

# 論文の内容の要旨

論文題目 骨におけるエストロゲン受容体の作用

指導教官 福岡秀興助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 藤田雅代

## 緒言

エストロゲンは生殖器官に作用するのみならず、骨組織においても重要な作用を及ぼしている。閉経後の骨粗鬆症はエストロゲン低下に起因するもので、エストロゲン補充により、この病態を防ぐことができる。また、エストロゲンは、女性だけでなく男性の骨代謝においても重要な役割を果たしている。

エストロゲンの作用は、核内受容体スーパーファミリーの一種であるエストロゲン受容体(ER)を介して発揮される。ERには、 $\alpha$ 、 $\beta$ の2種類のサブタイプが存在し、骨芽細胞、破骨細胞にER  $\alpha$ 、 $\beta$ が発現していることが知られている。しかし、骨におけるERの分子標的及び標的遺伝子は十分には解明されていない。

1以前、小川らは、ER $\alpha$ のC末を欠損させた変異体で、ER $\alpha$ 、 $\beta$ 両方の転写活性を抑制する作用を持つドミナントネガティブER(以下dnER)を強制発現させたトランスジェニックラットを作製した(Ogawa, Fujita et al, J. Biol. Chem. 2000, 275:21372-9)。dnERトランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞では、内在性のERによる転写活性が抑制された状態にあり、生体内においてdnERが機能していると認められた。このdnERトランスジェニックラットをエストロゲンに低反応を示すモデル動物として使用して、骨代謝に対するERの役割を検討した。雌の骨の表現型について解析したところ、野生ラットでは卵巣摘出後の骨密度減少がエストロゲン投与によって予防されたのに対し、dnERト

ランスジェニックラットの雌は、エストロゲンを投与しても骨密度の低下が予防されず、エストロゲンに対して低応答であったことから、雌において、卵巣摘出後のエストロゲン投与に対する骨への作用はERを介していることが示された。

本研究では、雌に引き続き、雄の dnER トランスジェニックラットを用い、雄の骨代謝に対する ER の作用を解析した。さらに、dnER トランスジェニックラットが骨におけるエストロゲン低応答のモデル動物であることを利用し、野生ラットおよび dnER トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞を用いて ER の転写活性が抑制された場合の反応性や遺伝子発現の違いについて検討した。

## 方法

### 雄の骨代謝における ER の役割に関する解析

3ヶ月齢の雄ラット(dnER トランスジェニックラット 10 匹、野生ラット 10 匹)をそれぞれ5匹ずつ、エストロゲン投与群、プラセボ投与群に分け、それぞれエストロゲンペレット、あるいはプラセボペレットを皮下に埋め込んだ。60 日後にサクリファイスし、大腿骨密度、大腿骨長、精巣、精囊の重量、体重を測定した。

### dnER トランスジェニックラット由来および野生ラット由来初代培養骨芽細胞における遺伝子発現の解析

1日齢の新生ラット頭蓋骨より、初代培養骨芽細胞を採取した。増殖測定は、BrdU 取り込み試験により行った。dnER トランスジェニックラット由来と野生ラット由来初代培養骨芽細胞の遺伝子発現の差異の同定は、マイクロアレイ法で解析した。ノザンプロット解析およびウェスタンプロット解析にて実際の遺伝子発現の増減を確認した。

### エストロゲンによる骨芽細胞への増殖誘導と細胞周期制御因子の活性化

野生ラット由来骨芽細胞を用い、エストロゲン添加による増殖促進作用を BrdU 取り込み試験にて解析した。骨芽細胞におけるエストロゲン添加による G1 サイクリンのタンパク発現誘導をウェスタンプロットにて解析した。さらに、サイクリンとサイクリン依存性キナーゼ(Cdk)複合体のリン酸化活性を GST-Rb を基質として、キナーゼ活性測定を行った。

## 結果

雄 dnER トランスジェニックラットは、骨においてエストロゲンの反応性が低下している

大腿骨密度に関しては、野生ラットではエストロゲン投与により骨密度が有意

に増加したのに対し、dnER トランスジェニックラットでは有意な骨密度の増加は認められなかった。大腿骨長は、野生ラットではプラセボ投与群に比べエストロゲン投与群では有意に短くなっていた。これに対し、dnER トランスジェニックラットではプラセボ投与群と E2 投与群とで長さに差はなかった。精巣重量、精嚢重量、体重については dnER トランスジェニックラット、野生ラットとも、E2 投与群は、プラセボ投与群に比べ、有意に低下していた。

*dnER トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞は増殖が低下している*

骨の表現型の検討から、dnER トランスジェニックラットは雄雌とも骨において、エストロゲンに対して低反応であることが認められた。続いて細胞レベルにおいては、エストロゲンに対し低反応であることとどのような変化が生じるか、初代培養骨芽細胞に着目して解析を行った。dnER トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞は野生ラット由来初代培養骨芽細胞に比べ増殖が有意に低下していた。この分子機構を知るために、dnER トランスジェニックラット由来および野生ラット由来初代培養骨芽細胞を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、細胞周期制御因子の一つであるサイクリン D2 の発現がトランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞で低下していた。実際に mRNA レベル、タンパクレベルで発現が低下していることがノザンプロットおよびウェスタンブロット解析で確認された。

*エストロゲン添加により D-タイプ サイクリンの発現が誘導される*

初代骨芽細胞に  $10^{-10}$ - $10^{-7}$ M の濃度でエストロゲン添加すると、 $10^{-8}$ M で最も増殖が促進された。また、エストロゲンを  $10^{-8}$ M 添加した際、初代培養骨芽細胞におけるサイクリン D2、サイクリン D3 タンパクの誘導が認められた。この誘導は、ER のアンタゴニストである ICI182,780 により抑制されたことから、サイクリン D2、サイクリン D3 の誘導は ER を介していることが示唆された。サイクリン D1 のタンパク発現は、初代培養骨芽細胞においては検出されなかった。

*エストロゲンによる D-タイプ サイクリン と Cdk4/6 の結合の増加及びサイクリン-Cdk 複合体のキナーゼ活性の上昇*

D-タイプ サイクリンは、Cdk4 または Cdk6 と複合体を形成する。エストロゲンを初代培養骨芽細胞に添加すると、サイクリン D2-Cdk4/6 およびサイクリン D3-Cdk4/6 の結合が誘導された。さらに、サイクリン D2-Cdk4/6 およびサイクリン D3-Cdk 4/6 複合体のキナーゼ活性の上昇も認められた。

## 考察

本研究で、dnER トランスジェニックラットをモデル動物として用い、雄におけるエストロゲンの骨への作用が ER を介しているか解析したところ、野生ラットではエストロゲン投与により有意に骨密度の増加が認められたのに対し、dnER トランスジェニックラットでは骨密度の増加は認められなかった。したがって、雄 dnER トランスジェニックラットは、骨においてはエストロゲンに対し低応答であることが認められ、エストロゲンによる骨密度の増加作用は ER を介していることが示唆された。また、大腿骨長は野生ラットではエストロゲン投与群はプラセボ投与群より有意に短くなっていたことから、長軸方向への成長阻害が生じていることが示されたが、dnER トランスジェニックラットではエストロゲン投与による成長阻害は認められなかった。エストロゲン投与により長軸方向への成長が抑制されることが報告されているが、これは ER を介した作用であると考えられる。精巣重量、精嚢重量、体重へのエストロゲン作用は、中枢神経系を介して引き起こされると考えられる。野生ラット、dnER トランスジェニックラットとも精巣重量、精嚢重量、体重が低下していたことから、中枢神経系においては dnER がエストロゲンシグナルを抑制しきれずに、内在性の ER を介してエストロゲン作用が引き起こされた可能性がある。

dnER トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞は野生ラット由来初代培養骨芽細胞に比べ、増殖が低下し、サイクリン D2 の発現レベルも低かった。初代培養骨芽細胞にエストロゲンを作用させるとサイクリン D2、サイクリン D3 の発現が誘導され、さらに Cdk4/6 のキナーゼ活性も上昇した。一方で、ER 陽性乳ガン細胞においては、サイクリン D1 がエストロゲンにより誘導され、それに伴い Cdk4 のキナーゼ活性が促進されるが、Cdk6 の活性は上昇しないことが知られている。従って、エストロゲンによる D-タイプサイクリンの誘導と Cdk のキナーゼ活性の促進は細胞や組織によって異なっていると考えられる。また、サイクリン D1 のプロモータ上には CRE や SP1 などのサイトが存在し、これらを介して ER が直接転写制御を行っていることが示唆されている。ラットサイクリン D2、サイクリン D3 のプロモータ上にも CRE, SP1 が存在し、これらを介した直接転写制御が行われる可能性が考えられ、興味深い。

## 結語

本研究より、dnER トランスジェニックラットをモデル動物として用いた検討から、雄におけるエストロゲンの骨に対する作用は ER を介することが示唆された。また、サイクリン D2、サイクリン D3 は、エストロゲンから ER を介した初代培養骨芽細胞増殖促進作用における標的因子であることが示唆された。