



Title	An Lrp6 Hypomorphic Mutation Affects Bone Mass through Bone Resorption in Mice and Impairs Interaction with Mesd
Author(s)	窪田, 拓生
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49967
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

骨量は様々なホルモンや局所因子が骨形成と骨吸収を調節することで制御されている。Wnt の共受容体の 1 つである low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) は骨形成を調節することで骨量を規定することが明らかにされてきている。しかし、Wnt のもう 1 つの共受容体である LRP6 の骨量維持における役割については充分には検討されていない。本研究では、Lrp6 の骨代謝における機能を明らかにするため、Lrp6 にハイボモルフ点変異 (R886W) が同定された自然発症変異マウス ringelschwanz (rs) の骨量及びその骨量異常の機序を検討し、並びに変異蛋白の機能解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

rs ホモ接合体マウス Lrp6^{rs/rs} と野生型マウス Lrp6^{+/+}において、pQCT の検討では Lrp6^{rs/rs} マウスは Lrp6^{+/+}マウスに比べて海綿骨密度の低下を示した。骨形態計測による組織学的検討では Lrp6^{rs/rs} マウスにおいて単位骨量の減少、骨梁数の減少、骨吸収面の増加を認めた。また骨芽細胞数や石灰化速度の低下は Lrp6^{rs/rs} マウスにおいて見られなかった。さらに、Lrp6^{rs/rs} マウスにおいて骨吸収マーカーである尿デオキシピリジノリンの増加を認めた。骨形成マーカーである血清オステオカルシンの低下は見られなかった。脛骨の免疫組織化学染色では破骨細胞誘導・活性化因子である Rankl の発現が骨芽細胞において増強していた。

頭蓋冠由来の初代骨芽細胞における石灰化能や細胞数の増加、さらには Lrp5 や Lrp6、骨芽細胞の分化マーカーの遺伝子発現を定量 PCR を用いて検討したところ、Lrp6^{rs/rs} と Lrp6^{+/+}の間に明らかな差を認めなかった。しかし、Lrp6^{rs/rs} 骨芽細胞において Rankl の発現増加を認めた。Rankl に拮抗作用を示すオステオプロテジェリンの発現量は明らかな差を認めなかった。骨髓細胞を用いて活性型ビタミン D により誘導される破骨細胞形成及び破骨細胞の骨吸収活性の検討を行ったところ、Lrp6^{rs/rs} 細胞において Lrp6^{+/+}細胞より多くの破骨細胞の形成及び吸収窩の形成を認めた。

次に、初代骨芽細胞及び骨髓間質系細胞株である ST2 を用いて Rankl の発現を検討したところ、活性型ビタミン D で誘導される Rankl の発現が Wnt3a の添加により抑制された。ST2 細胞において、野生型 Lrp6 (Lrp6[WT]) を過剰発現したところ Rankl の発現は抑制されたが、Lrp6^{rs/rs} マウスで同定された変異型 Lrp6 (Lrp6[rs])を過剰発現させても Rankl の発現は Lrp6[WT]の場合ほど抑制されなかった。骨髓細胞を用いた破骨細胞形成実験を行ったところ、Wnt3a は破骨細胞の形成を抑制した。

さらに、変異蛋白 Lrp6[rs]の機能解析を行った。COS7 細胞及び ST2 細胞に Lrp6[WT]及び Lrp6[rs]を遺伝子導入したところ、Lrp6[rs]の発現量は野生型 Lrp6[WT]と明らかな差を認めなかった。ST2 細胞を用いた TCF レポーターアッセイにおいて、Lrp6[rs]は Wnt3a により誘導される Wnt/beta-catenin シグナルを効率的に伝達できなかった。次に、免

【11】

氏 名	窪 田 拓 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 22402 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 7 月 18 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学 位 論 文 名	An <i>Lrp6</i> Hypomorphic Mutation Affects Bone Mass through Bone Resorption in Mice and Impairs Interaction with <i>Mesd</i> (Lrp6 ハイボモルフ変異は骨吸収を介して骨量に影響を与え、Mesd との相互作用を障害する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 菌 恵一 (副査) 教 授 吉 川 秀 樹 教 授 米 田 悦 啓

疫沈降法を用いて、シャペロンとして機能し Lrp6 を細胞膜へ局在させる作用を有する Mesd との相互作用について検討したところ、Lrp6[rs]では Lrp6[WT]と比し低下を認めた。形質膜蛋白のビオチンラベルを用いた実験において、形質膜に局在する Lrp6[rs]は Lrp6[WT]と比し減少していた。Mesd を過剰発現させると、Lrp6[WT]の形質膜における局在は著明に増加したが、Lrp6[rs]の増加は軽度であった。また、Mesd は Lrp6[WT]により誘導される Wnt/beta-catenin シグナルをさらに増加させたが、Lrp6[rs]においてはその増加効果は軽度であった。

[総 括]

Lrp6^{rs/rs} マウスは少なくとも部分的には骨芽細胞における Rankl の発現増加により破骨細胞が活性化し骨吸収が亢進していることが示唆された。Lrp6^{rs/rs} マウスで同定された R886W 変異型 Lrp6[rs]は、Mesd との結合低下により細胞膜への局在性が低下し、Wnt/beta-catenin シグナル伝達の異常を来したと考えられる。今後、Mesd が LRP5 や LRP6 の機能喪失型変異に関連した疾患の治療標的分子となる可能性を示したことに意義があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Wntの共受容体であるLDL receptor-related protein 5 (LRP5) が骨形成を正に調節することが明らかにされているが、もう1つの共受容体であるLRP6の骨代謝における役割は明らかではなかった。本論文では*Lrp6*遺伝子の機能喪失型の点変異 (R886W) が同定された自然発症変異マウス*ringelschwanz* (*rs*) を用いて、Lrp6が破骨細胞分化・活性化因子であるRanklの骨芽細胞における発現を抑制することで骨吸収を抑制し骨量を増加させること、及び*rs*変異型Lrp6蛋白はシャペロン分子であるMesoderm development (Mesd) との結合能の減少のために細胞膜への局在が障害され、Wnt/ β -cateninシグナルを効率的に伝達できないことを示している。Lrp6がLRP5とは異なる機序で骨量を調節することを示し、MesdがWntシグナルを介する骨粗鬆症治療薬の標的分子となりうる可能性が示された本論文は学位に値するものと認める。