

令和元年6月13日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11493

研究課題名(和文) 非典型的Wnt受容体Rykシグナルによる骨形成および骨ミネラル代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Roles of an atypical Wnt receptor, Ryk, for bone formation and mineral metabolism

研究代表者

中道 裕子 (Nakamichi, Yuko)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：20350829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルは、全動物において無数の生命過程を制御する。RykはWnt受容体メンバーの一員であるが、既存のWntシグナル伝達様式の分類に属さず、異端または非典型的Wnt受容体と呼ばれる。Rykは、Wntにより調節される骨リモデリングの過程に関与している可能性がある。本研究では、代表者らの研究室で作製したRykコンディショナルノックアウト(Ryk cKO)マウスを用いて、Rykが骨形成を促進することを証明した。また、RykリガンドであるWnt3aによる骨形成を担う分子を同定するために、UNC-CHのMajor研究室にて、Crispr-Aスクリーニングの立ち上げと、リン酸化質量分析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、Wntシグナルが活性化している悪性腫瘍において、抗腫瘍免疫活性がWntシグナルにより抑制されているという報告が多数存在する。これはRykが、癌治療の有望な分子標的であることを示す。本研究ではRykの骨代謝における役割と共に、Crispr-Aスクリーニングに用いるレポーターシステムの立ち上げに成功した。今後、Rykシグナルのエフェクター分子が同定されれば、基礎生物学のブレイクスルーとなる。このエフェクター分子は骨形成促進薬となり得るばかりか、がん治療、歯科領域治療における分子標的にもなる可能性がある。将来的には、Rykを標的とした新規治療法の開発がもたらされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：WNT signaling regulates numerous biological processes throughout life of all animals. Ryk is a member of the Wnt receptors, but it is called as a heretical or an atypical receptor because it seems to regulate both canonical and non-canonical Wnt pathways. In this study, we elucidated roles of Ryk for bone and mineral metabolism by using Ryk conventional KO (KO) and conditional KO (cKO) mice lines that are established in our laboratory. Using two mesenchymal-specific Ryk cKO mice, we confirmed that Ryk enhances bone formation. In addition, we tried to identify osteotropic downstream molecules of Wnt3a (one of the Ryk ligands) in the oversea collaborator, the Major laboratory in UNC-CH. To this end, we established a functional genomic screening method with a gain-of-function approach (called Crispr-A) using a sensitive reporter system I made. We also performed Phospho-MS analysis.

研究分野：分子生物学、口腔生化学

キーワード：Ryk 骨ミネラル代謝 プロテオゲノミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは多様な生命現象に関与し、その破綻は様々な病態をもたらす。Wnt 受容体として 7 回膜貫通型 Frizzled が 10 種類、1 回膜貫通型 LRP5, LRP6, Ror1, Ror2 および Ryk (receptor-like tyrosine kinase) が存在する。1 回膜貫通型受容体は、Frizzled の共受容体として、または単独で機能し、その組合せにより様々な生物学的プロセスを精緻に制御する。Ryk はその一翼を担う。Wnt シグナル伝達様式は古典経路と非古典経路に分類される。骨代謝研究領域では、古典経路は骨形成を促進することが知られている。一方、非古典経路に属する Wnt5a-Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) シグナルは、研究協力者の小林泰浩博士らにより破骨細胞分化および骨吸収機能を促進することが見出された (Nat Med 18:405, 2012)。一方、Ryk シグナルは古典経路と非古典経路の双方に関与し、Ryk は異端もしくは非典型的 Wnt 受容体と呼ばれる (Halford et al. 2015, Chapter 15 The RYK Receptor Family, DOI :10.1007/978-3-319-11888-8\_15)。Ryk 欠損 (Ryk KO) マウスは生後 1 日で死亡するため (Nat Genet 25:414, 2000)、Ryk の生理作用に関する知見は、神経発生や生殖器発生の分野にとどまっていた (Nature 439:31, 2006)。したがって、Ryk の骨代謝における役割は不明であった。本課題は、骨代謝における Ryk の生理作用と分子機構の解明を目的とし、国内外において唯一 Ryk cKO マウスを用いて行う研究である。

### 2. 研究の目的

- (1) 活性型ビタミン D 製剤 ELD による骨代謝制御における Wnt シグナルの関与を明らかにする。
- (2) 骨芽細胞分化に関与する細胞内 Wnt-Ryk シグナルコンポーネントを同定する。そのために、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) によるリン酸化質量分析 Phospho-MS とゲノムワイドな遺伝子機能獲得アプローチである Crispr-A スクリーニングを組み合わせたプロテオゲノミクスの手法を用いる。
- (3) 新規 Wnt シグナル阻害因子 AAK1 の骨芽細胞分化および OPG 発現における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 活性型ビタミン D 製剤 ELD を、骨芽細胞特異的ビタミン D 受容体欠損 (Ob-VDR-cKO) マウスと対照マウスに 1 か月間薬理量 (50 ng/kg/day) を投与し、骨形成速度と Wnt インヒビターであるスクレロスチン mRNA 発現レベルを計測した。
- (2) 骨形成における Ryk シグナルの調節因子を ゲノムワイドな遺伝子機能獲得アプローチである Crispr-A スクリーニングによって同定する。スクリーニングに用いるための、Wnt シグナル活性化ポーターシステムを構築した。
- (3) 海外共同研究者 Major, MB, PhD (ノースカロライナ大学チャペルヒル校) らは、Wnt3a に反応して、ネガティブフィードバック機構としてリン酸化酵素 AAK1 が、クラスリン依存性エンドサイトーシスを介して Wnt 受容体分解を促進することを見出した。この機構が Wnt3a 依存性骨芽細胞分化や OPG 発現促進に関与しているか調べた。

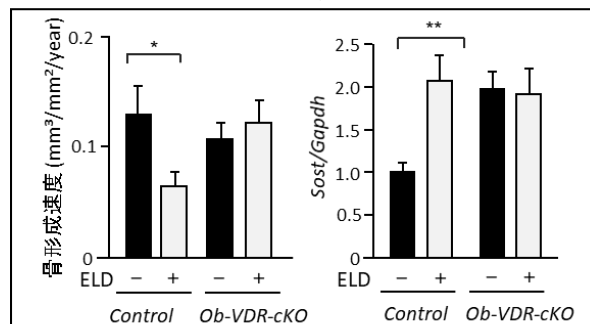
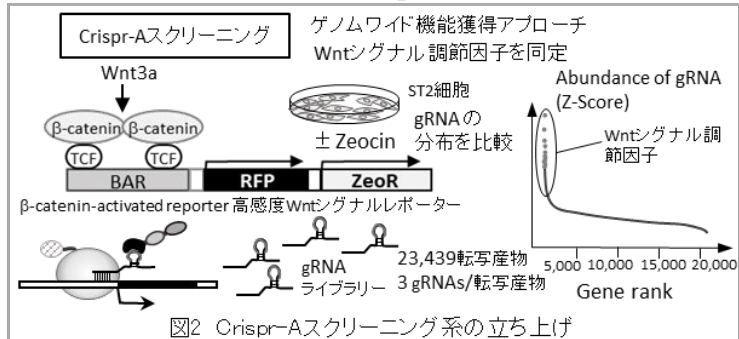


図1 活性型ビタミンD製剤による骨代謝共役減少におけるスクレロスチン発現上昇  
ELDにより骨形成抑制とスクレロスチン発現上昇効果は、骨芽細胞のVDRを介する。

#### 4. 研究成果

- (1) 活性型ビタミンD 製剤ELDを投与すると骨吸収が抑制され、共役して骨形成も抑制される。骨形成の抑制と一致してスクレロスチン(遺伝子名:Sost)の発現も増加した(図1)。したがってこの共役機構にRykが関与する可能性が示された(論文)。
- (2) ゲノムワイドのRyk下流遺伝子機能解析のため、遺伝子機能獲得アプローチであるCRISPR-Aスクリーニングの系の立ち上げを行った(図2)。Crispr-AコンポーネントとWnt活性レポーター共安定発現ST2モノクローナル細胞を取得した。今後ガイドRNAライブラリーの導入を行い、スクリーニングを実施する予定である。
- (3) AAK1-クラスリン依存性エンドサイトーシス機構がWnt3a依存性骨芽細胞分化とOPG発現誘導に関与しているか調べるため、AAK1阻害剤を骨芽細胞分化系に加えた。しかし、AAK1阻害剤はWnt3a依存性の骨芽細胞分化もOPG発現を促進しなかった(論文)。



#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計4件)

- Agajanian MJ, Walker MP, Axtman AD, Ruela-de-Sousa RR, Serafin DS, Rabinowitz AD, Graham DM, Ryan MB, Tamir T, Nakamichi Y, Gammons MV, Bennett JM, Couñago RM, Drewry DH, Elkins JM, Gileadi C, Gileadi O, Godoi PH, Kapadia N, Müller S, Santiago AS, Sorrell FJ, Wells CI, Fedorov O, Willson TM, Zuercher WJ, Major MB.; WNT Activates the AAK1 Kinase to Promote Clathrin-Mediated Endocytosis of LRP6 and Establish a Negative Feedback Loop. *Cell Rep.* 2019;26:79-93.e8. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.023. (査読有)
- Nakamichi Y, Udagawa N, Suda T, Takahashi N.; Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018; 177:70-76. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.11.005. (査読有)
- Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H, and Udagawa N.; The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling. *J Oral Biosci.* 2017; 59: 146-151. DOI: 10.1016/j.job.2017.05.001. (査読有)
- Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, Takahashi N.; VDR in Osteoblast-Lineage Cells Primarily Mediates Vitamin D Treatment-Induced Increase in Bone Mass by Suppressing Bone Resorption. *J Bone Miner Res.* 2017; 32:1297-1308. DOI: 10.1002/jbmr.3096. (査読有)

##### [学会発表](計5件)

- 中道裕子: 骨ミネラル代謝における骨芽細胞/骨細胞のVDRの役割。第4回 25(OH)Dを考える会(東京)2017年9月
- Nakamichi Y: Roles of VDR in osteoblasts and osteoclasts for vitamin D-induced increase in bone mass. 第14回 Bone Biology Forum(東京)2017年8月
- Nakamichi Y, Udagawa N, Mori T, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, and Takahashi N.; Roles of VDR in osteoblasts for 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  derivative-mediated bone and mineral metabolism. 第2回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会(東京)2017年8月
- Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, and Takahashi N.; Vdr in osteoblast-lineage cells primarily mediates a 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  derivative-induced increase in bone mass by suppressing bone resorption. 20th

Vitamin D Workshop, Orlando, 2017 年 3 月 (Plenary Poster)

中道裕子, 堀部寛治, 溝口利英, 山本陽子, 中村貴, 細矢明宏, 原田卓, 斎藤一史, 加藤茂明, 須田立雄, 宇田川信之, 高橋直之: 骨芽細胞系列のビタミン D 受容体(VDR)は、ビタミン D による骨量上昇効果とミネラル代謝に関与する。第2回 骨免疫学会ウインターセミナー (長野) 2017 年 1 月

〔図書〕(計 1 件)

Nakamichi Y, Takahashi N, Udagawa N, Suda T.; Chapter 18 - Osteoclastogenesis and Vitamin D, Vitamin D: Fourth Edition vol1. pp. 309-317, Academic Press 2018

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.mdu.ac.jp/laboratory/research\\_contents/saiken/kinou.html](https://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/saiken/kinou.html)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宇田川 信之

ローマ字氏名：Udagawa, Nobuyuki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70245801

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 智紀

ローマ字氏名：Mori, Tomoki

所属研究機関名：松本歯科大学

職名：大学院生

研究協力者氏名：堀部 寛治

ローマ字氏名：Horibe, Kanji

所属研究機関名：松本歯科大学

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 70733509

研究協力者氏名 : 小林 泰浩

ローマ字氏名 : Kobayashi, Yasuhiro

所属研究機関名 : 松本歯科大学

部局名 : 総合歯科医学研究所

職名 : 教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 20264252

研究協力者氏名 : 荒井 敦

ローマ字氏名 : Arai, Atsushi

所属研究機関名 : 松本歯科大学

部局名 : 歯学部

職名 : 講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 00532772

研究協力者氏名 : Major, Michael Ben

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 : University of North Carolina at Chapel Hill

部局名 : Lineberger Cancer Center,

職名 : Associate Professor

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。