

2. 分 担 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）
分担研究報告書

活性型ビタミン D による骨吸収抑制のメカニズム

分担研究者 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

閉経後骨粗鬆症のモデル動物と考えられる卵巣摘除ラットおよびマウスにおいて、活性型ビタミン D が骨吸収を抑制することによって治療効果を発揮すること、骨吸収抑制のメカニズムとして、活性型ビタミン D は、*in vivo* においては破骨細胞分化因子（ODF/RANKL）の発現には大きな影響を与えず、破骨細胞へと分化する前駆細胞の骨髄におけるプールを著明に減少させることが明らかになった。

キーワード： 骨粗鬆症、活性型ビタミン D、骨吸収、破骨細胞分化因子、
前駆細胞

A. 研究目的

我が国において、活性型ビタミン D はもっとも高頻度で用いられている骨粗鬆症治療薬であるが、その作用メカニズムには不明の点が多い。加齢に伴って、骨代謝は、骨吸収が亢進し、骨形成が相対的に低下する方向へと傾き、ネットとして骨量を不可逆的に失っていく。とりわけ加齢との関連で注目されるのは、栄養面および日光照射の不足に基づく腸管からのカルシウム吸収の低下であり、ビタミン D は、一般的には、加齢によって低下する腸管からのカルシウム吸収を刺激し、生体内のカルシウムバランスを正に戻すことにとって、間接的に骨に治療効果を発揮するものと信じられ

てきた。この理屈によると、活性型ビタミン D の骨粗鬆症に対する治療効果は、腸管からのカルシウム吸収の増加、すなわち尿中カルシウム排泄の増加および血清カルシウムの上昇とは不可分であり、治療効果と高カルシウム血症などの副作用が表裏一体の関係にあることになる。

我々は、昨年までの本研究事業において、活性型ビタミン D の骨に対する治療効果が、少なくとも一部は腸管からのカルシウム吸収作用とは分離できることを、動物モデルを用いて証明した（Shira-ishi A et al. *Calcif Tissue Int* 1999）。その上で、活性型ビタミン D の骨における作用を詳細に検討し、骨吸収を強力に抑制する一方で、

エストロゲンと大きく異なる特色として、骨形成はむしろ促進するという、骨組織の自己再生・修復能力の活性化というコンセプトにきわめて合致する作用を示すことを明らかにした (Shira-ichi A et al. *J Bone Miner Res* 2000)。そこで、今年度は、活性型ビタミン D の骨吸収抑制作用のメカニズムについて、破骨細胞の分化を支持するストローマ側の要因、ODF/RANKL と、破骨細胞へと分化する骨髄中の前駆細胞の数の両者に焦点を当てて検討を進めた。

B. 研究方法

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 µg/kg) 投与、

第四群：OVX マウスに alfacalcidol
(0.2 µg/kg) 投与、

第五群：OVX マウスに 17β-estradiol
(20 µg/kg) 投与、

の 5 群の実験グループを作成し、BMD、µCT、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。

C. 研究結果および考察

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。

D. 結論

活性型ビタミン D の骨吸収抑制のメカニズムとして、破骨細胞へと分化する前駆細胞の骨髄中でのプールを減少させることを明らかにした。ODF/RANKL に代表される、破骨細胞の分化を支持するストローマ側の要因だけではなく、血液中の前駆細胞の増殖・分化過程も、骨粗鬆症の病態なら

びに活性型ビタミン D やエストロゲンなどのホルモン薬の作用機序を理解する上で重要と思われる。

E. 研究発表

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 D₃ 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-β1 gene polymorphism and bone mineral density in Japanese adolescents. *Am J Med* 106: 477-479, 1999

6. Kanematsu M et al: PGE₂ 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 β 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- β 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 NIRS 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
- 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、軟骨初期分化及び後期分化の進行が 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/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て軟骨再生を誘導しう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、BMP-4、PTH

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、軟骨幹細胞ないしは前駆軟骨細胞の増殖分化制御システムを解析することにより、骨髄に存在する間葉系幹細胞及びこれに由来する軟骨前駆細胞による関節軟骨の再生修復のための技術基盤を確立する。

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(1, 2)。まず、未分化 ATDC5 細胞を、10 µg/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 ATDC 5 細胞にドミナントネガティブ型の BMP type IA 受容体 (DN-BMPR-IA) 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 (sBMPR) 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(3)。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織交換ヒト 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。

C. 研究結果

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(4)。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(5)。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(5)。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(5)。

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(1,4)。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(6)。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。

D. 考察

ATDC5 細胞培養は、通常、コンフル

メ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 と同様にコンフルメ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-BMP-1A の遺伝子導入と sBMP-1A 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-BMP-1A の発現と sBMP-1A 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(1,4)。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(6)。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。

E. 結論

In vitro 細胞分化系を駆使して分化制御のシグナルシステムが明らかとなり、これを利用した軟骨幹細胞あるいは軟骨前駆細胞からの *in vivo* 軟骨形成の制御が可能となってきた。従って、軟骨・骨の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。

F. 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 Miner. 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) 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

- 5) C. Shukunami, H. Akiyama, et al.: Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, *FEBS Lett.*, 468: in press, 2000
- 6) 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.

G. 研究発表

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

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

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

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を細胞核抽出液より精製・クローニングした。p68はcDNAクローニングの結果、RNAヘリケースの1種であることが判明し、アンドロゲン受容体、ミネラルコルチコイド受容体、ビタミンD受容体への効果についても調べたところ全く効果がなく、核内ホルモン受容体のなかでもER α 特異的であることが判明した。

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

社会の高齢化に伴う骨粗鬆症の増加に対し、様々な予防法や治療法が開発されつつある。主要な女性ホルモンであるエストロゲンは、閉経後の女性に骨粗鬆症が多くみられることから、骨量維持に極めて重要な因子であることが知られている。このことから様々なエストロゲン剤が開発されてきたが、これらは偶発的に見いだされたもので、エストロゲン作用の分子メカニズムに基き開発されたものではない。これは未だエストロゲン作用の分子メカニズムが解明されていないことに起因する。よってエストロゲン作用の分子メカニズムに基き創薬

の開発には、エストロゲン作用の分子メカニズムを解明する必要がある。様々なエストロゲン作用は、主に核内に存在する特異的なレセプター群（エストロゲンレセプター；ER α 、ER β ）を介した標的遺伝子の転写調節により発揮される。ERの転写活性化可能はN末端側（Activation function-1; AF-1）とC末端側（AF-2）の2箇所が存在する。AF-1の転写活性化能は構成的かつ組織特異的であるが、AF-2の転写活性化能はリガンド結合依存的である。これらの領域が如何にして転写活性を有するのかについては、これまで未知な部分が多かったが、近年この転写調節にはレセプターに相

相互作用し RNA ポリメラーゼ II をリクルートするような転写共役因子が必須であることが示されてきた。実際近年、リガンド結合に伴い AF-2 領域に相互作用する転写共役因子が次々とクローニング、解析され、その転写活性化機構における役割が次第に解明されてきた。しかしながら、AF-1 の転写活性化機構についてはその組織特異的な転写活性化能を説明しうるような転写共役因子が発見されておらず、未だ不明な点が多い。また、hER α AF-1 の転写活性化能は hER α Ser¹¹⁸ が MAP キナーゼによりリン酸化されることで上昇することから、このリン酸化依存的に相互作用する転写共役因子の存在が示唆されている。我々はこれまでに、Ser¹¹⁸ のリン酸化依存的に相互作用する転写共役因子として RNA helicase p68 を報告した。しかしながら、p68 が普遍的に発現する因子であることから、他の組織特異的 AF-1 転写共役因子の存在が示唆された。そこで我々は、hER α AF-1 の転写活性化能を担う組織特異的な転写共役因子の検索および機能解析を行なった。

B. 研究方法

はじめに、Ser¹¹⁸ が MAP キナーゼによりリン酸化された A/B 領域蛋白を作成し、この蛋白をプローブに用いた 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 α 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 α 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。

C. 研究結果

Ser¹¹⁸ がリン酸化された hER α A/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 と相同性が高く同じ 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 α の転写活性化能に対する効果を検討したところ、p72 は hER α の転写活性化能を亢進した。また、この効果は hER α 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 α 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 α の細胞内局在を検討したところ、p72 と hER α はリガンド添加時に極在が一致した。また免疫沈降法により p72 と hER α の細胞内での相互作用も確認した。

D. 考察および結論

以上の結果より、p72 が hER α 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 α 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をもたれる。現在 hER α AF-1 領域に Ser¹¹⁸ 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 α 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。

E. 研究発表

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 _ and _ 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 α . *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 β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- 1 0 . 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- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.
- 1 1 . Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
- 1 2 . 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 D₃ 1 α -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 D₃ 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α , 25(OH)₂D₃ 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 D₃ 1 α -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 D₃ 1 α -

- hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.
18. 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.
19. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
20. 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.
21. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
22. 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- β mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, 30, 1073-1080, 1999.
- G. 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

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

ヒト *klotho* 遺伝子座においてその遺伝子の機能に直接関連のある領域における coding-region single nucleotide polymorphisms (cSNPs) の検索を行い、これによって得られた遺伝子多型が、骨粗鬆症に関与しているか否かを検討した。計 4 カ所の cSNPs を特定し、cSNPs においても、CA 反復配列によるマイクロサテライト多型の解析と同様、高齢女性において骨密度との相関が見られた。この事実は、閉経による影響が小さくなった老齢期において、老化抑制遺伝子 *klotho* 遺伝子産物が骨代謝調節因子として働いている可能性を強く示唆するものと言える。

キーワード： *klotho*、遺伝子多型、骨密度、B リンパ球

A. 研究目的

我々は、昨年までの検討で、様々なヒトの老化に類似した表現型を呈する *klotho* マウスの骨組織の *in vivo* および *in vitro* の解析を行い、本マウスでは骨芽細胞および破骨細胞の両者の独立した分化障害があることを報告した。また、ヒト *klotho* 遺伝子の最終 exon の下流に CA 反復配列によるマイクロサテライト多型を見出し、この多型が、高齢女性において骨密度と有意な相関を示すこと、脊椎後縦靭帯骨化症（以下 OPLL）においてはその発現・進展のどちらとも関与していないことを報告してきた。しかしながら、これらのマイクロサテライ

ト多型の *klotho* 遺伝子の機能に対する関与については不明のままであった。本年度の研究で我々は、このヒト *klotho* 遺伝子座においてその遺伝子の機能に直接関連のある領域（全 5 つの exon とその近傍の intron、および promoter 領域）における coding-region single nucleotide polymorphisms (cSNPs) の検索を行い、これによって得られた遺伝子多型が、骨粗鬆症および OPLL に関与しているか否かを検討した。

B. 研究方法

1) cSNPs の検索

健常人および上記 2 疾患患者を含む 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

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。

D. 考察

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* の関与が強くなっ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。