

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 竹田 秀

本研究は骨組織を構成する破骨細胞と軟骨細胞の分化制御機構に着目し、発生工学的手法を用いてそれぞれの分化メカニズムの一端を明らかにしようと試みたものである。なかでも、ビタミン D 受容体(VDR)欠損マウスの作成と VDR の破骨細胞形成における役割の検討、軟骨特異的 Cbfa1 強制発現マウスの作成と Cbfa1 の軟骨細胞分化における役割の検討について研究を進め下記の結果を得ている。

1. 生体における VDR の機能を明らかとする目的でジーンターゲット法を用いて VDR 欠損マウスを作成した。VDR 欠損マウスは離乳後から出現するの成長障害、不妊を呈し、15 週前後で死亡した。また、VDR 欠損マウスはビタミン D 依存性クル病 II 型と同様に、低カルシウム血症、低リン血症、クル病を呈することが明らかとなった。1,25(OH)₂D が破骨細胞の形成に重要な役割を果たしていることはよく知られているが、その作用の発現が VDR への結合を介するか否かは未だ明らかでない。そこで、1,25(OH)₂D の存在下で骨芽細胞と脾細胞の共存培養を行った。両方の細胞を野生型マウスから調整した場合、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性の多核巨細胞の形成を認めた。一方、両方の細胞を VDR 欠損マウスから調整した場合、破骨細胞は形成されなかった。骨芽細胞を野生型マウス、脾細胞を VDR 欠損マウスから調整した場合は破骨細胞は正常に形成された。ところが、骨芽細胞を VDR 欠損マウスから、脾細胞を野生型マウスから調整した場合破骨細胞は全く形成されなかった。破骨細胞形成は他の因子によっても促進されるため、引き続いて副甲状腺ホルモン (PTH) または IL-1α を用いて共存培養を行った。PTH や IL-1α の存在下では骨芽細胞、脾細胞の遺伝子型に関わらず、破骨細胞の形成を認めた。さらに、VDR 欠損マウスの骨芽細胞と脾細胞から PTH の存在下で調整した破骨細胞は象牙切片上で正常に吸収窩を形成した。

2. Cbfa1 は骨格形成の初期、胎生 12.5 日まで細胞凝集領域の細胞で高レベルで発現している。その後も Cbfa1 は軟骨細胞で発現が認められるものの、その発現レベルはきわめて低い。一方、骨芽細胞でのその発現は発生前後を通じて極めて高く、また Cbfa1 は骨芽細胞の分化において必須の転写因子であることが In vivo で示されている。Cbfa1 欠損マウスの一部の骨では、骨芽細胞分化の異常のみならず軟骨細胞の肥大化異常が認められる。そこで今回、Cbfa1 が軟骨細胞の肥大化を調節する可能性を考えた。そのため、肥大軟骨細胞以外の軟骨細胞（以下、非肥大軟骨細胞）に Cbfa1 を恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作成した ($\alpha 1(\text{II})\text{Cbfa1}^{\text{tg}}$)。 $\alpha 1(\text{II})\text{Cbfa1}^{\text{tg}}$ は異所性の軟骨細胞の肥大化、それに引き続く内軟骨性骨化を示した。この内軟骨性骨化が Cbfa1 による骨芽細胞の軟骨細胞へ分化転換によるのか、肥大軟骨細胞分化を誘導する独立した Cbfa1 の機能によるものかを明らかにするため、引き続いて Cbfa1 トランスジェニックマウスを用いて、Cbfa1 欠損マウスの非肥大軟骨細胞のみに Cbfa1 を恒常的に発現させた ($\alpha 1(\text{II})\text{Cbfa1}^{\text{tg}}\text{-Cbfa1}$ 欠損マウス)。その結果 Cbfa1 欠損マウスの異常のうち軟骨細胞の肥大化及び血管侵入は Cbfa1 の発現により正常化したが、骨芽細胞の分化は認められなかった。この Cbfa1 トランスジェンによる救済はトランスジェンの発現部位に限局して認められ、細胞自律的な救済と考えられた。また、 $\alpha 1(\text{II})\text{Cbfa1}^{\text{tg}}$ では骨芽細胞がないにもかかわらず、肥大軟骨細胞基質に TRAP 陽性の多核巨細胞を認め破軟骨細胞と考えられた。

以上、本論文は VDR 欠損マウスを用いて $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は破骨細胞前駆細胞ではなく骨芽細胞に存在する VDR を介して破骨細胞形成を促進することを明らかとした。また、VDR の遺伝子型に関わらず、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞を用いた共存培養系で PTH や $\text{IL-1}\alpha$ の存在下で破骨細胞が形成されることが明らかとなった。さらに Cbfa1 軟骨特異的過剰発現マウスを用いて、Cbfa1 が軟骨細胞分化因子であること、しかも軟骨と骨という同じ間葉系由来の異なる 2 種の細胞分化を同時に調節する初めての転写因子であることが明らかとなった。従って、本研究は破骨細胞、軟骨細胞分化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと思われる。