

療域の活性型ビタミン D が、骨吸収を著名に抑制することを、生化学マーカーおよび組織学的手法を駆使して立証した。さらに我々は、活性型ビタミン D の骨作用を、同じく骨吸収を強力に抑制するエストロゲンと詳細に比較し、エストロゲンが骨吸収ともに骨形成をも抑制し、従来考えられているように、骨の turnover を低下させるのに対して、活性型ビタミン D は、骨形成をむしろ促進させる作用があることを立証した。異常に亢進した骨吸収を抑制するのみならず、骨形成を促進するという活性型ビタミン D の作用は、自己の修復能力を活性化することにより骨の老化を防止するホルモン療法の開発という我々の戦略に最適の薬理作用であり、今後その細胞・分子メカニズムを解明することにより、さらに強力にカルシウム上昇作用の少ないアナログ開発の基盤を築いた点で、本研究の意義は大きいと考える。

さらに我々は、活性型ビタミン D の骨作用の少なくとも一部が、血清カルシウム上昇作用とは独立に起こることを、ビタミン D との詳細な薬効比較によって明らかにした。このことは、活性型ビタミン D の骨粗鬆症治療作用が、血清カルシウム上昇作用と明確に分離できることを意味し、今後カルシウム作用を欠き、骨における anti-catabolic/anabolic 作用のみを発揮する理想的なアナログが開発できる可能性を示唆する。

活性型ビタミン D は、骨粗鬆症の動物モデルにおいては上述のように著名な治療効果を示すのに対して、実際の患者におけ

る BMD 増加作用は、エストロゲンやビスフォスフォネートなどに及ばない。その理由の一つとして、骨粗鬆症患者では、高カルシウム血症あるいは高カルシウム尿症の危険を避けるために薬物が十分量投与されていない可能性がある。さらに我々の結果は、活性型ビタミン D に対する反応性に、個々の患者の遺伝的素因が大きく左右することを示している。全集団の約 20% を占める TGF- β 1 遺伝子の CC genotype をもつ患者群が活性型ビタミン D 治療に対して良好な BMD 増加効果を示したことから、これら治療奏功群の成績が、治療に反応しない多くの患者の結果によって希釈されており、逆に、遺伝的スクリーニングによって治療が奏功する患者を選択できる可能性が示唆される。今後、症例数を増やして調査研究する価値があると思われる。

E. 結論

活性型ビタミン D は、閉経後骨粗鬆症など骨代謝回転が高まった病態では、骨吸収を抑制する。活性型ビタミン D には、エストロゲンのように骨形成を強く抑制する作用はなく、むしろ高用量で骨形成を促進したことから、骨の再生能力賦活化にはもつとも適した薬効を発揮する。しかも、これら骨における治療効果の少なくとも一部は、血清カルシウム上昇作用とは分離可能であることから、将来血清カルシウムにはほとんど影響しないで、骨に対する anti-catabolic/anabolic 作用のみを有する薬物開発の理論的基盤が形成されたことになる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Shira-ishi A, et al: The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 1999 in press
- ② Shira-ishi A, et al: Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. Submitted
- ③ Yamada Y, et al: Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β 1 with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13: 1569-1576, 1998
- ④ Yamada Y, et al: TGF- β 1 gene

polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med*, 1999 in press

2. 学会発表

- ① Ikeda K, et al: Satellite Symposium "Alfacalcidol- New Aspects of a Physiological Therapy" in European Congress on Osteoporosis, Berlin, September 14, 1998

G. 知的所有権の取得状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ホルモン・サイトカインによる軟骨修復能の活性化

分担研究者 開 祐司（京都大学再生医科学研究所 教授）

研究要旨

マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、初期分化及び後期分化の進行が BMP シグナルと PTH/PTHrP シグナルによる正負のシグナルバランスによって制御されていることを示した。さらに、ウサギ関節軟骨全層欠損での軟骨再生過程で PTH の作用を検討することにより、PTH/PTHrP シグナルが *in vivo* においても軟骨初期分化を抑制することを明らかにした。

キーワード： 軟骨再生、関節軟骨、軟骨分化、PTH/PTHrP シグナル

A. 研究目的

骨や関節疾患に対する適切な対処は、単に身体活動を確保する観点から高齢患者の QOL の増進をはかるみならず、医療保健費の抑制にも大きく寄与する。ところが、骨に比較して軟骨（特に関節軟骨）の再生修復能は、極めて乏しく、現在のところ、関節軟骨の変性に対する根治療法は知られていない。そこで、本研究では、軟骨幹細胞の同定とこれに対するサイトカイン刺激によって、これまで不可能とされてきた関節軟骨の再生修復を誘導する。

B. 研究方法

1) マウス胚性腫瘍由来 ATDC5 細胞培養系の軟骨マーカー遺伝子発現パターンを指標に、軟骨初期分化から後期分化（軟骨肥

大化・石灰化）に至る *in vitro* 多段階軟骨分化系を確立した(1, 2)。そこで、軟骨分化を制御する増殖分化因子シグナルネットワークを解析する。

まず、未分化 ATDC5 細胞を 96 穴プレートに 5×10^3 個/well、24 穴プレートに 2×10^4 個/well、6 穴プレートに 6×10^4 個/well、播種して、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリンと 5% FBS を含む DME/F-12 培地にてコンフルエントに達するまで 3 日間培養した。さらに、Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)、Transforming Growth Factor- β (TGF- β)、Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)、Parathyroid Hormone(1-34) (PTH(1-34))などの増殖分化因子を添加して、BrdU の取り込みから細胞増殖に対する作用を、また、type II collagen mRNA

の発現を Northern blot 解析することにより軟骨初期分化誘導に対する作用を評価した。

さらに、同様の条件にて軟骨結節の増殖が停止するまで 21 日間培養した後に、上記に示した各種増殖分化因子を添加して、type X collagen; Alkaline Phosphatase (ALP); type II collagen mRNA の発現を Northern blot 解析して軟骨後期分化誘導に対する作用を評価した。また、培養系の ALP 活性を測定し、更に Alizarin Red 染色により培養系の石灰化への作用を評価した。

2) 成熟ウサギの大腿骨膝蓋窩に軟骨下骨に達する関節軟骨全層欠損を作成して(3)、軟骨初期分化に対する PTH/PTHrP シグナルの作用を明かにする。

すなわち、成熟家兎の大腿骨膝蓋窩表面から電気ドリルで深さ 4 mm の円柱状の穴を開けて軟骨下骨に達する関節軟骨全層欠損を作成した。直径が 3 mm 以下の欠損では、欠損内に遊走した未分化細胞は 2 週間ほどで軟骨細胞に分化して、欠損深部から骨に置換されていく。ところが直径が 5 mm を超える欠損では軟骨分化が誘導されない。従って、欠損部は線維性組織で充填されるが、軟骨形成はおこらない。

本研究では、オスモティックポンプを使って欠損部中央から recombinant human PTH(1-84) (25 ng/hr)を持続的に注入した。欠損部の組織修復を safranin-O 染色により組織化学的に検索した。欠損部内に遊走する未分化細胞の細胞増殖動態を免疫組織学

的に Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)を経時的に検出することにより評価した。また、修復組織に遊走した細胞の PTH 応答能を抗 PTH/PTHrP 受容体抗体を用いた免疫組織染色により評価した。

C. 研究結果

1) コンフルエントに達して増殖を停止した未分化 ATDC5 細胞培養系の DNA 合成は、FGF-2 によって促進された。これに対応して培養系の saturation cell density は上昇したが、軟骨初期分化の「場」となる細胞凝集領域の形成は認められなかった。また、type II collagen mRNA の発現誘導も認められなかった。IGF-I は、DNA 合成を FGF-2 よりは弱いものの有意に促進した。IGF-I の添加により培養系内に細胞凝集領域の形成が認められた。しかし、type II collagen mRNA の発現誘導は直接には促進されず、IGF-I は軟骨前駆細胞に対する直接の分化促進因子として作用しているのではなく、細胞凝集領域の形成に作用していることが明らかとなった。

これに対して、BMP-2 は培養系の DNA 合成には促進的にも抑制的にも作用しなかった。しかし、type II collagen mRNA の発現は特異的に誘導され、培養系に軟骨分化が誘導されたことは細胞形態からも確認できた。すなわち、至適濃度の BMP-2 は、細胞凝集領域の形成を経ることなく軟骨前駆細胞の初期分化を促進する分化因子の作用を発現した。ATDC5 細胞は内因性の BMP-4 を未分化段階から発現しているので、BMP-2/-4 が autocrine/paracrine

形式の分化シグナルとなっていることが示唆された。TGF- β も、培養系の DNA 合成に影響を及ぼすことがなく、type II collagen mRNA の発現も誘導した。しかし、細胞形態は紡錘形の線維芽細胞様に変化して、特異的な軟骨基質形成は認められなかった。このことは、TGF- β が BMP とは異なり軟骨初期分化因子として機能していないことを示していた。一方、TGF- β と FGF-2 は相乗的に軟骨前駆細胞の増殖を促進した。

PTH(1-34)は、細胞凝集領域の形成と共に発現する PTH/PTHrP 受容体を介して、軟骨分化に負のシグナルを伝達すると推測されている。これに対応して、PTH(1-34)は未分化 ATDC5 細胞の増殖ならびに細胞形態に影響を与えなかった。

次に、初期軟骨分化により形成された軟骨結節の成長が終了する培養 21 日目の ATDC5 細胞培養系に対する各増殖分化因子の作用を検討した。BMP-2 は、軟骨後期分化マーカーである type X collagen mRNA の発現、ALP 活性の亢進のみならず、形成された軟骨基質の石灰化をも強力に促進した。これに対して、TGF- β はそのいずれの指標によっても抑制的に作用することが判明した。すなわち、BMP は軟骨後期分化の促進シグナルとなっているのに対して TGF- β は抑制シグナルとなっていた。一方、PTH(1-34)は評価した全ての後期分化マーカーの発現を阻害した。IGF-I は、ATDC5 細胞の軟骨後期分化の進展には作用を及ぼさなかった。

2) ウサギ大腿骨膝蓋窩に作成した関節軟骨全層欠損は、関節軟骨の自然治癒が誘導される直径 3 mm の系における修復組織の PCNA 陽性細胞率は $58.8 \pm 10.6\%$ と高値を示したのに対して、軟骨修復が誘導されない直径 5 mm の欠損においては $14.8 \pm 3.0\%$ と有意に低値を示した。直径 5 mm の欠損においても FGF-2 の投与により軟骨修復が誘導される実験条件では、PCNA 陽性細胞率は直径 3 mm の欠損と同様の高値を示した。すなわち、関節軟骨全層欠損における軟骨組織修復能は、欠損分に遊走する軟骨組織幹細胞の旺盛な増殖能の維持と相関することが明らかとなった。

これに対して、軟骨の自然修復が誘導されるはずの直径 3 mm の欠損であっても、PTH を投与すると修復組織内における軟骨分化誘導が著明に阻害されることが明らかとなった。このとき、修復組織の PCNA 陽性細胞率は $60.3 \pm 4.9\%$ と高値を示し、修復組織の細胞密度もコントロール群のそれと同様であった。これらの結果は、PTH/PTHrP シグナルが *in vivo* においても軟骨初期分化に対して負の制御作用を表すことを示唆している。また、その作用機序は、軟骨幹細胞の増殖抑制ではなく幹細胞の初期分化誘導そのものの抑制に基づいていることを示していた。

さらに、PTH/PTHrP 受容体の免疫組織学的検索により、修復組織内に遊走した未分化細胞は明らかに PTH/PTHrP 受容体を発現していた。このことは、胎生期にみられる軟骨多段階分化モデルの上では、細胞凝集領域の形成に伴って出現する

PTH/PTHrP 応答性の軟骨前駆細胞が欠損分の修復組織を構成していることを示唆している。PTH 投与により軟骨分化が阻害されると欠損部は、4 週後までに PTH/PTHrP 受容体陰性の繊維組織により充填された。

D. 考察

マウス胚性軟骨組織幹細胞株 ATDC5 を駆使して、内軟骨性骨形成において認められる組織幹細胞の軟骨初期分化とそれに続く後期分化を忠実に再現する *in vitro* 軟骨多段階分化モデルを構築した。これを用いて各分化段階の進展を制御する増殖分化シグナルネットワークが明らかとなった。その結果、軟骨前駆細胞の凝集領域の形成に続く type II collagen 発現を特徴とする増殖性軟骨細胞の出現（軟骨初期分化）に対する分化促進シグナルとして、BMP-2/-4 が作用していることが明らかとなった。FGF が軟骨前駆細胞の増殖能維持に作用するのに対して、BMP シグナルは前駆細胞の増殖にほとんど影響を与えず、細胞の形質発現を選択的に促進することが明らかとなった。さらに、軟骨結節の成長停止に続く type X collagen 発現を特徴とする肥大化・石灰化軟骨細胞の出現（軟骨後期分化）においても、BMP-2/-4 は正の分化シグナルとして作用していることが明らかとなった。一方、PTH/PTHrP シグナルは、軟骨初期分化及び後期分化のいずれの分化段階においても分化抑制シグナルとして作用し、軟骨分化を制御する負の paracrine シグナルとなっている可能性が

示された。

上記のような *in vitro* 細胞分化系によるシグナルネットワークの存在は、ウサギ関節軟骨全層欠損の再生モデルによって *in vivo* における細胞増殖分化制御にも適用されることが実証された。すなわち、骨髄由来組織幹細胞の遊走に始まる関節軟骨の再生においては、軟骨幹細胞の増殖維持が軟骨再生誘導の鍵を握っていることが軟骨再生能と PCNA 陽性細胞集団の維持に相関関係があることにより示唆された。この過程に、外因性・内因性の FGF シグナルが主要な役割を果たしていることが判明してきた(3)。また、既に形成された軟骨組織内部においても内因性の FGF シグナルが組織の成長と拡大に作用していることが判明している(4,5)。さらに、本年度の研究から *in vitro* 細胞培養系において示唆されたように、軟骨分化誘導に際して PTH/PTHrP シグナルの活性化は、軟骨分化の進行には *in vivo* においても著明な抑制効果を発現することが判明した。このとき、軟骨組織幹細胞の増殖能には全く影響を与えなかった。

一方、軟骨再生技術の臨床応用に当たっては、骨髄に存在する未分化細胞群から軟骨組織幹細胞を選択的に濃縮する技術の開発が不可欠となる。そのためには、本組織幹細胞を特徴づける細胞表面マーカーの同定が鍵を握っているものの、現在、ほとんど明らかにされていない。本研究から修復に直接関与する軟骨組織幹細胞が PTH/PTHrP 受容体を発現している事実が明らかとなったので、軟骨組織幹細胞の選

的濃縮に新たな道を拓く可能性を示した。

E. 結論

in vitro および in vivo の実験系を駆使して、軟骨分化制御の実体的解明が可能となってきた。また、軟骨組織に由来する特異的な細胞分化機能制御因子の実体も明らかとなってきたことから(6-9)、組織特性を十分に考慮すれば、従来、不可能とされてきた軟骨再生能力の再活性化を成熟個体においても実現できることを示した。

1. 引用論文

- ① C. Shukunami, C. Shigeno, et al: Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro; Differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, J. Cell Biol., 133: 457-468, 1996.
- ② C. Shukunami, K. Ishizeki, et al: Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro, J. Bone Min. Res., 12: 1174-1188, 1997.
- ③ Y. Otsuka, H. Mizuta, et al: Requirement of FGF signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage, Dev. Growth Diff., 39: 143-156, 1997.
- ④ H. Satoh, M. Susaki, et al: Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter; Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans, J. Biol. Chem., 273: 12307-12315, 1998.
- ⑤ G. Cai, M. Nakayama, et al.: Mutational analysis of the DTDST gene in a Japanese patient with achondrogenesis type IB, Am. J. Med. Gene., 78: 58-60, 1998.
- ⑥ Y. Hiraki, H. Inoue, et al: A novel growth-promoting factor derived from fetal bovine cartilage, chondromodulin-II: Purification and its amino acid sequence, J. Biol. Chem., 271: 22657-22662, 1996.
- ⑦ Y. Hiraki, H. Inoue, et al: Identification of chondromodulin-I as a novel endothelial cell growth inhibitor: Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage, J. Biol. Chem., 272: 32419-32426, 1997.
- ⑧ Y. Mori, Y. Hiraki, et al: Stimulation of osteoblast proliferation by cartilage-derived growth promoting factors, chondromodulin-I and -II, FEBS Lett., 406: 310-314, 1997.
- ⑨ H. Inoue, J. Kondo, et al: Identification

of an autocrine chondrocyte colony-stimulating factor; Chondromodulin-I stimulates colony formation of growth plate chondrocytes in agarose culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241: 395-400, 1997.

2. 研究発表

1. 論文発表

- ① C. Shukunami, Y. Ohta, et al.: Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5, *Exp. Cell Res.*, 241: 1-11, 1998.
- ② C. Shukunami, Y. Hiraki: Expression of the cartilage-specific functional matrix chondromodulin-I mRNA in rabbit growth plate chondrocytes, and its responsiveness to growth stimuli in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 885-890, 1998.
- ③ S. Kudo, H. Mizuta, et al: Inhibition of chondrogenesis by parathyroid hormone in vivo during repair of full-thickness defects of articular cartilage, 投稿中, 1999

2. 学会発表

- ① 宿南知佐、猪山賢一他、Chondromodulin-I の内軟骨性骨形成における役割、日本発生生物学会第31回大会、1998
- ② 工藤智志、水田博志他、関節軟骨全層欠損の修復過程に及ぼす PTH の影響、第13回日本整形外科学会基礎学術集会、1998
- ③ 水田博志、工藤智志他、関節軟骨修復過程における細胞増殖に関する免疫組織学的検討、第13回日本整形外科学会基礎学術集会、1998
- ④ 光井かおり、高野貴晴他、組換えヒト Chondromodulin-I の CHO 細胞による生産およびその血管新生抑制作用、第71回日本生化学会大会、1998

H. 知的所有権の取得状況

7. 特許取得

なし

8. 実用新案登録

なし

9. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

骨特異的なエストロゲン作用の分子メカニズム

分担研究者 加藤 茂明（東京大学分子細胞生物学研究所 教授）

研究要旨

骨粗鬆症は閉経後の女性に頻発するが、エストロゲン（E₂）補充により改善が見られることから、E₂不足により生じる病態と考えられている。エストロゲン核内レセプターは、リガンド誘導性転写制御因子であり、最近第二のレセプター（ERβ）も見い出された。核内レセプターは基本転写装置と共に、転写制御をホルモン依存的におこなうが、最近の研究成果から、このときレセプターへのホルモン結合依存的に相互作用する核内因子群が見い出されている。これら核内因子群は転写共役因子とよばれ、SRC-1(ERAP 160)、TIF が知られ、核内レセプターのみならず、他の転写因子群の転写共役因子として働くものに CBP/P300 が挙げられている。そこで今回これら転写共役因子群のレセプター N 末端に存在する転写促進領域に対する関与を調べたところ、SRC-1(ERAP 160)、TIF は関係無く、CBP/P300 が効率よく転写促進能を亢進することがわかった。更にリン酸化依存的に結合する核内転写共役因子を検索したところ、分子量約68000の蛋白の同定に成功した。

キーワード： 骨粗鬆症、エストロゲン受容体、転写共役因子

A. 研究目的

骨粗鬆症は閉経後の女性に頻発するが、エストロゲン（E₂）補充により改善が見られることから、E₂不足により生じる病態と考えられている。骨組織は、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの複数の細胞種と骨基質から成る上に、これら骨細胞間で複雑な連絡が取られるため、数多くの細胞調節因子群が存在する。エストロゲンを始め

としたステロイドホルモン、甲状腺ホルモン及ビタミン A、D 等の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内レセプター群は、1つの遺伝子スーパーファミリーを形成し、リガンド誘導性転写制御因子である。通常ステロイドレセプターはホルモン（リガンド）1つに対し、レセプターは1種であるが、エストロゲンレセプター（ERα）のみに、最近第二のレセプター（ERβ）が見い

出された。このことは、エストロゲンの複雑な生理作用を良く説明するものであり、実際エストロゲン標的組織内でも、細胞種によってはこの2種のレセプターの局在が異なることが報告されている。ERの転写促進能は、A/BとE領域の2箇所が担っている。何れの機能も組織や動物種の違いによって活性が異なっている。またA/B領域の転写促進機能(AF-1)は恒常的であるのに対し、E領域の転写促進機能(AF-2)はリガンド結合誘導的である。AF-1の機能は成長因子群からの情報伝達系から活性化されたMAP kinaseによるリン酸化により調節されることをみいだしている。核内レセプターは基本転写装置と共に、転写制御をホルモン依存的におこなうが、最近の研究成果から、このときレセプターへのホルモン結合依存的に相互作用する核内因子群が見い出されている。これら核内因子群は転写共役因子とよばれ、ホルモンやアンチホルモンの生物活性を規定するものと考えられている。現在までにAF-2に対し、転写共役因子として働くものにSRC-1(ERAP 160)、TIFが知られ、核内レセプターのみならず、他の転写因子群の転写共役因子として働くものにCBP/P300が挙げられている。

B. 研究方法

ER α 、ER β の全長及各種決失変異体をコードする発現ベクターを培養動物細胞にCa-Pi法にて導入する。同時にCATや β -gal遺伝子をreporterとして、レセプターの転写促進能を評価する。また転写共役因子

の効果も同様な手法で調べた。In vitroでの転写共役因子との結合は大腸菌内で発現させた組み換えタンパクをプローブにしたGST-pull down assayで行った。

C. 研究結果と考察

これら転写共役因子群のAF-1に対する関与を調べたところ、SRC-1(ERAP 160)、TIFは関係無く、CBP/P300が効率よく転写促進能を亢進することがわかった。しかしAF-1機能のMAP kinaseによるリン酸化により調節にはCBP/P300は関与しなかった。そこでリン酸化依存的に結合する核内因子を検索したところ、分子量約68000の蛋白を見い出した。この因子(p68)の性状と、AF-1及びAF-2に対する効果を調べているところである。今後骨組織での機能、および病態との関連を探る予定である。

E. 結論

エストロゲン受容体のAF-1機能が、SRC-1よりCBP/P300により強く増強されることを見いだすとともに、受容体のリン酸化に依存して結合する因子p68を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. Nature

- Genetics, 21, 138-141, 1999.
- ② Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999
- ③ Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- ④ Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 1999 (in press).
- ⑤ Kato, S., Sekine, K., Matsumoto, T., Yoshizawa, T.: In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999 (in press).
- ⑥ Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1005-1008, 1999.
- ⑦ Kato, S., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth factors signaling pathways. *Oncology*, 55 (suppl 1), 5-10, 1998.
- ⑧ Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T., Kato, S.: Inactivating mutations in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficient rickets. *N. Engl. J. Med.*, 338, 653-661, 1998.
- ⑨ Harada, H., Kuboi, Y., Miki, R., Honda, C., Masushige, S., Nakatsuka, M., Koga, Y., Kato, S.: Cloning of rabbit TR4 and its bone cell-specific activity to suppress estrogen receptor-mediated transactivation. *Endocrinology*, 139, 204-212, 1998.
- ⑩ Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka,

- S., Kodera, Y., Hosoya, T., Kato, S.: The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin and 1 α , 25(OH)₂D₃. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 11-16, 1998.
- ⑪ Watanabe, M., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: A putative tumor suppressor, TSG101, acts as a transcriptional suppressor through its coiled-coil domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 900-905, 1998.
- ⑫ Kato, S., Sekine, K., Matsumoto, T., Yoshizawa, T.: Molecular genetics of vitamin D receptor acting in bone. *J. Bone Miner. Metab.*, 16, 65-71, 1998.
- ⑬ Kato, S., Yanagisawa, J., Murayama, A., Kitanaka, S., Takeyama, K.: The importance of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in vitamin D-dependent rickets. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 7, 377-383, 1998.
- ⑭ Kishimoto, H., Hoshino, S., Ohori, M., Kontani, K., Nishina, H., Suzawa, M., Kato, S., Katada, T.: Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 273, 15429-15434, 1998.
- ⑮ Takeshita, A., Imai, K., Kato, S., Kitano, S., Hanazawa, S.: 1 α , 25-Dehydroxyvitamin D₃ synergism toward transforming growth factor- β 1-induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *J. Biol. Chem.*, 273, 14738-14744, 1998.
- ⑯ Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., Kato, S., Kawashima, H.: A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 142-147, 1998.
- ⑰ Fukumoto, S., Suzawa, M., Kikuchi, T., Matsumoto, T., Kato, S., Fujita, T.: Cloning and characterization of kidney-specific promoter of human PTH/PTHrP receptor gene: Absence of mutation in patients with pseudohypoparathyroidism type Ib. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 141, 41-47, 1998.
- ⑱ Nishihara, A., Hanai, J., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., Kawabata, M.: Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling

of TGF- β . Genes to Cells, 3, 613-623,
1998.

G. 知的所有権の取得状況

10. 特許取得
なし

11. 実用新案登録
なし

12. その他
なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

新規老化抑制遺伝子 (*klotho*) 欠損マウスにおける骨粗鬆化の解析

分担研究者 川口 浩（東京大学医学部整形外科講師）

研究要旨

様々なヒトの老化に類似した表現型を呈する *klotho* マウスでは骨髄細胞自身に破骨細胞の分化障害の原因があると考えられたため、骨髄細胞の細胞分画を検討した。破骨細胞前駆細胞である F4/80 陽性細胞分画の割合は両者に差がなかったが B220 陽性細胞分画 (B リンパ球)、中でも IgM μ 鎖陰性の細胞 (pre-B リンパ球)の割合が *klotho* マウスにおいて約 1/10 に減少していた。また、閉経後女性 377 例 (41~91 歳、平均年齢 65.6 歳) を対象としてヒト *klotho* 遺伝子座マイクロサテライト多型と骨密度の関連を検討したところ、ヒト *klotho* 遺伝子座多型が閉経後、比較的短期間における骨密度とは相関せず、閉経後の経過が長くなるほど骨密度との相関が強くなることが明らかとなった。

キーワード： *klotho*、遺伝子多型、骨密度、B リンパ球

A. 研究目的

様々なヒトの老化に類似した表現型を呈する *klotho* マウスでは骨代謝回転が抑制されており、破骨細胞の数が野生型 (WT) マウスの約 1/3 に減少していることが昨年度までの検討で明らかになっている。また、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において骨芽細胞の由来に拘わらず、骨髄細胞が *klotho* 由来の場合に限って破骨細胞形成が抑制されることから、*klotho* の骨髄細胞自身に破骨細胞の分化障害の原因があると考えられた。そこで今回、骨髄

細胞の細胞分画を検討した。また、ヒト *klotho* 遺伝子の骨粗鬆症の発症・進展への関与を検討するために、マウス *klotho* 遺伝子と相同配列を持ったヒト *klotho* 遺伝子を特定し、さらにこのヒト *klotho* 遺伝子最終エクソンの下流に CA 反復配列による多型を見出した。閉経後女性において、このマイクロサテライト多型と骨密度の相関を検討した。

B. 研究方法

Klotho マウスの骨髄の解析：5-7 週齢

の *klotho* マウスと野生型マウスで骨髄、末梢血、脾臓での有核細胞数を計測後、特異的表面抗原として C220 (Cリンパ球)、Gi-1 (顆粒球)、CE3 (Tリンパ球)、TFR119 (赤芽球)、G4/80 (マクロファージ) の抗体を用いフローサイトメトリーで細胞分画を調べた。さらに C220 陽性細胞の分化程度を検討するため細胞膜上 IaM μ 鎖の抗体を用いた 2 カラー分析を行った。

ヒトの遺伝子解析：閉経後非血縁日本人女性 377 例 (41~91 歳、平均年齢 65.6 歳) を対象とした。*klotho* 遺伝子では、マイクロサテライト法によって CA 反復配列数の解析を行い、末梢白血球から抽出した ENA 遺伝子型と、閉経後年代別での骨密度 (腰椎 L2-4 および全身骨密度の U-kXgie) との関連につき解析した。

C. 研究結果

Klotho マウスの骨髄においては野生型マウスに比べて全有核細胞数が約 1/2、末梢血、脾臓において約 1/6 に減少していた。*Klotho* マウスの骨髄での全有核細胞にしめる各細胞の割合は野生型マウスに比べて、C220 陽性細胞が約 1/3 に減少 ($P < 0.001$)、Gi-1 陽性細胞は軽度増加、CE3 陽性細胞、TFR119 陽性細胞は共に増加 ($P < 0.05$)、G4/80 陽性細胞には変化なかった。さらに C220 陽性細胞の分化程度を検討するため細胞膜上 IaM μ 鎖の抗体を用いた 2 カラー分析を行ったところ、Cリンパ球のうち特に未分化な hie-Cリンパ球の割合が減少していることが分かった。末梢血、脾臓でも同様に *klotho* マウスで

は Cリンパ球の減少と顆粒球の軽度の増加が認められた。

閉経後女性 377 例における *klotho* 遺伝子座マイクロサテライト多型によって CA 反復配列数の解析を行い、末梢白血球から抽出した ENA 遺伝子型と、閉経後年代別での骨密度 (腰椎 L2-4 および全身骨密度の U-kXgie) との関連につき解析した。CA 反復配列数は 10 種類認められ、各反復配列数の頻度は、2 が 143 例 (25%)、4 が 261 例 (45%)、5 が 40 例 (7%)、7 が 7 例 (1%)、10 が 16 例 (3%)、11 が 39 例 (7%)、12 が 23 例 (4%)、13 が 30 例 (5%)、14 が 13 例 (2%)、15 が 3 例 (0.7%) であった。閉経後 5 年未満の症例 (61 例) および閉経後 10 年未満の症例 (131 例) においては *klotho* 遺伝子座多型と骨密度の間には有意な相関は認められなかった。しかしながら、閉経後 10 年以上経過した症例 (246 例) では、CA 反復配列数 10 の *Wild* を有する群で腰椎骨密度 (L2-4 U kXgie) が他の群に対して有意に低かった (+; -0.607, -; 0.250, $hA0.048$)。また、閉経後 20 年以上経過した対象群 (102 例) では、同 *Wild* を有する群で、L2-4 U kXgie は有意に低く (+; -868, -; 0.355, $hA0.029$)、10 年後の群より差が大きくなった。一方、閉経後 20 年以上経過した症例 (102 例) では、CA 反復配列数 12 を有する遺伝子型でも骨密度との相関が見られ、同遺伝子型を有する群の L2-4 U kXgie および全身骨密度 (lglWd U kXgie) とともに有意に他の群よりも高値を示した (L2-4 U kXgie; +: 1.146, -: 0.220, $hA0.048$ およ

び 1.04 , -0.201 , $hA0.026$)。以上より、老化に伴う骨密度減少の背景に、老化関連遺伝子 *klotho* の関与が存在する可能性が示唆された。

D. 考察

今回の検討で、骨代謝回転が低下している *clbg* マウスにおいては骨髄中の C リンパ球、特に *hie-C* リンパ球の割合が著名に減少していることが明らかとなった。一方、骨代謝回転が亢進している卵巣摘出マウスではこの C リンパ球分画の割合が増加していることが報告されており、C リンパ球が骨代謝回転の調節に関与している可能性が示唆された。*Klotho* マウスにおける C リンパ球の低下と破骨細胞形成への関与、加齢に伴う骨代謝回転の低下に骨髄の C リンパ球系細胞の役割を検討することが、今後の検討課題といえる。

また、今回の検討で、*klotho* 遺伝子が高齢者の骨量減少に関与している可能性が示された。今後は、整形外科領域における主要な老化関連疾患である骨粗鬆症、変形性関節症、および脊柱靭帯骨化症の発現・進展に直接関与している変異を特定するために、*klotho* 遺伝子の全 5 個の *enke* につき PCR-SSCP およびダイレクトシーケンスによる解析を行い、表現型に相関する遺伝子変異に関しては機能との相関について詳細に検討する予定である。

E. 結論

Klotho マウスの骨髄細胞の細胞分画を

検討したところ、C リンパ球、特に *hie-C* リンパ球の割合が減少しており、骨代謝回転の維持における C リンパ球の関与が示唆された。また、閉経後女性においてヒト *klotho* 遺伝子座多型が閉経後の経過が長くなるほど骨密度との相関が強くなることが明らかとなった。

3. 研究発表

1. 論文発表

① 川口浩、筑田博隆: *clbg* 遺伝子と老人性骨粗鬆症. 臨床科学 34 (10) (特集: 骨粗鬆症「基礎から臨床へ」): 1373-1377, 1998.

② 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分化異常と骨髄造血異常のメカニズム (第 16 回日本骨代謝学会奨励賞受賞論文). 日本骨代謝学会雑誌 16 (4): 152-154, 1999.

2. 学会発表

① 川口浩: 新規老化抑制遺伝子 (*klotho gene*) と骨粗鬆症. 第 33 回 Ca 代謝研究会. 1998. 6.18 (名古屋大学鶴友会館、名古屋).

② 川口浩、真鍋典世、緒方直史、黒尾 誠、松村 稔、相沢宏樹、鍋島陽一: *klotho* 遺伝子異常による老化マウスの解析. 第 16 回富士ホルモンカンファレンス. 1998. 7. 17-19. (箱根、神奈川).

- ③ 川口浩: 新規老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝調節機構. 新潟県医師会生涯教育講座. 1998. 7. 24 (ホテルイタリア軒、新潟).
- ④ 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、矢野和樹、津田英資、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分化異常と骨髄造血異常のメカニズム. 第16回日本骨代謝学会. 1998. 8. 5 - 8 (東京国際フォーラム、東京).
- ⑤ 緒方直史、松村穰、黒尾誠、鍋島陽一、細井孝之、大内尉義、白木正孝、中村耕三、黒川高秀、川口浩: 老化関連遺伝子 *klotho* 遺伝子および *werner* 遺伝子の閉経後女性の骨密度への関与. 第16回日本骨代謝学会. 1998. 8. 5 - 8 (東京国際フォーラム、東京).
- ⑥ 緒方直史、川口浩、中村耕三、黒川高秀、松村穰、黒尾誠、細井孝之、大内尉義、白木正孝: 老化関連遺伝子 *Klotho* 遺伝子および *Werner* 遺伝子の閉経後女性の骨密度への関与. 第13回日本整形外科学会基礎学術集会. 1998.9.25-27 (名古屋).
- ⑦ 真鍋典世、川口浩、中村耕三、宮浦千里、尾上佳子、矢野和樹、津田英資、鍋島陽一、黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨、骨髄の分子細胞学的解析. 第13回日本整形外科学会基礎学術集会. 1998.9.25-27 (名古屋).
- ⑧ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常. 第9回骨細胞分子研究会. 1998. 11. 14. (京都ホテル、京都).
- ⑨ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* の骨軟骨代謝異常疾患における関与. 岐阜整形外科教育セミナー. 1999. 2. 4 (岐阜会館、岐阜).
- ⑩ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨軟骨代謝異常. 第57回関節疾患フォーラム. 1999. 2. 9. (東京YMCAホテル、東京).
- ⑪ 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨軟骨疾患. 昭和医学会例会. 1999. 2. 25 (昭和大学病院、東京).
- ⑫ Hiroshi Kawaguchi, Noriyo Manabe, Takahide Kurokawa, Yo-ichi Nabeshima, and Makoto Kuro-o. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation causing osteopenia in the *klotho* mouse. 3rd Combined Orthopaedic Research Societies Meeting. 1998. 9.28-30 (Hamamatsu, Japan).
- ⑬ Hiroshi Kawaguchi, Noriyo Manabe, Kozo Nakamura, Kazuki Yano, Eiji Tsuda, Yoichi Nabeshima, Makoto Kuro-o. Mechanism of low turnover osteoporosis in the *klotho* mouse

exhibiting multiple aging phenotypes. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).

- ⑭ Noriyo Manabe, Hirotaka Chikuda, Chisato Miyaura, Yoshiko Onoe, Makoto Kuro-o, Yoichi Nabeshima, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi. Suppression of B-lymphopoiesis in the klotho mouse exhibiting low turnover osteoporosis. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).

- ⑮ Naoshi Ogata, Makoto Kuro-o, Yutaka

Matsumura, Yo-chi Nabeshima, Takayuki Hosoi, Yasuyosi Ouchi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi. Association of polymorphisms of aging related genes, klotho and Werner's syndrome, with the bone loss of postmenopausal women. 2nd joint meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society. 1998. 12.1 - 6 (San Francisco, USA).

H. 知的所有権の取得状況

1 3. 特許取得

なし

1 4. 実用新案登録

なし

1 5. その他

なし