

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462905

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

研究課題名(英文) Roles of an atypical 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルは、発生、恒常性維持、老化など多様な生命現象に関与する。RykはWnt受容体の最新のメンバーである。Rykは、Wntシグナル伝達様式の既存の分類に該当せず、その作用機構については不明な点が多い。Wntが関わる骨代謝調節にも、Rykが関与する可能性がある。本研究では、申請者が作製したRyk条件付遺伝子欠損(Ryk cKO)マウスを用いて、Rykの骨代謝における役割および作用分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling is involved in virtually every aspect of embryonic development, and also homeostatic self-renewal and aging in a variety of adult tissues. Ryk is the latest member of the Wnt receptors. Ryk does not belong to the conventional classification of the Wnt-promoted signal transduction. Therefore, 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 mice lines that are established in our laboratory.

研究分野：分子生物学

キーワード：Ryk Wnt 破骨細胞 骨芽細胞

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 が存在する。Wnt は、受容体の組合せ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 LRP5 シグナルは骨形成を促進し(*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(*Nat Med* 18:405, 2012)。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 (*SciSTKE* 2004, pe54)。Ryk 欠損(Ryk KO)マウスは出生日に死亡する(*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。Ryk cKO マウス作製については国内外において全く報告がなかった。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)。しかし Wnt が関わる骨代謝をはじめ他の様々な生命現象も、Ryk が調節する可能性がある。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、非常に重要な意味を持つと考えられた。

2. 研究の目的

Wnt シグナルは、発生、恒常性維持、老化など多様な生命現象に関与する。したがって、Wnt シグナル調節機構の解明は、重要である。Ryk は Wnt 受容体の最新のメンバーである。Ryk は、Wnt シグナル伝達様式の既存の分類に該当せず、その作用機構については不明な点が多い。Wnt-Ryk シグナルは、種を超えて神経ガイダ

スを調節することが知られている。加えて、Wnt が関わる骨代謝調節にも、Ryk が関与する可能性がある。しかし、Ryk シグナルの骨組織における生理作用については、全くわかっていない。本研究では、申請者が作製した Ryk 条件付遺伝子欠損 (Ryk cKO) マウスを用いて、Ryk の骨代謝における役割および作用分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 全身的な Ryk KO マウスにおける破骨細胞数の低下は、Ryk の破骨細胞系列への直接作用によるのか明らかにする目的で、Cre-loxP システムによる破骨細胞系列特異的 Ryk cKO マウスの解析を行った。具体的には、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)マウス (*Nat Med* 18:405, 2012)と Ryk flox マウスの交配より得られた RANK-Cre, Rykflox/- (Ocp-Ryk cKO) マウスを作製し、非脱灰標本を用いた骨組織形態計測、マイクロ CT による骨密度測定を行った。

(2) 全身的な Ryk KO マウスにおける骨形成の低下が、Ryk の骨芽細胞系列への直接作用によるのか明らかにするために、Cre-loxP システムによる骨芽細胞系列特異的 Ryk cKO マウスの解析を行った。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 マウスを作製した。骨組織形態計測、マイクロ CT による骨密度測定を行った。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞系列特異的 Ryk cKO [RANK (Receptor activator of NF- κ B)-Ryk cKO]マウスの破骨細胞分化、骨吸収機能は *in vitro* 系で評価した。M-CSF および RANKL 添加によるマクロファージから破骨細胞への分化系および骨芽細胞との共存培養によるマクロファージから破骨細胞への分化系、の双方において、破骨細胞系列特異的 Ryk cKO マウス由来マクロファージは、正常に破骨細胞へ分化した。 *in vivo*

の組織形態計測、マイクロCTによる骨密度測定いずれにおいても、破骨細胞系列特異的 Ryk cKO マウスは骨吸収に異常が認められず、正常値を示した。

(2) 骨芽細胞系列特異的 Ryk cKO [Osx (Osterix)-Ryk cKO]マウスの骨量および骨密度は著しく低く、骨芽細胞数、破骨細胞数ともに少なかった。骨形成速度も著しく低かった。また、Osx-Ryk cKO マウスから単離した骨芽細胞前駆細胞は、様々なサイトカインに対する応答性が傷害され、骨芽細胞分化において異常が認められた。

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 11 件)

1. 中道裕子, 高橋直之, 宇田川信之; 「歯髄細胞に関する分子生物学的研究」, 腎と骨代謝 **29**:21-40 (査読無)
2. Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. lation of bone metabolism by Wnt signals. *Biochem* **159**:387-92, 2016 (査読有) doi: 10.1093/jb/mvv124
3. Sakai K, Shimodaira S, Maejima S, Udagawa N, Hongo K(15) (他 11) ; Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Neurosurgery* **123**: 989-97, 2015 (査読有)doi: 10.3171/2015.1.JNS141554.
4. Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N; Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun* **463**:1278-83, 2015 (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.
5. 中道裕子, 高橋直之 ; 活性型ビタミンDの骨リモデリング制御系における作用. *CLINICAL CALCIUM* **25**: 395-402, 2015 (査読無) doi: CliCa1503395402.

6. Nakamichi Y, Horibe K, Takahashi N, Udagawa N; Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology* **102**:137-146, 2014 (査読有) doi: 10.1007/s10266-014-0167-0
7. Okamoto M(1), Udagawa N(2), Nakamichi Y(6), Kato H, Takahashi N(10), Kobayashi Y(11) (他 5) ; Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep* **4**:4493, 2014 (査読有) doi: 10.1038/srep04493.
8. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep* **3**:495, 2014 doi: 10.1038/bonekey.2013.229.
9. Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N, Udagawa N; Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology* **140**:344-351, 2013 (査読有) doi: 10.1111/imm.12146.
10. Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N; IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* **31**:486-495, 2013 (査読有) doi: 10.1007/s00774-013-0476-3.
11. Yamamoto Y(1) , Nakamichi Y(10) (他 19) ; Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology* **154**: 1008-10020, 2013 (査読有) doi: 10.1210/en.2012-1542.

(学会発表) (計 5 件)

1. 中道裕子, 溝口利英, 山本陽子, 原田卓, 斎藤一史, 小林泰浩, 加藤茂明, 須田立雄, 宇田川信之, 高橋直之: 活性型ビタミンD製剤エルデカルシトールは、骨芽細胞のVDRを介して骨吸収を抑制し、骨量を増加させる: 第33回日本骨代謝学会: 京王プラザホテル(東京都) 2015年7月
2. 中道裕子, 溝口利英, 山本陽子, 原田卓,

齋藤一史, 小林泰浩, 加藤茂明, 須田立雄, 宇田川信之, 高橋直之: 活性型ビタミンD製剤エルデカルシトールは, 骨芽細胞と骨細胞のVDRを介して骨吸収を抑制し, 骨量を増加させる: 第1回日本骨免疫学会: ホテルブリーズベイマリーナ(沖縄県) 2015年6月

3. 中道裕子: Vitamin D receptor in osteoblasts mediates eldecarcitol-induced increase in bone mass: エルデカルシトールは, 骨芽細胞におけるビタミンD受容体を介して, 骨量増加作用を発揮する: 第3回 Osteoclast Biology Meeting: ホテルマロウド(長野県) 2015年2月
4. 中道裕子, 徳田吉彦, 萩原貴寛, 堀部寛治, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之: 硬組織再生におけるヒト歯髄細胞と骨髄間葉細胞の有用性についての比較解析: 第1回日本骨免疫会議: 万国津梁館(沖縄県) 2014年7月
5. 中村美どり, 米田紘一, 徳田吉彦, 山下照仁, 中道裕子, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之: W9 ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用とヒト骨芽細胞分化促進作用: 第1回日本骨免疫会議: 万国津梁館(沖縄県) 2014年7月

(図書) (計3件)

1. 中道裕子 (分担執筆) (2015) 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会編, 「M-CSF/IL-34」, p. 128-130, 羊土社.
2. 宇田川信之 (分担執筆) (2015) 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード辞典, 日本骨代謝学会編, 「IL-1 ファミリー」, p.212-213, 羊土社.
3. 宇田川信之 (分担執筆) (2015) 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード辞典, 日本骨代謝学会編, 「IL-6 ファミリー」,

p.214-215, 羊土社.

(産業財産権)

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

(その他)

ホームページ等

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

宇田川 信之(Udagawa, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号:70245801