

---

平成11年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

---

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる  
組織修復能の再活性化

**研 究 報 告 書**

主任研究者 池 田 恭 治

平成11年度  
厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
研 究 報 告 書

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる  
組織修復能の再活性化

平成12年3月

主任研究者 池田 恭治

# 平成11年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書 -----	1
軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる 組織修復能の再活性化-----	2
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. 分担研究報告書 -----	18
1. 活性型ビタミンDによる骨吸収抑制のメカニズム -----	19
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治
2. ホルモン・サイトカインによる軟骨修復能の活性化-----	24
京都大学再生医科学研究所 生体分子設計学分野 教授	開 祐司
3. 骨組織特異的なエストロゲン作用の分子機構における 転写共役因子の解析 -----	31
東京大学分子細胞生物学研究所 分子系統分野 教授	加藤 茂明
4. 新規老化抑制遺伝子 ( <i>klotho</i> ) 欠損マウスにおける 骨粗鬆化の解析-----	36
東京大学医学部 整形外科教室 講師	川口 浩
3. 総合研究報告書 -----	41
軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる 組織修復能の再活性化-----	42
国立長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	池田 恭治

# 1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

軟骨・骨の加齢変化とホルモン・サイトカインによる  
組織修復能の再活性化

主任研究者 池田恭治（長寿医療研究センター 老年病研究部長）

研究要旨

軟骨の分化が、BMP と PTH/PTHrP による正負のオートクリンシグナルバランスによって制御されていること、PTH/PTHrP シグナルが間欠的に加わることによって軟骨前駆細胞の再生場からの散逸を抑制し軟骨再生を誘導しうることを明らかにした。骨吸収と骨形成の修復過程において、ホルモン型ビタミン D が骨吸収を抑制すること、そのメカニズムとして、*in vivo* では ODF/RANKL 発現はあまり変化せず、むしろ骨髄における破骨細胞前駆細胞の数を減少させることを見いだした。エストロゲンの骨特異的作用に関与する可能性があるエストロゲン受容体（ER）のN末端側の転写促進領域（AF-1）に結合する蛋白 p69 をクローニングした。p69 は、RNA ヘリケースの1種で、核内ホルモン受容体のなかでも ER $\alpha$  に特異的であることが判明した。抗老化遺伝子として注目される *klotho* 遺伝子に4つの cSNP を同定し、高齢女性において骨密度と相関することを明らかにした。

キーワード：骨粗鬆症、変形性関節症、エストロゲン、活性型ビタミン D、  
BMP、PTHrP、*Klotho* 遺伝子多型

池田 恭治	長寿医療研究センター 老年病研究部 部長	加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学 研究所 分子系統分野 教授
開 祐司	京都大学再生医科学研究所 生体分子設計学分野 教授	川口 浩	東京大学医学部 整形外科講座 講師

## A. 研究目的

軟骨・骨の退行性変化を基盤として発病する変形性関節症・骨粗鬆症に焦点を当て、これらの疾病における軟骨・骨の修復能の低下を、ホルモン・サイトカインによって自己の再生・修復能力を活性化することで予防・治療に役立てるための基盤研究を行った。

本年度は、関節軟骨の再生に関しては、*in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて、副甲状腺ホルモンおよび関連ペプチド (PTH/PTHrP) と BMP による軟骨分化の制御機構を検討した。骨組織修復能の活性化に関しては、加齢に伴う骨代謝の変化に大きく関わるエストロゲンとホルモン型ビタミン D に着目し、エストロゲンの骨作用の分子基盤と活性型ビタミン D による骨吸収抑制のメカニズムについて検討した。さらに、抗老化遺伝子として注目される *klotho* のヒトにおける遺伝子多型と骨粗鬆症との関連について臨床的調査研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 軟骨の再生

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の発現パターンを指標に、軟骨初期分化から後期分化に至る *in vitro* 多段階軟骨分化系を確立した。まず、未分化 ATDC5 細胞を、10  $\mu$ g/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-4 (BMP-4) を添加して、type II collagen mRNA の発現を Northern blot 解析した。細胞分化による軟骨結節の形成を Alcian Blue 染色によって可視化した。

軟骨初期分化に対するオートクリン BMP シグナルの役割を明らかにする目的で、未分化 ATDC5 細胞にドミナントネガティブ型の BMP type IA 受容体 (DN-BMPRII) コンストラクトをリポフェクション法により導入した。導入細胞クローンを薬剤耐性により分離して、その軟骨分化能を検討した。これと並行して、可溶性 BMP 受容体 (sBMPRII) を培養系に添加して、内因性 BMP-4 によるシグナルを阻害する試みも行った。

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、関節軟骨の再生修復を *in vivo* において検討した。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組

換えヒト PTH(1-84) (25 ng/hr)を持続的あるいは 10 時間ごとに間欠的に注入した。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。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。

## 2. 活性型ビタミン D と骨

破骨細胞分化系の実験がマウスを用いて行うため、まず卵巣摘除マウスを用いて、ラットの時と同じく、*in vivo* における活性型ビタミン D とエストロゲンの効果を調べた。

第一群：sham、

第二群：OVX、

第三群：OVX マウスに alfacalcidol (0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 投与、

第四群：OVX マウスに alfacalcidol (0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 投与、

第五群：OVX マウスに 17 $\beta$ -estradiol (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 投与、

の 5 群の実験グループを作成し、BMD、 $\mu\text{CT}$ 、骨代謝の生化学マーカーを測定するとともに、骨代謝動態を骨形態計測法を用いて詳細に解析した。

各群マウスの脛骨から RNA を抽出し、ODF/RANKL mRNA レベルを Northern blot で解析した。また、各群のマウスから採取した骨髄細胞を sODF と M-CSF の存在下で 4 日間培養し、破骨細胞の形成能を TRAP 染色で評価した。同じく各群のマウスから採取した骨髄細胞を、96-well plate の ST-2 ストローマ細胞 layer の上に、1、

15、50 細胞/well ずつ播き、活性型ビタミン D と dexamethasone の存在下で 7 日間培養し、TRAP 染色をした後、TRAP 陽性細胞が存在する well の数から計算により、もともと骨髄中に存在していた破骨細胞の前駆細胞の frequency を求めた。

## 3. 骨特異的エストロゲン作用の分子基盤

Ser<sup>118</sup> が MAP キナーゼによりリン酸化された ER A/B 領域蛋白を作成し、この蛋白をプローブに用いて Far western 法による相互作用因子の検出を試みた。エストロゲン作用の認められる、COS-1、MCF-7、HeLa 細胞の核抽出液より hER $\alpha$ AF-1 領域相互作用因子の検出を行なった。また Far western 法や Yeast two-hybrid 法による相互作用因子の検索も行なった。これにより取得した候補因子群については、ルシフェラーゼアッセイにより、hER $\alpha$  の転写活性化能に対する効果を検討した。この結果、有望であった因子については *in vivo* および *in vitro* における相互作用実験も行なった。

## 4. *Klotho* 遺伝子多型と骨粗鬆症

### 1) cSNPs の検索

健常人、骨粗鬆症、OPLL 患者を含む 115 例 (男性 56 例、女性 59 例、平均年齢 64.0 才) よりインフォームドコンセントに基づいて採取した末梢白血球から DNA サンプルを抽出した。これらの全サンプルについて、ヒト *klotho* 遺伝子の全 5 つの exon と exon1 の上流 600bp を網羅する 23 組の primer を作製、direct sequence 法を用いて全塩基配列を決定し、点変異を検索して多型分類を行った。

## 2) Association study

骨粗鬆症との関連については閉経後女性 215 例(平均 73.2 才)の前腕の骨密度を DXA を用いて測定した。OPLL との関連については OPLL 患者 73 例(平均 63.7 才)の単純レントゲン像における骨化椎体数を測定した。全症例の末梢白血球から DNA を抽出し、SSCP 法または direct sequence 法にて上記 4 カ所の cSNP について遺伝子型分類を行い、それぞれの表現型との相関を検討した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 軟骨の再生

1) ATDC5 細胞は内因性の BMP-4 を未分化段階から発現していたので、BMP-4 がオートクリン/パラクリン形式の分化シグナルとなっていることが示唆された。コンフルエントに達した未分化細胞の DNA 合成は、FGF-2 によって促進された。これに対して、BMP-4 は培養系の DNA 合成には作用しなかった。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や Alcian Blue 染色からも確認できた。すなわち、BMP-4 は、細胞凝集領域の形成を経ることなく軟骨前駆細胞の type II collagen mRNA を発現する増殖軟骨細胞への分化を誘導した。このために、培養系内には軟骨結節ではなく単層の軟骨細胞シートが形成された。このように、BMP-4 は前駆細胞からの

軟骨初期分化を誘導する分化シグナルとして作用していた。

そこで、培養系内で産生される内因性 BMP-4 の作用を明らかにする目的で、コンフルエントに達した ATDC5 細胞に可溶性 BMP 受容体 (sBMPR) を添加して軟骨初期分化の誘導を評価した。その結果、sBMPR は用量依存性に軟骨分化を阻害し、軟骨結節の形成は 300 ng/ml から 1000 ng/ml の sBMPR の添加によってほぼ完全に阻害されることが判明した。しかし、軟骨分化に先立つ細胞凝集領域の形成には影響を与えなかった。次に、ドミナントネガティブ型の BMP type IA 受容体 (DN-BMPR-IA) を発現させた ATDC5 細胞クローンを分離し、得られた DN-BMPR-IA 導入細胞株をインスリンを含む通常の分化培地で培養を行った。その結果、細胞は親株と同様に増殖してコンフルエントに達するものの、軟骨分化は著しく阻害された。しかし、細胞凝集領域の形成は、sBMPR の添加実験と同様に阻害されなかった。

一方、我々は既に、PTH が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事を明らかにしている。PTH を添加すると、PTH/PTHrP 受容体の発現する前の段階(すなわち、単層の未分化細胞の段階)で細胞分化は停止した。その分化抑制作用は可逆的で、培



養系への PTH の添加を停止すると軟骨結節の形成は、時間的に遅延するものの再び誘導された。

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。このように、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前駆細胞の増殖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 陽性細胞率は高値を示し、PTH/PTHrP シグナルが *in vivo* においても前駆細胞の増殖ではなく分化進展に対して負のシグナルとして機能することが示唆された。次いで、PTH/PTHrP シグナルによる分化抑制と脱抑制による修復機序の活性化を試みた。即ち、自然修復出来ない直径 5 mm の欠損に遊走した未分化細胞に対して、PTH の間欠投与の効果を検討した。その結果、欠損作成時から骨髄由来未分

化細胞の遊走から軟骨分化の誘導に至る 2 週間に PTH の間欠投与 (10 時間毎) を行った後、脱抑制することにより、直径 5 mm の大きな欠損においても軟骨分化が誘導され、欠損部は軟骨組織によって再生修復されることが明らかとなった。

ATDC5 細胞培養は、通常、コンフルエントに達すると接触阻害により増殖を停止する。その後、増殖を停止した細胞は、一定の確率で細胞形態を一層紡錘形に変化させる。この細胞を起点に細胞凝集領域が出現し、この領域内で軟骨分化が進行する。一方、凝集領域外では逆に軟骨分化の進展が停止する。このために、培養系は不均化して、軟骨結節とこれを囲む線維芽細胞のシートが形成される。

前年度までに、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 が作用す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した。BMP-4 が BMP-2 と同様にコンフルエントに達した未分化 ATDC5 細胞を type II collagen を発現する軟骨細胞に転換することは、

BMP-4 の添加によって軟骨細胞シートが培養系に短時間で出現したことで明らかであった。本年度は、特に、ATDC5 細胞が内因性に産生する BMP-4 が軟骨分化の進展を支えるオートクリン分化因子であることを、DN-BMPR-IA の遺伝子導入と sBMPR の添加実験によって明らかにした。BMP-4 の発現レベルは、ATDC5 細胞の初期分化・後期分化に際して重大な変動を示さなかった。従って、細胞分化段階の進展に伴って新たに発現してくる BMP-6、BMP-7 も加わることによって、インスリン添加培地における ATDC5 細胞の自律的な軟骨多段階分化の進展が支持されているものと推察された。興味深いことに DN-BMPR-IA の発現と sBMPR によって、軟骨前駆細胞の分化パターンを作り出す細胞凝集過程が、BMP シグナルとは独立に制御され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、軟骨分化を負に制御するシグナルとなっている。ウサギ関節軟骨全層欠損の再生モデルによって、PTH/PTHrP シグナルが *in vivo* においても軟骨幹細胞の分化に阻害的に作用することが明らかとなった。欠損作成後 2 週間に亘って PTH(1-84)を間欠的に投与することにより、通常は関節軟骨が自然修復されない直径 5 mm の欠損に

おいても関節の軟骨再生修復が誘導された。この事実は、PTH がその分化進展阻害作用によって、欠損部内に集積した PTH/PTHrP 受容体陽性軟骨前駆細胞の機能的散逸を抑制したことを示している。軟骨分化抑制からの脱抑制によって、軟骨再生を誘導する新しい技術となる可能性を示している。

## 2. 活性型ビタミン D による骨吸収抑制のメカニズム

1) マウスにおいても、卵巣摘除によって減少した骨量を、高カルシウム血症を惹起しない薬理量の活性型ビタミン D が、用量依存的に回復させることを確認した。活性型ビタミン D の効果は、エストロゲンとほぼ同程度であった。以上から、活性型ビタミン D の骨粗鬆症に対する治療効果は、ラットとマウスモデルにおいて保存されていること、マウスにおいても、エストロゲンを比較の対照として用いることができることが示された。

2) 骨における ODF/RANKL mRNA の発現は、OVX 後 2 週間目に解析したところ、軽度上昇する傾向は認められたものの、大きな変動はなく、活性型ビタミン D およびエストロゲンの投与によってもほとんど影響を受けなかった。*In vitro* においては、高用量 ( $10^{-8}$  M 以上) の活性型ビタミン D がストローマ細胞における ODF/RANKL mRNA レベルを上昇させることが報告されているが、動物の血中濃度は  $10^{-10}$  M オーダーであり、血清カルシウム濃度を正常に保つ程度の薬理量の活性型ビタミン D

は、*in vivo* においてはあまり ODF/RANKL 発現を上昇させないことが明らかになった。

3) OVX 後活性型ビタミン D を投与したマウスの骨髄細胞は、*in vitro* での破骨細胞形成能が活性型ビタミン D の用量依存性に抑制されていた。抑制の程度は、エストロゲン投与群とはほぼ同程度であった。この結果は、十分量の ODF と M-CSF が存在する環境においては、言い換えると、破骨細胞の形成を支持する因子が rate-limiting でない条件では、破骨細胞形成能は、その前駆細胞の数に依存すること、間接的に、*in vivo* で活性型ビタミン D を投与しておくと、骨髄中の破骨細胞前駆細胞の数が減少することを意味する。

4) 以上の結果に基づき、実際に frequency 解析を行って、骨髄中の前駆細胞の数を評価したところ、*in vivo* で活性型ビタミン D を投与した OVX マウスでは、OVX 対照群と比較して、前駆細胞の frequency が用量依存性に減少することが示された。

### 3. 骨特異的エストロゲン作用 の分子基盤

Ser<sup>118</sup> がリン酸化された hER $\alpha$ /B 領域蛋白をプローブとした Far western 法による解析の結果、COS-1、MCF-7、HeLa 細胞で発現が異なるものの各々の細胞に 68、72、120kDa の分子量の相互作用因子を検出した。Far western 法や Yeast two-hybrid 法による検索の結果、72kDa の分子は p68 と相溶性が高く同じ DEAD-box protein の 1 種である p72 である可能性が示唆された。ルシフェラーゼアッセイにより、p72 の hER $\alpha$

の転写活性化能に対する効果を検討したところ、p72 は hER $\alpha$  の転写活性化能を亢進した。また、この効果は hER $\alpha$ AF-1 に特異的であることが判明した。さらに、最近明らかとなった、PR、ER などの AF-1 の転写活性化能の亢進を行なう RNA 分子である SRA と p72 の協調効果を検討したところ、これらは協調的に hER $\alpha$ AF-1 の転写活性化能を亢進した。また SRA と p72 の *in vitro* における直接の相互作用も確認した。さらに p72 と hER $\alpha$  の細胞内極在を検討したところ、p72 と hER $\alpha$  はリガンド添加時に局在が一致した。また免疫沈降法により p72 と hER $\alpha$  の細胞内での相互作用も確認した。

以上の結果より、p72 が hER $\alpha$  の転写共役因子として機能することが明らかとなった。p72 は RNA helicase p68 と高いホモロジーを持つが、これまでの報告では RNA helicase 活性は認められていない。従って p72 による hER $\alpha$ AF-1 の機能亢進がどのような分子機構により発揮されるのか不明である。これまでの解析から、p72 の転写共役因子としての働きは SRA と協調的であることが示唆されている。今後、骨組織において p72 が如何に AF-1 の転写活性化能の亢進を行なうのかを解析することが必須の課題である。また、AF-1 活性が発揮されるときに形成される転写共役因子複合体について興味もたれる。現在 hER $\alpha$ AF-1 領域に Ser<sup>118</sup> の MAP キナーゼによるリン酸化依存的に形成される複合体の解析を行なう目的で、この複合体の精製を進めてい

る。この複合体の性状解析を行なうことが hER $\alpha$ AF-1 の転写活性化機構解明には必須の課題であると考えられる。

#### 4. *Klotho* 遺伝子多型と骨粗鬆症

##### 1) cSNPs の検索

Exon1 の上流に 1 ケ所 (G/G 78.7%、G/A14.2%、A/A7.1%)、exon3 に 1 ケ所 (C/C 92.6%、C/T 7.4%)、exon4 に 2 ケ所 (C/C 60.0%、C/T 30.6%、T/T 9.4%、および C/C 54.1%、C/T 37.8%、T/T 8.1%) の、計 4 個の cSNPs を特定した。

##### 2) Association study

骨粗鬆症との関連については閉経後女性 215 例(平均 73.2 才)の前腕の骨密度を DXA を用いて測定した。OPLL との関連については OPLL 患者 73 例 (平均 63.7 才) の単純レントゲン像における骨化椎体数を測定した。全症例の末梢白血球から DNA を抽出し、SSCP 法または direct sequence 法にて上記 4 カ所の cSNP について遺伝子型分類を行い、それぞれの表現型との相関を検討した。その結果、閉経後女性全 215 例においてはどの cSNPs も骨密度と有意な相関を示さなかった。しかしながら、症例を年齢の平均値を境にして若年群 (119 例) と老年群 (96 例) に分けて解析したところ、老年群において exon 4 の 1 ケ所の cSNP と骨密度の間に有意な相関が認められた。OPLL については、全症例でも年齢別でも、どの cSNPs とも有意な相関は認められなかった。

本年度の検討で、*klotho* 遺伝子座多型の

うち、その機能への関与が不明のままである CA リピートによるマイクロサテライト多型のみならず、機能に直接関わる cSNPs が高齢者の骨量減少に関与している可能性が示された。若年群には見られず老年群においてのみ有意な相関が認められたのは、閉経という内分泌環境の影響が小さくなった老年群で *klotho* の関与が強く出たためと予測される。事実、我々は変形性関節症患者を対象としてマイクロサテライト多型との関連を検討したが、本疾患の場合は若年群のみに有意な相関が認められた。これは、変形性関節症患者においては加齢とともに、力学的負荷の蓄積が増え環境因子の関与が大きくなるためと予測される。

#### D. 結論

1) 軟骨の分化が、BMP と PTH/PTHrP による正負のオートクリンシグナルバランスによって制御されていること、PTH/PTHrP シグナルが間欠的に加わることによって軟骨前駆細胞の再生場からの散逸を抑制し軟骨再生を誘導しうることを明らかにした。

2) 骨吸収と骨形成の修復過程において、ホルモン型ビタミン D が骨吸収を抑制すること、そのメカニズムとして、*in vivo* では ODF/RANKL 発現はあまり変化せず、むしろ骨髄における破骨細胞前駆細胞の数が減少することを見いだした。

3) エストロゲン受容体 (ER) の N 末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する蛋白 p68 をクローニングした。P68 は、RNA ヘリケースの 1 種で、核内ホルモン受容体のなかでも ER  $\alpha$  に特異的であることが判明

した。

4) 抗老化遺伝子として注目される *klotho* 遺伝子座に4つの cSNP を同定し、高齢女性において骨密度と相関することを明らかにした。

## E. 研究発表

主任研究者

### 1. 論文発表

1. Ikeda K, Ogata E: The effect of vitamin D on osteoblasts and osteoclasts. *Curr Opin Orthop* 10: 339-343, 1999
2. Shira-ishi A, et al: The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 65: 311-316, 1999.
3. Shira-ishi A, et al: Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 2000 in press.
4. Endo K et al: 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion. *J Bone Miner Res* 15: 175-181, 1999
5. Yamada Y, et al: Transforming growth

factor- $\beta$ 1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med* 106: 477-479, 1999

6. Kanematsu M et al: PGE<sub>2</sub> induces expression of RANKL/OPGL on pre-B cells: implication for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 2000 in press.

7. Sato T et al: Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220-positive cells: its role in accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. submitted

8. Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, Shiraki M: Association of transforming growth factor  $\beta$ 1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15: 415-420, 2000.

9. 池田 恭治: 退行期骨粗鬆症の病態生理 ホルモンと臨床 “骨粗鬆症のマネジメントのすべて” 48: 4-12, 2000

### 2. 学会発表

1. 山田芳司、原田 敦、宮内章光、細井孝之、池田恭治、太田博明、白木正孝: TGF- $\beta$ 1 遺伝子多型による閉経後骨粗鬆症の治療効果の予測 第17回日本骨代謝学会、平成11年7月29-31日、大阪
2. 佐藤卓也、池田恭治、渡辺 研: B220陽性細胞から破骨細胞は形成されるか

第 17 回日本骨代謝学会、平成 11 年 7 月  
29-31 日、大阪

3. 池田恭治：活性型ビタミン D の国際的評価について 第 17 回日本骨代謝学会サテライトシンポジウム、平成 11 年 7 月 29-31 日、大阪
4. Ikeda K: Vitamin D analogs that potently inhibit bone resorption and stimulate bone formation in vivo: implications for the treatment of osteoporosis, First International Conference on chemistry and biology of vitamin D analogs, September 26-28, Rhode Island, Providence
5. Sato T, Ikeda K, Watanabe K: A novel pathway to osteoclasts from B220-positive cells: implication in estrogen deficiency osteoporosis. The 21st annual meeting, American Society for Bone and Mineral Research, St Louis, USA. 99.9.30-99.10.4
6. 池田恭治：骨粗鬆症の病態と治療に関する最近の知見 第 10 回骨細胞分子研究会特別講演 11 月 20 日、京都
7. Ikeda K: Active vitamin D for the treatment of osteoporosis: new aspects in its mode of action. The 4th NLS Workshop, December 2-3, 1999, Obu, Japan
8. 池田恭治：シンポジウム I “ビタミン D の骨作用—その現状と展望” 第 15 回ビタミン D ワークショップ、2 月 18—19 日、横浜

分担研究者

開 祐司

1. 論文発表

1. C. Shukunami, K. Iyama, et al.: Spatiotemporal pattern of the mouse chondromodulin-I gene expression and its regulatory role in vascular invasion into cartilage during endochondral bone formation, *Int. J. Dev. Biol.*, 43:39-49, 1999.
2. H. Akiyama, Y. Hiraki, et al.: Cloning of a novel gene specifically expressed in clonal mouse chondroprogenitor-like EC cells, ATDC5, *Biochim. Biophys. Acta*, 1444:291-294, 1999.
3. Y. Hiraki, K. Mitsui, et al.: Molecular cloning of human chondromodulin-I, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in Chinese hamster ovary cells, *Eur. J. Biochem.*, 260:869-878, 1999.
4. C. Shukunami, J. Kondo, et al.: Molecular cloning of mouse and bovine chondromodulin-II cDNAs and the growth-promoting actions of its recombinant protein, *J. Biochem.*, 125: 436-442, 1999.
5. H. Akiyama, C. Shigeno, et al.: Indian

- hedgehog in the late-phase differentiation in mouse chondrogenic EC cells, ATDC5: Upregulation of type X collagen and osteoprotegerin ligand mRNAs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 814-820, 1999.
6. C. Shukunami, S. Yamamoto, et al.: Generation of multiple transcripts from chicken chondromodulin-I gene and their expression during embryonic development. *FEBS Lett.*, 456: 165-170, 1999.
7. T. Hayami, C. Shukunami, et al.: Specific loss of chondromodulin-I gene expression in chondrosarcoma and the suppression of tumor angiogenesis and growth by its recombinant protein in vivo. *FEBS Lett.*, 458: 436-440, 1999.
8. H. Akiyama, Y. Hiraki, et al.: Molecular cloning and biological activity of a novel H-Ras suppressor gene predominantly expressed in skeletal muscle, heart, brain and bone marrow by differential display using clonal mouse EC cells, ATDC5, *J. Biol. Chem.*, 274: 32192-32197, 1999.
9. S. Kudo, H. Mizuta, et al.: Inhibition of chondrogenesis by parathyroid hormone in vivo during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Miner. Res.*, 15: 253-260, 2000.
2. 学会発表
1. 渡辺尚子、木村直子他、活性型 Notch は軟骨細胞様細胞株 ATDC5 の結節形成と基質産生を抑制する、第 17 回日本骨代謝学会、1999
2. 若林弘樹、飯田浩次他、異所性骨転移モデルによる血管新生阻害剤 chondromodulin-I による骨転移抑制効果、第 58 回日本癌学会総会、1999
3. T. Hayami, N. Endo, et al.: Reactive chondrogenesis induced by chondrosarcoma -difference of chondromodulin-I (ChM-I) mRNA expression between chondrosarcoma in vitro and in vivo-、第 46 回アメリカ整形外科学会、2000
4. T. Hayami, H. Yamagiwa, et al.: Decrease of Chondromodulin-I (ChM-I, cartilage specific vascular endothelial growth inhibitor) accelerates cartilage thinning with the vascular invasion in rat osteoarthritic cartilage、第 46 回アメリカ整形外科学会、2000
5. K. Iida, H. Watanabe, et al.: Prevention of bone metastasis by a new angiogenesis inhibitor、第 46 回アメリカ整形外科学会、

2000

加藤茂明

1. 論文発表

1. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 2000 (in press).
2. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
3. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
4. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).
5. 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.
6. 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.
7. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5363-5372, 1999.
8. Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
10. Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- $\beta$  signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.
11. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
12. Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T.,



- Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4111-4117, 1999.
- 1 3 . Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kadera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in intact animals. *Endocrinology*, 140, 2224-2231, 1999.
- 1 4 . Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, 140, 2125-2133, 1999.
- 1 5 . 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.
- 1 6 . Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 265, 950-956, 1999.
- 1 7 . Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.
- 1 8 . Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: *In vivo* function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69, 247-251, 1999.
- 1 9 . Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
- 2 0 . 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.*, 14, 248-255, 1999.

2 1 . Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.

2 2 . Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- $\beta$  mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, 30, 1073-1080, 1999.

川口 浩

1. 論文発表

1) Kawaguchi H., Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, and Kuro-o M: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *klotho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest* 104: 229-237, 1999.

2) 川口浩: 老化関連遺伝子と骨代謝. CLINICAL CALCIUM 9 (4) (特集: 骨カルシウム研究の最近の進歩): 507-510, 1999.

3) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *Klotho* と骨代謝. 腎と骨代謝 12 (3) (特集: 骨の分子発生学): 279-284, 1999.

4) 川口浩: *klotho* 遺伝子と骨軟骨代謝異常. The Bone 13 (3) (特集: 老化遺伝子と骨):

89-95, 1999.

5) 川口浩: 老化モデル *klotho* 変異マウスにおける骨代謝異常 - その 1 : *in vivo* での解析. 整形外科 (カラーフォーラム): 90-92, 2000.

6) 川口浩: 老化モデル *klotho* 変異マウスにおける骨代謝異常 - その 2 : *in vitro* での解析. 整形外科 (カラーフォーラム): 206-207, 2000.

7) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常 (ミニレビュー). 骨代謝学会誌 17 (3): 110-115, 2000.

8) 川口浩: *Klotho* 遺伝子変異マウスにおける骨代謝異常. 医学のあゆみ (特集: 遺伝子異常と骨) : 702-707, 2000.

9) 川口浩: *klotho* 遺伝子の骨粗鬆症への関与. ホルモンと臨床 (増刊号)「骨粗鬆症のマネジメントのすべて」: 62-68, 2000.

2. 学会発表

1) Ogata N, Shiraki M, Koshizuka Y, Hosoi T, Ouchi Y, Kuro-o M, Nakamura K, and Kawaguchi H. Association of Polymorphism of Human *Klotho* Locus with Lumbar Spondylosis. 21<sup>st</sup> annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 1999. 9.30 - 10.4 (St. Louis, USA).

2) Manabe N, Miyaura C, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, and Kawaguchi H. Decreased B Lymphocytes in Bone Marrow Contributes to Impaired Osteoclastogenesis in

the *Klotho*-Deficient Mouse with Low Bone Turnover. 21<sup>st</sup> annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 1999. 9.30 – 10.4 (St. Louis, USA).

3) Kawaguchi H: Mechanism of low turnover osteopenia in the *Klotho*-deficient mouse exhibiting multiple aging phenotypes. 8<sup>th</sup> international symposium on the molecular cell biology of macrophages (Symposium: Molecular biology of osteoclasts. 1999. 6.16-17 (National institute of infectious diseases, Tokyo, Japan).

4) 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).

5) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *Klotho* と骨軟骨代謝異常. 第72回日本整形外科学会学術集会 (イブニングセミナー). 1999. 4.8-11 (パシフィコ横浜、神奈川).

6) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* 変異マウスにおける骨代謝異常と骨軟骨変性疾患における関与. 第31回日本結合組織学会 (ワークショップ「遺伝子改変動物からみた骨軟骨形成と疾患病態」). 1999. 6.10-11 (名古屋国際会議場、愛知).

7) 緒方直史、腰塚裕、下赤隆、細井孝之、大内尉義、白木正孝、黒尾誠、中村耕三、川口浩: 変形性腰椎症におけるヒト *klotho*

遺伝子座多型の関与. 第17回日本骨代謝学会. 1999. 7.29-31 (リーガロイヤルホテル、大阪).

8) 真鍋典世、宮浦千里、鍋島陽一、黒尾誠、中村耕三、川口浩: 老化モデル *klotho* マウスにおける破骨細胞形成の抑制は骨髄Bリンパ球の減少に起因する. 第17回日本骨代謝学会. 1999. 7.29-31 (リーガロイヤルホテル、大阪).

9) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* 変異マウスにおける骨代謝異常. 第41回歯科基礎医学会学術大会・総会 (シンポジウム「骨・軟骨形成の分子メカニズム」). 1999. 9.24-25 (日本歯科大学歯学部・富士見ホール、東京).

10) 真鍋典世、宮浦千里、鍋島陽一、黒尾誠、中村耕三、川口浩: 老化モデル *klotho* マウスにおける破骨細胞形成抑制に対する骨髄Bリンパ球の関与. 第14回日本整形外科学会基礎学術集会. 1999. 10.7-8 (なら100年会館、三井ガーデンホテル奈良、奈良).

11) 緒方直史、川口浩、腰塚裕、下赤隆、細井孝之、大内尉義、白木正孝、黒尾誠、中村耕三: 変形性腰椎症におけるヒト *klotho* 遺伝子座多型の関与. 第14回日本整形外科学会基礎学術集会. 1999. 10.7-8 (なら100年会館、三井ガーデンホテル奈良、奈良).

12) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常. 秋田整形外科医学会学術講演会. 1999. 11.27 (秋田ビューホテル、秋田).

13) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常. 科学研究費企画調査班「骨格系の制御プログラムと疾患」公開シンポジウム. 2000. 1.13 (東京大学山上会議所、東京).

14) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* の骨軟骨変性疾患における関与. 第8回 代謝性

骨疾患研究会. 2000. 3.11 (笹川記念会館、東京).

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし