

機関番号： 32620

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20580123

研究課題名 (和文) ビタミンD受容体の新たな生体内高次機能の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the new higher functions of vitamin D receptors on bone tissues in vivo.

研究代表者

五十嵐 庸 (IGARASHI MAMORU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号： 00277815

研究成果の概要 (和文) : 破骨細胞特異的ビタミンD受容体 (VDR) 遺伝子欠損マウスを作出し、解析した。その結果、野生型と比較し体長および体重に関しては差は認められなかったが、成長期後の大腿骨において骨量および骨密度の増加、海綿骨の増加、破骨細胞数の減少が認められた。また、破骨細胞初代培養系の結果と併せると、破骨細胞における VDR は破骨細胞分化に大きく寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Osteoclast-specific vitamin D receptor (VDR) gene deficient (VDR Δ 0c/ Δ 0c) mice were created and analyzed. As a result, the body length and the body weight of VDR Δ 0c/ Δ 0c mice were not recognized in comparison with the wild type mice. However, after the anagen, later, the bone mass, the bone mineral density and the trabecular bone were increased, and the osteoclast cell number were decreased in the femur. It was revealed that VDR in the osteoclast contributed to osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：遺伝子欠損マウス、骨代謝、ビタミンD、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

抗くる病因子として発見されたビタミンDは、カルシウム代謝調節など多様な生理作用をもち、現在ビタミンD誘導体は骨粗鬆症の治療薬などとして利用されている。しかしながら、ビタミンDの骨への作用が直接的なものか間接的なものか明らかではなかった。ビタミンDの生理作用は、活性型である $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 ($1\alpha, 25$ (OH) $_2D_3$) がリガンド依存性の転写因子である VDR に結合し、レチノイドX受容体とのヘテロ二量体

が、標的遺伝子プロモーター上の VDR 応答配列に結合し転写を制御することによって発揮される。これまで、全身性 VDR 遺伝子欠損 (conventional-VDRKO) マウスが作出され、その解析の結果 (Yoshizawa et al., Nat. Gene., 16, 391-6, 1997) 、conventional-VDRKO マウスは、離乳後に II 型くる病に典型的な成長障害、カルシウム代謝異常などを示したため、生体内においてもビタミンD作用発現において VDR が中心的な役割を果たすことが in vivo においてははじめ

て明らかとなったが、カルシウム投与によって成長障害や骨形成不全などが改善されたことから、骨組織における VDR の機能の詳細は明確ではない。一方、VDR は、N 末端から A～E までの構造領域に分割され、E 領域はリガンド結合領域かつリガンド依存的な転写促進領域 (AF-2) である。VDR に $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ が結合すると、E 領域の C 末端の α -helix (helix12) が移動し AF-2 領域に転写共役活性化因子がリクルートされ、転写が促進される。このように、VDR の構造や機能は分子レベルでは詳細に解析がなされているが、個体レベルでの VDR の高次機能は明らかではなかった。そこで本研究課題では、骨組織における VDR の高次機能の解析を行った。

2. 研究の目的

骨組織は、軟骨内骨化により成長し、成長後もダイナミックに骨吸収と骨形成を繰り返し、再構築され形態や機能を維持している。この再構築により維持される骨組織の質および量は、骨吸収と骨形成との平衡関係の破綻により障害される。その平衡関係に破綻を来す病態の典型的なものが、女性の閉経に基づく閉経後骨粗鬆症であり、人類にとって不可避な老化に基づく老人性骨粗鬆症である。また、骨折などの損傷を受けると、骨の再生プログラムが起動し、損傷は修復される。これらの過程は、骨芽細胞および破骨細胞からなるおもに 2 つの細胞系の機能的分業により制御されている。そこで、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスを作成し、解析すれば、破骨細胞内での直接的な VDR 遺伝子の高次機能が解明出来ると考えられる。

以上のように、本研究課題の目的は、生体内での破骨細胞における VDR 遺伝子の高次機能の解明にある。

3. 研究の方法

(1) 分子基盤を構築するために、核内受容体である TLX やエストロゲン β (ER β) などの機能解析を行う。

(2) Cre-loxP システムを用いた破骨細胞特異的な VDR 遺伝子欠損マウスは、VDR 遺伝子座への loxP 部位導入マウスである VDR flox マウスと破骨細胞特異的 Cre 発現マウスとを交配させることにより作出する。

また作出したマウスは、野生型マウスとの比較を行いながら、以下の実験を行う。

①破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスが破骨細胞でのみ VDR が欠損していることを、各組織から調整したゲノム DNA を用いて確認する。

②経時的に体重および体長を計測し、野生型マウスの成長曲線と比較する。

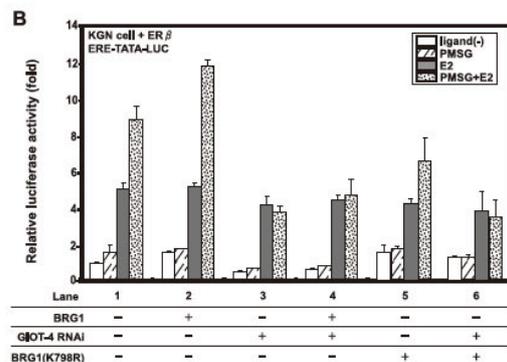
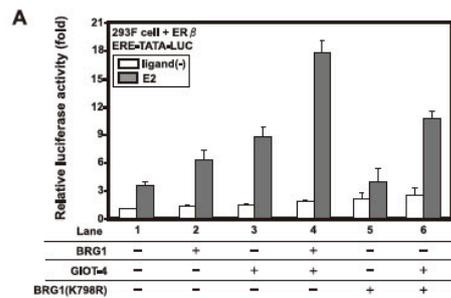
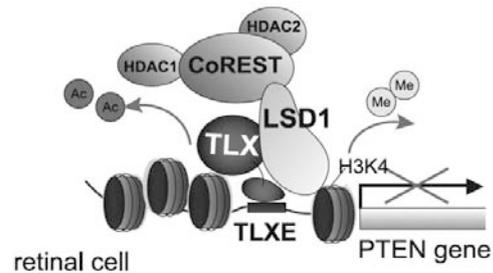
③conventional-VDRKO マウス骨でみられた

成長障害、骨形成不全、カルシウム代謝異常等の表現型が見られるかどうかを確認する。
④大腿骨や脛骨における異常の有無を形態学的手法や免疫染色法を用いて評価する。

4. 研究成果

(1) 分子基盤の構築

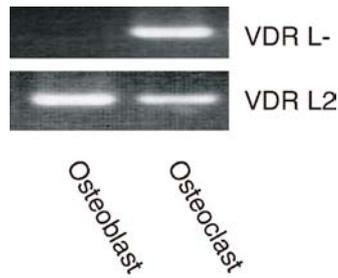
核内受容体の機能解析を行うことにより分子基盤を構築した。その過程で、核内受容体 TLX のヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を介した網膜での新規機能や、ER β の新規タンパク質複合体の機能などを明らかにした。



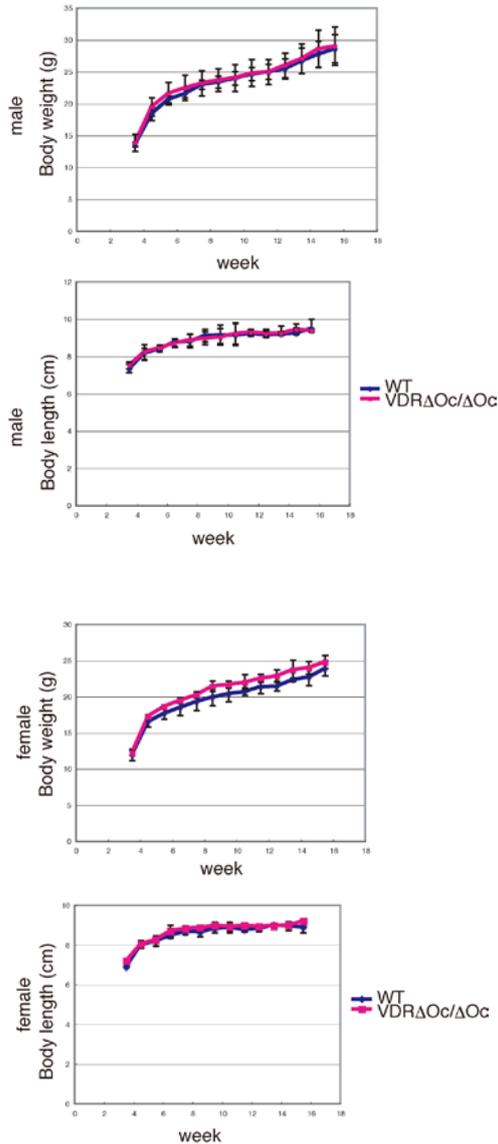
(2) 破骨細胞特異的な VDR 遺伝子欠損マウスの解析

VDR flox マウスと破骨細胞特異的 Cre 発現マウスとを交配し、その後 3 世代交配をすることにより目的の破骨細胞特異的な VDR 遺伝子欠損マウスを作成した。

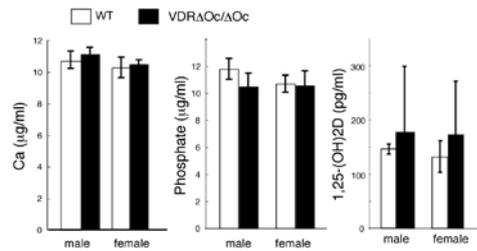
①作出した破骨細胞特異的な VDR 遺伝子欠損マウスが破骨細胞でのみ VDR 遺伝子が欠損していることを各組織から調整したゲノム DNA を用いて確認するとともに、骨芽細胞および破骨細胞の初代培養系を用いても確認した。



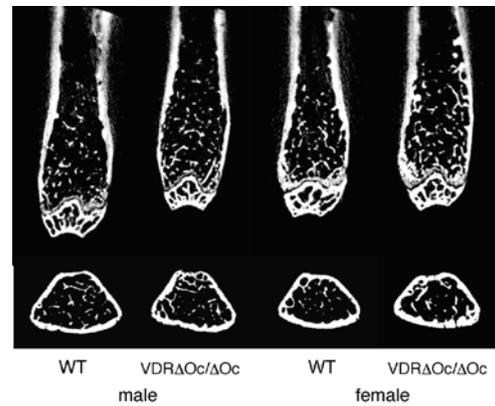
②経時的に体長および体重を計測した結果、雌雄ともに破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスと野生型の間で差は認められなかった。



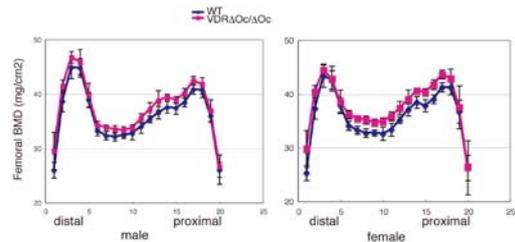
③血中パラメータを測定したところ、血中カルシウム、血中リン、血中ビタミンD濃度は、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスと野生型の間で差は認められなかった。



④軟X線写真により破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの大腿骨および脛骨の骨量を測定したところ、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスの方が野生型よりも骨量が増加しているように見られた。そこで大腿骨遠位部のμ-CTを測定したところ、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスの方が野生型に比べ海綿骨の増加が認められた。

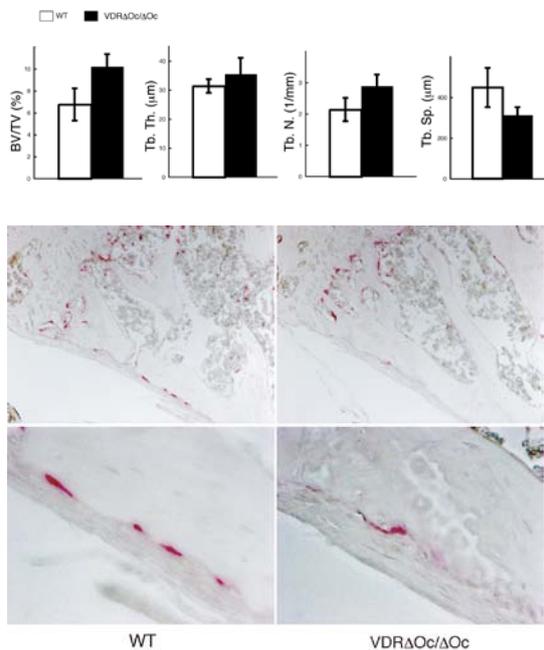


そこで、大腿骨の骨密度を測定したところ、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスの方が野生型に比べ骨密度の増加が認められた。

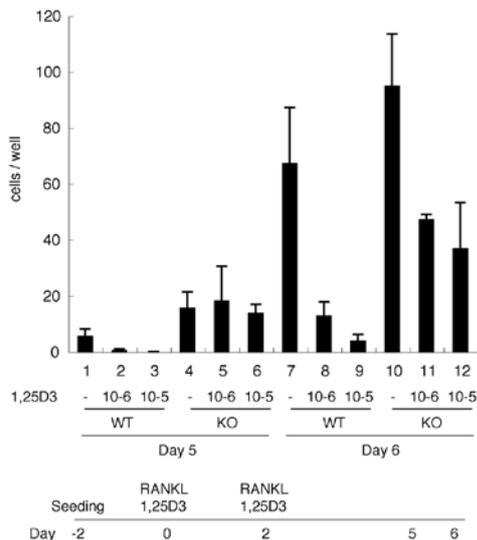


また、大腿骨の骨形態計測を行ったところ、骨梁幅は破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスと野生型との間で差は認められなかったが、単位骨量、骨梁数、は破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスの方が野生型に比べ増加し、骨梁間距離が減少していることが明らかとなった。これらの事は、μ-CT 画像解析で見られた、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスにおける海綿骨の増加と一致する。さらに、骨組織の切片を作成し解析したところ、破骨細胞数は、破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウスの方が野生型よりも減少していることが示唆された。しかし、その減少は

アポトーシスによるものではないことが TUNEL 染色の結果から明らかとなった。また、骨組織における破骨細胞関連遺伝子の発現量を検討したが m その発現に差は認められなかった。



さらに、破骨細胞補題培養系を用いて $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を検討したところ、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加により破骨細胞分化が阻害されたが、その効果は破骨細胞特異的 VDR 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞では野生型由来の破骨細胞よりも小さいものであった。



以上より、破骨細胞内の VDR は、破骨細胞分化に重要な役割を果たしており、破骨細胞内で VDR 遺伝子を欠損させると、破骨細胞の分化が阻害されるため、破骨細胞数の減少を伴い、海綿骨が増加することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Sawatsubashi, S., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Coactivation of estrogen receptor β by gonadotropin-induced cofactor GOIT-4. *Mol. Cell. Biol.* 29, 83-92 (2009). 査読有
2. Kouzmenko, A. P., Takeyama K., Kawasaki Y., Akiyama, T. and Kato, S. Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27, 4888-4899 (2008). 査読有
3. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H. and Kato, S. Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3995-4003 (2008). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 横山敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明：オープン核内受容体 TLX の転写制御を介した神経幹細胞未分化維持機構の解明。第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会。(神戸、2008. 12. 9-12)
2. 伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、趙越、山形薫、田辺真彦、木村周平、上田崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、林珍仙、武山健一、加藤茂明：新規クロマチン構造調節因子 BARD1 を介した転写抑制機構の解明。第 31 回日本分子生物学会、第 81 回日本生化学会合同大会。(神戸、2008. 12. 9-12)
3. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：ビタミン K は Mx2 遺伝子の発現を調節することにより骨芽細胞分化を促進する。第 62 回日本栄養・食糧学会。(坂戸、2008. 5. 2-4)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 庸 (IGARASHI MAMORU)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：00277815

(2) 研究分担者

武山 健一 (TAKEYAMA KEN-ICHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号：30323570

北川 浩史 (KITAGAWA HIROCHIKA)
東京大学・分子細胞生物学研究所・特任講
師
研究者番号：20345234

(3)連携研究者
なし