

氏 名	なか にし り か
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3087 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice (Secreted frizzled-related protein 4 は SAMP6 マウスの最大骨密度を負に制御する因子である)
論文調査委員	(主 査) 教 授 戸 口 田 淳 也 教 授 鈴 木 茂 彦 教 授 開 祐 司

論 文 内 容 の 要 旨

若年成人期の低い最大骨量は老年期骨粗鬆症の主要な危険因子である。そして最大骨量という量的形質は多くの骨量を制御する遺伝子のアリの組み合わせによって規定されると考えられる。ヒトの最大骨量を規定する遺伝子を探索する為、ヒト遺伝子との相同性が高くかつ交配実験の可能なマウスを用いて最大骨量規定遺伝子の探索を行った。

老化促進マウス (Senescence -accelerated mouse) の内 SAMP6 マウスは著しく低い最大骨量を持ち、SAMP2 は相対的に高い最大骨量を持っている。この 2 系統間の全染色体連鎖解析において、著しく高いロッドスコアをもつ量的形質座 (以下 QTL) が第11番及び第13番染色体上に示され、SAMP6 バックグラウンド上に約15cM の SAMP2 の第13番染色体上 QTL を持つコンジェニックマウスが作製された。本研究においては、まず候補領域を狭める為コンジェニックマウスと SAMP6 を交配し、QTL 内で染色体組み替えがおこったサブラインを複数系統作製した。これらのサブラインの内、2.4Mb の QTL を持ち、他系統より有意に高い最大骨量を持つサブラインを P6.P2-13 と名付けた。

マイクロ CT を用いた骨量解析にて P6.P2-13 の 4 ヶ月齢における大腿骨の骨皮質量は SAMP6 と比較して6.6%、遠位部海綿骨量は54.2%増加していた。又 2 ヶ月齢におけるカルセイン 2 重標識を用いた動骨形態計測において、P6.P2-13 では骨形成量が有意に増加しており、第13番染色体上の責任遺伝子が骨形成に関わるものである事が示唆された。

QTL 上に存在する11の候補遺伝子について SAMP6 と P6.P2-13 における mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて比較した。Secreted frizzled-related protein 4 (以下 *Sfrp4*) の SAMP6 骨組織における発現レベルは P6.P2-13 の約40倍であった。そこで、SAMP6 と SAMP2 の *Sfrp4* のゲノムの塩基配列を比較したところ 5' プロモーター領域に14ヶ所の一塩基多型を認めた。次に未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにて SAMP6 由来配列を持つプロモーターの活性が SAMP2 由来配列を持つプロモーターよりも約40%高い事を確認した。

細胞外分泌蛋白である *Sfrp* ファミリーは Wnt ライガンドと結合しデコイレセプターとして働く事で細胞内 Wnt シグナリングを抑制していると考えられている。ヒトやマウスにおいて Wnt のレセプターの一つである LRP5 の変異により骨量が大きく変動する事から Wnt シグナリングが骨形成、骨代謝に重要な働きをしている事が明らかとなった。*Sfrp4* は Wnt のアンタゴニストである事から骨形成に抑制的な効果を持つと推測された。前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において、リコンビナント *Sfrp4* は用量依存的にその増殖活性を抑制した。又 Wnt シグナリング下流で活性化される転写因子 TCF の活性を抑制した。一方 SAMP6 頭蓋冠由来初代骨芽細胞は P6.P2-13 由来細胞より低い増殖活性を示し、Wnt 刺激による TCF 活性が抑制されていた。これらの結果から、SAMP6 由来骨芽細胞において *Sfrp4* が Wnt シグナリングを抑制する事により骨形成を負に制御する事が示唆された。

マウス第13番染色体上に示された QTL のヒト相同領域 7p14 は連鎖解析によりヒト骨量 QTL として報告されている領域である。この領域にヒト、マウスに共通する最大骨量規定遺伝子が存在する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

骨粗鬆症の主要な危険因子である最大骨量が低い事は多数の遺伝子により規定されており、このような多因子疾患を解明する一つのアプローチとして、モデルマウスを用いた量的形質遺伝子座（QTL）の解析が考えられる。本研究では老年性骨粗鬆症モデルマウス、SAMP6を用いて最大骨量を規定する遺伝子を探索した。

SAMP6と高最大骨量を持つSAMP2間の連鎖解析にて示された第13番染色体上のQTLをSAMP6バックグラウンド上にうつしたコンジェニックマウスとSAMP6を交配する事によりQTLを2.4Mbの領域に確定した。コンジェニックマウスの形質解析からこの領域は骨形成量を制御する事が示され、候補遺伝子の発現レベル解析では、Secreted frizzled-related protein4 (*Sfrp4*)がSAMP6骨組織において高発現していた。又、リコンビナントSfrp4はin vitroで骨芽細胞活性を抑制し、細胞内Wntシグナリングを抑制した。

これらの結果及びSfrp4が骨形成に重要な働きを持つWntシグナリングのアンタゴニストであるとの知見から、*Sfrp4*がSAMP6の最大骨量を負に制御すると考えられた。

以上の研究は、今後ヒトの最大骨量規定因子を探索する為に非常に有益であり、*Sfrp4*を含むQTLのヒトシンテニー領域にヒト骨量規定遺伝子が存在する可能性を示唆している。

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19年2月19日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格と認められたものである。