

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金藤 紫乃

女性ホルモンであるエストロゲンや男性ホルモンであるアンドロゲンの骨防御作用は、閉経や加齢による血中性ホルモン濃度の低下が骨粗鬆症の原因となることからよく知られている。しかし、その詳細な作用機序については不明な点が多い。エストロゲンやアンドロゲンはエストロゲン受容体  $ER\alpha$ 、 $\beta$  やアンドロゲン受容体  $AR$  を介してその作用を発揮することが知られている。また、エストロゲンやアンドロゲンの作用は、骨組織の  $ER\alpha$ 、 $\beta$ 、 $AR$  を介する直接作用と、いったん他組織に作用し血中サイトカインの変動が骨組織に影響を及ぼす間接作用の 2 通りに大別できるが、本研究室では直接作用に着目し、研究を行ってきた。先行研究である破細胞特異的  $ER\alpha$  欠損マウスの解析では、エストロゲンが破骨細胞の  $ER\alpha$  を介して破骨細胞の寿命を調節していることが明らかとなった。また申請者本人の修士論文の研究により、骨芽細胞の  $ER\alpha$  が雄性における骨量維持作用の一端を担っていることが示唆された。このように骨芽細胞、破骨細胞における  $ER\alpha$ 、 $AR$  の機能は明らかになりつつある。しかしながら骨細胞における  $ER\alpha$ 、 $AR$  の機能の大部分は未だ不明である。

本研究が対象としている骨細胞は骨基質中に埋まっており、骨組織の細胞の 9 割以上を占める細胞である。しかしその機能については、メカニカルストレスの感知、ミネラル代謝調節、骨芽細胞による骨形成・破骨細胞による骨吸収の調節と多様であり、不明な点も多い。

そこで、本研究ではこの骨細胞における  $ER\alpha$ 、 $AR$  の機能を明らかにすべく、 $Cre-loxP$  システムにより骨細胞  $ER\alpha$  および骨細胞  $AR$  欠損マウスを作出し、その機能解析を行った。

第一章の序論に引き続き、第二章では骨細胞  $ER\alpha$  欠損マウスを作出し、骨細胞  $ER\alpha$  欠損マウスが骨密度の低下を呈することを明らかにした。また卵巣摘出実験から、この骨細胞の  $ER\alpha$  を介した骨量維持作用がリガンド依存的であることが明らかになった。更に、本マウスに対し尾部懸垂実験や骨折治癒実験の負荷実験を行い、尾部懸垂の非荷重下でも、骨細胞の  $ER\alpha$  が骨量維持作用を発揮していること、言い換えると、骨細胞はメカニカルストレスを感知し、 $ER\alpha$  を介した骨量維持作用を発揮することが明らかになった。

更に、第三章では骨細胞の  $ER\alpha$  の骨量維持作用の詳細なメカニズムを明らかにすべく、骨形態計測などの解析を行った。その結果、骨細胞の  $ER\alpha$  は骨芽細胞数を正に制御することで、骨防御作用を発揮することが明らかになった。更に、骨細胞はタンパクの分泌によ

り骨形成や骨吸収を制御していることが報告されているため、骨細胞 ER $\alpha$ 欠損マウスと対照群の骨細胞における遺伝子発現プロファイルを比較した。この際、骨細胞は単純な酵素処理のみでは単離が不可能である。そこで、本研究では、Dmp1-GFP マウスと交配させ、骨細胞が GFP でマークされたマウスをまず作出した。これらマウスの頭蓋骨を酵素処理することにより骨芽細胞と骨細胞の混在した細胞集団を取得し、その中から FACS で骨細胞のみを単離する方法を確立した。これにより単離された骨細胞の遺伝子プロファイルを骨細胞 ER $\alpha$ 欠損マウスと対照群で比較したところ、273 遺伝子の発現変動を認めた。これら遺伝子をデータベース DAVID で解析した結果、分泌タンパクが比較的多数含まれることが判明した。このことから骨細胞の ER $\alpha$ は分泌タンパクの転写を制御することにより骨芽細胞の増殖を促し、骨防御作用を発揮していることが示唆された。なお、骨細胞における ER $\alpha$ の候補遺伝子としては Wnt シグナル関連因子がいくつか取得された。

また、第四章では、雄性における骨細胞を介した骨量維持機構を明らかにする目的で、雄で主要な性ホルモンであるアンドロゲンの受容体 AR を骨細胞特異的に欠損させたマウスを作出した。その結果、骨細胞 AR 欠損マウスでも骨量減少が認められ、それが骨吸収の亢進に起因することが示唆された。

本論文では、これまで大部分が不明であった骨細胞における ER $\alpha$ 、AR の生体内機能を明らかにすることができた。更に、遺伝子欠損マウスからの骨細胞単離法を確立し、骨芽細胞の増殖因子の発現を骨細胞の ER $\alpha$ が制御することを明らかにすることで、エストロゲンの骨防御作用の一端を解明した。以上、本研究は、エストロゲンが骨細胞の ER $\alpha$ を介して骨細胞-骨芽細胞間の機能的インタラクションを調節することを提唱するものであり、骨組織における性ホルモン作用の新たな制御機構を明らかにした。以上の理由により、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。