

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中村 貴

本論文は性ステロイドホルモン受容体の骨代謝制御機構に関するもので、4章より構成される。男性ホルモン（アンドロゲン）は主要な骨代謝制御因子として知られている。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。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、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不明であった。加えて、骨組織でのAR発現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。しかし、破骨細胞内での作用を個体レベルで解析した報告はない。

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。

第2章では、破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作出と解析を行っている。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、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 Cathepsin K 遺伝子座を含む BAC クローンを取得し、λ-プロファージ遺伝子相同組換えシステムにより 1st ATG

以降を Cre 遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを構築した。ベクターの ES 細胞への導入、キメラマウスの作出を経て、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。

第3章では、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ている。まず、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 Oc/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。

12週齢雄マウス大腿骨の解析を行った結果、AR Δ Oc/Yマウスでは大腿骨遠位の大幅な海綿骨減少が観察された。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 Δ 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。

これまで多くの破骨細胞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**マウスにより、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。

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。この結果は、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。以上の結果から、これまでアンドロゲンの骨増強効果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、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。

以上、本論文は破骨細胞特異的 **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ており、骨代謝学、分子遺伝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。