

主論文の要旨

**LRP4 induces extracellular matrix productions
and facilitates chondrocyte differentiation**

〔 LRP4 は細胞外基質の産生を誘導し軟骨細胞の分化を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

浅井 信之

【緒言】

内軟骨性骨化は骨格の発達において重要なステップであり、膜性骨化と異なり、成長軟骨における軟骨細胞の分化を必要とする。Wnt シグナル伝達経路は軟骨の発達において重要な制御因子であることが明らかになってきており、Wnt シグナルの複数の構成因子が *in vitro* において軟骨細胞の分化に、*in vivo* において軟骨の発達に関与していることが示されている。Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) は LDLR ファミリーに属する膜タンパクであり、骨芽細胞においては、Wnt シグナルのインヒビターである Dkk1、Sost や Sostdc1 の受容体として働き、骨の発達において Wnt/ β カテニンシグナルを抑制している。LRP4 欠損マウスに認められる骨格形成異常は、部分的には内軟骨性骨化の異常により説明されうるが、軟骨細胞の分化における LRP4 の機能はよく知られていない。今回我々は、内軟骨性骨化における LRP4 の機能を解析した。

【対象及び方法】

生後 9 日の ICR マウスの脛骨を採取し、レーザーマイクロダイセクションを用いて近位成長軟骨板を軟骨細胞の層ごとに切り抜き、各層における LRP4 の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR を用いて評価した。

軟骨細胞の分化を再現できる cell line である ATDC5 細胞に、human LRP4 をトランスフェクションし LRP4 を過剰発現させる一方、レンチウイルスを用いて shRNA を導入し LRP4 をノックダウンした。ATDC5 細胞から RNA を抽出して、リアルタイム PCR を用いて Col2a1、Acan、Col10a1、Sox9、Runx2、MMP13、Dkk1、Sost、Axin2 の mRNA 発現レベルを評価した。また ATDC5 細胞において細胞外基質であるグリコサミノグリカンを評価するためにアルシアンブルー染色を行った。

LRP4 を過剰発現させた、あるいは siRNA を用いて LRP4 をノックダウンした ATDC5 細胞において、TOPFlash を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、Wnt シグナル活性を評価した。

LRP4 をノックダウンした ATDC5 細胞の培養液に Wnt シグナルのインヒビターであるケルセチンを添加して、Col2a1、Acan、Col10a1 の mRNA 発現レベルとアルシアンブルー染色を評価した。

【結果】

LRP4 はマウス成長軟骨板の肥大軟骨層に多く発現しており (Fig. 1A, B)、過去に報告されているマウス成長軟骨板におけるレーザーマイクロダイセクションを用いたマイクロアレイのデータを再解析したところ、同様の結果であった。

LRP4 の過剰発現により、細胞外基質である Col2a1、Acan、Col10a1 の mRNA の発現とアルシアンブルーの染色性は上昇した (Fig. 1C-G)。反対に LRP4 のノックダウンにより、細胞外基質の遺伝子発現とアルシアンブルーの染色性は低下した (Fig. 2)。

LRP4 のノックダウンにより、Sox9 と Dkk1 の mRNA の発現は抑制されたが、Sost の発現に影響はなかった (Fig. 3)。

TOPFlash アッセイにおいて、ATDC5 細胞における LRP4 の過剰発現により Wnt シグナル活性は低下し、LRP4 のノックダウンにより Wnt シグナル活性は上昇した (Fig. 4A, B)。

LRP4 のノックダウンにより低下した Col2a1、Acan、Col10a1 の mRNA 発現レベルとアルシアンブルの染色性は、ケルセチンによりレスキューされた (Fig. 4C-G)。

【考察】

LRP4 は歯牙原基や尿管芽など複数の組織で発現しており、LRP4 欠損マウスでは各組織の発達異常を来す。軟骨細胞における LRP4 の発現とその機能はまだ解明されていなかったが、今回我々は LRP4 が内軟骨性骨化において肥大軟骨層に多く発現していることを明らかにした。また LRP4 が軟骨細胞の成熟と、軟骨形成における細胞外基質の産生において重要な制御因子であることを示した。今回の研究結果と一致するように、過去の報告では、LRP4 欠損マウスでは軟骨組織において異常なアルシアンブル染色を呈し、大腿骨長の短縮を認める。ヒトにおいては、LRP4 の突然変異は、Cenani-Lenz 症候群や sclerosteosis-2、先天性筋無力症を引き起こすが、LRP4 欠損マウスと異なり、これらの疾患では軟骨組織の異常や低身長は来さない。ヒトの疾患においては、LRP4 による Wnt/ β カテニンシグナルの抑制効果が、LRP4 突然変異下でも残っている可能性や、他の LRP ファミリータンパクが、欠損した LRP4 の代わりに作用して、内軟骨性骨化に起きうる異常をレスキューしている可能性が考えられる。

Wnt シグナルの構成因子について、Wnt リガンドである Wnt-5a や Wnt-5b は前肥大軟骨層や肥大軟骨層に発現し、軟骨細胞の分化に対して一定の役割を担っている。また Frizzled タンパクである Fzd-1 や Fzd-7 は軟骨細胞の成熟を遅らせ、LRP5/6 は軟骨細胞の肥大化を促進する。今回我々は、LRP4 が Wnt/ β カテニンシグナルを阻害することにより、軟骨細胞の成熟と細胞外基質の産生を誘導することを確認した。LRP4 に結合することが知られている Dkk1 は、ヒトの間葉系幹細胞の早期軟骨形成において、グリコサミノグリカンの合成と、Sox9、Col2a1 の発現を促進し、内軟骨性骨化において成熟軟骨細胞や骨芽細胞に発現している。また他に LRP4 に結合することが知られている Sostdc1 は、内軟骨性骨化においてマウスの四肢に広く発現している。内軟骨性骨化における Dkk1 と Sostdc1 の機能は、結合パートナーである LRP4 に依存し、これらの分子がともに作用して内軟骨性骨化において Wnt/ β カテニンシグナルを下方制御している可能性が示唆される。

【結語】

LRP4 は内軟骨性骨化において Wnt/ β カテニンシグナルを抑制することにより、細胞外基質の産生を誘導し軟骨細胞の分化を促進する。