

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 21 年度博士課程 入学  
氏 名 于 太永  
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 ダイオキシン受容体(AhR)の骨代謝制御機構における高次機能解析

### 第一章 序論

脂溶性生理活性物質は、生体内において様々な器官や組織を標的として、幅広い恒常性の維持において非常に重要な役割を担っている。これら脂溶性生理活性物質は多種多様であり、生体内で合成されるステロイドホルモン類や、体外より食物から摂取されるビタミン類などが含まれる。中でも、ステロイドホルモンの一種である性ホルモンは、性腺を中心とした生殖器官の発生や成熟を調節するのみならず、複雑なネットワーク制御を介し、直接のおよび間接的に骨量維持作用を示す。一方、脂溶性ビタミンの一つであるビタミン D は小腸や腎臓へ作用し、カルシウム代謝調節を介し、骨代謝を制御することが明らかになっている。

これら様々な脂溶性生理活性物質の骨代謝への作用メカニズムの 1 つは、リガンドとして結合する核内受容体を介する事が証明されている。核内受容体は受容体型転写因子として機能し、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する。核内受容体の骨代謝制御機構における生理的重要性については、実際、核内受容体遺伝子欠損マウスの骨表現型解析により徐々に明らかになりつつある。

一方で、脂溶性生理活性物質の中には核内受容体とは種類の異なる受容体であるダイオキシン受容体 (AhR) を介し、作用を発揮するものも知られている。AhR は全身に広く発現する。近年の AhR 遺伝子欠損マウスの解析から、AhR は肝臓や血管の発達や、免疫系の活性化制御、癌の発症や増大など、様々な恒常性の維持や病態に寄与していることが明らかになりつつある。しかしながら、AhR 遺伝子欠損マウスの骨表現型解析は未だ報告がなく、骨代謝制御機構における AhR の生体内高次機能は、その大部分が不明である。

そこで、本研究では、全細胞種および骨細胞種特異的 AhR 遺伝子欠損マウスの作出とその変異を解析することで、骨代謝制御機構における AhR の生体内高次機能を解明することを目的とした。

## 第二章 全身性 AhR KO マウスの骨解析

AhR の骨代謝での生理的意義を解析するため、全身性 AhR 遺伝子欠損マウス ( $AhR^{-/-}$ ) (埼玉県立がんセンターより分与) を、骨表現型を中心に解析した。同腹野生型 (WT) と比べて  $AhR^{-/-}$  では、雌雄ともうに出生後早期から、体重低下などの発育不全が認められた。12 週齢において、軟 X 線撮影及び Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA) 法による骨密度測定を用いた骨解析を行ったところ、WT と比較して  $AhR^{-/-}$  では有意な骨密度の増加が認められた。

さらに、この骨量増加の原因を検索するため、骨形態計測を行ったところ、 $AhR^{-/-}$  雄マウス (12 週齢) では骨吸収パラメータの減少が見られた。一方、 $AhR^{-/-}$  雌マウス (12 週齢) では、骨吸収および骨形成パラメータ双方の減少を認めた。これらの結果より、AhR が骨代謝機構において生理的作用を発揮していると推察した。

しかしながら、 $AhR^{-/-}$  は、肝臓の発達異常、免疫不全、生殖能力低下などの様々な表現型を呈することが既に報告されている。そのため、これら  $AhR^{-/-}$  の骨量増加が、骨組織における直接的な AhR 機能欠損によるものであるのか、あるいは他の組織における AhR 欠損の結果生じた二次的な影響によるものなのかを明らかにすることが出来なかった。そこで、骨組織特異的な AhR 遺伝子欠損マウスを作出し、解析することとした。

## 第三章、組織特異的 AhR KO マウスの作出と骨解析

### 1. 骨芽細胞特異的 AhR KO マウス ( $AhR^{AOB/AOb}$ ) の作出と骨解析

骨組織において、骨芽細胞が骨形成を担っている。そこで、骨芽細胞における直接的な AhR の機能を明らかにするため、骨芽細胞特異的に Cre recombinase を発現する Col1a1-Cre Tg マウスと AhR flox マウスとの交配により、骨芽細胞特異的 AhR KO マウス ( $AhR^{AOB/AOb} : Col1a1-Cre^{Tg/0}; AhR^{flox/flox}$ ) を作出した。この変異体の各組織のゲノム DNA を抽出し、各組織における AhR 遺伝子座の欠失を検索したところ、骨組織でのみ欠失が確認された。また、経時的な体重増加を計測したところ、対照群 ( $AhR^{flox/flox}$ ) と比較して雌雄ともに、明らかな差を認めなかった。これら結果から、他臓器での変異による二次的な影響を受けない  $AhR^{AOB/AOb}$  の作出に成功したと判断し、骨変異解析を行った。その結果、DXA 法による骨密度測定では明らかな骨密度変化を認めず、骨形態計測においても各種パラメータで有意な変化を認めなかった。

以上の結果より、骨芽細胞における AhR 機能は骨代謝制御において顕著でないと判断した。

### 2. 破骨細胞特異的 AhR KO マウス ( $AhR^{AOc/AOc}$ ) の作出と骨解析

次に、骨吸収を担う破骨細胞における直接的な AhR の機能を解明するために、成熟破骨細胞

特異的に Cre recombinase を発現する Ctsk-Cre マウスと AhR flox マウスとの交配により、破骨細胞特異的 AhR KO マウス ( $AhR^{AOc/AOc}; Ctsk^{cre/+}; AhR^{flox/flox}$ ) を作出し、解析を進めた。 $AhR^{AOb/AOb}$  と同様に、骨組織でのみ AhR 遺伝子座欠失が確認され、 $AhR^{AOc/AOc}$  の作出に成功したと判断した。 $AhR^{AOc/AOc}$  雌マウスでは、体重変化は認められなかったものの、対照群 ( $Ctsk^{cre/+}$ ) と比較して、 $AhR^{AOc/AOc}$  雄マウスでは、6 週齢から 12 週齢にかけて体重増加が認められた。

続いて、軟 X 線撮影及び DXA 法による骨密度測定を行ったところ、対照群と比べて  $AhR^{AOc/AOc}$  では、雌雄ともに  $AhR^{-/-}$  と同様に大腿骨、脛骨及び頭蓋冠における骨密度の増加を認めた。そこで、骨量増加の原因を調べるために、骨形態計測を行った。その結果、 $AhR^{AOc/AOc}$  (12 週齢) では、雌雄ともに海綿骨量の増加、破骨細胞数と破骨細胞面の減少が示された。骨形成パラメータである骨芽細胞数と骨芽細胞面に変化は認められなかった。更に、週齢による影響を考慮し、24 週齢においても骨解析したところ、雌雄ともに同様の表現型が観察された。以上の結果より、 $AhR^{AOc/AOc}$  の骨量増加は、破骨細胞の減少による骨吸収低下が原因であると考えられた。

全身性及び組織特異的 AhR KO の骨変異解析により、破骨細胞内の AhR が直接的に破骨細胞の増加に作用することで、生理的状態での骨代謝制御機構における役割を担っていることが明らかとなった。

#### 第四章 性ホルモン欠乏条件下での AhR の機能解析

生理的状態における AhR の破骨細胞での生理機能は明らかとなったが、性ホルモン欠乏により引き起こされる骨粗鬆症などの病態における生体内機能は未だ不明であった。そこで、性ホルモン欠乏により誘導される骨吸収亢進を伴う骨量減少における AhR の機能を明らかにする目的で  $AhR^{AOc/AOc}$  マウスおよび対照群に精巣摘出術(ORX)あるいは卵巣摘出術(OVX)を行った後に、骨解析を行った。

6 週齢にて ORX あるいは OVX を行い、12 週齢において、骨密度測定及び骨形態計測を行った。対照群と同様に  $AhR^{AOc/AOc}$  においても ORX あるいは OVX により、破骨細胞数と破骨細胞面の上昇に伴う長管骨の骨密度低下を同程度に認めた。しかしながら、ORX あるいは OVX を行った状態でも  $AhR^{AOc/AOc}$  の骨密度は対照群と比較して有意に高値を示した。これらの結果により、性ホルモン欠乏下においても、破骨細胞内 AhR の欠損により破骨細胞増加抑制による骨密度低下制御が認められたことから、破骨細胞内 AhR は骨量減少に寄与する可能性が明らかとなった。

#### 第五章、総合討論

本研究では、全細胞種及び骨細胞種特異的な AhR 遺伝子欠損マウスの作出および骨変異解析を行うことで、AhR の骨代謝制御機構における生体内高次機構の解明を試みた。

##### 1. AhR は骨量維持機構において負の制御因子である

$AhR^{-/-}$  雌マウスでは、骨吸収および骨形成パラメータの減少に伴う、骨量増加を認めた。この結果から、AhR の欠損が骨量増加を誘導することから、AhR は骨量を負に調節していることが

明らかとなった。しかしながら、骨芽細胞特異的 AhR 欠損では、骨量変化が認められなかったことから、AhR 機能は骨形成においては有意ではないと結論した。

## 2. AhR は骨吸収を正に制御する

全身性及び破骨細胞特異的 AhR KO マウスでは、AhR の欠損による骨吸収パラメータの低下に伴う骨量増加が認められた。この骨変異は、性ホルモン欠乏により誘導された骨量低下状態でも同様に観察された。これらの成果から、骨代謝制御機構において、AhR は様々のホルモンやサイトカイン等のシグナルと協調的に作用し、骨吸収を正に調節していることが推察された。

## 3. AhR による破骨細胞数制御の分子基盤

本研究の成果から、破骨細胞内の AhR が破骨細胞数を正に制御することが推察された。破骨細胞はマクロファージ系細胞の融合により形成される多核巨細胞である。このため、破骨細胞の細胞数は、アポトーシスと破骨細胞分化とにより制御されると考えられる。

当研究室の先行研究結果から、破骨細胞内エストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) を介した女性ホルモン作用により、破骨細胞のアポトーシスが誘導される事を明らかにした。一方、AhR は転写因子として標的遺伝子の発現調節を介した経路とユビキチン依存的蛋白分解作用を介する 2 つの経路により、性ホルモン作用を制御することを報告している。しかしながら、本研究の結果から、性ホルモン欠乏下においても、AhR 遺伝子欠損による骨吸収低下を伴う骨量増加が認められた。このことから、破骨細胞内では、AhR は性ホルモンとは独立した分子経路により、破骨細胞数を制御している可能性が考えられる。

一方で、破骨細胞分化制御は複雑なネットワークにより制御されていることが明らかになりつつある。中でも、破骨細胞分化主要因子である RANKL シグナルの下流で作用している Stat1 の機能を、AhR が制御することが、最近明らかになっている。本研究の結果およびこれらの報告を考え合わせると、生理的状态における AhR は、内因性リガンドにより活性化され、破骨細胞内シグナル伝達とのクロストークによりその作用を発揮していることが推察される。今後、初代培養破骨細胞を用いた解析を行うことで更なる詳細な分子メカニズムが明らかになると考えられる。

以上、本研究では全身性及び組織特異的 AhR 遺伝子欠損マウスの骨変異を解析することにより、骨代謝制御機構における AhR の生体内高次機能の一部が、破骨細胞が担う骨吸収を正に制御することによる骨量調節への寄与であることを解明することが出来た。詳細な分子メカニズムの解明により、本研究の成果を発展させることが出来れば、骨代謝制御機構における AhR の更なる分子基盤が明らかになることが期待できる。