

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程進学
氏名 中村 貴
指導教員 加藤 茂明

論文題目 破骨細胞における性ステロイドホルモン受容体高次機能の解明

1. はじめに

骨は身体の支持組織であるとともに、カルシウム等のミネラル貯蔵器官として重要である。骨基質はコラーゲンを主成分とする基質にハイドロキシアパタイトが沈着した硬組織であるにも関わらず、内外からの刺激に応じて常に活発に再構築（骨リモデリング）を繰り返している。この過程は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の正負の調節の上に成立するため、正常な骨組織の維持には骨リモデリングのバランス維持が重要である。骨リモデリングには数多くの代謝制御因子が知られているが、なかでも性ステロイドホルモンは主要制御因子として知られている。実際、近年顕在化している閉経後骨粗鬆症は、女性ホルモン（エストロゲン）欠乏によって引き起こされることが広く知られている。一方、男性骨組織は雌性に比較して骨長・骨量でも優位であるため、骨粗鬆症や骨折の頻度が少ない。これは男性ホルモン（アンドロゲン）の同化作用による骨増強効果と考えられている。

アンドロゲンの生理作用はリガンド依存性転写制御因子であるアンドロゲン受容体（AR）を介した標的遺伝子の転写制御により発揮されると考えられている。実際に当研究室の佐藤らによって作製された AR 遺伝子欠損（ARKO）マウスでは顕著な骨量低下が雄のみで観察された。しかしながら、ARKO マウスの解析で明らかとなった AR を介した骨増強作用が骨組織内の骨芽細胞または破骨細胞内の機能であるのか、あるいは骨組織以外の器官からの間接的な機能なのかが不明であった。加えて、骨組織での AR 発現パターンは骨芽細胞での発現が報告されてきたが、破骨細胞については検出限界以下である。よって破骨細胞は AR の非標的細胞と考えられてきた。そのため骨組織に対するアンドロゲンの直接的な作用は骨

芽細胞内 AR を介したものと考えられてはいるものの、*in vitro* 培養系の観察であり、AR 機能を個体レベルで解析した報告はない。更に、*in vitro* 初代破骨細胞培養系では性ステロイドホルモン作用を直接解析した例に乏しく、破骨細胞内での性ステロイドホルモン受容体機能は不明であった。

そこで本研究では破骨細胞内での AR 高次機能解明を目的に、Cre/loxP システムを利用した破骨細胞特異的 AR 遺伝子破壊法を確立し、その骨組織変異を解析した。

2. 破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスの作製と解析

破骨細胞特異的に当該遺伝子を欠損させる Cre トランスジェニックマウスは存在しないため、Cathepsin K 遺伝子を介した破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスの作製を行った。一般的なトランスジェニックマウスの問題点である組織特異性の低さや、成長・継代に伴う発現量低下などの解決を期待し、特異的遺伝子座に直接 Cre 遺伝子を挿入した Cre ノックインマウスの作製を行った。破骨細胞特異的に発現する骨基質分解酵素の一種、Cathepsin K 遺伝子座を含む全長 188 kbp の BAC クローンを先ず取得し、近年開発された λ -プロファージ遺伝子相同組換えシステムを用いた 2 段階組換えによりターゲティングベクターを構築した。Cathepsin K 遺伝子 (*Ctsk*) の 1st ATG 以降を Cre 遺伝子に置き換え、選択マーカには両端に FRT 配列を付加したネオマイシン耐性遺伝子を用いた。エレクトロポレーションにより TT2 ES 細胞株へ導入し、相同組換え体クローンを取得、アグリゲーション法により *Ctsk*^{Cre/+}; neo+ キメラマウスを得た。このキメラマウスを Flpe トランスジェニックマウスと交配する事でネオマイシン耐性遺伝子を除去し、*Ctsk*-Cre ノックインマウス系統を樹立した。各組織での Cre 遺伝子発現を RT-PCR Southern 法にて調べたところ、骨組織特異的な発現を確認した。CAG-CAT-Z テスターマウスと交配を行う事で生体での Cre 依存的遺伝子欠損について検討した結果、胎生期・成体で破骨細胞特異的な LacZ 遺伝子の発現が確認された。以上の結果から破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作製に成功したと判断した。

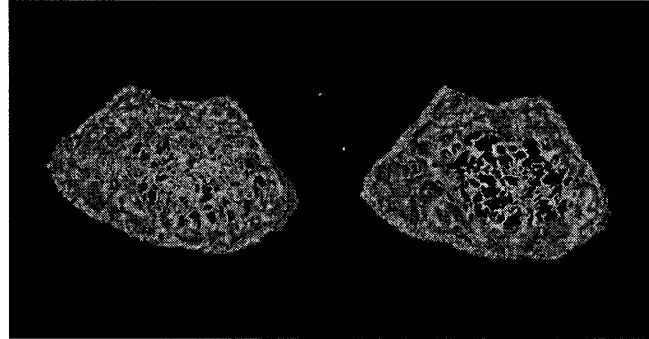
3. 破骨細胞特異的 ARKO マウスの解析

3-1. 破骨細胞特異的 ARKO (AR ^{Δ 0c/Y}) 雄マウスの作製

2. で樹立した *Ctsk*-Cre マウスと AR flox マウスの交配により破骨細胞特異的 ARKO 雄マウスの作製を行った。先ず、破骨細胞分化段階における AR 遺伝子欠損に関して *in vitro* 破骨細胞形成系を用いて検討を行った。*Ctsk*^{Cre/+}; AR^{flox/Y} マウス骨髄から骨髄マクロファージを調整後、M-CSF, RANKL 刺激を与え、破骨細胞様細胞分化過程で一日おきにゲノム DNA を採取、サザンブロッティング法にて AR 遺伝子欠損について確認を行った。その結果、RANKL 刺激から少なくとも 2 日後には遺伝子欠損が観察された。作製した AR ^{Δ 0c/Y} 雄マウスは、全身性 ARKO マウスの特徴的ある不妊や肥満を示さず、内分泌系にも異常が無い事から、二次作用や間接的な骨組織への影響を排除した系統であると考えられた。これにより生体レベルにおいて破骨細胞特異的な AR 機能解析が可能となった。

3-2. 破骨細胞特異的 ARKO($AR^{\Delta Oc}/Y$) マウス骨組織の解析

12週齢雄マウス大腿骨のX線撮影および3次元マイクロCTによる解析を行った。全身性 ARKO マウスでは骨密度・皮質骨量・海綿骨量ともに減少していたのに対し、 $AR^{\Delta Oc}/Y$ マウスでは全体的な骨密度に差は無いものの、大腿骨遠位の大幅な海綿骨減少が観察された。KO群で観察された海綿骨減少について詳細に検討するため、骨形態計測による解析を行った結果、骨組織中の破骨細胞数が大幅に増加し、骨吸収面の増加が観察された。更に代表的な骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度がWT群に対して有意に上昇していた事から、破骨細胞機能亢進による骨吸収速度の増加が起きていると考えられた。興味深い事に骨芽細胞数も増加しており、骨形成速度・石灰化速度が上昇傾向にあった。以上の結果をまとめると、 $AR^{\Delta Oc}/Y$ マウスでは破骨細胞機能が亢進する事で骨代謝回転が高回転となり、その結果として海綿骨量の減少が起きている事が明らかとなった。



3次元 μ CTによる大腿骨遠位部断面画像
(左: 野生型マウス, 右: 破骨細胞特異的 ARKO マウス)

4. 考察

本研究では破骨細胞特異的 ARKO 雄マウスを作製する事で、生体レベルにおける雄性破骨細胞内 AR 機能について解析を試みた。

4-1. 破骨細胞特異的遺伝子破壊法の確立

現在、骨吸収機能をもつ唯一の細胞種が破骨細胞であると考えられている。*in vitro*の実験系を通じてこれまで多くの骨吸収制御因子が報告されているが、培養破骨細胞を用いた検証には限界があり、それら因子が破骨細胞で特異的に機能しているか証明する手段が存在しなかった。本研究で樹立した Ctsk-Cre ノックインマウスを用いた成熟破骨細胞特異的な遺伝子欠損が可能となった事で、今後、これら因子群の詳細な作用メカニズムの解析が可能となった。しかしながら、破骨細胞分化の初期段階で特異的に遺伝子欠損を行う手段は未だ存在していない。そのため、Cathpsin K より更に早い段階から発現する遺伝子を用いた Cre ノックインマウスの作製が今後の課題である。

4-2. AR は破骨細胞内骨吸収抑制因子である

現在まで破骨細胞での明確な AR 発現報告がないにも関わらず、実際に破骨細胞特異的 ARKO マウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。特に大腿骨遠位部等における海綿骨量の低下が顕著であった。一般的に破骨細胞は海綿骨部分に多く存在する事から考えても、この結果は破骨細胞機能亢進による直接の結果であり、破骨細胞内 AR が破骨細胞機能を直接抑制する事を示している。一方、皮質骨での明確な骨量減少は観察されず、破骨細胞内 AR を介する皮質骨への作用は僅かであると考えられる。しかしながら、全身性 ARKO マ

ウスでは海綿骨・皮質骨ともに減少する事が分かっていることから、皮質骨に対するAR作用は主に骨芽細胞を介したものである可能性がある。加えて、全身性ARKOマウス骨芽細胞では、破骨細胞分化誘導因子であるRANKLの発現量の上昇が観察されている¹⁾。しかしながら、この上昇が骨芽細胞内ARを介した転写抑制解除によるものであるのか、それとも破骨細胞機能亢進に伴う二次的な作用なのかは現時点では判別できない。これらの点を明確にするため、骨芽細胞特異的ARKOマウスの解析が今後必須である。以上の結果から、これまでアンドロゲンの骨組織に対する同化作用は骨芽細胞を介した骨形成促進作用によるものと考えられてきたが、少なくとも海綿骨においては破骨細胞ARを介した骨吸収抑制の結果である事を明らかにする事ができた。

4-3. 性ステロイドホルモン受容体の骨組織での高次機能

また、現時点でエストロゲンによる骨代謝制御メカニズムが不明である。特に、卵巣切除によってエストロゲン産生を抑えたマウスでは骨量が低下するものの、エストロゲン受容体(ER)KO雌マウスでは骨量低下が起こらず、その作用点は不明である。ERKO雌マウスではエストロゲンの前駆体且つアンドロゲンの一種であるテストステロンの血中濃度が上昇する。そのため、破骨細胞内ARを介した骨吸収抑制によってER欠損による骨量低下が回避されている可能性がある。しかしながら破骨細胞内ERを介した同様の骨吸収抑制メカニズムの存在が想定される事から、現在、破骨細胞特異的ERKOマウスの解析を行っているところである。

以上、本研究は破骨細胞特異的ARKOマウスの作製および解析により、破骨細胞内ARが骨代謝制御に直接関与している事を明らかにし、骨組織に対する性ステロイドホルモン作用メカニズムの一端を解明した。

参考文献

1. Kawano H., Sato T. *et al* : Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9416-9421, 2003