

京都大学	博士 (医学)	氏名	木村 浩明
論文題目	Cthrc1 is a positive regulator of osteoblastic bone formation (Cthrc1 は骨芽細胞性骨形成を刺激することにより生後骨量を増加させる)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生後骨量は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が均衡を保ちながら再構築を繰り返すリモデリングという過程を経て一定量を維持しており、その恒常性は様々な因子により調節されている。</p> <p>骨形成に関わる新たな遺伝子を同定するために、骨軟骨前駆細胞様細胞株である ATDC5 細胞において骨形成誘導因子である BMP2 の下流にある遺伝子を suppression subtractive hybridization 法でスクリーニングし、Cthrc1 をクローニングした。Cthrc1 はコラーゲンに特徴的な GXY 繰り返し配列をもつ分泌糖タンパクである。</p> <p>Cthrc1 は骨に高発現していることから、骨格形成または骨量調節に関わる遺伝子であることが推測された。そこで Cthrc1 の in vivo での機能を調べるために、ジーンターゲット法により、LacZ 遺伝子を挿入することによって Cthrc1 遺伝子を破壊した変異マウスを作製した。ヘテロ欠損マウスの LacZ 染色の解析から Cthrc1 は骨格、特に骨に高発現していることを確認した。しかし、胎仔における in situ ハイブリダイゼーション法では骨軟骨マーカー遺伝子の発現にノックアウトマウスと野生型の間で差はなく、新生仔における骨格標本においても表現型の差異を認めないことから Cthrc1 は骨格形成に大きな影響を与えないと考えられた。次に2か月齢マウスの骨量を比較した。脛骨のマイクロ CT、腰椎骨の非脱灰標本による骨形態計測から、ノックアウトマウスでは骨量、骨梁数、骨芽細胞数の減少と骨形成能の低下を認めた。さらに1週齢の頭蓋冠における BrdU 免疫染色で骨芽細胞増殖能も低下していた。</p> <p>ノックアウトマウスの解析から、Cthrc1 は骨芽細胞性骨形成を刺激することで生後骨量を調節する役割があると考えた。そこで、骨芽細胞において Cthrc1 を過剰発現する Colla1-Cthrc1 トランスジェニックマウスを作製した。ノックアウトマウスと同様、骨格形成に明らかな異常は認められなかったが、2か月齢トランスジェニックマウスでは骨形成能亢進に伴う骨量、骨梁数、骨芽細胞数の増加を認め、1週齢の頭蓋冠における BrdU 免疫染色においても骨芽細胞増殖能の亢進を認めた。これらのマウスの解析から Cthrc1 は骨芽細胞増殖を伴う骨形成能を刺激して骨量を増加させる働きがあると推測した。</p> <p>In vitro における Cthrc1 の機能をノックアウトマウス、及びトランスジェニックマウスから採取した初代骨芽細胞と骨髄細胞を用いて解析した。頭蓋冠から採取した初代骨芽細胞を用いた BrdU アッセイと骨芽細胞特異的マーカー遺伝子の発現解析、そして骨髄細胞を用いたコロニー形成単位アッセイを行ったところ、Cthrc1 は骨芽細胞の増殖、分化を刺激することがわかった。</p> <p>Cthrc1 が骨芽細胞の増殖、分化を刺激することにより骨量を増加させる機能があることから、閉経後骨粗鬆症の疾患モデルである卵巣摘出マウスの骨量に対する Cthrc1 の効果をトランスジェニックマウスを用いて解析した。トランスジェニックマウスでは卵巣摘出による骨量減少が野生型に比べて緩和されており、これは骨形成能の増加が卵巣摘出後も維持していたためと考えられる。従って、Cthrc1 は将来、骨粗鬆症の治療につながる可能性を秘めており、さらなる機能解明が必要である。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

生後骨量は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の緻密なバランスのもとに制御されている。Collagen triple helix repeat containing 1(Cthrc1)は骨形成を調節する因子として強力な骨形成作用を有する BMP2 の下流にある因子として同定された。Cthrc1 は骨組織において高発現しており、生体内での骨への Cthrc1 の機能をノックアウトマウス、及び骨芽細胞において Cthrc1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し解析した。マイクロ CT、骨形態計測の結果からノックアウトマウスでは骨形成能の低下による骨量の減少を認める一方、トランスジェニックマウスでは骨形成能の亢進による骨量の増加を認めた。さらにこれらのマウスから採取した骨芽細胞、骨髄細胞を用いた in vitro の実験から Cthrc1 は骨芽細胞の分化、増殖を促進することがわかった。そこで、閉経後骨粗鬆症の疾患モデルである卵巣摘出マウスの骨量減少に対する Cthrc1 の効果をトランスジェニックマウスを用いて解析した。トランスジェニックマウスでは卵巣摘出による骨量減少が野生型と比して軽減されていた。よって、Cthrc1 は骨芽細胞の分化、増殖を促進することにより骨形成能を高め生後骨量を増加させる働きがあると考えられる。以上の研究は生後の骨量調節における分子機構の解明に貢献するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降