

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山本陽子

本論文はビタミン D 受容体の骨組織における高次機能解析に関するもので、4 章より構成される。抗くる病因子として発見されたビタミン D は古くから骨代謝の主要調節因子として知られてきたが、他にもカルシウム代謝調節、細胞の増殖抑制・分化誘導など多様な生理作用を持つ。これらの作用は活性型の  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  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。これまでに吉澤らは VDR の高次機能解明のため、VDR 遺伝子欠損 (KO) マウス (Conventional-VDRKO : Conv.-VDRKO) を作出した。Conv.-VDRKO マウスは成長障害、低カルシウム・低リン血症、高 PTH 血症、血清  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の著しい増加、骨量減少といった典型的な病状を離乳後に示した。しかし Conv.-VDRKO マウス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ず、ビタミン D の骨細胞への直接作用の可能性は証明することができなかった。そこで本研究では骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの作出により、ビタミン D の骨芽細胞を介した骨への直接作用の検証を試みている。

第 2 章では VDRflox マウスの作出を行っている。Cre/loxP システムによる骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの作出のため、VDR 遺伝子座に loxP を挿入したターゲティングベクターを構築し、VDRflox マウス (VDR<sup>L2/L2</sup>) を得た。

第 3 章ではまず全身 VDRKO (VDR<sup>L/L</sup> : All-VDRKO) マウスの作出と解析を行っている。Cre を全身で発現する CMV-Cre マウスと VDRflox マウスとの交配により、全身の VDRKO (VDR<sup>L/L</sup> : All-VDRKO) マウスが得られた。このマウスは Conv.-VDRKO と同様の典型的な病変を示し、判別は困難であった。よって VDRflox マウスと組織特異的 Cre 発現マウスとの交配により、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。

次に骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO) マウスの作出と解析を行っている。骨芽細胞特異的に Cre を発現する Col.  $\alpha 1(\text{I})$ -Cre マウスと VDRflox マウスとの交配により Ob-VDRKO (VDR<sup>Ob-L/Ob-L</sup>) マウスの作出を行った。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 Conv.-VDRKO マウスと All-VDRKO マウスは共に低カルシウム・低リン血症、高 PTH 血症が観察されたが、Ob-VDRKO マウスはいずれも正常値を示した。また大腿骨の X 線解析により、Conv.-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。骨組織形態を詳細に解析したところ、Ob-VDRKO マウスは皮質骨形成が促進され、海綿骨形成は抑制されることが明らかになった。また骨吸収も抑制されることが明らかになった。さらに骨代謝関連

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。一方骨形成に関与する転写因子 Runx 2 の発現量は変化がなく、Runx 2 非依存的に骨形成に関与する Wnt シグナルの下流に位置する転写因子 Lef1 の発現が Ob-VDRKO マウスで上昇していることを見出した。

本研究により、骨組織に対する VDR の直接作用と間接作用が新たに解明された。間接作用については、Aii-VDRKO マウスと Ob-VDRKO マウスの比較から、Aii-VDRKO マウスでは骨吸収促進作用を持つ PTH 濃度の上昇によりくる病症状が見られるようになることを明らかにした。つまり、VDR は PTH の発現を抑制する事で、間接的な骨吸収抑制作用を持つことを明らかにした。また直接作用については、Ob-VDRKO マウスでは骨吸収が抑制される事を明らかにし、これは破骨細胞分化に関わる RANKL 遺伝子発現抑制によるものであることを明らかにした。一方骨形成に関しては、海綿骨骨形成が抑制され、皮質骨骨形成が促進される事を明らかにした。つまり、骨芽細胞の VDR は骨吸収促進作用の他、海綿骨骨形成促進作用、皮質骨骨形成抑制作用を持つことを明らかにした。

以上本論文は、骨組織に対する VDR の直接作用と間接作用を解明しており、栄養学、骨代謝学いずれの分野においても発展性が期待され、学問上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。