

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780114

研究課題名（和文）ビタミンDによる骨増強の分子機構の解明

研究課題名（英文）Biological functions and mechanisms of vitamin D action on bone and mineral metabolism

研究代表者

山本 陽子（YAMAMOTO YOKO）

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：30376644

研究成果の概要（和文）：

本研究ではビタミンDによる骨増強の分子機構の解明を目指し研究をおこなった。骨芽細胞特異的 VDRKO マウスは対照群と比較し、骨量および骨密度の増加が認められたことから、骨芽細胞の VDR は骨量を負に調節することが示唆された。また、全身性の VDRKO マウスと異なり、リガンド結合能のない VDR (VDR Δ AF2) ノックインマウスは、高カルシウム食で飼育しても、カルシウム代謝異常や骨形成不全が改善されなかった。よってリガンドの結合していない VDR はカルシウム代謝や骨形成に対して悪影響をおよぼすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The present study aims to find out biological functions and mechanisms of vitamin D action on bone and mineral metabolism. Osteoblast-specific VDRKO mice exhibited increased bone mass. These data indicated that VDR in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. Unlike systemic-VDRKO mice, AF-2 domain deleted VDR knock-in mice fed with high calcium diet exhibited hypocalcemia and impaired bone formation. These data indicated that unliganded VDR exerted negative effects on bone formation and mineral metabolism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ビタミンD、VDR、骨代謝、カルシウム代謝、転写制御、遺伝子改変マウス、
栄養化学

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、細胞増殖抑制・分化促進、免疫応答制御など様々な生理作用を持つことが知られている。ビタミンDの生理作用はリガンドである $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がビタミンD受容体(VDR)に結合し、標的遺伝子の転写制御を行うことにより発揮される。

ビタミンDは古くから骨増強作用を持つことが知られているが、そのメカニズムは小腸や腎臓におけるカルシウム代謝調節作用によるものであると考えられており、骨組織におけるビタミンDの生理作用は明らかになっていない。これまで個体レベルでのVDRの高次機能を明確にするためVDR遺伝子欠損(VDRKO)マウスが作出された。VDRKOマウスはII型くる病に典型的な成長障害、低カルシウム血症、高副甲状腺ホルモン(PTH)血症、骨形成不全、脱毛といった表現型を示した。VDRKOマウスで観察された骨形成不全は食餌によるカルシウム補充により正常化されたことから、カルシウム代謝を介した間接的な作用であると考えられる。しかしながら、カルシウム補充によっても血中PTH濃度は正常化せず高値のままであり、PTHは連続投与により骨吸収を促進し骨密度を低下させることが知られていることから、なぜVDRKOマウスの骨形成が正常となるのかについては実は未解明な部分が多く残されており、骨組織におけるVDRが何らかの機能を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では骨芽細胞特異的VDRKOマウスの解析を行うことにより、小腸や腎臓におけるカルシウム代謝調節を無視できる系において、骨組織におけるVDRの機能を明らかにし、また、リガンド結合能のないVDRノックインマウスの解析を行うことにより、リガンド結合状態およびリガンド非結合状態のVDRの機能を明らかにし、ビタミンDによる骨増強の分子機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1)骨芽細胞特異的VDRKOマウスの解析

Cre-loxPシステムを用いた骨芽特異的なVDRKOマウスはVDR遺伝子座へのloxP部位導入マウスであるVDR floxマウスと骨芽細胞特異的Cre発現マウス(Col. I-Cre(tg/0))とを交配させることにより作出した。作出したマウスは同腹解析をおこなうことにより、産子数の違いなどによる体格差による影響を排除した。骨量・骨密度は軟X線写真撮影および骨密度解析装置を用いて解析をおこなった。また骨形態計測により、骨構造/骨形成/骨吸収について各パラメーターを数値化することで骨の形態について詳細な解析をおこなった。

また、骨組織および頭蓋冠から調製した初代培養骨芽細胞からRNAを抽出し、遺伝子発現解析をおこなった。さらに、マウスの頭蓋冠および骨髄より初代培養細胞を調製し、そ

れぞれ骨芽細胞、破骨細胞への分化能について検討を行うとともに、両細胞の共存培養を行い、破骨細胞形成について検討をおこなった。

(2) 全身的 VDRKO ヘテロマウスの解析

Cre-loxP システムを用いた全身的 VDRKO ヘテロマウスは VDR flox マウスと全身的 Cre 発現マウス (CMV-Cre(tg/0)) とを交配させることにより作出した。作出したマウスは同腹解析をおこなうことにより、産子数の違いなどによる体格差による影響を排除した。骨量・骨密度は軟 X 線写真撮影および骨密度解析装置を用いて解析をおこなった。

(3) リガンド結合能のない VDR (VDR Δ AF2) ノックインマウスの解析

リガンド結合能のない VDR (VDR Δ AF2) ノックインマウスは生後 6 週齢を過ぎた頃から致死となるので、高カルシウム食にて飼育することにより致死性を回避し表現型の解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの解析

骨芽細胞特異的 VDRKO マウスは 16 週齢において、対照群と比較し骨量および骨密度の増加が認められた。この骨量増加のメカニズムを明らかにするため、骨形態計測をおこなったところ、骨芽細胞が担う骨形成のパラメーターについては有意な差は認められなかったが、破骨細胞が担う骨吸収のパラメーターについて減少が認められた。よって骨芽細胞特異的 VDRKO マウスで観察された骨量増加

は骨吸収の抑制によるものであると考えられた。

次に、マウスの脛骨から RNA を抽出し遺伝子発現解析をおこなったところ、骨形成に関わる転写因子である *Runx2* の遺伝子発現量には変化が認められなかった一方で、骨芽細胞で発現し、破骨細胞の分化を誘導する因子である *Rank1* および破骨細胞で発現する *Nfatc1*、*c-fos*、*Trap* の遺伝子発現がいずれも有意に減少していた。さらに骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの頭蓋冠から調製した初代培養骨芽細胞より RNA を抽出し VDR および *Rank1* の遺伝子発現量を検討したところ、VDR の遺伝子発現量は対照群に比べ半減する程度であり、骨芽細胞における VDR が完全に欠損しているわけではないことが明らかになったが、*Rank1* の遺伝子発現量には有意な減少が認められた。よって骨芽細胞特異的 VDRKO マウスでは骨芽細胞の *Rank1* の遺伝子発現量が減少することにより、破骨細胞分化が抑制されていることが示唆された。

次に、マウスの頭蓋冠より初代培養細胞を調製し、アスコルビン酸および beta-グリセロリン酸による骨芽細胞形成実験を行ったところ、骨芽細胞特異的 VDRKO と対照群で差は認められなかった。また骨髄より初代培養細胞を調製し、M-CSF および RANKL による破骨細胞形成実験を行ったところ骨芽細胞特異的 VDRKO と対照群で差は認められなかった。さらに頭蓋冠および骨髄より調製した初代培養細胞の共存培養をおこなったところ、ビタミン D 存在下において、骨芽細胞特異的 VDRKO 由来の細胞は対照群由来の細胞に比べ、破骨細胞形成が抑制された。

以上のことから骨芽細胞特異的 VDRKO マウスでは骨芽細胞の *Rank1* の遺伝子発現量が減少することにより、破骨細胞分化抑制/破骨細胞数減少がおこり、その結果、骨吸収抑制

を介した骨量増加が起きていることが示唆された。つまり骨芽細胞の VDR は骨量を負に調節すると考えられる。

(2) 全身的 VDRKO ヘテロマウスの解析

骨芽細胞特異的 VDRKO マウスでは、骨芽細胞における VDR は対照群に比べ半分程度の欠損となるため、全身的 VDRKO ヘテロマウスでも骨量増加が認められるかを検討した。その結果、全身的 VDRKO ヘテロマウスでもカルシウム代謝に異常は見られず、骨量増加が認められるものの、その程度は骨芽細胞特異的 VDRKO マウスの場合と比較すると僅かであった。よって骨組織には骨芽細胞の VDR の機能とは相反する、つまり骨量を正に調節する機能をもつ VDR が存在することが示唆された。

(3) リガンド結合能のない VDR (VDR Δ AF2) ノックインマウスの解析

リガンド結合能のない VDR (VDR Δ AF2) ノックインマウスも通常食では VDRKO マウスと同様の II 型くる病に典型的な表現型を示した。しかしながら、VDRKO マウスと異なり、高カルシウム食で飼育しても、カルシウム代謝異常や骨形成不全が改善されなかった。よってリガンドの結合していない VDR はカルシウム代謝や骨代謝に対して悪影響をおよぼすことが示唆された。

以上、本研究により、骨芽細胞の VDR は骨量を負に調節すること、また、骨組織には骨量を正に調節する機能をもつ VDR が存在すること、さらにリガンドの結合していない VDR はカルシウム代謝や骨代謝に対して悪影響をおよぼすことが示唆され、骨組織における VDR の機能の一端を明らかにした。

今後、作出した遺伝子改変マウスの更なる解析およびこれらのマウスから調製した細胞等を用いた実験等をおこなうことにより、ビタミン D による骨増強の分子機構の全容解明につながっていくのではないかと考えられる。

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 1 件)

① 加藤茂明、山本陽子、骨組織内での VDR は、負の骨量調節因子か？、CLINICAL CALCIUM、査読なし、21 巻、2011、45-52

[学会発表] (計 2 件)

① 山本陽子、骨芽細胞の VDR は負の骨量調節因子である、日本ビタミン学会第 63 回大会、平成 23 年 6 月 5 日、広島、安田女子大学

② 山本陽子、骨芽細胞の VDR は負の骨量調節因子である、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、平成 23 年 5 月 15 日、東京、お茶の水女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 陽子 (YAMAMOTO YOKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・

特任研究員

研究者番号：30376644

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：