

令和 元年 6 月 13 日現在

機関番号：33602
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
 研究期間：2016～2018
 課題番号：15KK0356
 研究課題名（和文）非典型的なWnt受容体Rykシグナルによる骨代謝制御機構の解明（国際共同研究強化）
 研究課題名（英文）Roles of an atypical Wnt receptor, Ryk, for bone remodeling(Fostering Joint International Research)
 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） 11,200,000円
 渡航期間： 18ヶ月

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、その作用機構に関しては判然としていない。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。本研究ではゲノムワイドスクリーニングの系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、骨や神経の再生医療、がん治療、および口蓋裂などの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、この分子標的を利用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 controls myriad biological processes throughout life of all animals. Ryk is a member of the Wnt receptors and does not belong to the conventional classification of the Wnt signal transduction. Little is known about its mechanism of action. Ryk may be involved in Wnt-regulated processes in bone remodeling. In this study, we elucidated roles of Ryk for bone and mineral metabolism by using Ryk 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 to the analysis of Ryk cKO mice, we tried to identify osteotropic downstream molecules of Wnt3a (one of the Ryk ligands), utilizing the analysis platform developed by the oversea collaborator, the Major laboratory (UNC-CH). To this end, we set up a functional genomic screening with a gain-of-function approach (called Crispr-A) and developed a sensitive reporter system. 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：プロテオーム ゲノム シグナル伝達

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。Ryk (receptor-like tyrosine kinase) は、Wnt シグナル伝達の一翼を担う Wnt 受容体である。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。申請者の専門である骨代謝研究領域において、古典経路は骨形成を促進し、非古典経路のひとつである Wnt5a-Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) シグナルは、破骨細胞分化と骨吸収機能を促進することが見出されている。一方、Ryk は古典経路と非古典経路の双方に関与すると考えられ、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 の骨代謝における役割は不明であった。申請者は Ryk conditional KO (Ryk cKO) マウスを作製し、はじめて骨代謝における Ryk の生理作用を明らかにした。骨芽細胞系列特異的 Ryk cKO [Osx (Osterix)-Ryk cKO] マウスの解析を行ったところ、このマウスは骨密度の低下、骨芽細胞数、破骨細胞数の減少および骨形成速度の低下を示した。この結果より、Ryk シグナルが強力な骨形成促進因子であると予想され、この下流因子を同定することの重要性が示された。

2. 研究の目的

本国際共同研究は、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) による 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駆使し、Ryk 下流の骨形成促進因子の同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) Ryk の下流で骨形成に関与するリン酸化カスケードを同定するため、リン酸化プロテオーム解析は、図1に示す Phospho-MS によって行った。
- (2) 骨形成における Ryk シグナルの正および負の調節因子を 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 (図2)。スクリーニングに用いるための、Wnt シグナル活性レポーターシステムを構築した。
- (3) 海外共同研究者 Major 博士らは、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、Wnt 受容体をクラスリン依存性エンドサイトーシスを介して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に関与しているか調べた。

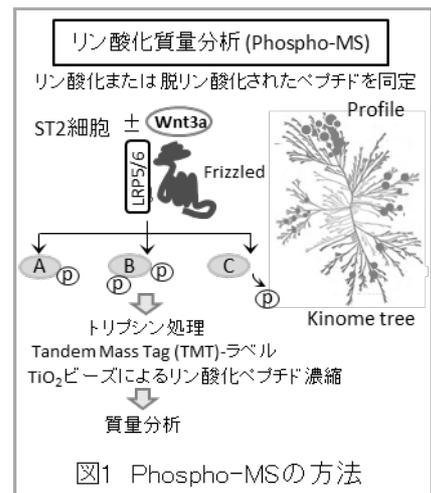


図1 Phospho-MSの方法

4. 研究成果

- (1) 当初の計画通り、まず骨形成促進因子の探索に用いる未分化間葉系細胞の Cell line の決定を行った。

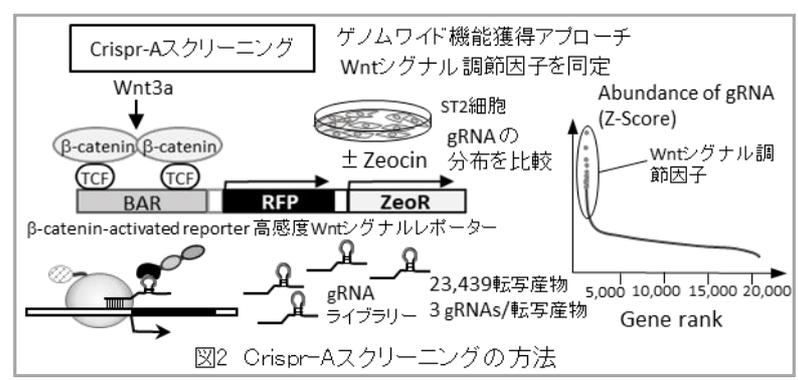


図2 Crispr-Aスクリーニングの方法

Rykのリガンドの一つであるWnt3aに対する応答について、C3H10T1/2, ST2, C2C12細胞を用いて骨芽細胞の分化指標であるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の比較により解析した。Wnt3aは、ST2細胞とC3H10T1/2細胞においてALP活性を用量依存的に上昇させた。一方、Wnt3aは、C2C12細胞においてWntシグナルレポーター遺伝子の活性は上昇させたもののALP活性は上昇させなかった。LC-MS/MSによるリン酸化プロテオーム解析は一番応答性の高かったST2細胞を用いて行った。リン酸化ペプチド質量分析は3回行い、3回目の実験においては約2,000種のリン酸化ペプチドが検出された。そして5つのBiological replicate ST2細胞において、Wnt3a処理により共通に上昇するリン酸化ペプチド種が複数得られた(図3)。

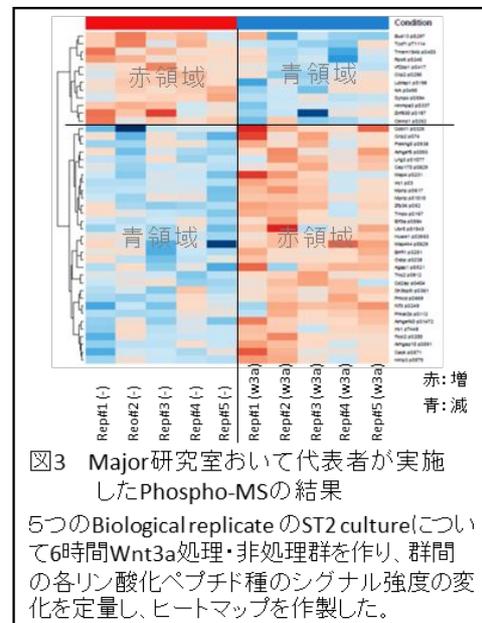


図3 Major研究室において代表者が実施したPhospho-MSの結果

5つのBiological replicateのST2 culture(について6時間Wnt3a処理・非処理群を作り、群間の各リン酸化ペプチド種のシグナル強度の変化を定量し、ヒートマップを作製した。

- (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した。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) この機構がWnt3a依存性骨芽細胞分化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を促進しなかった(論文)。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[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 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

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

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：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

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。