要 旨	1
緒 言	3
材 料 と 方 法	6
結 果	13
考 察	28
謝 辞	32
引 用 文 献	33

要 旨

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、主に血漿中に存在する脂質メディエーターで、血管内皮細胞、リンパ球を始め様々な細胞に対して、増殖、運動、形態調節、分化など多彩な作用を及ぼし、シグナル分子としても注目されている。

骨組織は、骨芽細胞による骨新生と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が維持されている。近年、S1P が破骨細胞の分化を抑制することが示されたが、S1P が骨芽細胞の分化や骨形成に及ぼす影響については解明されていない。そこで、本研究では、S1P が骨芽細胞の分化及び OPG 遺伝子発現に及ぼす影響と、そのシグナル伝達経路として、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt/ glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) と、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路との関連について検討した。

実験には、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 とマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。SaOS-2、MC3T3-E1 細胞ともに S1P₁～S1P₅ の全ての S1P 受容体を発現していた。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であり、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングに重要な osteoprotegerin (OPG) 、receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) の発現に対して、S1P は、OPG の mRNA、タンパク質の発現を増加させ、RANKL の mRNA 発現を減少させた。

S1P は、Akt のリン酸化を促進させ、GSK-3 β のリン酸化を阻害した。PI3K の特異的阻害薬である LY294002 は、その作用を阻害したことから、S1P は PI3K/Akt/GSK-3 β を介したシグナル伝達作用を持つことを確認した。また、OPG タンパク質発現は、LY294002 の添加により減少した。一方、GSK-3 β の特異的阻害薬 SB2167632 の添加により、OPG タンパク質発現は増加した。LY294002 及び SB2167632 の添加により、OPG のタンパク質発現は増加し

た。以上の結果から、S1P によるWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子 OPG 発現の増加には、PI3K/Akt/GSK-3 β が関与することが示唆された。次に、S1P がWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響についてさらに検討を行った。S1P は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路における転写因子である TCF の転写活性ならびに TCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現を増加させた。一方、LY294002 は、TCF7L2 のタンパク質発現を減少させた。以上の結果から、S1P は PI3K/Akt/GSK-3 β を介して Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化させ、OPG の遺伝子発現を増加させる可能性が示唆された。

また、S1P が骨芽細胞分化に及ぼす影響についても検討した。S1P は、細胞増殖には影響を与えなかったが、骨芽細胞分化のマーカーであり、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子でもあるアルカリホスファターゼの活性を増加させた。さらに、S1P が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、von Kossa 染色、アリザリンレッド染色を行い検討したところ、S1P は石灰化を促進させた。すなわち、S1P は骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。

この研究は、S1P が、PI3K/Akt/GSK-3 β 及び Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して、骨芽細胞における OPG 遺伝子発現を増加させること、及びS1P が骨芽細胞の分化を促進させることを示した初めての報告である。

緒 言

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) はセラミドから生合成される。セラミドがセラミダーゼによりスフィンゴシンに加水分解され、そのスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによるリン酸化を受けることにより、細胞内で S1P が生成される (1-3)。その後、生成されたS1PはABCトランスポーターを介して細胞外へ放出される。

S1P は、血管内皮細胞、リンパ球をはじめとして様々な細胞に対して、細胞の増殖、運動、形態調節、分化など多彩な作用を及ぼすことが報告されており、細胞膜上に発現している G タンパク質共役受容体 (S1P₁~S1P₅) を介して作用することが明らかにされている (4-6)。その中でも S1P₁ は幅広く様々な細胞に分布し、血管新生の促進に関与するほか、リンパ球の体内移行とリンパ組織におけるリンパ球分布を調節することが明らかにされている (7)。

骨組織は、骨芽細胞による骨新生と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が維持されている。これまでに、S1P と骨組織との関連としては、S1Pが破骨細胞分化のレギュレーターであり、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングに重要な役割を果たすこと (8) が知られていた。さらに近年、破骨細胞前駆細胞において、S1P の受容体である S1P₁ が発現しており、血中 S1P への走化性によって前駆細胞が血中へ再還流すること、その結果、破骨細胞への成熟が阻止されて、骨吸収が抑制されることが報告された (9)。また、破骨細胞が S1P を通じて骨芽細胞前駆細胞をリクルートすることも示されており (10)、S1P が破骨細胞に対する骨吸収抑制だけでなく、骨形成の場でも骨芽細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかしながら、S1P が骨芽細胞に及ぼす影響については未だ解明されていない点が多い。

Wnt シグナル伝達経路は、初期発生から形態形成の種々の段階において重要

な役割を担っており、成人の組織においてもその恒常性維持に不可欠とされている。中でも Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は標準経路として知られ、骨組織においては骨形成や恒常性の維持に深く関わっており、体内の骨量調節に重要なシグナル伝達経路である (11-12)。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路では、Wnt タンパク質が受容体 Frizzled に結合すると、Dishevelled (Dvl) を介して、GSK-3 β は不活性化され、 β -カテニンのリン酸化は回避される。リン酸化されていない β -カテニンは、安定化して細胞質内に蓄積され核内へ移行し、そこで T-cell factor (TCF) /lymphoid enhancer-binding factor (LEF) ファミリーの転写因子と複合体を形成して様々な標的遺伝子の発現を調節する。

これまでに、Wnt タンパク質が、骨芽細胞から成熟した骨細胞へ分化を促すことが示されており、また未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化にも、Wnt タンパク質が必要とされることが示されている (11)。また、Wnt の協働受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) の機能喪失変異が、ヒト及びマウスにおいて骨密度の低下を引き起こすことが報告されており、LRP5 の機能亢進変異では骨密度の増加が起こることが報告されている (12)。さらに Wnt1、Wnt2、Wnt3a などの数種類の Wnt タンパク質は、骨芽細胞前駆細胞である C2C212、C3H10T1/2、ST2 細胞においてアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を増加させることが報告されている (12、13)。

一方、S1P は、S1P 受容体を介して PI3K/Akt 経路を活性化し、GSK-3 β を阻害することが明らかとなっている (15-18)。S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナルと Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路において、GSK-3 β は共通の因子である。

そこで、本研究では、S1P が骨芽細胞の分化および遺伝子発現に及ぼす影響について、特に PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路及びWnt/ β -カテニンシグ

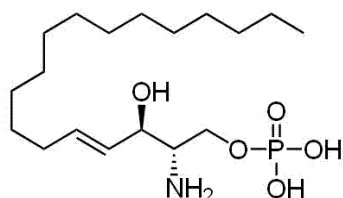
ナル伝達経路との関連に着目して検討を行った。

その結果、S1P は SaOS-2 細胞において、PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル及び Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して、骨吸収抑制因子である OPG の遺伝子発現を増加させた。また、ALP は骨芽細胞分化のマーカーであり、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であるが (13、14)、S1P は ALP の活性を上昇させた。さらに、S1P が骨芽細胞の石灰化を促進させたことから、S1P は骨芽細胞の分化を促進させることが示唆された。

材料と方法

1. 試薬及び抗体

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は BIOMOL 社から購入した。



分子式: $C_{18}H_{38}NO_5P$

分子量: 379

S1P の構造式

モノクローナル抗 GAPDH 抗体は Abcam 社、ポリクローナル抗 phospho-Akt 抗体、ポリクローナル抗 Akt 抗体、ポリクローナル抗 phospho-GSK3 β 抗体、モノクローナル抗 GSK-3 β 抗体は Cell Signaling 社及びモノクローナル抗 TCF7L2 抗体は Millipore 社から購入した。TOPflash (TCF レポータープラスミド) ならびに FOPflash (TOPflash のネガティブコントロール) は Upstate Biotechnology 社から購入した。LY294002 及び SB2167632 は Sigma 社から購入した。

2. 細胞培養

SaOS-2 細胞及び MC3T3-E1 細胞は、37°C、CO₂ 濃度 5 %のインキュベーター中に、10 %ウシ胎児血清 (Invitrogen 社)、100U/ml ペニシリンG (明治製菓)、100 μ g/ml ストレプトマイシン(明治製菓)存在下の Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma社) 及び α -minimum essential medium (Sigma社) にてそれぞれ培養した。

3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

S1P レセプターの発現は RT-PCR 法を用いて半定量的に検出した。SaOS-2 及び MC3T3-E1 細胞を10cm シャーレに 2.0×10^4 個/cm² で播種し、3日間培養した。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。1 μ gのトータルRNA から 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)を用いて cDNA を合成し、RT-PCR 法を行った。反応条件は denature: 94 °C 30 秒、annealing: 55 °C 45 秒、extension: 72°C 30 秒で GAPDH の検出の場合は30サイクル、S1P レセプターの検出の場合は35サイクル行った。PCR プライマーは、GenBank のデータベースに基づいて合成し (表1)、Sigma 社から購入した。

Target gene	Primer sequence forward/reverse	Size of amplified products(bp)
human S1P ₁	5'-ATCATGTCCTGCTGCAAGTG-3' / 5'-AGGAATTGTCCGATTTGCTG-3'	103
human S1P ₂	5'-CCTTCAGCATCCTCCTTCTG-3' / 5'-AGGGAATTCAGGGTGGAGAC-3'	100
human S1P ₃	5'-CAAGCAGCAGCAACAATAGC-3' / 5'-TGAAGTGCTGCGTTCTTGTC-3'	100
human S1P ₄	5'-GTCTTTGGCTCCAACCTCTG-3' / 5'-GCTGCGGAAGGAGTAGATGA-3'	111
human S1P ₅	5'-TCTTCCTGCTGCTGTTGCT-3' / 5'-GCGTGTAGATGATGGGGTTC-3'	123
human GAPDH	5'-AGCCGCATCTTCTTTTGCCTC-3' / 5'-TCATATTTGGCAGTTTTTCT-3'	835
mouse S1P ₁	5'-TCCATGTAAACTGGGTCAAG-3' / 5'-AAAGGTGCTGTAGGGGTTAG-3'	295
mouse S1P ₂	5'-TTTTAAAATTGGGACAGGGT-3' / 5'-TTCTCCACAGGATTTAGCAA-3'	257
mouse S1P ₃	5'-ATGGCATTGCTCTTGTTTA-3' / 5'-TATTTTTCCCTTAACCCAGC-3'	239
mouse S1P ₄	5'-AACTGTGGGTATGACTCTGG-3' / 5'-ATACAGTTGGAACAGTTGGG-3'	189
mouse S1P ₅	5'-CTAGGTCTGGAAATTTGGCT-3' / 5'-AACTGAAGTTGCCAGAATCA-3'	319
mouse GAPDH	5'-CTAGGTCTGGAAATTTGGCT-3' / 5'-AACTGAAGTTGCCAGAATCA-3'	431

表 1 RT-PCR法に用いたプライマーの配列

4. Real-time RT-PCR

OPG 及び RANKL の mRNA の発現は real-time RT-PCR 法を用いて定量的に検出した。SaOS-2 細胞を10cm シャーレに 2.0×10^4 個/cm² で播種し、その翌日に S1P (100 nM) を添加した (time0)。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。3 μ gのトータル RNA から 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 社)を用いて cDNA を合成し、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。PCR の反応は、denature: 95°C 5秒、annealing: 60°C 30秒、extension: 72°C 30秒の工程を40サイクル繰り返した。GAPDH を内部コントロールとして使用し、OPG、RANKL の発現は delta-delta Ct 値から算出した。PCR プライマーは、GenBank のデータベースに基づいて合成し(表2)、Sigma 社から購入した。

Target gene	Primer sequence forward/reverse	Size of amplified products(bp)
human OPG	5'-GGCAACACAGCTCACAAGAA-3' / 5'-CGCTGTTTTACAGAGGTCA-3'	117
human RANKL	5'-AGAGCGCAGATGGATCCTAA-3' / 5'-TTCCTTTTGCACAGCTCCTT-3'	180
human GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' / 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	137

表 2 Real-time RT-PCR 法に用いたプライマーの配列

5. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

SaOS-2 細胞を24穴プレートに 2.0×10^4 個/well で播種した。上清を抽出し、OPG・ELISA Kit (BIOMEDICA 社) を用いてメディウム中への OPG タンパク質の分泌量を測定した。データはマイクロプレートリーダー(BIORAD 社) を用いて解析した。

6. OPG レポーター遺伝子

ヒトゲノム OPG プロモーターを転写開始部位からさかのぼり、5'末端の -1309 bp から +205 bp を制限酵素 Kpn I ならびに Bgl II (Takara Bio 社) によって、それぞれ GGTAC 及び GATCT の部位で切断した。目的サイズの DNA を、電気泳動後にゲルから抽出して精製した。精製した DNA は、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターである pGL-3 ベーシック・ベクター (Promega 社) にライゲーションした。

7. ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性測定

SaOS-2 細胞を24穴プレートに 4.0×10^4 個/well で播種した。細胞には、プラスミド DNA である OPG pGL-3、TOPflash、FOPflash (Upstate Biotechnology 社)、及び遺伝子導入の効率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 (Toyo Ink Manufacturing Co. 社) を、リポフェクトアミンプラス試薬 (Invitrogen 社) を用いてプロトコールに従い導入した。導入3時間後、メディウム交換を行い、24時間インキュベートした (37°C、CO₂ 5%)。その後 S1P を添加し、さらに24時間インキュベートした (37°C、CO₂ 5%)。Lysis Buffer (Promega 社) を用いてサンプルを回収した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) 及びルミノメーター

(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。

8. ウェスタンブロッティング

SaOS-2 細胞を6穴プレートに 4.0×10^5 個/well で播種した。サンプルは 2× Sample Buffer を用いて回収した。Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BIORAD 社) を用いてタンパク質濃度が10 µgになるように調整した。サンプルは、10%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、PVDF メンブレン (Millipore 社) にセミドライ式でトランスファーを行った (16 V、1時間)。モノクローナル抗 GAPDH 抗体は1:1000、モノクローナル抗 GSK-3β 抗体、抗 TCF7L2 抗体、ポリクローナル抗 phospho-GSK3β 抗体、抗 phospho-Akt 抗体、抗 Akt 抗体は1:1500の希釈率になるように Can Get Signal Solution1 (TOYOBO 社) で希釈して用いた。1次抗体がモノクローナル抗体の場合は室温で1時間反応させ、ポリクローナル抗体の場合は4 °Cで一晩反応させた。その後、TBS-T でメンブレンの洗浄を行い、2次抗体として、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、室温で1時間反応させた。次に TBS-T で洗浄を行い、メンブレン上の免疫反応タンパク質の検出は、検出試薬 LumiGLO (Cell Signaling 社) を用いて行った。結果は、デンストメーターでスキャンし、解析ソフト ImageJ を用いて検出バンドをグラフ化した。

9. 細胞数の計測

SaOS-2 及び MC3T3-E1 細胞を24穴プレートに 1.0×10^4 個/well で播種し、翌日 0-1000 nM の S1P を添加した (time0) 。細胞はトリプシン/EDTA (Invitogen 社) 処理で回収し、ワンセルセルカウンター (和研薬株式会社) を用いて計数した。

10. ALP 活性の測定

SaOS-2 及び MC3T3-E1 細胞を24穴プレートに 2.0×10^4 個/well で播種し、翌日に 0-1000 nM の濃度の S1P を添加した (time0) 。培養した細胞は、PBS (Invitogen 社) にて洗浄後、トリプシン/EDTA 処理で回収した。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 社) を用いた。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 社) 、2 mM 塩化マグネシウム (Wako 社) 、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15-60分保温した後、波長405 nmでマイクロプレートリーダー (BIORAD 社) を用いて吸光度を測定した。ALP 活性測定の結果は、タンパク質濃度で補正しグラフ化した。

11. アリザリンレッド染色

SaOS-2 細胞を24穴プレートに 5.0×10^4 個/well で播種し、コンフルエントに達してから S1P (100 nM) を添加した。また、石灰化メディウムとして、アスコルビン酸 (50 μ g/ml; Wako 社) 及び β -グリセロリン酸 (2 mM; Wako社) を使用して、21日間培養した。細胞は、10%ホルムアルデヒドを用いて室温で60分間固定し、アンモニア水溶液 (Wako 社) にてpH 6.3~6.4 になるように調整した1%アリザリンレッドS 水溶液 (Wako 社) を加え、5分間染色した後、

水洗した。

12. von Kossa 染色

MC3T3-E1 細胞を24穴プレートに 5.0×10^4 個/well で播種し、コンフルエントに達してから S1P (100 nM) を添加した。また、石灰化メディウムとして、アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g/ml}$) 及び β -グリセロリン酸 (2 mM) を使用して、21日間培養した。なお、石灰化メディウムは4日毎に交換した。細胞は、10%ホルムアルデヒド (Wako 社) を用いて室温で30分間固定し、5% 硝酸銀水溶液 (Wako 社) を加え、20分間 UV を照射させた。その後5% チオ硫酸ナトリウム (Wako 社) で2分間処理し、黒化を停止させた。

結 果

1. SaOS-2 細胞及び MC3T3-E1 細胞における S1P 受容体の発現

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の作用の多くは細胞膜上に発現している5つの G タンパク質共役受容体である S1P₁~S1P₅ を介することが明らかにされている (4-6)。

S1P₁ は全身の様々な臓器、組織に広範に発現し、S1P による作用は、主としてこの受容体を介することが知られており、現在までに、細胞遊走促進 (7)、血管新生 (19)、リンパ球動態の調節 (7、20、21)、神経系発生 (7)、破骨細胞分化制御 (9) などに関与することが明らかになってきている。

本研究では、まず RT-PCR 法を用いて SaOS-2 細胞及び MC3T3-E1 細胞上に発現する S1P 受容体を確認した。

SaOS-2 細胞及び MC3T3-E1 細胞ともに、S1P₁~S1P₅ の全ての S1P 受容体を発現していることが確認された。また、中でも S1P₁ が強く発現していた。

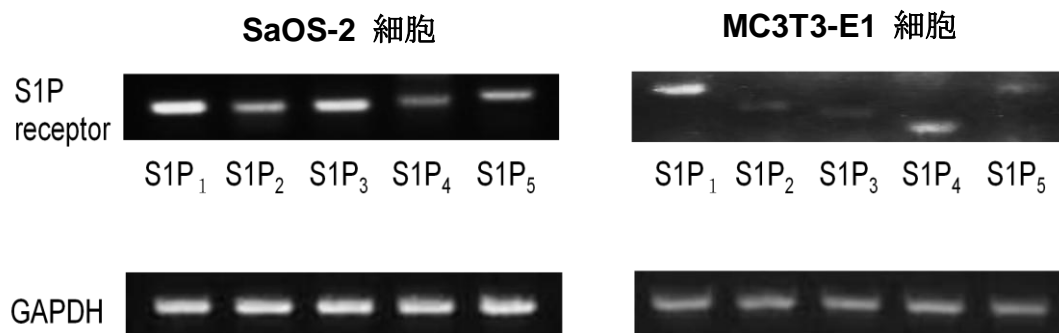


図1

SaOS-2 細胞及び MC3T3-E1 細胞における S1P レセプターの発現

S1P レセプターの mRNA 発現は RT-PCR 法を用いて半定量的に検出した。細胞は 10 cm シャーレに 2.0×10^4 個/cm² で播種した。翌日に S1P (100 nM) を添加し、この時を time0 とした。3日間培養し、S1PレセプターのmRNAの発現は、トータルRNAからcDNA を作製し、半定量的RT-PCR法を用いて検出した。3回の独立した実験を行った。

2. SaOS-2 細胞において S1P が OPG および RANKL の発現に及ぼす影響

骨組織は、骨芽細胞による骨新生と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が維持されている。近年、S1P が破骨細胞の分化を抑制する作用が見出された (9)。そこで、骨芽細胞、破骨細胞のカップリングに重要であり、また骨芽細胞分化に重要な Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子でもある OPG (22)、及び RANKL (23) の mRNA 発現に対する S1P の影響を検討した。

図2 に示すように S1P はコントロールに比べて、OPG の mRNA 発現を増加させ、RANKL の mRNA 発現は減少させた。

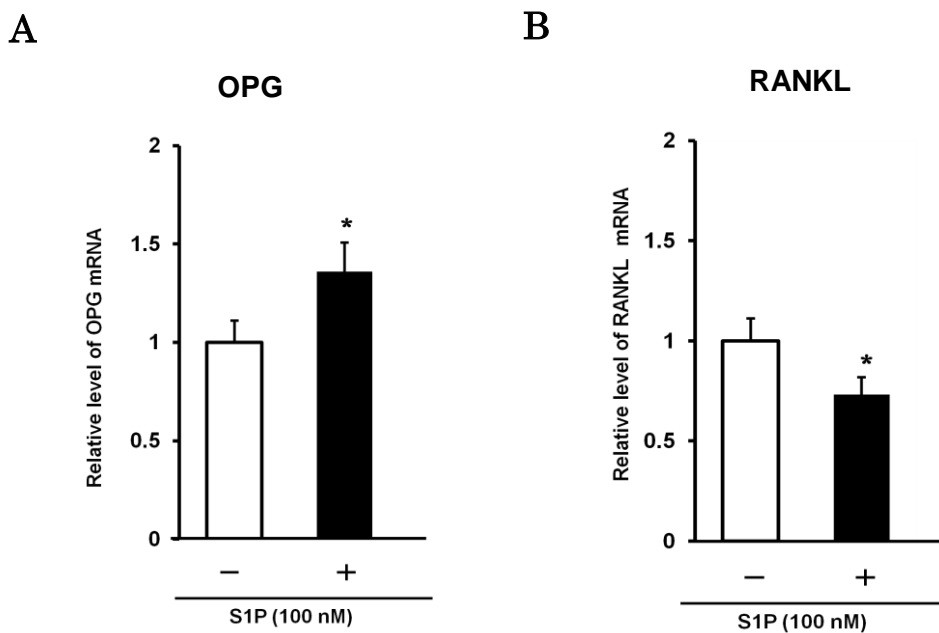


図2

S1P が SaOS-2 細胞において OPG 及び RANKL の mRNA 発現に及ぼす影響

A) OPG、B) RANKL

SaOS-2 細胞は 10 cm シャーレに 2.0×10^4 個/cm² で播種した。翌日に S1P (100 nM) 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、トリゾール試薬を用いて total RNA を抽出した。total RNA を cDNA に変換し、mRNA の発現量を real-time RT-PCR 法を用いて解析した。mRNA の発現量はコントロールを基準として比較した。3 回の独立した実験を行い、データは平均値 \pm S.E. で表示した。*, $p < 0.05$, vs. コントロール。

(コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

3. S1P が OPG 遺伝子発現に及ぼす影響

次に、S1P の添加により mRNA の発現増加が認められた OPG のタンパク質発現に対する S1P の影響を検討した。S1Pによる明確な濃度依存性はなかったものの、S1P は OPG のタンパク質発現を増加させた(図3A)。さらに、ヒト OPG プロモーター領域を組み込んだ OPG レポーター遺伝子を作成し、S1P がヒト OPG プロモーター活性に及ぼす影響について検討した。図3B に示したとおり、S1P は、コントロールに比べて OPG プロモーター活性を増加させた。

以上の結果から、S1P は、タンパク質発現及び OPG のプロモーター活性を増加させることが明らかとなった。

A

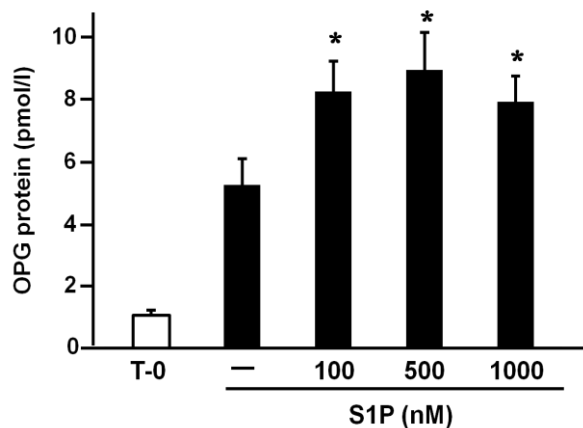


図3

S1P がOPG 遺伝子発現に及ぼす影響

A) S1Pが OPG のタンパク質発現に及ぼす影響

SaOS-2 細胞を24穴プレートに 2.0×10^4 個/well で播種し、図に示したS1P (100-1000 nM) を添加し、3日間培養した。その後上清を抽出し、OPG・ELISA Kit を用いてELISA 法による解析を行った。3回の独立した実験を行い、データは平均値 \pm S.E.で表示した。

*, $p < 0.05$, vs.コントロール。

(コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

B

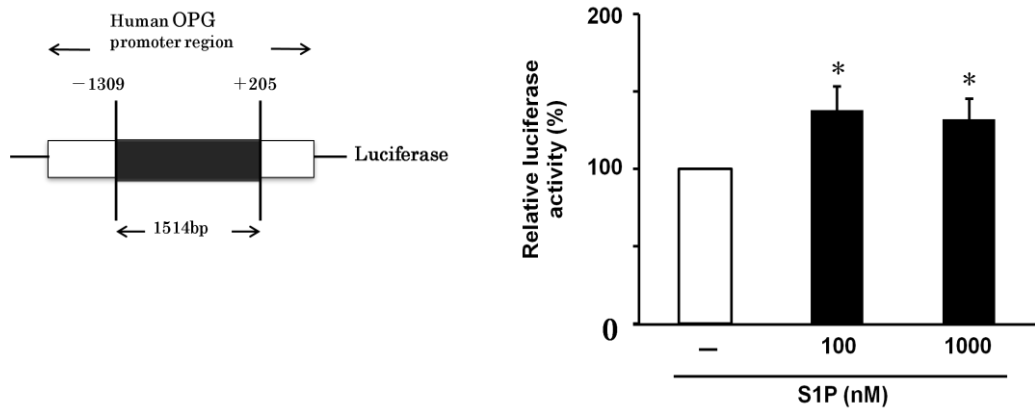


図3

B) S1P が OPG プロモーター活性に及ぼす影響

i) ヒト OPG プロモーター領域を組み込んだ pGL-3 ベーシック・ベクターの構造。

ii) OPG プロモーター活性: SaOS-2 細胞は24穴プレートに 4.0×10^4 個/well で播種した。pRL-SV-40 とともに、OPG レポーター遺伝子を細胞に導入した。24時間後、S1P (100, 1000 nM) を添加し、その後24時間培養した。ルシフェラーゼ活性はコントロール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 S.E. で表示した。

*, $p < 0.05$, vs. コントロール。

(コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

4. S1P が PI3K/Akt/ GSK-3 β シグナルに及ぼす影響

これまでに S1P は G タンパク質共役受容体 (S1P₁~S1P₅) を介して、PI3K/Akt シグナルを活性化し、GSK-3 β の活性を阻害することが報告されている(16-18)。そこで、S1P がPI3K/Akt シグナルに及ぼす影響について検討した。

Akt は473位のセリンのリン酸化により活性化することが示されている。図4に示すように、S1P は473位のセリンのリン酸化を促進させた。すなわち、S1P は Akt を活性化した。また、PI3K の特異的阻害薬である LY294002 により、Akt のリン酸化は顕著に抑制された。この結果から、S1P は、PI3K/Akt シグナル経路を活性化することが確認された。

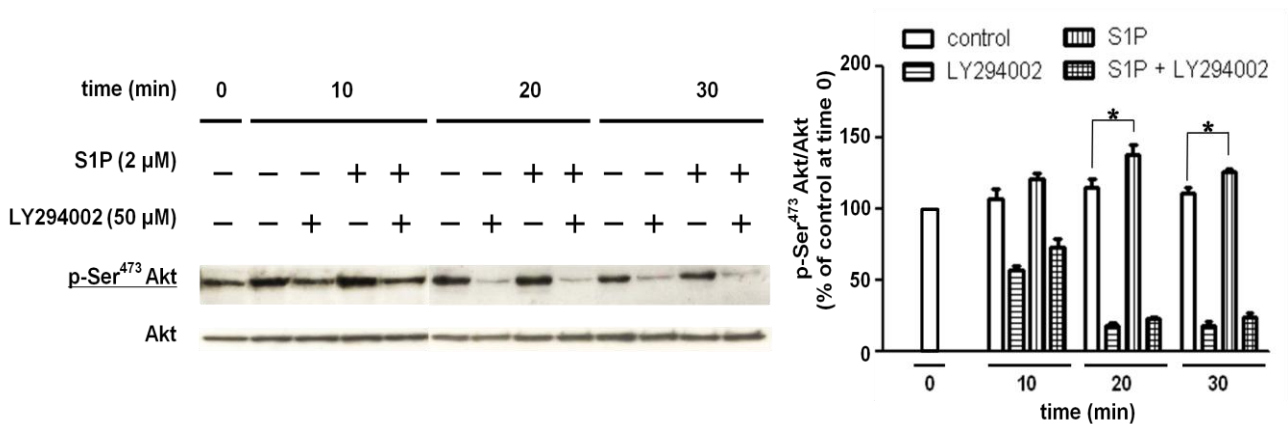


図4

S1P がAkt のリン酸化に及ぼす影響

SaOS-2 細胞を6穴プレートに 4.0×10^5 個/well で播種し、2日間培養した。その後、LY294002 (50 μ M) もしくはDMSO (コントロール;sigma 社) で2時間前処理した細胞に、S1P (2 μ M) もしくは

BSA (Invitrogen 社)を添加した。図に示した時間で培養し、2 \times sample Buffer を用いてサンプルを回収した。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 phospho-Akt 抗体を用い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 Akt 抗体にてリプローブした。検出したバンドは定量化して、time0 のコントロール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 S.E.で表示した。

*, $p < 0.05$, vs.コントロール。(コントロールと比較してStudent's t-testで検定した。)

次に、PI3K/Akt シグナル伝達経路の下流にあるGSK-3 β に対して、S1P が及ぼす影響について検討した。GSK-3 β は恒常的に活性化しており、9位のセリンのリン酸化により活性が阻害されることが示されている。図5に示すように、S1P はGSK-3 β の9位のセリンのリン酸化を促進させた。すなわち S1P はGSK-3 β を阻害した。また、PI3K の特異的阻害薬である LY294002 を用いると、GSK-3 β のリン酸化が顕著に抑制された。これらの結果から、S1P は、PI3K/Akt シグナル伝達経路を介してGSK-3 β を阻害することが示唆された。

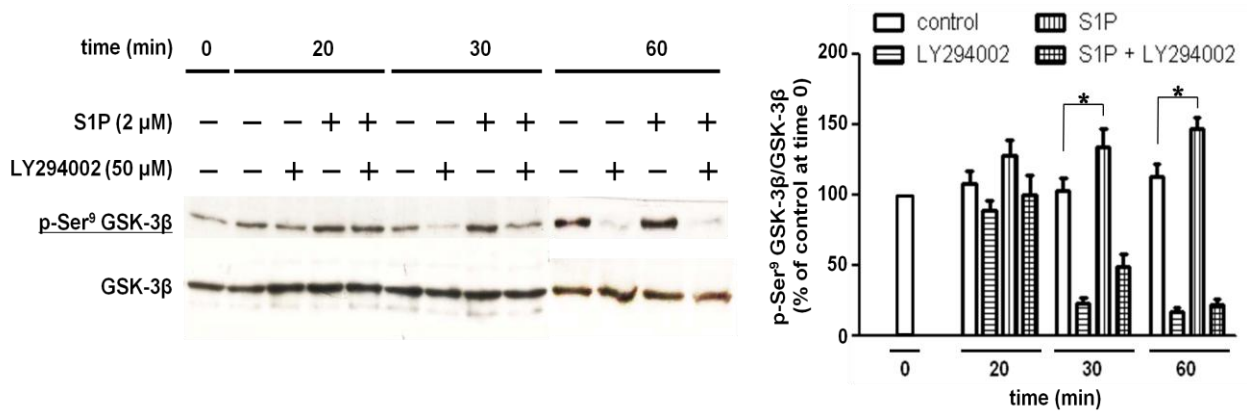


図5

S1P が GSK-3 β のリン酸化に及ぼす影響

LY294002 (50 μ M) もしくはDMSO (コントロール) で2時間前処理したSaOS-2 細胞に、S1P (2 μ M) もしくはBSA を添加した。図に示した時間で培養し、細胞からサンプルを回収した。抗 phospho-GSK-3 β 抗体を用い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 GSK-3 β 抗体にてリプローブした。検出したバンドは定量化して、time0 のコントロール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 S.E.で表示した。*, p<0.05, vs.コントロール (コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

5. S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が OPG のタンパク質発現に及ぼす影響

図2、3で、S1P の添加により発現増加が認められた OPG に対して S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が及ぼす影響について検討した。図6に示すように、OPG のタンパク質発現は、LY294002 の添加により顕著に抑制された。一方、GSK-3 β の特異的阻害薬である SB216763 の添加により、OPG のタンパク質発現は増加した。さらに、LY294002 及び SB216763 の添加により、OPG のタンパク質発現は増加したことから、S1P による OPG 発現の増加には PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が関与することが示唆された。すなわち、S1Pは、PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路を介して OPG の発現を増加させた。OPGは Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であると報告されていることから (22) 、S1P は PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路を介して、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に影響を及ぼす可能性が示唆された。

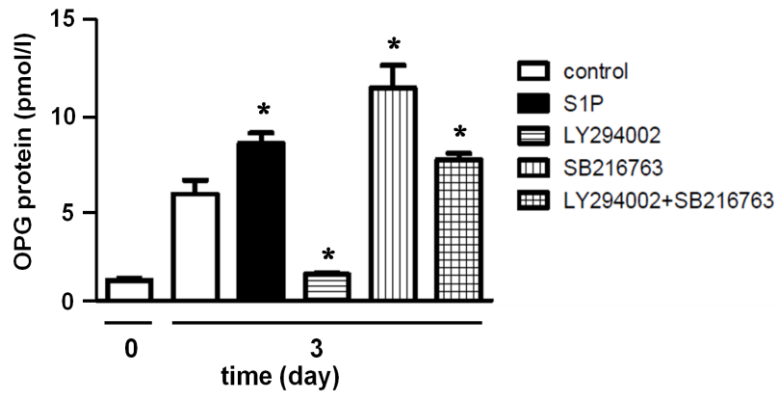


図6

S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナルが OPG のタンパク質発現に及ぼす影響

SaOS-2 細胞を24穴プレートに 2.0×10^4 個/well で播種し、翌日に LY294002 (20 μ M)、SB216763 (20 μ M)、S1P (100 nM) をそれぞれ添加した。この時を time0 とし、3日間培養した。なお、LY294002 (20 μ M)、SB216763 (20 μ M) 共に添加したものは3時間前に SB216763 (20 μ M) で処理を行い、その後 LY294002 (20 μ M) を添加した。上清を抽出し、OPG・ELISA Kit を用いてELISA 法による解析を行った。3回の独立した実験を行い、データは平均値 \pm S.E.で表示した。*, $p < 0.05$, vs.コントロール (コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

6. S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響

次に、S1P が OPG 発現を増加させるメカニズムを解明するため、S1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響について検討を行った。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路において、GSK-3 β の阻害により、リン酸化を回避された β -カテニンは、安定化して細胞内に蓄積し、核へ移行して TCF/LEF ファミリーの転写因子と複合体を形成し、様々な標的遺伝子の発現を調節する (11、24、25)。そこで、TCF の転写活性、ならびにTCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現に対するS1P/PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路の影響を検討した。

TCF 転写活性に対する影響は、TCF 結合部位を有するルシフェラーゼレポータープラスミドである TOPflash ならびに、その TCF 結合部位にミューテーションをおこした FOPflash を用いて検討した。図7に示したとおり、TOPflash の活性は S1P を添加した細胞では著しく増加した。一方 FOPflash の活性には、S1P は有意な影響を及ぼさなかった。

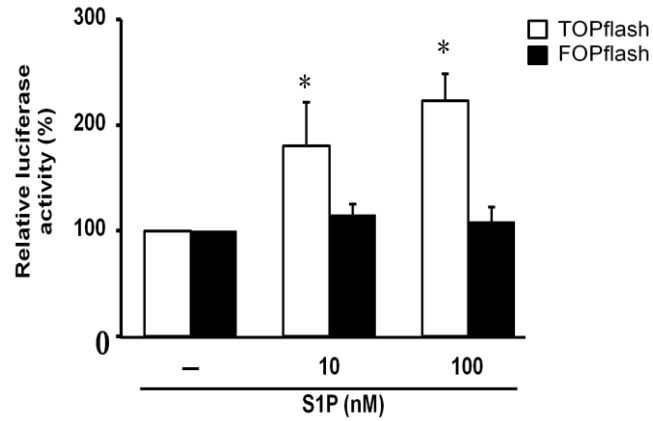


図7

S1P が TCF 転写活性に及ぼす影響

SaOS-2 細胞は24穴プレートに 4.0×10^4 個/well で播種し、2日間培養した。TOPflash、FOPflash を pRL-SV-40 とともに、細胞に導入した。24時間後、細胞に S1P (10, 100 nM) を添加し、その後24時間培養した。ルシフェラーゼ活性は、S1P 添加から24時間後のコントロール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 S.E.で表示した。*, $p < 0.05$, vs.コントロール (コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

また、図8A に示すように S1P はTCF7L2 のタンパク質発現を増加させた。興味深いことに、LY294002 の添加により TCF7L2 の発現は顕著に抑制された。一方、SB216763 の添加により、TCF7L2 のタンパク質発現は増加した (図8B)。

以上の結果から、S1P は、PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路を介して Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化していることが示唆された。

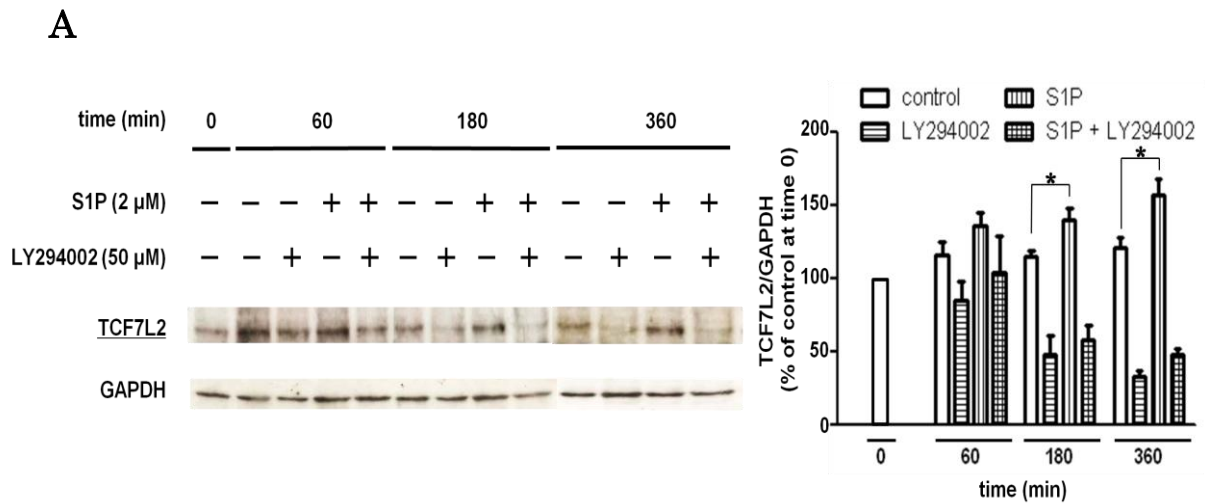


図8

S1P がTCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現に及ぼす影響

A) LY294002 (PI3K 阻害剤) が TCF7L2 発現に及ぼす影響

SaOS-2 細胞を6穴プレートに 4.0×10^5 個/well で播種し、2日間培養した。

LY294002 (50 μ M) もしくは DMSO (コントロール) で2時間前処理した細胞に、S1P (2 μ M) もしくはBSA を添加した。図に示した時間で培養し、細胞からタンパク質を回収した。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 TCF7L2 抗体を用い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。検出したバンドは定量化して、time0 のコントロール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 S.E.で表示した。*, $p < 0.05$, vs.コントロール (コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

B

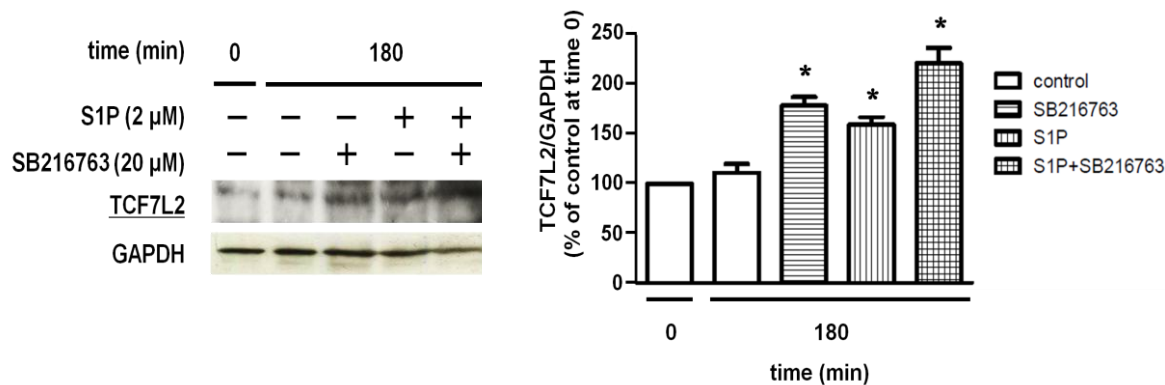


図8

B) SB216763 (GSK-3 β 阻害剤) がTCF7L2 発現に及ぼす影響

SaOS-2 細胞を6穴プレートに 4.0×10^5 個/well で播種し、2日間培養した。SB216763 (20 μ M) もしくは DMSO (コントロール) で2時間前処理した細胞に、S1P (2 μ M) もしくは BSA を添加した。図に示した時間で培養し、細胞からタンパク質を回収した。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 TCF4 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。検出したバンドは定量化して、time0 のコントロール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 S.E.で表示した。*, $p < 0.05$, vs.コントロール (コントロールと比較して Student's t-test で検定した。)

7. S1P が骨芽細胞の増殖と分化に及ぼす影響

さらに、S1P がSaOS-2 及びMC3T3-E1 の細胞増殖及び分化に及ぼす影響について検討した。図9A に示す通り、S1P は、細胞増殖には影響しなかった。

次に、S1P が骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討した。ALP は骨芽細胞の分化マーカーとして広く用いられており、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子 (13, 14) でもある。そこで、S1P がALP 活性に及ぼす影響について検討した。図9B に示すようにコントロールに比べ S1P は ALP 活性を増加させた。また S1P の濃度依存による有意差は認められなかった。S1P は骨芽細胞において、細胞増殖よりも分化に対して影響を及ぼすことが示唆された。

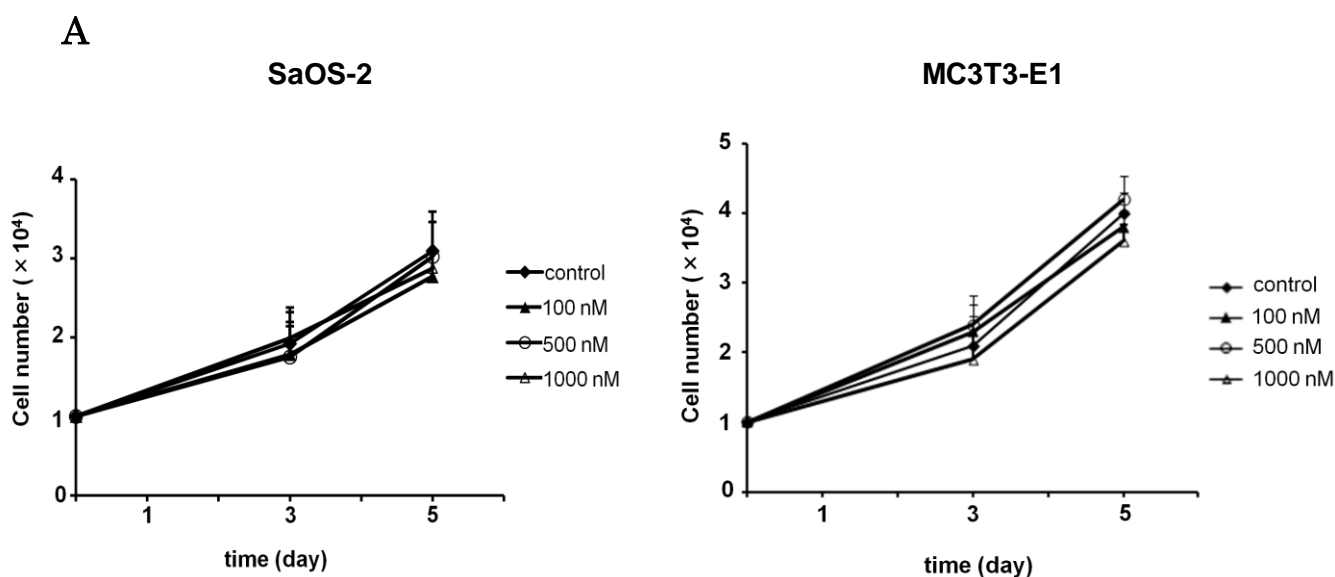


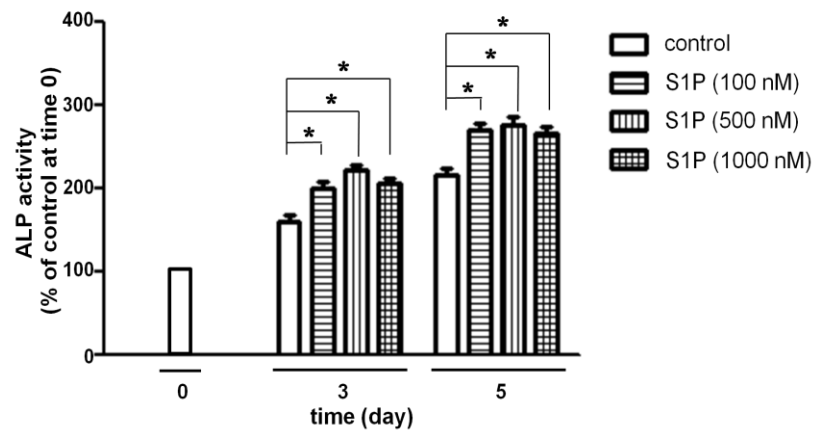
図9

A) S1Pが骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響

SaOS-2 及び MC3T3-E1 細胞は24穴プレートに 1.0×10^4 個/well で播種し、翌日図に示した濃度 (100-1000 nM) のS1Pを添加し、このときを time0 とし、3日及び5日間培養した。細胞はトリプシン/EDTA 処理を行い回収し、細胞数をセルカウンターにて計測した。

B

SaOS-2



MC3T3-E1

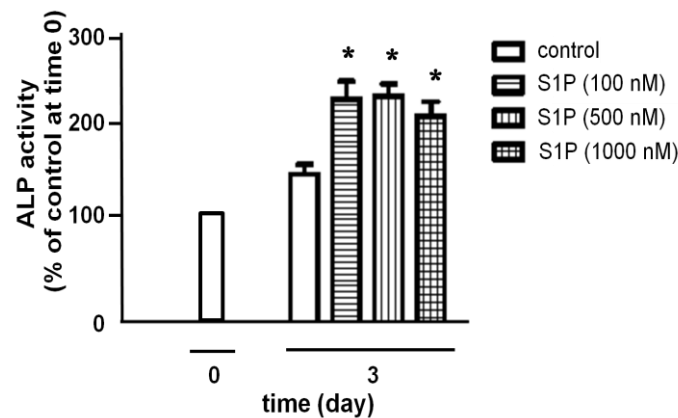


図9

B) S1Pが骨芽細胞のALP活性に及ぼす影響

SaOS-2 及び MC3T3E-1 細胞は24穴プレートに 2.0×10^4 個/well で播種し、翌日図に示した濃度 (100-1000 nM) の S1P を添加し、この時を time0 とし、3日及び5日間培養した。細胞はトリプシン/EDTA 処理を行い回収し、ALP 活性を測定した。ALP 活性測定の結果は、タンパク質濃度で補正し、time0 のコントロール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 S.E.で表示した。*

p<0.05, vs.コントロール

(コントロールと比較してStudent's t-testで検定した。)

次に、S1P が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、アリザリンレッド染色および von Kossa 染色を用いて検討した。図10に示すようにコントロールに比べ、S1P は骨芽細胞の石灰化を促進させた。以上の結果から、S1P は骨芽細胞の分化を促進させることが示唆された。

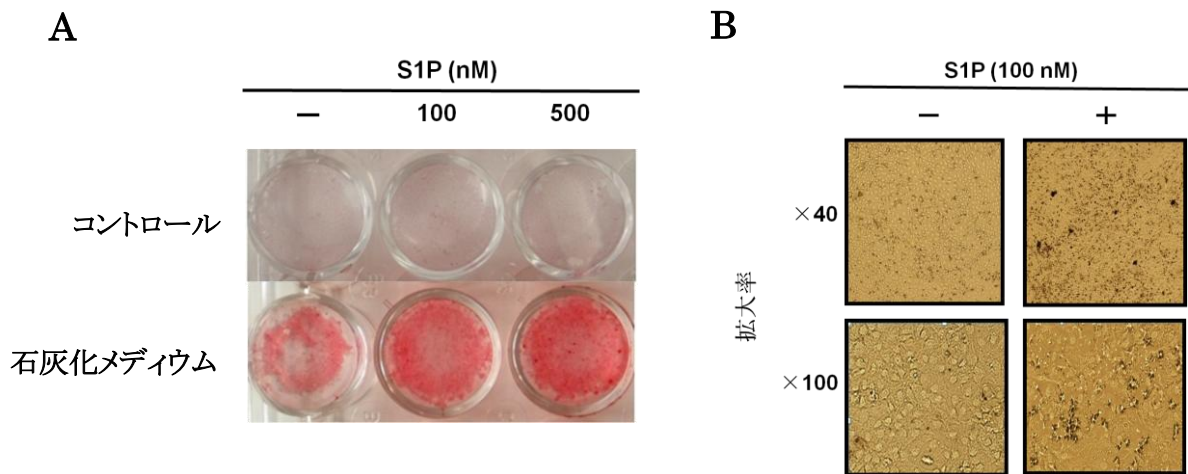


図10

S1P が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響

A) アリザリンレッド染色 (SaOS-2 細胞)、B) von Kossa 染色 (MC3T3-E1 細胞)

細胞は24穴プレートに 5.0×10^4 個/well で播種し、コンフルエントに達してから図に示した濃度 (100, 500 nM) のS1P及び石灰化メディウム[アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 β -グリセロリン酸 (2 mM)]を添加して21日間培養した。3回の独立した実験を行った。

考 察

本研究において、S1P が骨芽細胞において、OPG 遺伝子の発現を増加させること、また骨芽細胞の分化及び石灰化を促進させることを見出した。これは、S1P が PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路及び Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して、OPG 遺伝子発現を増加させること、及びS1Pが骨芽細胞の分化を促進させることを示した初めての報告である。

S1P₁～S1P₅ の5つの S1P 受容体が発見されたことにより、現在幅広く S1P の研究が進められており、S1P がリンパ球移行とその再循環、血管系や心臓における重要な生理的調節因子であることが明らかとなってきた (4, 6, 7) 。そして近年、S1P が骨組織における破骨細胞動態を調節するという生理機能が新しく発見されたことから (9)、S1P は骨組織における骨リモデリングにおいても影響を及ぼすことが考えられる。

S1P の骨芽細胞への関与としては、骨リモデリングの過程において、破骨細胞から産生された S1P が、骨溶解部位に骨芽細胞前駆細胞を誘導するのに重要な働きをすること (10) 、S1P が PI3Kを介して、骨芽細胞のアポトーシスを抑制すること (26) 、また、骨芽細胞において、S1P がp38 MAPK 及びPI3K/Akt/GSK-3 β シグナルに対して、それぞれ独立して作用し、heat shock protein 27 (HSP27) の発現を誘導することが明らかになっている (15-17, 27) 。しかしながら、S1P が骨芽細胞の分化に及ぼす影響については未だ解明されていない。

一方、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おいて重要であり、骨芽細胞の分化・増殖を促進させることが明らかとなっている (11-13) 。

そこで、本研究ではまず、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であり、骨芽細胞、破骨細胞のカップリングに重要な OPG、RANKL に対して、S1P が及ぼす影響を検討した。RANKL は TNF ファミリーに属する破骨細胞の分化誘導を

調節するサイトカインであり、受容体である RANK に結合することで働く。一方、骨、皮膚、肝臓などで産生される OPG は、RANKL のおとり受容体として RANKL の真の受容体である RANK と拮抗し、RANK よりも高い親和性で RANKL に結合する。その結果、RANKL の活性を抑制するため、破骨細胞および破骨前駆細胞の分化誘導を阻害することが知られている。実験の結果、S1P は OPG の mRNA の発現を上昇させ、RANKL の mRNA の発現は減少させた (図2)。すなわち S1P 添加により、OPG/RANKL 比が増加した。OPG/RANKL 比が骨芽細胞と破骨細胞の機能を調節する重要な因子であるという報告もあることから (28-30)、S1P は骨組織において破骨細胞の分化を阻害する可能性を持つことが示唆された。

次に、S1P の添加により発現が増加した OPG についてさらなる検討を行った。ELISA 法を用いて OPG のタンパク質発現量を測定したところ、S1P はその発現量を増加させた (図3A)。また、ヒト OPG プロモーター領域 (-1309/+205) を組み込んだレポーター遺伝子を用いて OPG プロモーター活性を測定したところ、S1P は OPG 遺伝子プロモーター活性を増加させた (図3B)。

以上の結果より、S1P は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子である OPG の mRNA 及びタンパク質発現を増加させることが明らかとなった。そこで、次に、S1P が OPG 発現の増加に及ぼす分子メカニズムについてさらに検討した。

S1P は細胞膜上に発現している G タンパク質共役受容体 (S1P₁~S1P₅) を介して作用する。S1P は PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化し、GSK-3 β を阻害することが明らかにされている (16-18)。本研究においても、S1P は SaOS-2 細胞において、PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化し、GSK-3 β を阻害した (図4、5)。

次に S1P シグナル、すなわち PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路が OPG の発現に影響を及ぼすかどうか検討した。PI3K の阻害剤 (LY294002) の添加により、OPG のタンパク質発現は減少し、GSK-3 β の阻害剤 (SB216763) の添加により、

OPG のタンパク質発現は増加した (図6) 。SB216763 と LY294002 を両方添加した時には、OPG のタンパク質発現は増加した (図6) 。以上の結果から、PI3K/Akt/GSK-3 β が OPG の発現に関与している可能性が示唆された。

GSK-3 β は本研究における PI3K/Akt シグナル伝達経路と Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に共通する構成因子である。これまでの報告に、GSK-3 β を介して PI3K/Akt シグナルと Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路のクロストークはないという報告や (31) 、一部のがん細胞において、PI3K/Akt シグナル伝達経路は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に影響を及ぼさないという知見がある (32) 。しかし近年では、GSK-3 β が2つのシグナルのクロストークに働くという多くの報告が示されており (33–38) 、さらに PI3K/Akt シグナル伝達経路が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路において、 β -カテニンの安定化を誘導し、標的遺伝子の発現につながるという知見もある (39–42) 。骨芽細胞においても、PI3K/Akt シグナル伝達経路が直接的及び間接的に β -カテニンに作用することで、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を促進するという報告がある (43) 。そこで本研究においては、特に GSK-3 β に着目し、S1P が

PI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路を介して Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響について検討した。

GSK-3 β は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路における重要な因子で、GSK-3 β の阻害により、リン酸化を回避された β -カテニンは、安定化して細胞内に蓄積し、核へ移行して TCF/LEF ファミリーの転写因子と複合体を形成し、様々な標的遺伝子の発現が調節される。

S1P は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の転写因子である TCF の転写活性を増加させ (図7) 、TCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現を増加させた (図8A) 。PI3K の阻害剤 (LY294002) の添加により、TCF7L2 のタンパク質発現は減少した (図8A) 。また、GSK-3 β の阻害剤 (SB216763) により TCF7L2 のタンパク質発

現は増加した (図8B)。以上の結果から、S1P がPI3K/Akt/GSK-3 β シグナル伝達経路を介して間接的に、或いは直接的に Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化する可能性が示唆された。

また、S1Pは、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子で、骨芽細胞の分化マーカーである ALP (13、14) の活性も増加させ (図9B)、骨芽細胞の石灰化も促進させることが明らかとなった (図10)。

本実験では Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路における、S1P の直接的なターゲット分子の発見には至らなかったが、S1P が直接的、或いは間接的にこの経路を促進し、標的遺伝子である OPG の発現を増加させ、骨芽細胞分化を促進させる可能性が示唆された。S1P が骨芽細胞に及ぼす影響については、そのメカニズムが未だ解明されていない点が多く、今後その作用機序についてはさらなる検証が必要である。

近年、S1P の臨床応用への研究が進んでいる。S1P が血管内皮細胞を活性化して血管新生を促進することが明らかにされており (7、19)、これは虚血肢及び心筋梗塞等の治療への応用が期待されている。また、リンパ球遊走を制御する脂質メディエーターである S1P を標的とした免疫抑制薬も注目を集めており、S1P 受容体作働薬である FTY-720 は、免疫抑制作用と骨吸収抑制作用を併せ持つことが知られている (7、44)。これは免疫異常と骨吸収の混合した病態を示す関節リウマチの治療薬として、有望であることが検証されている。さらに中枢神経系の代表的な自己免疫疾患である多発性硬化症への臨床応用もされている (45、46)。

本研究では S1P の骨組織への影響、特に骨芽細胞への作用について検証したが、S1P と Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路との関連を示したこの研究は、現在進められている S1P とその受容体を標的とした薬剤の開発、並びに骨粗鬆症や歯周炎等の骨吸収性疾患の治療薬の開発に大いに貢献できる可能性を秘めている。

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。

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 松崎英津子 助教、医学部臨床薬理学分野 高橋 富美 助教に深謝いたします。

さらに、研究生活のご指導、ご助言をいただき、あたたかく見守ってくださいました、歯周病学分野 濱地 貴文 講師をはじめ歯周病学分野の皆様、及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) Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 2002;277(29):25851-4.
- (2) Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(5):397-407.
- (3) Sanchez T and Hla T: Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell Biochem.* 2004;92:913-22.
- (4) Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;688:141-55.
- (5) Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 2004;279(20):20555-8.
- (6) Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2004;73:321-54.
- (7) Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells: Potential as novel therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1784(1):66-75.
- (8) Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 2006;25(24):5840-51.
- (9) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009;458(7237):524-8.

- (10) Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008;105(52):20764-9.
- (11) Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 2010;30(12):3071-85.
- (12) Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513-23.
- (13) Rawadi G, Vayssière 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):1842-53.
- (14) Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, et al. 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):1307-16.
- (15) Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Kato K, Kozawa O. Phosphatidylinositol3-kinase/Akt plays a role in Sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *J. Cell Biochem.* 2006;98(5):1249-56.
- (16) Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, et al. Involvement of Rho-kinase in sphingosine 1-phosphate stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *Int J. Mol. Med.* 2009;24(1):77-82.

- (17) Natsume H, Adachi S, Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, et al. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates the induction of HSP27 stimulated by sphingosine 1-phosphate via suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in osteoblasts. *Int J. Mol. Med.* 2009;24(2):197-203.
- (18) Roztocil E, Nicholl SM, Davies MG. Mechanisms of sphingosine-1-phosphate-induced Akt-dependent smooth muscle cell migration. *Surgery* 2009;145(1):34-41.
- (19) Sefcik LS, Petrie Aronin CE, Wieghaus KA, Botchwey EA. Sustained release of sphingosine 1-phosphate for therapeutic arteriogenesis and bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29(19):2869-77.
- (20) Sanna, MG, Liao, J., Jo, E., Alfonso, C., Ahn, MY, Peterson, MS, Webb, B., Lefebvre, S., Chun, J., Gray, N., and Rosen, H. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* 2004;279:13839-48
- (21) Matloubian, M., Lo, CG, Cinamon, G., Lesneski, MJ, Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, ML, Proia, RL, and Cyster, JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427:355-60
- (22) Sato MM, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M. Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/beta-catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes Cells* 2009;14(2):141-53.
- (23) Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of

- NF kappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell Sci.* 2006; 119(Pt 7):1283-96.
- (24) Nusse R. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* 1999; 15(1):1-3.
- (25) Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 1999;18(55):7860-72.
- (26) Grey A, Chen Q, Callon K, Xu X, Reid IR, Cornish J. The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology* 2002;143(12):4755-63.
- (27) Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Tokuda H, Miwa M, Ito H, Kato K and Uematsu T: Sphingosine 1-phosphate induces heatshock protein 27 via p38 mitogen-activated protein kinase activation in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 1999;14:1761-67.
- (28) Tat SK, Padrines M, Theoleyre S, Couillaud-Battaglia S, Heymann D, Redini F, et al. OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone* 2006;39(4):706-15.
- (29) Flint J, Wu S, Shott S, Suarez E, De Luca F. Relationships between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL), and growth hormone (GH) secretory status in short children. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2009;22(12):1105-12.
- (30) Yang L, Hai Y, Zhou JL. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand

expression during human marrow stromal cell differentiation and their effect on osteoclast formation. *Chin. Med. J. (Engl)* 2011;124(13):2033-7.

(31) Ding VW, Chen RH, McCormick F. Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 β by insulin and Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(42):32475-81.

(32) Ng SS, Mahmoudi T, Danenberg E, Bejaoui I, de Lau W, Korswagen HC, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the Wnt cascade. *J. Biol. Chem.* 2009;284(51):35308-13.

(33) Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C, and Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 β inhibition and Ras activation. *Oncogene* 2001;20:252-9.

(34) Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T et al. Akt participation in the Wnt signaling pathway through dishevelled. *J. Biol. Chem.* 2001;276:17479-83.

(35) Macdonald BT, Semenov MV, and X.He. SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell* 2007;131:1204.

(36) Naito AT, Akazawa H, Takano H, Minamino T, Nagai T, Aburatani H, and Komuro I. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ. Res.* 2005;97:144-51.

(37) Smith E, and Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. *J. Biol. Chem.* 2005;280:238

8-94.

(38) Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, and Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J. Biol. Chem.* 2005;280:41342-51.

(39) Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 2007.;282:11221-29.

(40) He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 2004;36:1117-21.

(41) Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta -catenin accumulation. *J. Biol. Chem.* 2002;277:30935-41.

(42) Tian Q, He XC, Hood L, Li L. Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell Cycle* 2005;4:215-6.

(43) Rybchyn MS, Slater M, Conigrave AD, Mason RS. An Akt-dependent increase in canonical Wnt signalling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2011;286(27):23771-9.

(44) Petrie Aronin CE, Shin SJ, Naden KB, Rios PD Jr, Sefcik LS, Zawodny SR, et al. The enhancement of bone allograft incorporation by the local delivery of the sphingosine 1-phosphate receptor targeted drug FTY720.

Biomaterials 2010;31(25):6417-24.

(45) Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, et al.

FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2011;108(2):751-6.

(46) Petrie Aronin CE, Sefcik LS, Tholpady SS, Tholpady A, Sadik KW,

Macdonald TL, et al. FTY720 promotes local microvascular network formation and regeneration of cranial bone defects. Tissue Eng. Part A 2010;16(6):1801-9.