

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：33602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21027

研究課題名(和文) 異端Wnt受容体Rykシグナルによる骨形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of osteoblastogenesis through atypical wnt receptor Ryk signaling

研究代表者

岩本 莉奈 (Iwamoto, Rina)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・助教

研究者番号：20907216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：異端Wnt受容体RykがどのWntリガンド結合を介して骨形成を促進するか全く未解明のままであった。申請者は、骨芽細胞特異的Ryk欠損(Ob-Ryk cKO)マウス及び野生型(WT)マウスの骨を用いてRNA-seqを行った。その結果、Ob-Ryk cKOマウス骨においてWnt4及びWnt10b発現が増加していたため、骨芽細胞への分化能を有するST2細胞にWnt4及びWnt10bの過剰発現を行ったところ、Ryk機能と一致して骨芽細胞分化を促進した。加えて、Wnt4及びWnt10bの脂肪細胞分化への影響も検討したところ、Wnt4及びWnt10bの過剰発現により脂肪細胞分化が抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は超高齢化社会を迎えたことで骨粗鬆症などの骨量が低下する疾患の患者数が急増し、これらの疾患を克服することは喫緊の課題であると言える。Wntシグナルは骨量調節に関与することが報告されており、異端Wnt受容体であるRykは骨形成に関与することが示唆されているものの、Rykを介するWntシグナルは、Wntリガンド、受容体、エフェクター因子の多さから、作用機序の全容解明にはほど遠い状況にある。本研究ではRykに作用するWntリガンド及びその下流シグナルを明らかにすることを目的とした結果、RykはWnt4及びWnt10bと結合することで骨形成促進、骨髄脂肪細胞形成抑制を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It remained utterly unclarified which Wnt ligand binding of the atypical Wnt receptor Ryk promotes osteogenesis. The applicant performed RNA-seq on bones from osteoblast-specific Ryk-deficient (Ob-Ryk cKO) and wild-type (WT) mice. Wnt4 and Wnt10b expression was increased in Ob-Ryk cKO mice bone. Thus overexpression of Wnt4 and Wnt10b in ST2 cells, which can differentiate into osteoblasts, promoted osteoblastogenesis. It is consistent with the Ryk function. In addition, the applicant also examined the effects of Wnt4 and Wnt10b on adipocytogenesis and found that overexpression of Wnt4 and Wnt10b suppressed adipocytogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：Wnt Ryk 骨芽細胞 脂肪細胞 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により恒常的に作り変えられており、この代謝活動を骨代謝と呼ぶ。骨代謝制御因子の一つである Wnt シグナルは複数の受容体により調節されており、その中でも申請者の所属研究チームでは Wnt 異端受容体と呼ばれる Ryk が骨芽細胞分化を促進していることを見出している。そのため、Ryk は骨形成を促進する創薬標的として期待されているものの、骨芽細胞分化を促進する際に Ryk に作用する Wnt リガンド、Ryk の下流シグナル、Wnt-Ryk シグナルの阻害機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では Ryk に作用する Wnt リガンド及びその下流シグナルを明らかにすることを目的とし、新規骨量増加薬開発に向けた基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

Ryk に作用する Wnt リガンドを同定するために、Ryk 欠損(KO)骨芽細胞では Wnt-Ryk シグナルが促進されず、負の調節を受けないことから、発現が上昇した Wnt リガンドは Ryk に作用する Wnt リガンド(Ryk 結合性 Wnt リガンド)の候補であると想定される。そこで、骨芽細胞特異的 Ryk KO(ob-Ryk cKO)マウス骨組織において発現が上昇した Wnt リガンドを RNA-seq により見出す。見出された Ryk 結合性 Wnt リガンド候補を野生型(WT)及び Ryk KO(又はノックダウン:KD)ST2 細胞に過剰発現させ、WT ST2 細胞でのみ骨芽細胞が促進される Wnt リガンドがあるか ALP 活性及び qRT-PCR による骨芽細胞マーカー遺伝子発現を指標に判定する。

4. 研究成果

骨芽細胞特異的 Ryk 欠損(Ob-Ryk cKO)マウス及び野生型(WT)マウスの骨を用いて RNA-seq を行った結果、Ob-Ryk cKO マウス骨において Wnt4 及び Wnt10b 発現が増加していた。

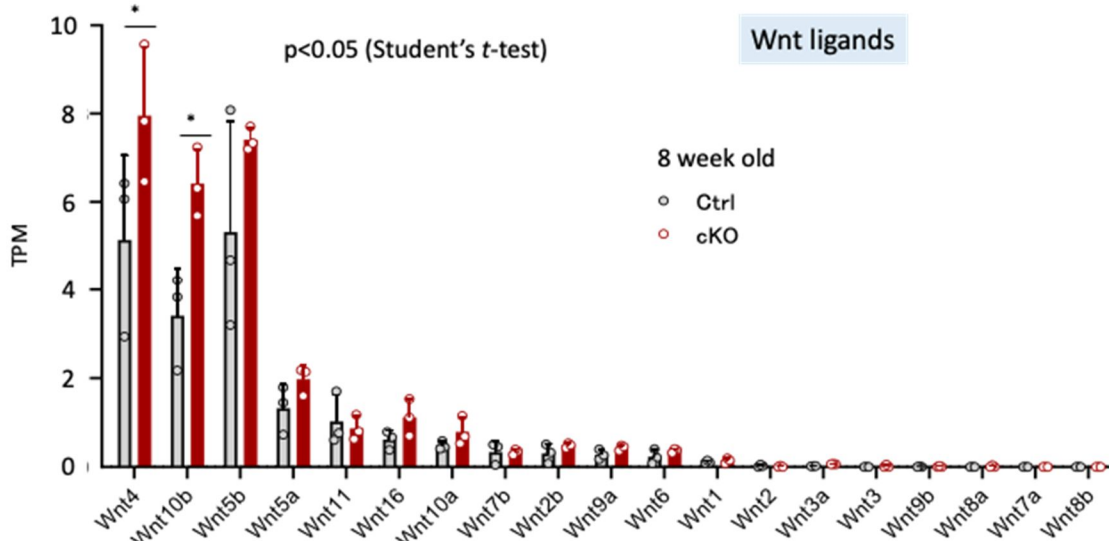


図1 RNA-seq による WT 及び Ob-Ryk cKO マウス骨における Wnt リガンドの発現量比較

RNAseq の結果を受け、骨組織において発現量が高く、WT マウスよりも発現量が高いことが示唆された Wnt4, Wnt10b, 及び Wnt5b が Ryk の機能と同様に骨芽細胞分化を促進するか検討するために、骨芽細胞への分化能を有する ST2 細胞への Wnt4, Wnt10b, 及び Wnt5b 過剰発現を行った。その結果、Wnt4 及び Wnt10b が Ryk 機能と一致して骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。(Wnt3a はポジティブコントロール)

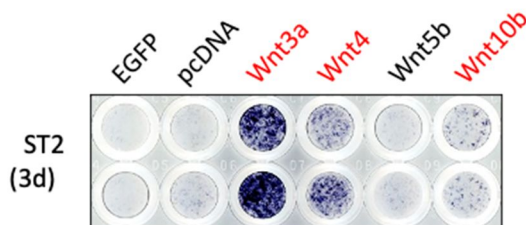


図2 Wnts 過剰発現による骨芽細胞分化の評価 (ALP 染色)

Ob-Ryk cKO マウスにおいて骨髄脂肪が増加していることから、Ryk は骨髄間質細胞が脂肪細胞になることを抑制している可能性が示唆されていることから、Wnt4 及び Wnt10b の脂肪細胞分化への影響も検討した。その結果、ST2 細胞に Wnt4, Wnt10b, 及び Wnt5b を過剰発現したところ、Wnt4 及び Wnt10b により脂肪細胞分化が抑制されることを見出した。

[ST2: 誘導12日目 (transfection後13日目)]

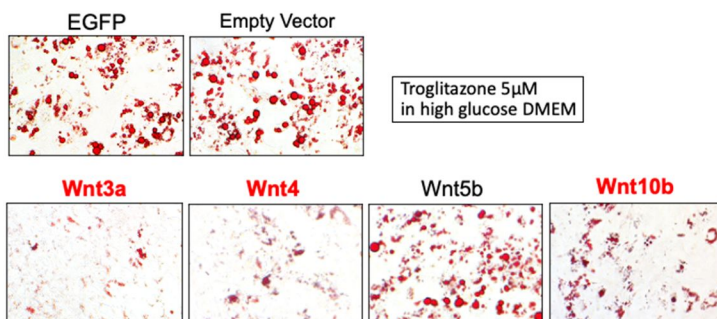


図3 Wnts 過剰発現による脂肪細胞分化の評価 (Oil Red O 染色)

Ryk, Wnt4 及び Wnt10b が骨芽細胞分化促進、脂肪細胞分化抑制をすることから、骨髄間質細胞 (BMSC) への影響に着目した。

まず、LepR を免疫染色により Ob-Ryk cKO において BMSC の数に変化が見られるか検討した結果、Ob-Ryk cKO マウス骨髄に存在する BMSC が少ないことが明らかになった。加えて骨髄に存在する細胞の増殖能を評価するために、Ki67 を免疫染色により検出したところ、Ki67 陽性の増殖細胞が減少していることが明らかになった。

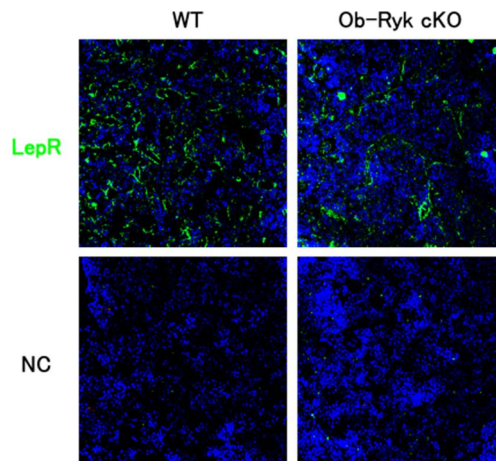


図4 WT 及び Ob-Ryk cKO マウス骨髄における LepR 免疫染色像

これらの結果は骨組織において、Wnt4 及び Wnt10b は Ryk を介して BMSC 数の調整、及び BMSC の骨芽細胞・脂肪細胞分化のコミットメントに関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------