

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2007~2009

課題番号: 19591081

研究課題名(和文) 膜型受容体 Rykを介した骨代謝作用の解明と骨粗鬆症治療への応用開発

研究課題名(英文) Investigation of membrane receptor Ryk on bone metabolism and the therapeutic application to osteoporosis

研究代表者

大中 佳三 (OHNAKA KEIZO)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 30325518

研究成果の概要(和文):

Wnt/LRP5系が骨形成を促進するシグナルとして重要な働きを担うことが知られている。本研究はWntの共役受容体として機能することが最近新たに報告された膜型タンパク質Ryk(receptor-related tyrosine kinase)について、Wntによる骨形成促進作用への関与とそのメカニズムを解明することをめざして、骨芽細胞培養系を用いて解析を行うとともに、閉経後女性を対象にWntシグナル関連遺伝子の一塩基多型と骨密度の関連の解析を行った。

研究成果の概要(英文):

The Wnt/LRP5 signal plays important roles in promoting bone formation in rodents and human. This study investigated the involvement of Wnt co-receptor Ryk (receptor-related tyrosine kinase) in Wnt-induced bone formation signaling in cultured osteoblastic cells. Association study between the SNPs in Wnt signal-related genes and bone mineral density (BMD) was performed in postmenopausal Japanese women.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学、内分泌学

キーワード: 骨芽細胞、Wntシグナル、Ryk

## 1. 研究開始当初の背景

社会の急速な高齢化にともないわが国における骨粗鬆症の患者数は 1000 万人以上にのぼり、さらに増加し続けると推定されている。骨粗鬆症は主に加齢に伴うさまざまな変化が原因で起こるとされているが、その発症メカニズムは解明されていない部分も多い。骨粗鬆症は骨形成が骨吸収を下回る結果、骨量並びに骨質の低下をきたし、骨強度が低下する疾患と定義されている。近年、骨形成を促進するシグナルとして Wnt/LRP5 系が重要な働きを担っていることが、ヒトおよびマウスにおける Wnt の共役受容体である LRP5 受容体の遺伝子変異解析により明らかにされている。我々は、骨形成を強力に抑制して骨粗鬆症を引き起こすステロイド（グルココルチコイド）がこの Wnt シグナルを阻害することをこれまで明らかにしてきた。

最近、膜型受容体のひとつである Ryk (receptor-related tyrosine kinase)が Wnt の共役受容体として機能し、神経系の発生に関与することが明らかにされた。Ryk は frizzled とともに Wnt による canonical 経路を活性化して、神経細胞の outgrowth に関与する。Wnt による canonical 経路の活性化が骨形成促進に重要であることは、Wnt の共役受容体である LRP5 受容体遺伝子の変異解析に加えて、 $\beta$ -catenin や APC のノックアウトマウスの解析結果でも示されている。しかしながら、Wnt によるこの骨形成促進作用が LRP5 を介したものですべて説明可能かどうかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

(1) Wnt による canonical 経路を介した骨形成作用における LRP5 並びに Ryk の関与について骨芽細胞培養系を用いて検討し、Wnt による骨形成促進作用への関与とそのメカニ

ズムを解明する。

(2) Wnt/LRP5 ならびに Wnt/Ryk による骨代謝への関与について、骨密度検診を受けた一般地域住民女性において Wnt シグナル関連遺伝子の一塩基多型 (SNPs) と骨密度との関連を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞系細胞における Wnt/Ryk 系の解析：

①マウス間葉系細胞である C3H10T1/2 細胞を用いて Wnt 受容体および Ryk 受容体の発現を RT-PCR 法で確認し、real-time PCR 法にてその量比を定量する。Wnt3a による canonical Wnt シグナル経路の活性化について、Western blot 法による  $\beta$ -catenin 蛋白質量の解析、 $\beta$ -catenin/TCF 応答遺伝子の活性化を指標に確認する。また骨形成作用について ALP 活性、Alizarin Red 法による mineralization assay 等を用いて解析する。

②LRP5 と Ryk の合成 siRNA を用いて上記細胞におけるそれぞれの受容体蛋白を knock down して、Wnt3a による  $\beta$ -catenin 蛋白発現の変化、 $\beta$ -catenin/TCF 応答遺伝子活性化、ALP 活性、石灰化を指標とした作用に対するそれぞれの受容体の寄与の割合を検討する。また両方の siRNA を用いて両受容体蛋白を knock down した場合についても同様の検討を行う。さらにこの作用への両蛋白受容体の役割を確認するために、それぞれの受容体の siRNA を発現するウイルスベクター系を構築し、上記細胞に発現させてそれぞれの受容体を単独で、あるいは両方を knock down した安定細胞株を作成し、同様の検討によりそれぞれの受容体の寄与の割合を確認する。

(2) LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子の一塩基多型と骨密度の関連解析：

LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子を含む Wnt シ

グナル関連遺伝子の複数の一塩基多型 (SNPs) について一般地域住民における骨密度検診受診女性を対象に、それぞれの遺伝子の一塩基多型 (SNPs) と骨密度の関連解析を行う。骨密度検診受診者に対するゲノム DNA 採取と遺伝子解析については十分な説明の後、文書にて同意を取得する。

#### 4. 研究の結果

##### (1) 骨芽細胞系細胞における Wnt/Ryk 系の解析

マウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 細胞を用いて LRP5 受容体および Ryk 受容体の発現を RT-PCR および real-time PCR 法にて検討した。培養 C3H10T1/2 細胞は LRP5 受容体および Ryk 受容体の mRNA をほぼ同等に発現していた。各受容体の発現は Western blot 法により蛋白レベルでも確認され、その量比はほぼ 1:1 であった。

LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子に対する合成 siRNA を用いて C3H10T1/2 細胞におけるそれぞれの受容体のノックダウン効率を検討した。LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子は、それぞれ real-time PCR 法による mRNA の発現レベルで 70-80% がノックダウンされていた。蛋白レベルでも受容体のノックダウンを確認した。

LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子に対する shRNA を発現するウイルスベクター系を構築し、C3H10T1/2 細胞に発現させてそれぞれの受容体をノックダウンした安定細胞株 (LRP5<sup>kd</sup>細胞、Ryk<sup>kd</sup>細胞) を作成した。それぞれの遺伝子の発現を mRNA ならびに蛋白レベルで検討し 80-90% のノックダウンを確認した。この細胞系を用いて Wnt3a の conditioned medium (Wnt3a-CM) に対する ALP 活性、TCF/β-catenin を介した転写活性化への効果を検討した。LRP5<sup>kd</sup>細胞と比べ

Ryk<sup>kd</sup>細胞では Wnt3a-CM に対する ALP 活性、TCF/β-catenin を介した転写活性化が有意に高く、Wnt による canonical 経路の活性化には LRP5 が主たる役割を担うことが示唆された。

##### (2) LRP5 遺伝子と Ryk 遺伝子の一塩基多型と骨密度の関連解析

一般地域住民の検診受診女性 931 名を対象とした解析の結果、既に報告のある LRP5 遺伝子の多型に加えて、Wnt シグナル関連遺伝子 sFRP-1 について骨密度と関連のある遺伝子多型を見いだした。2つの SNP において腰椎および大腿骨の骨密度と有意な関連がみられた。一方、Ryk 遺伝子の SNP については検討した範囲の多型と骨密度には横断解析では有意な関連はみられなかった。今後、検診受診女性の骨密度のフォローアップを行い、骨密度の経時的変化と各 SNP との関連について検討していく必要があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R. Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. *Geriatr Gerontol Int* 9(3): 304-309, 2009. 査読有

② 大中佳三 日本人の骨密度関連遺伝子の網羅的解析：福岡骨粗鬆症コホート研究. *日本老年医学会雑誌* 46(2): 114-116, 2009 査読有

③ 大中佳三、高柳涼一. アンドロゲン、エストロゲンと骨代謝マーカー. *CLINICAL CALCIUM* 19(8): 1118-1124, 2009 査読無

④ 高柳涼一、大中佳三. 閉経後のステロイ

ド性骨粗鬆症に対するラロキシフェンとビスフォスフォネートの臨床効果の比較.  
Osteoporosis Japan 16(4): 298-301, 2008  
査読無

[学会発表] (計5件)

① 大中佳三、河手久弥、高柳涼一. Wntシグナル関連遺伝子の一塩基多型 (SNPs) と骨密度の相関解析. 第25回日本骨代謝学会 2008年10月29日、大阪.

② 大中佳三. 「日本人の骨密度関連遺伝子の網羅的解析 (高密度SNP): 福岡骨粗鬆症コホート研究」 第50回日本老年医学会学術総会—シンポジウム「骨粗鬆症と変形性関節症: 研究と診療の最前線」— 2008年6月21日、千葉.

③ Ohnaka, K. 「Glucocorticoid Enhances the Expression of a Wnt Antagonist, Secreted Frizzled-Related Protein 3, in Cultured Human Osteoblasts」 American Society for Bone and Mineral Research 29th Annual Meeting. Working Group on Osteoporosis and Rheumatic Diseases: Glucocorticoid-Induced Osteoporosis (GIOP) 2007年9月17日, Honolulu, USA.

④ 大中佳三、河手久弥、高柳涼一. グルココルチコイドは培養骨芽細胞において secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3) の発現を増加させる. 第25回日本骨代謝学会 2007年7月19日、大阪

⑤ 大中佳三、足立雅広、河手久弥、高柳涼一. Wntシグナル遺伝子の一塩基多型 (SNPs) と骨密度の関連解析. 第49回日本老年医学会学術総会 2007年6月21日、札幌

[図書] (計1件)

① 大中佳三、高柳涼一. ステロイド骨粗鬆

症の予防と治療. 別冊・医学のあゆみ「骨粗鬆症—臨床と研究の最新動向」(福本誠二編集) 医歯薬出版株式会社、東京、2008年、p113-p118.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大中 佳三 (OHNAKA KEIZO)

研究者番号: 30325518

(2) 研究分担者

高柳 涼一 (TAKAYANAGI RYOICHI)

研究者番号: 30154917

(2008~2009年度: 連携研究者)