

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792135

研究課題名（和文）

異端の Wnt 受容体 Ryk の骨代謝における役割解明

研究課題名（英文）

Roles of a heretical Wnt receptor, Ryk for bone remodeling

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

研究成果の概要（和文）：本研究は、骨代謝における非典型的な Wnt 受容体 Ryk の役割を明らかにすることを目的とする。Ryk は、古典経路を活性化する Wnt3a および非古典経路を活性化する Wnt5a の両方をリガンドとするため、Ryk は異端（heretical）Wnt 受容体と呼ばれる。破骨細胞分化系列と骨芽細胞の双方において Ryk が発現しているが、これらの細胞特異的な Ryk 遺伝子欠損マウスを用いて解析した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is clarifying a role of atypical Wnt receptor Ryk in the bone metabolism. Ryk was called a heretical Wnt receptor because of its function and properties in both canonical and non-canonical Wnt pathway. Ryk binds to Wnt3a (a canonical ligand) and Wnt5a (a non-canonical ligand), and transduces signals to control many biological processes. Ryk is expressed in both osteoclast-lineage cells and osteoblasts. We generated conditional Ryk knockout mice to delete Ryk gene in these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝, Wnt, Ryk, 骨芽細胞, 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは発生、幹細胞の維持、および成体における恒常性の維持など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 が存在する。Wnt は、受容体を使い分けて複雑な生物学的プロセスを精緻に

制御する。Rykはその一翼を担っている。Wntシグナル伝達様式は古典経路と非古典経路の2種類に分類される。古典経路のは骨形成を促進し (*J Cell Biol* 157:303, 2002)、非古典経路のWnt5a-Ror2シグナルは、研究協力者の小林らにより、破骨細胞分化を促進することが見出された (*JBMR* 22(S1): S43, 2007)。一方、Rykシグナルは古典経路にも非古典経路の双方に関与し、Rykは異端Wnt受容体と呼ばれる (*SciSTKE* 2004, pe54)。異端のWntシグナルRykの骨代謝における役割は不明である。Ryk欠損(Ryk KO)マウスは生後1日で死亡する (*Nat Genet* 25:414, 2000)。したがって、Ryk KOマウスを用いた骨代謝機能の解析は不可能であり、申請者が作製したRyk cKOマウスを用いてのみ可能である。これまでにRykは、神経ガイダンスを調節することが示されている (*Nature* 439:31, 2006)。Rykの生理作用における分子メカニズムは、神経と骨では異なり、状況に応じて多様である可能性がある。本研究は、骨代謝におけるRykの生理作用と分子メカニズムの解明を、国内外において唯一Ryk cKOを用いて行うもので、重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

- (1) 破骨細胞系列特異的なRyk cKOマウスを作製し、破骨細胞分化および機能調節におけるRykの役割を明らかにする。
- (2) 骨芽細胞系列特異的なRyk cKOマウスを作製し、骨芽細胞分化および機能調節におけるRykの役割を明らかにする。

(3) 1および2の実験結果をふまえてRykの下流シグナルの同定を行う

3. 研究の方法

- (1) Cre-loxPシステムによる破骨細胞系列特異的Ryk cKOマウスの解析を行う。具体的には、① 破骨細胞前駆細胞(Ocp)および破骨細胞特異的にCreを発現するRANK-Cre KI (Knock in) (*Nat Med*18:405, 2012) マウスとRyk floxマウスを交配しRANK-Cre, Rykflox/- (Ocp-Ryk cKO)マウスを作製する。骨組織形態計測、マイクロCTによる骨密度測定を行う。
- ② 破骨細胞 (Oc)特異的にCreを発現するCathepsine K-Cre KIマウス (東大分生研 加藤茂明教授 (研究協力者) からご供与) とRyk floxマウスを交配し、Cathepsine K-Cre, Rykflox/- (Oc-Ryk cKO) マウスを用いて解析作製する。骨組織形態計測、マイクロCTによる骨密度測定を行う。
- (2) Cre-loxPシステムによる骨芽細胞系列特異的Ryk cKOマウスの解析の解析を行う。Cre-loxPシステムにより、骨芽細胞(Ob)特異的なOsterix発現制御下でRyk遺伝子を欠損させ、Ob-Ryk cKOマウスを作製する。Osterix-CreマウスはJackson laboratory(米国)より購入する。(1)と同様に組織形態計測、マイクロCTによる骨密度測定を行う。
- (3) Rykの下流シグナルの同定
Ocp-Ryk cKO, Oc-Ryk cKO, Ob-Ryk cKO,

コントロールマウスの骨から、total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、Ryk 下流のシグナルカスケードを同定する。

4. 研究成果

- (1) ①Ocp-Ryk cKO マウス, ②Oc-Ryk cKO マウスの尻尾よりゲノム DNA を抽出し, Ryk 遺伝子の部分的欠損を確認し, 次いで免疫組織染色にて, 破骨細胞前駆細胞および破骨細胞における Ryk 遺伝子の欠損を確認した. すなわち, RANK-Cre, Rykflox/-マウスの作製に成功した. 骨組織形態計測、マイクロ CT による骨密度測定を継続中である。
- (2) Ob-Ryk cKO マウスの尻尾よりゲノム DNA を抽出し, Ryk 遺伝子の部分的欠損を確認し, 次いで免疫組織染色にて, 骨芽細胞における Ryk 遺伝子の欠損を確認した. すなわち, Osx-Cre, Rykflox/-マウスの作製に成功した. 骨組織形態計測、マイクロ CT による骨密度測定を継続中である。
- (3) Ocp-Ryk cKO, Oc-Ryk cKO, Ob-Ryk cKO, コントロールマウスの骨から, total RNA を抽出し, GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いてマイクロアレイ解析を行った. Ryk の下流で強く調節を受けている可能性のある因子がいくつか存在した. 現在, それらの因子について, 培養細胞を用いた過剰発現系およびノックダウン系にて, 機能を解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM, Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N.; Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 109:10006-11, 2012 (査読有), DOI: 10.1073/pnas.1207361109.
- ② Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N.; Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. **J Cell Sci** 125:2910-7, 2012 (査読有), DOI: 10.1242/jcs.099986.
- ③ Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi F, Saito H, Yasuda H, Udagawa N, Suda T, Takahashi N.; Daily administration of eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. **J Bone Miner Res** 27:461-73, 2012 (査読有), DOI: 10.1002/jbmr.555.
- ④ Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N.; Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle

down into bone. **J Bone Miner Res**
26:2978-90, 2011 (査読有), DOI:
10.1002/jbmr.490.

- ⑤ 中道裕子; 破骨細胞前駆細胞の形成と供給におけるビタミンDの役割の新知見 THE BONE 25: 233-237, 2011 (査読無), URL:
<http://www.de-hon.ne.jp/digital/tmp/4A03DDAE2E9E40899044B70D623658FC/2000003264009800600P0B.pdf>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中道裕子, 荒井敦, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之; 破骨細胞形成における M-CSF/RANKL/IL-34 のそれぞれの役割: 松本歯科大学学会例会 (第 75 回) 2012 年 12 月 1 日, 松本歯科大学 (長野県塩尻市)
- ② 中道裕子; 「破骨細胞形成における M-CSF/IL-34/RANKL のそれぞれの役割」 第 15 回骨発生・再生研究会, 2012 年 11 月 10 日, 慶応大学 (東京都新宿区)
- ③ 中道裕子, 溝口利英, 荒井敦, 小林泰浩, 保田尚孝, 加藤茂明, 須田立雄, 宇田川信之, 高橋直之; M-CSF 欠損 op/op マウスにおいて, 脾臓は破骨細胞前駆細胞の貯蔵庫として機能する: 破骨細胞形成における IL-34 の新しい役割, 日本骨代謝学会学術集会 (第 30 回) 2012 年 7 月 21 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)
- ④ Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Penninger JM, Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N.; Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through IL-34 expression in op/op mice: 4th International Conference on Osteoimmunology (第 4 回国際骨免疫学会議) 2012 年 6 月 21 日, Chandris Hotel (コルフ島, ギリシア)

- ⑤ Nakamichi Y, Hagihara T, Nakamura M, Imaoka A, Abiko Y, Nakamura H, Takahashi N, Udagawa N., Dental Pulp Cells Exhibit High Performance as a Biomaterial for Bone Formation Through Expression of Annexin A8, 第 31 回米国骨代謝学会, 2011 年 9 月 17 日, サンディエゴコンベンションセンター (カリフォルニア州, 米国)
- ⑥ 中道裕子, 萩原貴寛, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之; 歯髄細胞の有する顕著な骨再生能力は, annexin A8 を介して発揮される, 日本骨代謝学会 (第 29 回) 2011 年 7 月 30 日, 大阪国際会議場 (大阪市北区)

[その他]

ホームページ

URL;

http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/649/000647.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者