

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成11年度博士課程入学

氏名 山本 陽子

指導教官 加藤 茂明

論文題目 ビタミンD受容体の骨組織における高次機能の解析

1. 目的

骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより再構築を繰り返し一定の骨量を保っている。骨にはカルシウムの貯蔵庫としての役割があるため、骨代謝はビタミンDや副甲状腺ホルモン(PTH)などが制御する血中カルシウム濃度の変動によって影響を受ける。このような骨代謝に加え骨形成の制御には骨芽細胞分化に関わる転写因子Runx 2/Cbfa 1、ビタミンDの他エストロゲン等をリガンドとする核内受容体群、Wntシグナル系、レプチン等の関与が、骨吸収の制御には骨芽細胞系細胞で発現する破骨細胞形成誘導因子であるRANKL、炎症性サイトカインであるTNF α やIL-1等の関与がそれぞれ報告されている。

ビタミンDは古くから骨代謝、骨形成の主要調節因子として知られてきたが、他にカルシウム代謝調節や細胞の増殖抑制・分化誘導を調節することも証明されている。一般にこれらのビタミンD作用は活性型の1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ がリガンド依存性の転写調節因子であるビタミンD受容体(VDR)に結合し、標的遺伝子の転写を制御することによって発揮される。これまでに本研究室の吉澤らはVDRの生体内での高次機能を解明するため、VDR遺伝子欠損(KO)マウス(VDR $^{-/-}$: Conventional-VDRKO)を作製した¹⁾。Conventional-VDRKOMausは成長障害、低カルシウム・低リン血症、高PTH血症、血清1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ の著しい増加、骨量減少および脱毛といった典型的なクル病症状を離乳後に示した。しかしConventional-VDRKOMausの骨で観察された骨量減少は低カルシウム・低リン血症を伴うPTH過剰産生状態(二次性副甲状腺機能亢進症)によって間接的に引き起こされた可能性が否定できなかった。このようにビタミンDが血中カルシウム代謝を介し少なくとも間

接的に骨代謝を制御することは明らかにすることができたが、ビタミン D の骨細胞の増殖分化への直接作用の可能性は証明することができなかった。そこで本研究では、カルシウムの間接的作用のない骨芽細胞特異的に VDR 遺伝子を欠損するマウスを作出することでビタミン D の骨芽細胞を介した骨へのビタミン D 直接作用の検証を試みた。

2. VDR^{flox} マウスの作出

P1 フェージ由来の Cre リコンビナーゼ (Cre) が loxP 配列で挟まれた領域を切り出す性質を利用した Cre-loxP システムによる骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの作出を試みた。まずラット VDR cDNA (exon 2-3) 235bp をプローブとし、TT2 ES 細胞株ゲノムライブラリーのスクリーニングを行いマウスゲノム断片を取得した。このマウスゲノム断片について制限酵素地図を作成し、VDR 遺伝子座の開始コドン及び DNA 結合領域の存在する exon 2 の両側に loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを構築した。このベクターを TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し、サザンプロット法により相同組換え体を同定した。得られた ES 細胞相同組換え体を CD-1 マウス 8 細胞期胚にアグリゲーション法により導入し VDR^{flox} キメラマウスを作出した。これらのキメラマウスと C57BL/6 マウスとの交配により VDR^{flox} マウス (VDR^{L2/L2}) を得た。

3. 骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの解析

3-1. 全身 VDRKO (VDR^{L/L}:All-VDRKO) マウスの作出と解析

VDR^{flox} マウスの生体内で実際 Cre-loxP システムが働き、Cre 存在下で VDR 遺伝子座の切り出しを確認する目的で、Cre を全身で発現する CMV-Cre トランスジェニック (Tg) マウスと VDR^{flox} マウスとの交配を行った。これにより吉澤らが作出した Conventional-VDRKO マウスと同様の全身の VDR 遺伝子が欠損した All-VDRKO (VDR^{L/L}) マウスが得られた。このマウスは Conventional-VDRKO と同様の典型的なクル病的変異を示し、判別は困難であった。これらのことから VDR^{flox} マウスの生体内で Cre-loxP システムが機能することが明らかになり、このマウスと標的組織特異的 Cre 発現マウスとを掛け合わせることで組織特異的な VDR 遺伝子欠損マウスの作出が可能と判断した。

3-2. 骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO) マウスの作出

骨芽細胞特異的に Cre を発現する collagen $\alpha 1(I)$ -Cre Tg マウスと VDR^{flox} マウスとの交配により 3-1.のアプローチにより Ob-VDRKO (VDR^{ob-L/ob-L}) マウスの作出を行った。まず始めに Ob-VDRKO マウスの各組織において、Cre による VDR 遺伝子座の切り出しをサザンプロット法により検討したところ、骨芽細胞の存在する頭骸骨、大腿骨、頸骨のみで切り出しが起きており、カルシウム代謝に関わる腎臓や小腸等の組織における骨芽細胞非特異的な切り出しは観察されなかった。Ob-VDRKO マウスの成長曲線は野生型と有意な差異は見出されず、正常であった。また Conventional-VDRKO マウスや All-VDRKO マウスでは共に低カルシウム血症、低リン血症、高 PTH 血症、更に血清 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の著しい増加が観察された。しかしながら骨芽細胞特異的 VDRKO マウスにおいてはいずれも正常値を示した。

3-3. 骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO)マウスの骨組織の解析

骨量が最大となる 16 週齢のマウスの大腿骨の X 線解析を行なったところ、Conventional-VDRKO マウスや All-VDRKO マウスでは著しい骨量の減少が観察されたが、Ob-VDRKO マウスは予想に反し野生型と比較し骨量が増加することを見出した。また骨密度も野生型に比べ有意に上昇していたが、この傾向は骨端部よりも骨幹部でより顕著であった。この骨量および骨密度増加の現象を詳細に解析するために骨組織形態計測を詳細に解析したところ、Ob-VDRKO マウスは野生型に比べ骨形成の遅延が観察されるものの、骨吸収が抑制されたことにより骨量が増加していることが明らかになった。

次に十数種類の骨代謝関連遺伝子発現を検討した結果、Ob-VDRKO マウスでは破骨細胞形成誘導因子である RANKL 遺伝子発現の減少を見出した。一方骨形成のマスタージーンと考えられている転写因子 Runx 2/Cbfa 1 の発現量は変化がなかった。しかしながら、最近 Runx 2/Cbfa 1 非依存的に骨形成に関与することが明らかになった Wnt シグナル関連遺伝子の発現を検討したところ、Wnt シグナルの下流に位置する Lef1 の発現が Ob-VDRKO マウスで上昇していた。

これらのことから VDR は単にカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞の VDR が骨量および骨代謝の制御、骨芽細胞分化制御に直接関与していることが明らかになった。

4. 考察

本研究では、カルシウムの間接的作用のない、Ob-VDRKO マウスを作出し解析することによりビタミン D の骨芽細胞を介した骨への直接作用の解明を試みた。作出した Ob-VDRKO マウスの血中ホルモン濃度はいずれも正常値を示したため、従来は不可能であった生体内におけるビタミン D のカルシウム作用と骨の細胞に対するビタミン D の直接作用の分離に初めて成功した。吉澤らの作出した Conventional-VDRKO マウスや本研究 3-1. で作出した All-VDRKO マウスでは著しい骨量の減少が観察されており、抗クル病因子として発見されたという歴史的背景から考えても、Ob-VDRKO マウスも同様の表現型を示すと考えられた。しかしながら Ob-VDRKO マウスは驚くべき事に、骨量および骨密度が上昇するという表現型を示した。このことから Conventional-VDRKO マウスおよび All-VDRKO マウスの骨量減少は血中ホルモン濃度の変動によって引き起こされたと考えられる。中でも PTH は間欠的投与では骨量を増やすが、連続投与では骨量を減少させることが知られており、Conventional-VDRKO マウスおよび All-VDRKO マウスでは PTH が高値を示すことから、骨量減少の原因は持続的な PTH の分泌にあることが示唆された。本研究室の竹田らは Conventional-VDRKO マウスを用いた実験により、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨芽細胞の VDR を介して破骨細胞形成を誘導する作用をもつが、この作用が欠損した場合には PTH や IL-1 の刺激により破骨細胞が形成されることを明らかにしており²⁾、Conventional-VDRKO や All-VDRKO マウスは PTH による破骨細胞形成が亢進していると考えられる。そして Ob-VDRKO マウスの PTH 濃度は正常であるため、野生型に比べ骨芽細胞の VDR を介した破骨細胞形成が抑制された分だけ骨吸収が減少し、骨量が増加したものと考えられた。

一方、Ob-VDRKO マウスでは Wnt シグナル系の Lef1 の発現が上昇していたことから、骨形成にも関与していることが示唆された。ビタミン D と Wnt シグナルの関連については、

ビタミン D が β -catenin-TCF-4 の転写活性を阻害することにより大腸癌細胞の分化を誘導するという報告がある。また VDRKO マウスは毛周期が欠如し、その結果脱毛がみられるようになるが、 β -catenin の皮膚特異的 KO マウスでも毛周期が欠如することが報告されており、両者は非常によく似た表現型を示す。また Lef1 は毛包形成に深く関与していることが知られている。これらの事実からビタミン D と Wnt シグナルの間には何らかのクロストークが存在すると思われる。ビタミン D と骨芽細胞増殖に関する詳細な解析報告はないが、ビタミン D の増殖抑制・分化誘導作用は白血病細胞で証明されていることから、骨芽細胞においても同様の調節作用の存在が予想される。そしてもしこのような作用があるとなれば、Wnt シグナルの関与が考えられる。この点については今後さらなる検討が必要である。

以上本研究により、VDR を介したビタミン D 作用は単にカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞の VDR が骨吸収と骨形成の両面から骨代謝の制御に直接関与していることを明らかにし、VDR の骨組織における高次機能の一端を解明した。

参考文献

- 1) Yoshizawa, T. *et al.* Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 16:391-6. (1997)
- 2) Takeda, S. *et al.* Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 140:1005-8. (1999)