

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症疾患遺伝子の同定・機能の解明と

その診断・治療への応用

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡

平成15（2003）年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	ゲノム医学を用いた骨粗鬆症疾患遺伝子の同定・機能の解明と その診断・治療への応用	
	井上 聡 -----	1
II.	分担研究報告	
	1. 核内受容体とその共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割	
	加藤 茂明 -----	19
	2. 動物モデルを活用した骨粗鬆症疾患遺伝子としての新しい遺伝子 情報制御因子、標的因子の同定、機能解析	
	津久井 通 -----	24
	3. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝 子としての役割	
	堺 隆一 -----	29
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	35
IV.	刊行物の別刷 -----	37

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症疾患遺伝子の同定・機能の解明と
その診断・治療への応用

主任研究者 井上 聡
東京大学医学部附属病院老年病科講師

【研究要旨】

高齢者社会の進展とともに、1,000万人にも及ぶ罹患者をもつ骨粗鬆症に対する対策が急務となっている。退行期骨粗鬆症は加齢にともなう骨量の減少が病的に亢進し腰痛や骨折などがひきおこされる症候群で、とくに高齢者の生活の質を低下させる。21世紀におけるゲノム医学の発展により、新しい手法で疾患遺伝子の検索、機能解明と、その診断・治療への応用が可能となった。しかしながら、骨粗鬆症の診断・治療は未だ確立されているとはいえず、疾患遺伝子とその分子機能の解明が待ち望まれている。本研究により、主任研究者の井上は、遺伝子改変動物、DNAチップ、マイクロアレイ、プロテオーム解析を活用し、閉経後骨粗鬆症の病因の主役であるエストロゲンの標的因子と、老人性骨粗鬆症の鍵を握る細胞老化によって変化する因子を多数同定し、そのうちサイクリンD2, サイクリンD3, Efp, メタロチオネイン, p57 をはじめとする複数の骨粗鬆症疾患候補遺伝子の機能や骨代謝における役割を明らかにした。さらに、LRP5, TNFR1, β 3ARをはじめとして約10におよぶ新しい骨粗鬆症関連遺伝子のSNPと骨量との有意な相関を明らかにし、遺伝子診断、オーダーメイド医療への応用が期待された。分担研究者の加藤は、本年度は核内受容体とその共役因子の新規複合体を解明し、今後遺伝子改変動物を活用しそれらの骨代謝における役割を明らかにしていく。津久井は、発生工学、疾患モデル動物から、骨粗鬆症治療薬であるビタミンK、エストロゲン関連の遺伝子改変動物を作製解析した。堺は、細胞内シグナル伝達における複合体、標的因子を探索し、リン酸化を中心とする蛋白修飾の解析法を新たに確立した。本研究事業はこのようにDNA、RNA、蛋白レベルでの多面的かつゲノム医学を取り入れた新しい方法で骨粗鬆症における疾患遺伝子を探索し、その機能を動物モデルとヒトにおいて生物個体レベルで、基礎ならびに臨床医学的なアプローチにより明らかにし、さらに研究を発展させていく。

分担研究者氏名：所属機関名及び所属機関における職名

加藤 茂明
東京大学分子細胞生物学研究所核内情報
教授

津久井 通
埼玉医科大学医学部分子生物・実験動物
講師
堺 隆一
国立がんセンター細胞増殖因子研究部
部長

A. 研究目的

退行期骨粗鬆症は、加齢にともなう骨量の減少が病的に亢進した状態と、それに基づく腰痛や骨折などの臨床症状からなる症候群である。本症は罹患者、特に高齢者の生活の質を著しく低下させる大腿骨頸部骨折や脊椎圧迫骨折などの原因として重要な位置を占めている。しかも本症の患者数は年々増加傾向にあり、病態の解明とともに予防法、治療法の確立が強く望まれている。本症の治療薬として有効とされているものうち、エストロゲンとビタミン D はいわゆる核内受容体を介して作用するとされている。その他、同様な核内受容体は、グルココルチコイド、アンドロゲン、プロゲステロン、甲状腺ホルモン、レチノイン酸の作用を媒介しており、これらのリガンドも骨代謝との関連が示唆されている。さらには、治療薬が主に細胞内の情報制御伝達系を介して働くことから、核内受容体、転写因子、細胞内シグナル伝達因子、膜受容体、酵素を含む遺伝子情報制御分子が骨粗鬆症疾患遺伝子として関与していることが想定される。21 世紀をむかえ、ヒト全ゲノムの配列、遺伝子情報が決定される現在の状況において、骨粗鬆症および骨代謝における遺伝子情報制御分子の作用機序を解明することにより、骨粗鬆症の病態解明、診断、治療に役立てることが出来ると考えられる。そのためにはそれら分子の基本的な作用機構に加え、その新しい標的因子や骨代謝における生物学・医学的役割を知ることが重要である。

本研究の目的は、1) ゲノム医学の手法を活用し、骨における遺伝子情報制御分子ならびにその共役因子、標的因子群を網羅的に同定するとともにその機能を分子レベルで解明し、2) 遺伝子改変動物とヒト遺伝学的解析を用いて、生物個

体レベルでそれらの分子の骨代謝における役割を解明することにより、骨粗鬆症の疾患遺伝子としての意義を明らかにし、遺伝子診断、ゲノム創薬により新しい診断、治療法への応用を計ることにある。

B. 方法

1. 骨芽細胞における老化応答遺伝子の探索と老化応答遺伝子 Metallothionein が骨量に及ぼす影響 (分担：井上)

老人性骨粗鬆症の主要な要因として、骨芽細胞の老化があげられる。継代を重ねることにより細胞老化が誘導された 8 passage でのヒト由来骨芽細胞から mRNA を抽出し、老化に至っていない 2 passage の mRNA をコントロールとしてマイクロアレイ法を用いて、骨芽細胞の細胞老化により発現上昇する遺伝子ならびに発現低下する遺伝子をリストアップした。そのリスト中の Metallothionein (MT) に注目し、BALB/C マウスにリコンビナント MT を 5 回注射し、体内に抗 MT 抗体を産生させた。抗 MT 抗体産生マウスに塩化水銀を(1 mg/kg)週に一回 3 週間皮下に注射した後に骨量を測定した。

2. 骨芽細胞老化に伴う TGFβ 反応性低下における分子機構 (分担：井上)

ラット初代培養骨芽細胞を 1:2ratio で継代することにより細胞の passage を増加させ細胞老化を誘導した。各 passage における 10%FCS での増殖能ならびに TGFβ を添加後 48 時間後の細胞数の変化率を測定した。各条件下での細胞抽出液を用いて細胞周期制御因子の発現を Western blot 法を用いて検討した。

3. エストロゲン応答遺伝子の探索と骨粗鬆症における役割 (分担：井上)

閉経後骨粗鬆症の主要な原因は、卵巣機能廃絶に伴うエストロゲン分泌低下に

よって、エストロゲンへの応答が不足することによる。エストロゲンへの応答には、二つのエストロゲン受容体 ER α 、ER β が鍵を握っている。これら受容体にアミノ酸変異を導入することにより、リガンドに依存することなく常に活性型となるエストロゲン受容体を作成し、これをアデノウイルスに組み込み骨芽細胞に導入した。遺伝子導入 48 時間後の RNA を採取し、マイクロアレイ法により ER α 、ER β により発現上昇ならびに低下する遺伝子をリストアップした。一方、ER α と ER β 両方のシグナルを阻害する ER 変異体を発現させたトランスジェニックラットを作製し、雄における骨代謝に対する ER の役割を検討した。これらエストロゲン低応答性トランスジェニックラット胎児頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞ならびに野生株由来の初代培養骨芽細胞から mRNA を採取し、その mRNA から DNA チップ法を用いて発現に差違のある遺伝子をリストアップすることにより骨芽細胞によるエストロゲン応答遺伝子を探索した。さらに、Genomic binding site cloning 法、マイクロアレイ法、DNA チップ法によりエストロゲン応答遺伝子を網羅的に同定し、それらの機能と骨粗鬆症との関連を検討した。

4. プロテオーム解析による骨芽細胞における骨粗鬆症治療薬反応因子の解析 (分担：井上)

骨粗鬆症治療薬の一つであるビタミン K は、 γ カルボキシラーゼの補酵素として蛋白修飾を行うことが主な作用点であるため、蛋白レベルでの解析が必須である。ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG63 および SaOS2 を用いて、ビタミン K₂ (MK 4) の作用を検討した。これらの細胞に、メナテトレノン (ビタミン K₂, 10 μ M) を添加した培地で 24 時間および 48 時間培養し、細胞を回収した後、

蛋白を二次元電気泳動法で分離して銀染色を行った。コントロールには溶媒であるエタノール (0.1%) を用いた。二次元電気泳動は、一次元目を pH5-8 の範囲で等電点電気泳動し、二次元目を 12.5% のアクリルアミドゲルで泳動した。

5. 骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響 (分担：井上)

骨粗鬆症発症に関わる遺伝的因子の解明を目指し、性ホルモン、老化、骨代謝、骨粗鬆症治療薬シグナル経路に関連する遺伝子を対象に、遺伝子多型と骨量、骨代謝マーカーの関連を解析した。本年度は、VDP, osteocalcin, IL6, TNF α , IL1RA, β 3AR, Klotho, BNP, GnRH, TNFR1, TNFR2, DKK1, LRP5/6 の遺伝子多型と、骨量もしくは骨代謝マーカーとの相関を解析した。特に、最近骨形成との関連が注目される LRP5 の遺伝子多型 5 部位(イントロン-1、5、7、17、エクソン 10)に関し、SNP-dependent PCR 法を用いて genotype の分類を行った。またアミノ酸変異を伴う LRP5 のエクソン 18 の SNP に関しては、Invador 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 343 人を対象として骨密度(BMD)との関連を検討した。また、LRP5 シグナルに関連する因子として LRP6(イントロン 21)、DKK1(イントロン 3)の遺伝子多型についても RFLP 法を用いて検討を加えた。

6. エストロゲン受容体転写共役因子複合体の精製と機能解析 (分担：加藤)

エストロゲン受容体のリガンド結合領域 (AF-2) をプローブ蛋白とし、エストロゲン存在下でいくつかの吸着カラムとグリセロールグラジエント密度勾配遠心法を用いて AF-2 転写共役因子複合体の単離を行なった。また、同様に、エストロゲン受容体の AF-1 領域をプローブ蛋白としたアフィニティークロマトグラフィーとグリセロールグラジエント密度勾

配遠心法により、AF-1 転写共役因子複合体の単離を行った。単離した複合体の構成因子の同定はペプチドマスフィンガープリンティング法により行った。単離された複合体とエストロゲン受容体との相互作用の解析は、免疫沈降法と GST プルダウン法により行った。また、複合体の構成因子の細胞内での機能解析は、RNAi 法、アンチセンス法、レポーターアッセイ法、クロマチン免疫沈降法、細胞増殖測定法等により行った。

7. 動物モデルを活用した骨粗鬆症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子、標的因子の同定、機能解析 (分担：津久井)

ビタミン K、エストロゲンの経路を集中的に解析するために、以下の研究材料が必要となり、これらの材料および疾患モデル動物の作製を行なった。1) エストロゲンについては、ER α 、ER β から転写される下流応答遺伝子群について検討するために、活性型 (constitutive active form) caER α 、caER β の組換えアデノウイルスの作製。2) 活性型 caER α 、および caER β トランスジェニックマウスの作製。3) ビタミン K 依存性 γ カルボキシラーゼの組換えアデノウイルスの作製。4) ビタミン K 依存性 γ カルボキシラーゼおよびそのグラ化標的蛋白としての Bone Gra Protein (BGP)、等のビタミン K 関連遺伝子のトランスジェニックマウスの作製。

8. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割 (分担：堺)

1) 骨芽細胞・破骨細胞の分子発現制御機構、チロシンリン酸化の解析

骨芽細胞や破骨細胞に分化や活性化の刺激を与えることが知られる外的刺激によって、細胞内に起こる遺伝子・蛋白質発現、チロシンリン酸化をマイクロアレ

イ法、二次元電気泳動・免疫沈降により網羅的に解析するための方法と条件を検討した。

2) 刺激で誘導される SH2、PTB 結合リン酸化蛋白質ならびに核外エストロゲン受容体の複合体分析

Src、Fyn、Grb2、Shc、Crk 等、主要なシグナル伝達分子の SH2 領域と PTB 領域ならびに、エストロゲン受容体の各ドメインと局在シグナルを増幅、改変してクローニングし、哺乳類細胞で Flag タグとの融合蛋白質の形で発現させるベクターを構築した。これらのリン酸化チロシン結合ドメインや ER 各ドメインを、それぞれ分化誘導・各種ホルモン刺激・細胞接着などで刺激した骨芽細胞や破骨細胞に一過性に発現させ、抗 Flag 抗体と抗リン酸化チロシン抗体による二段階の特異的精製法、もしくは抗 Flag 抗体とゲル濾過により結合するチロシンリン酸化蛋白質群、もしくは複合体構成蛋白群を通常の SDS-PAGE あるいは二次元の SDS-PAGE で解析した。

C. 研究結果

1. 骨芽細胞における老化応答遺伝子の探索と老化応答遺伝子 Metallothionein が骨量に及ぼす影響

ヒト由来骨芽細胞における老化応答遺伝子を表 1 に記した。興味深いことに Metallothionein (MT)が老化骨芽細胞で激減していることが示された。

MT は、水銀をはじめとする金属の解毒作用に関連する因子として知られている。その一方で、骨にもその発現が確認されている。今回、この MT が骨代謝に及ぼす影響に関して検討を加えた。MT を注射することにより抗 MT 抗体を産生し、血清中の抗 MT 抗体が高値であるマ

表1a 骨芽細胞老化にて発現上昇する遺伝子

Transcription Factor

human forkhead gene, freac-6 (FKHL10)= mouse Fkh10
NFRKB (Nuclear factor related to kappa B binding protein)
Smad1

Cancer related gene

TAN-1 (the human homolog of the Drosophila notch gene,
Notch (Drosophila) homolog 4)

Bcl-2

Bcl-3 (B-cell CLL/lymphoma 3)

IPL / Tssc3 (Tumor suppressing subtransferable candidate 3)

c-abl

Cell cycle

Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kD, elongin C)
p21^{Cip1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) *

Cell adhesion molecule

DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule)

ALCAM / CD166 (Activated leucocyte cell adhesion molecule)

Integrin alpha 7 chain

Desmoplakin (DPI, DPII)

WD-repeat protein 1 (actin interacting protein 1)

NAD related gene

NADH:ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit homolog

Lactate dehydrogenase A

SCO (cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog 2 (SCO2)

Collagen

Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)*

Collagen, type IV, alpha 2

Collagen, type VI, alpha 1*

Collagen, type VI, alpha 2

Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)

Fibronectin 1*

Osteonectin / SPARC (Secreted protein, acidic, cysteine-rich)*

Chaperone

BiP (glucose-regulated 78K protein)*

Crystallin alpha B chain

Others

NIK (Nck interacting kinase)

FKBP12 (FK506-binding protein 1A (12kD))

PAF-AH2 (Platelet-activating factor acetylhydrolase 2)*

Parathyroid hormone receptor 1

human serum amyloid A (SAA2)

Oxysterol binding protein (OSBP)

Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B

Dihydrolipoamide branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)

Coagulation factor XIII, A1 polypeptide

Poliiovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)

carbonic anhydrase VI (CA6)

*は過去に老化応答遺伝子として報告のあった遺伝子

ウスを作成した。この抗 MT 抗体高値のマウスに水銀(HgCl)を添加すると骨量が劇的に減少することを発見した。

2. 骨芽細胞老化に伴う TGFβ反応性低下

における分子機構

骨芽細胞においては血清下での増殖能の低下に先立って、TGFβによる細胞増殖応答性ならびに ALP 活性の低下が出現した。細胞周期制御因子に関しては細胞周期の負の制御因子であるはずの p57 の発現が継代とともに劇的に減少し、8 passage 以後では検出が出来なくなった。これら細胞に TGFβを添加すると、添加 24 時間後には p57^{Kip2} 蛋白が 90%以上減少した。継代とともに TGFβ添加前の p57 の発現量は減少していったが TGFβによるその発現の減少率に変化はなかった。一方、他の CDK 阻害因子である p27 の発現が継代とともに増加し、TGFβ添加後も発現減少を認めなかった。さらに免疫沈降を用いてこれら蛋白とその阻害標的である CDK2 や CDK4 ならびにサイクリン D2 との結合を確認したところ継代とともにこれら蛋白は p57 との結合から p27 との結合にシフトした。

3. エストロゲン応答遺伝子の検索と骨粗鬆症における役割

エストロゲンは、性ホルモンとして女性の生殖機能に必須であるのみならず、脳や心血管系、骨代謝においても様々な作用を及ぼしている。骨代謝に関しては、エストロゲンは特に重要な役割を担っており、閉経後や卵巣摘出による低エストロゲン状態において骨密度が減少し、エストロゲン補充によってその減少が阻止される。骨芽細胞と破骨細胞にはエストロゲン受容体 ERα、ERβが発現している。本年度は、表 2 のようにアデノウイルスを用いて骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子を ERα、ERβそれぞれに対してリストアップした。ERαならびに ERβを遺伝子導入した時に共通に上昇する遺伝子として Osteopontin がリストアップされていた (表 2 下線)。Osteopontin は骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝

表1b 骨芽細胞老化にて発現低下する遺伝子

Metallothionein 1H
Metallothionein 2A
Mitochondrial ribosomal protein S15
Mad4 homolog
Cytochrome c-1
Olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene
Glioma-associated oncogene homolog (zinc finger protein)
Latent transforming growth factor beta binding protein 2
Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease
Glutaminyl-tRNA synthetase
Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 (epsilon, 82kD)
ADP-ribosylation factor-like 1
Serologically defined colon cancer antigen 28
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2
Aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
POU domain, class 3, transcription factor 4
X-linked retinopathy protein
RAB2, member RAS oncogene family
Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
Laminin, alpha 4
Neuropeptide Y receptor Y5

子として複数の報告があり、今回の系での positive control として重要である。

一方、以前我々は、ER α と ER β 両方のシグナルを阻害する ER 変異体を発現させたトランスジェニックラットを作製し、骨代謝に対する ER の役割を検討した。そこで、雌ラットにおいて骨におけるエストロゲン補充による骨量減少予防効果に関して抵抗性を示すことが明らかにし、エストロゲンの骨量減少予防作用に ER α 、ER β が重要な役割を果たすことを直接示している。本年度は、まず雄トランスジェニックラットを用い、雄の骨代謝における ER の関与を検討した。トランスジェニックラットおよび野生ラットをエストロゲン投与群、プラセボ投与群に分け、大腿骨遠位部骨密度を測定したところ、野生ラットでは有意な骨密度の増加が認められたのに対し、トランスジェニックラットでは、エストロゲン投与による有意な骨密度の増加は認められなかった。このことから、卵巣摘出後の雌で ER を介した骨量維持作用が認められたのと同様に、雄の場合でもエストロゲン補充に

よる骨代謝への作用は ER を介していることが示唆される。さらに、このラットの骨芽細胞初代培養系を用いて DNA チップ解析を行い、骨芽細胞における ER の下流応答遺伝子群を探索したところ、サイクリン D2 を含むいくつかの候補遺伝子を同定した。サイクリン D2 は細胞周期の正の進行役として CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し、その酵素活性を上昇させることが知られている。そこで、骨芽細胞に生理的濃度のエストロゲンを添加し、その増殖が誘導されるときにサイクリン D2 の発現変化を Western blot 法を用いて検討したところサイクリン D2 の発現増加が確認された。さらにそのファミリーであるサイクリン D3 の発現も同時に増多することも確認した。同時に免疫沈降法を用いてエストロゲン添加により骨芽細胞内でサイクリン D2 と D3 が CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し CDK4 ならびに CDK6 の酵素活性を上昇させることも確認した。以上よりエストロゲンによる骨芽細胞増殖にはサイクリン D2,D3/CDK4,CDK6 を介した経路が機能していることが示された。

さらに、本研究において、新しい標的遺伝子を探索する目的で、ヒトゲノム上に存在する ER が結合する DNA 断片を単離し、その近傍に、複数の新規エストロゲン応答遺伝子を同定し (Genomic binding-site cloning)、並行して、mRNA レベルの発現の差を指標に、DNA チップ法、マイクロアレイ法を活用してエストロゲン応答遺伝子を複数単離した。なかでも、骨芽細胞のエストロゲン応答遺伝子であることを明らかにした Efp の乳癌細胞における分子作用機構を解明した。エストロゲン応答性乳癌細胞に Efp を発現させたところ増殖を促進し、エストロゲン非依存性の増殖能を獲得した。逆に Efp の発現を抑えると増殖が抑制された。

表2a ER活性変異体過剰発現骨芽細胞にて
発現上昇する遺伝子

ER α , ER β 共に上昇
 Creatine kinase-B (CKB)
 Fibronectin gene
 Latent TGF-beta binding protein-2 (LTBP-2)
 Type XI collagen alpha-1 chain (COL11A1)
 Platelet-derived growth factor receptor beta (extracellular domain)
Osteopontin*
 Tissue-type plasminogen activator (t-PA)
 Ra-reactive factor serine protease p100
 Neuropilin
 Carboxypeptidase D precursor (Cpd)
 Stearoyl-CoA desaturase 2
 ATP-citrate lyase
 Polypeptide GalNAc transferase T1
 ER α で上昇
 Collagen XII alpha 1 (Col12a1)
 Carboxypeptidase E (CPE)
 Rabaptin-5
 Ribonuclease 4
 ER β で上昇
 Keratin 19
 MHC-associated invariant chain gamma
 zinc finger protein AT-BP2
 Transferrin receptor
 Heat sle antigen CD24
 Cyclooxygenase-2
 Phosphofructokinase C (PFK-C)
 UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase
 homolog
 Immediate-early serum-responsive JE gene
 Retroviral-like ovarian specific transcript 30-1
 Dermatan sulfate proteoglycan-II (decorin)
 Cathepsin C
 Prostacyclin synthase (ratpgis)
 Fibromodulin
 Lumican
 71 kDa component of rsec6/8 secretory complex Metallothionein 2A
 Heme oxygenase gene
 GADD45
 Cathepsin L proenzyme
 Neuronal olfactomedin-related ER localized protein
 Squalene epoxidase
 RNA binding protein (transformer-2-like)
 Brain hexokinase
 Cytochrome P450 (CYP1B1)
 Nucleosome assembly protein
 Alpha-mannosidase II
 Placenta growth factor (PIGF)
 Myosin heavy chain-A
 Integrin alpha-1
 Amphoterin

表2b ER活性変異体過剰発現骨芽細胞にて
発現低下する遺伝子

ER α , ER β 共に低下
 Alpha-actinin-2 associated LIM protein
 ER α で低下
 Acyl-CoA hydrolase
 Embryonic skeletal muscle myosin heavy chain gene
 Thrombin
 Liver L-cysteine oxygen oxidoreductase
 Dethiobiotin synthetase
 UDP-glucuronosyltransferase
 RYD5
 Syntaxin 7
 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase
 NF1-X1
 Cytochrome oxidase subunit I, Scr-tRNA
 Insulin-like growth factor II
 Angiotensin II receptor
 Nerve growth factor-induced (NGFI-A)
 ER β で低下
 Non-specific lipid transfer protein (nsL-TP)
 Vesicular acetylcholine transporter
 Fumarylacetoacetate hydrolase (FAH)
 150K dynein-associated polypeptide
 Sodium-dependent multi-vitamin transporter (SMVT)
 Integrin-associated protein form 4 (IAP)
 Smooth muscle myosin RLC-B
 Gamma-enteric smooth muscle actin isoform
 Protein kinase C delta-binding protein
 2,4-dienoyl-CoA reductase
 Proteasome subunit R-ZETA
 Fit-1S (Fit-1)
 Alpha-actin gene
 Ribosomal protein L14
 Choline/ethanolamine kinase
 Dihydropteridine reductase
 Glutathione synthetase
 DAD-1 gene
 VAMP5
 Glucose-regulated protein GRP78
 Myosin heavy chain
 Alpha B-crystallin
 Small nuclear ribonucleoparticle-associated protein
 (snRNP) ad1-antigen
 Ribosomal protein L15
 WAP four-disulfide core domain protein (ps20)
 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
 Collagen alpha 1 type II
 syntaxin 4

*は過去に应答遺伝子として報告のあった遺伝子

Efp は細胞周期のブレーキ役 14-3-3 α の破壊を担うユビキチンリガーゼであることを示し、細胞周期進行の新しい分子メカニズム、癌耐性獲得の新しい病態モデルを提唱した (図 1)。このことから Efp は癌治療、創薬の新規分子標的であること

を示した。
 4. プロテオーム解析による骨芽細胞における骨粗鬆症治療薬反応因子の解析
 骨粗鬆症治療薬の一つであるビタミン K の作用の主なものは、 γ カルボキシル化という蛋白修飾にある。従って、遺伝

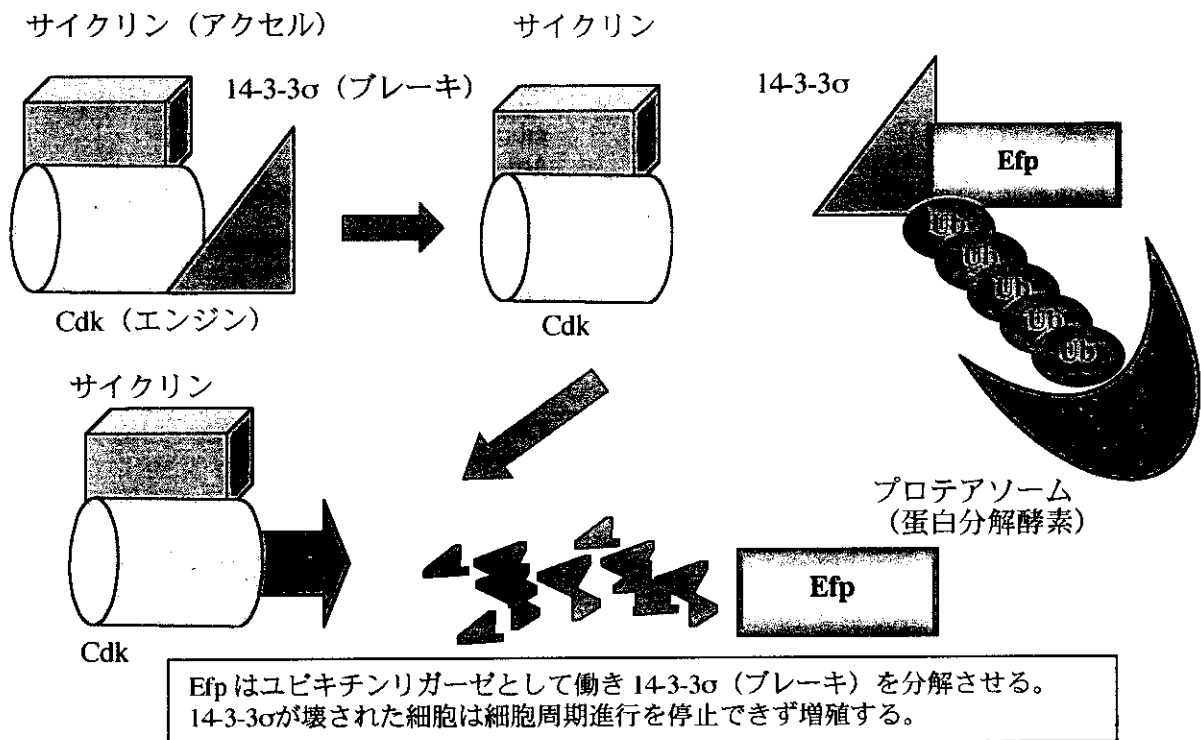


図1 Efpは14-3-3σの蛋白分解を誘導することにより細胞周期を進行させる

子発現の変化を追う、マイクロアレイ、DNAチップ法では、その標的因子を明らかにすることは困難であり、蛋白レベルでの解析、プロテオーム解析が必須となる。本年度は、骨芽細胞蛋白を二次元電気泳動で分離した。MG63にビタミンKの一つであるメナテトレノンを添加して24時間、48時間で比較したところ、メナテトレノン添加48時間後では酸性領域側の15個の蛋白発現量が増加していた。

5. 骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

骨粗鬆症発症に関わる遺伝的因子の解明を目指し、骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型と骨量、骨代謝マーカーの関連を解析した。VDP, IL6, TNFα, β3AR, Klotho, BNP, GnRH, TNFR1, LRP5/6の遺伝子多型において、骨量もしくは骨代謝マーカーとの有意な相関を認めた。特に、今回解析した遺伝子多型のうちLRP5遺伝

子のイントロン5に存在する遺伝子多型では、全身骨ならびに腰椎骨密度(Z score)において有意差を呈していた。イントロン17に存在する遺伝子多型では、腰椎骨密度(Z score)において有意差を呈していた。エクソン10、18に存在する遺伝子多型では、全身骨密度(Z score)において有意差を呈していた。イントロン5に存在する遺伝子多型では全身骨密度(Z score)において 0.46 ± 1.06 (G/G) vs. 0.10 ± 1.05 (G/T + T/T) $p=0.0051$ と強い相関係数を示した(表3)。このように、複数の遺伝子多型で、p値が0.01を下回る有意差を得ており、遺伝子診断のための新しいマーカーとしての応用、オーダーメイド医療への応用が期待された。

6. エストロゲン受容体転写共役因子複合体の精製と機能解析

HeLa細胞核抽出液からエストロゲン受容体AF-2転写共役因子複合体の精製を行ったところ、TRRAP及びGCN5を

表3 LRP5遺伝子イントロン5での多型における背景と骨量

Items	Genotype (mean ± SD))		
	G/G	G/T+T/T	P-value
No. subjects	183	160	
Age (years)	65.2±9.9	65.4±10.0	NS
Height (cm)	150.8±6.4	150.2±6.3	NS
Body weight (kg)	50.4±8.3	50.2±7.9	NS
Lumber spine BMD (Z score)	-0.02±1.44	-0.38±1.50	0.025
Total body BMD (Z score)	0.46±1.06	0.10±1.05	0.0051
ALP (IU/l)	184.4±62.1	197.1±71.5	NS
I-OC (ng/ml)	7.4±3.6	8.2±3.6	NS
PD (pmol/umol of Cr)	34.2±12.3	34.9±11.7	NS
DPD (pmol/umol of Cr)	7.2±2.9	7.4±2.4	NS
Intact PTH (pg/ml)	34.5±15.5	36.3±16.2	NS
Calcitonin (pg/ml)	22.3±10.8	22.6±11.1	NS
1,25 (OH)2D3 (pg/ml)	36.6±12.3	34.5±10.4	NS
TC (mg/ml)	199.0±36.8	196.7±40.1	NS
TG (mg/ml)	143.0±83.3	137.4±70.5	NS
% fat	31.8±8.1	31.4±7.3	NS
BMI	22.2±3.2	22.2±2.9	NS

含む複合体がエストロゲン受容体にリガンド依存的に結合し、転写活性を促進することが明らかとなった。更にこの複合体は、エストロゲン受容体のみならずアンドロゲン受容体やビタミン D 受容体などにも作用することが判明し、p300/p160 複合体、DRIP/TRAP 複合体に引き続く、第 3 のクラスの新たな転写共役因子複合体であった。更に、この複合体のエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖における役割を検討したところ、TRRAP が鍵分子であることが判明した。

加えて、HeLa 細胞核抽出液からエストロゲン受容体 AF-1 転写共役因子複合体の精製を行ったところ、p54 および PSF を含む複合体がエストロゲン受容体にリガンド依存的に結合し、転写活性を抑制することが明らかとなった。この複合体は ERβ やアンドロゲン受容体に対しては転写抑制効果を持たなかった。ER の p54 結合領域は転写コアクチベーター p300 結合領域と一致し、転写抑制因子 p54 と転写活性化因子 p300 が競合的に ER に結合することにより組織特異的なエストロゲン受容体転写活性化機能が発揮されるこ

とが示唆された。更にこの複合体はエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった。

7. 動物モデルを活用した骨粗鬆症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子、標的因子の同定、機能解析

エストロゲンに関しては、活性型エストロゲン受容体 (caERα、および caERβ) について、コンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスをそれぞれについて作製を行い、それぞれ caERα および caERβ について 10 ライン以上のトランスジェニックマウスが得られた。また、これらの cTg マウスは普段 GFP または DsRed を発現しており、予め個体において外来遺伝子の発現部位を予測できることが示された。さらに、これらのマウスを交配させることにより、caERα・ERβ のシグナルを同時に活性化させる cTg マウスの作製を行う。ビタミン K に関連する骨疾患遺伝子の候補として、γカルボキシラーゼおよびそのグラ化の標的蛋白である BGP に関して、同様に cTg マウスの作製を行った結果、両遺伝子において数ラインずつ cTg マウスが得られた。

8. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

1) Cas ノックアウト細胞のマイクロアレイによる解析

Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質であり、破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されている。Src チロシンキナーゼはそもそもノックアウトマウスが骨大理石病を示すことから、破骨細胞の活性化や生存に重要であることが早くから示されてきた。Src-Cas 経路の下流分子を明らかにする目的で、Cas を欠損する細胞と、更に Cas 蛋白質を発現させ直した細胞の間での遺

伝子発現の違いをマイクロアレイ法により解析した。Cas 欠損細胞では Caveolin-1 の発現が顕著に減少する一方、Procollagen 1 α 1, 3 α 1, 11 α 1, Elastin, Periostin の発現が著明に上昇していた。このなかで、特に Periostin は別名 OSF-2 (osteoblast-specific factor) と呼ばれ、Src の欠損によっても著明に発現量が上がるなどから、Src-Cas のシグナルから Periostin/OSF-2 の発現制御に至るシグナル伝達経路が、骨代謝に関わる可能性が示唆される。Cas 欠損マウスの発生過程の諸段階での骨組織の Periostin 抗体による免疫染色などによる解析が進行中である。

2) チロシンリン酸化蛋白質の分離法の確立

近縁の細胞株間のチロシンリン酸化の差異を検出する目的で、まずチロシンリン酸化蛋白質を精製して一次元あるいは二次元電気泳動で分離したのち質量分析により同定する実験系を確立した。本年度は骨肉腫細胞株の系 (Hu09) においてこの実験型を適用したところ、高転移性の系で Paxillin, Cortactin, Cas のリン酸化の上昇が認められた。

3) エストロゲンの核外作用の骨代謝における役割

骨の細胞において、エストロゲンの核内における作用については精力的に研究が進められてきているが、核外での作用についてはまだほとんど明らかにされていない。その一方で前立腺癌細胞 (LNCaP) や乳癌細胞 (MCF-7) では、エストロゲンが核外で Src キナーゼに働きかけ細胞増殖やアポトーシスを制御していることが判明している。このような調節機構の骨代謝における役割を明らかにするため、ER の個々の機能ドメインに Flag タグを付加し、更に膜に局在するシグナルをつけたものにつけないものと

をそれぞれ発現するベクターを構築し、これらのエストロゲンのドメインに結合する蛋白質群を見出した。

D. 考察

老人性骨粗鬆症の鍵を握る骨芽細胞老化における増殖能低下の分子機構を解明するためマイクロアレイ法を施行したところ、Metallothionein (MT) が激減していることが明らかになった。さらに ER β にて発現増加する遺伝子に MT はリストアップされていた。今回、我々は MT が骨量、骨代謝に関連することを *in vivo* の実験で初めて明らかにした。MT は骨芽細胞に多量に発現していること、ならびに老化骨芽細胞では激減していることと合わせ考えると、MT は金属に対する反応以外にも重要な機能を有している可能性が示唆された。MT のトランスジェニックマウスにおける骨芽細胞の増殖と分化ならびに骨形成に与える影響に興味を持たれる。さらに MT の SNP と骨量との関連から骨粗鬆症疾患遺伝子としての意義を探りたい。

骨芽細胞老化時における細胞周期制御因子の発現パターンは p57 蛋白が減少し、p27 蛋白が増加した。p57 蛋白は TGF β により劇的な蛋白分解が誘導されることを示したが、p27 に関してはこのような蛋白分解は誘導されない。このことは老化に伴う不可逆的な増殖停止の一因を明らかにしていると考えられる。

マイクロアレイ、DNA チップ解析を行い、骨芽細胞における ER の下流応答遺伝子群を探索したところ、サイクリン D2 を含むいくつかの候補遺伝子を同定した。特に、エストロゲンは初代骨芽細胞において、サイクリン D2、サイクリン D3 を誘導し、Cdk4/6 のキナーゼ活性を上昇させることに伴い、細胞増殖促進に寄与

することが示唆され、骨代謝における ER とその応答遺伝子の重要性が示された。エストロゲン応答遺伝子の機能解析としては、そのノックアウトマウスの子宮におけるエストロゲン依存性増殖が損なわれていることを既に示している、Efp の分子作用メカニズムを明らかにした。Efp は子宮や乳腺などに発現し、エストロゲンによりその発現は制御され、エストロゲン依存性の子宮の発育、増殖や乳癌増殖との関連が示唆される。そればかりでなく、骨芽細胞にもその発現が認められ、エストロゲン応答性が示された。乳癌に Efp を過剰に発現させると、本来エストロゲンが存在しない状態では増殖できない乳癌細胞が、エストロゲン非依存下においても増殖し、腫瘍を形成することが観察された。逆に乳癌細胞の Efp の発現を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて抑制することにより腫瘍形成も抑えられ、乳癌治療の新しい分子標的としての役割が示された。そして、Efp は細胞周期進行のブレーキ役である 14-3-3 σ に対してユビキチンを結合させる酵素 (E3) として働き、同蛋白の分解を介して、細胞増殖を引き起こすことを見出した。この新規分子メカニズムの解明は、新しい細胞周期調節機構の発見として注目を浴びている。さらに、Efp は乳癌、特にホルモン療法耐性癌の治療の新しい分子標的として臨床応用が期待される。今後、骨代謝、骨粗鬆症におけるこれら応答遺伝子の役割について解析を進めていく。

プロテオーム解析については、特に蛋白修飾をターゲットとする骨粗鬆症治療薬に対する応答蛋白の探索として、pI 5-8 かつ 15 kDa から 70 kDa に相当する蛋白を対象として骨芽細胞株 MG63 においてスクリーニングを行った結果、ビタミン K2 として実際の骨粗鬆症治療に使用

されているメナテトレノンの添加により酸性領域の蛋白発現に変化が認められた。ビタミン K は γ カルボキシラーゼの補酵素となることが知られており、グルタミン酸のカルボキシル化前後で蛋白の等電点に変化する可能性も考慮すると、pH およびターゲットとする蛋白分子サイズを変えてスクリーニングする必要性が考えられ、今後詳細な解析と標的蛋白の同定を進めていく。

骨粗鬆症の新しいマーカーの開発と疾患遺伝子の解明を目指し、ゲノムワイドの多数の遺伝子の遺伝子多型を検索するとともに、主に発現調節部位やアミノ酸に変異をもたらす SNP を用いて、骨代謝への関与と骨量予測に用いる遺伝子マーカーとしての有用性を検討した。VDP, IL6, TNF α , β 3AR, Klotho, BNP, GnRH, TNFR1, LRP5/6 の遺伝子多型において、骨量もしくは骨代謝マーカーとの有意な相関を認め、遺伝子診断のための新しいマーカーとしての応用、オーダーメイド医療への応用が期待された。特に、LRP5 と骨形成に関連した研究はこの 2 年間で、飛躍的に進歩した。2001 年には LRP5 が、遺伝性の骨量減少を認める、骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群の原因遺伝子であることが報告された。さらに 2002 年には高骨量の家系調査の結果、LRP5 において活性型変異体が発見されたことから、LRP5 は骨芽細胞の分化を介した骨形成における Key regulator であることが他のグループから示されてきた。さらに興味深いことに、LRP5 のノックアウトマウスでも骨量減少が認められ、骨芽細胞の機能異常も認められたが、この経路においては今まで骨芽細胞の分化において中心的な役割をはたしていると考えられてきた Cbfa1 を介していないことが示されている。今回我々は、LRP5 の遺伝子多型が骨量に劇的な変化を及ぼすことを世界に

先駆けて示した。本研究にて、日本人女性における LRP5 遺伝子のヘテロ、ホモを合わせた出現頻度は約 45%と非常に高頻度であることから、骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性が高い。今後、この多型での薬剤による反応性の相違を検討することで、この Wnt-LRP5 に関与する薬剤と関与しない薬剤との判別が明らかとなる可能性がある。反応性があった薬剤に関しては、骨芽細胞による添加実験を行い Wnt-LRP5 経路のシグナル伝達にどのような影響を与えるかを *in vitro*、*in vivo* の系を用いて明らかにする予定である。

加藤は、骨粗鬆症治療薬としての SERM の組織特異的な転写活性化メカニズムの解明を目的とし、エストロゲン受容体転写共役因子複合体の精製と機能解析を行った。今回新たに HeLa 細胞核抽出液から AF-2 転写活性化因子複合体および、AF-1 転写抑制因子複合体の精製を行った。特に今回同定した AF-1 転写抑制因子複合体はリガンド依存的にエストロゲン受容体に結合することから、AF-1 と AF-2 の機能的相互作用を解明するための有力な鍵因子である可能性が示唆された。これらの新規転写共役因子複合体と既知転写共役因子複合体が生体内で複雑に相互作用することにより、組織特異的なエストロゲン受容体の転写活性化が起こると考えられる。またその結果、エストロゲン受容体の転写活性を正および負に制御する転写共役因子複合体の同定に成功した。これらの転写共役因子複合体の機能解析により、組織特異的なエストロゲン受容体転写活性化メカニズムの一端を明らかにすることができた。今後はこれら転写共役因子複合体の生体内高次機能を明らかにするため、ノックアウトマウスを作製して機能解析を行う。

津久井はエストロゲン受容体およびビ

タミン K に関連した遺伝子に関して、それぞれの遺伝子をマウス個体で過剰発現させる病態モデル遺伝子改変動物を作製した。これらの動物は、胎生期において骨代謝に影響が与えることが想定され、骨代謝研究に制限があり、マウスをライン化することすら困難と考えられたが、コンディショナルトランスジェニックマウスにすることにより、胎生期以降の骨代謝研究にも応用できることが示唆された。したがって、このモデル作製は、閉経後ならびに老人性骨粗鬆症の疾患モデルマウスの開発を目指す本研究課題の目的に合致しており、如何に生体内の骨組織において時期・分化特異的な関連遺伝子群の *gain of function* を行うかが、今後の研究課題の鍵となると考えられる。すなわち、それぞれのシグナルが本来持つ生理機能を解明するために、骨組織特異的にエストロゲン・ビタミン K シグナルを過剰発現、または異所性発現させることが必要である。さらに研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組換え酵素 Cre を発現させる研究資材が必要であり、骨芽細胞系または破骨細胞系のみで発現できる遺伝子改変マウスの作製に取り組んでいく。エストロゲンに関しては、下流応答遺伝子群の同定・生体機能解析を中心に行い、ビタミン K に関しては、疾患モデルマウスの作製、その受容体の同定やグラ化標的蛋白の同定・解析を中心に行うことが重要と考えられた。

蛋白質を標的とした解析は、疾患遺伝子を見だし、生体機能と病態における役割を知るためにも必須である。さらにシグナル伝達という複雑な蛋白質の動きについても、蛋白質の局在と複合体形成の両面から情報を得ようとするのが、単なる発現解析から一歩進み重要である。堺が現在までに確立した 2 種類の細胞間

のチロシンリン酸化を比較する方法は、他の細胞刺激やノックアウトマウスにおけるチロシンリン酸化の変化を分析する手法としても広く利用可能なものであるものと考えられる。細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の網羅的解析は、通常のマイクロアレイ法や二次元スポット解析だけでは手の届かない分野であり、この手法を用いて生物学的に重要なドッキング分子を選択し機能解析に持ち込むことを狙う。この情報をもとに細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることや、骨芽細胞の増殖を刺激するようなことが可能になり、疾患遺伝子、疾患蛋白の機能解明と、ゲノム創薬にむすびつくものと考えられる。

E. 結論

本研究により、老人骨粗鬆症の鍵を握る骨芽細胞の老化標的因子、閉経後骨粗鬆症病因の主役であるエストロゲンの骨における新しい分子標的を明らかにし、さらに骨粗鬆症治療薬と密接に関連した骨粗鬆症疾患モデル動物を作製解析した。新しい分子標的に関して、サイクリンD2, サイクリンD3, Efp, メタロチオネイン, p57 をはじめとする複数の骨粗鬆症疾患候補遺伝子の機能や骨代謝における役割を明らかにした。骨量に相関する遺伝子のSNPを多数同定し、ゲノムワイドな研究を進めている。このように、骨粗鬆症に対する多角的アプローチによる研究をDNA、RNA、蛋白レベルで、ゲノム医学ならびに世界に先駆け独自に開発した手法を用いて取り組み、新しい骨粗鬆症における疾患遺伝子を探索し、骨粗鬆症モデル動物の開発解析と新規標的因子の同定機能解析を推進した。今後、骨粗鬆症

疾患遺伝子の役割の解明を目指し、基礎ならびに臨床医学的なアプローチにより、さらに研究を発展させていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 222-228, 2002
2. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Efp targets 14-3-3sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417, 871-875, 2002
3. Jin B, Inoue S, Urano T, Cho S, Ouchi Y, Cyong JC: Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 185, 98-110, 2002
4. Fujita M, Ogawa S, Fukuoka H, Tsukui T, Nemoto N, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Differential expression of secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) in decidual cells during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 28, 213-223, 2002
5. Vasudevan N, Kia HK, Inoue S, Muramatsu M, Phaff D: Isoform specificity for oestrogen receptor and thyroid hormone receptor genes and their interactions on the NR2D gene promoter. *J*

- Neuroendocrinol* 14, 836-842, 2002
6. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of amino acid variation (Trp64Arg) in the beta3-adrenergic receptor gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 2, 138-142, 2002
 7. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector T, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H: Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 17, 1744-1751, 2002
 8. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Iwasaki H, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H: Association of a haplotype (196Phe/532Ser) in the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK1) gene with low radial bone mineral density in two independent populations. *J Bone Miner Res* 18, 419-423, 2003
 9. Kajita M, Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Yoshida H, Kodaira M, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M: Association of -381T/C promoter variation of brain natriuretic peptide gene with low bone mineral density and rapid postmenopausal bone loss. *J Hum Genet* 48, 77-81, 2003
 10. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H: Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing. *Bone* 32, 185-190, 2003
 11. Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* (in press)
 12. Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A, Takeyama K: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research* 57, 73-78, 2002
 13. Kato S: Androgen receptor structure and function from knock-out mouse. *Clin Pediatr Endocrinol* 11, 1-7, 2002
 14. Yanagisawa J, Kitagawa H, Yanagida M, Wada O, Ogawa S, Nakagomi M, Oishi H, Yamamoto Y, Nagasawa H, MacMahon SB, Cole MD, Tora L, Takahashi N, Kato S: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* 9, 553-562, 2002
 15. Takeyama K, Ito S, Yamamoto A, Tanimoto H, Furutani T, Kanuka H, Miura M, Tabata T, Kato S: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron* 35, 855-864, 2002
 16. Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 167-171, 2003
 17. Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 23, 636-644, 2003
 18. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H,

- Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR γ function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol* 5, 224-230, 2003
19. Tsukui T, Toyoda Y: Transgenic Techniques, section in "Adenoviral infection." *Methods Mol Biol* 180, 73-82, 2002
20. Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, Gamou T, Saito M, Iwamatsu A, Sakai R: Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 21, 5823-5834, 2002
21. Nakamoto T, Suzuki T, Huang J, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, Hirai H Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 635-641, 2002
22. Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, Takato T, Sakai R: Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization and cell transformation by functional domains of Cas. *J Biol Chem* 277, 27265-27272, 2002
2. 学会発表
【国際学会】
1. Inoue S: [Workshop] Differential growth control of cells via multiple estrogen-responsive pathways. 12th International vascular biology meeting, Karuizawa, Japan (2002.5.12-16)
2. Inoue S: [Symposium] Mechanism of Estrogen Action in Breast Cancer and Vascular Cells. 5th Vascular Biology Conference, Osaka, Japan (2002.8.3)
3. Inoue S: [Symposium] Role of estrogen responsive RING finger protein in growth control of breast cancer. 11th International Congress on Hormonal Steroids and 7th International Congress on Hormones and Cancer, Fukuoka, Japan (2002. 10. 21-25)
4. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive RING finger protein controls breast cancer growth, 2nd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka, Japan (2003.2.15-16)
5. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive genes and breast cancer, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2003, Kanazawa, Japan (2003.3.12-13)
6. Ishida R, Ezura Y, Yoshida H, Iwasaki H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: A single Nucleotide Polymorphism of interleukin-1-receptor-associated kinase Associate with Bone Mineral Densities of Adult Women. American Society of Bone and Mineral Research, San Antonio, Texas, USA (2002.9.20-24)
7. Amano H, Suzuki K, Nara A, Takahashi K, Tomita T, Urano T, Inoue S, Yamada S: The role of p57^{kip2} gene in bone metabolism. American Society of Bone and Mineral Research, San Antonio, Texas, USA (2002.9.20-24)
8. Kato S: [Symposium] Function of Androgen Receptor, Keystone Symposia, "Nuclear Receptor Superfamily "meeting", Snowbird Resort, Snowbird, Utah, USA (2002.4.13-19)
9. Kato S: [Symposium] ER α coactivator complexes and AR KO mice, 12th International Vascular Biology Meeting, Karuizawa, Japan (2002,5,12-16)
10. Kato S: [Symposium] Lesson from Androgen receptor knockout mouse, 48th

- NIBB Conference, Okazaki, JAPAN (2002.10.18-20)
11. Kato S: [Symposium] Function of steroid hormone receptors in gene regulations, NUS-IMCB-IMSUT Joint Symposium on Integrative Biotechnology, National University of Singapore, Singapore (2002.11.29)
 12. Hisatake K, Fukuda A, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y: Stimulation of Promoter Escape by a Coactivator PC4, 5th EMBL Transcription Meeting,, Hidelberg, Germany (2002.8.24-28)
 13. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: [Workshop] Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on Modification of Signaling Cascades in Cancer, Tokyo (2003.1.8-11)
- 【国内学会】
1. 井上聡: [シンポジウム]エストロゲン受容体とその標的因子の作用メカニズム (2002.6.28-30) 第 75 回日本内分泌学会 (大阪)
 2. 浦野友彦、斉藤智之、大内尉義、井上聡: [YIA 受賞] エストロゲンによる乳癌細胞の増殖機構における estrogen-responsive finger protein の役割 (2002.6.28-30) 第 75 回日本内分泌学会 (大阪)
 3. 井上聡: [ランチョンセミナー]抗エストロゲン作用を標的とした乳癌増殖制御と SERM の臨床応用 (2002.7.6) 第 10 回日本乳癌学会総会 (名古屋)
 4. 浦野友彦、藤田雅代、細井孝之、長幡武光、岩崎公典、江見充、大内尉義、井上聡: [優秀ポスター賞] 骨芽細胞老化に伴う TGFβ1 応答性低下における分子機構の解析 (2002.7.25-27) 第 20 回日本骨代謝学会 (岡山)
 5. 井上聡: 標的分子からみたエストロゲン作用メカニズム (2002.7.31) 第 7 回 CREST「内分泌かく乱物質」研究会 (東京)
 6. 井上聡: ホルモン依存性癌の増殖制御と SERM の臨床応用 (2002.10.19) 第 9 回滋賀更年期セミナー (滋賀)
 7. 江見充、江面陽一、梶田満子、石田良太、小平美奈、吉田英世、細井孝之、井上聡、鈴木隆雄、白木正孝: 骨粗鬆症の体系的 SNP 解析 -Systematic analysis of osteoporosis susceptibility SNPs- (2002.11.13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
 8. 江面陽一、梶田満子、石井良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充: ビタミン D 結合蛋白 (DBP) 遺伝子領域の遺伝子多型と成人女性橈骨骨密度値との相関の検討 (2002.11.13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
 9. 梶田満子、江面陽一、石田良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充: ゴナドトロピン遊離ホルモン (GnRH) のシグナルペプチド遺伝子多型と成人女性の橈骨・腰椎骨密度との相関 (2002.11.13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
 10. 石田良太、江面陽一、大益史弘、梶田満子、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充: Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase 遺伝子多型と成人女性の骨密度の相関 (2002.11.13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
 11. 池田和博、小川純人、井上聡: エストロゲン受容体 (ER) と相互作用する ERIF の機能解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
 12. 星野眞二郎、浦野友彦、関根絵美子、

- 白木正孝、井上聡、大内尉義：骨粗鬆症未病者における骨形成に関わる遺伝子解析の応用 (2003.1.11-12) 第 9 回日本未病システム学会 (佐賀)
13. 大石元、北川浩史、和田修、柳澤純、加藤茂明：癌抑制遺伝子 BRCA1 は GCN5 を含む HAT 複合体と結合し、転写活性と DNA 損傷修復の両機能を促進する (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
14. 目崎喜弘、吉田輔、北川浩史、加藤茂明：エストロゲン受容体 N 末側転写活性化能によるクロマチンテンプレート *in vitro* 転写系構築の試み (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
15. 北川浩史、藤木亮次、植松良勝、松井大輔、時田章史、伊藤敬、石見幸男、松本俊夫、柳澤純、加藤茂明：VDR 機能と共役する新規染色体構造変換因子複合体 WINAC の同定・性状解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
16. 松本高広、佐藤隆史、河野博隆、渡辺資之、植松良勝、福田亨、山田高嗣、山本陽子、中村貴、吉村公宏、椎名博子、加藤茂明：アンドロゲン受容体欠損雄マウスにおける性特異的行動発現の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
17. 伊藤紗弥、武山健一、Alexander Kouzmenko、沢津橋俊、加藤茂明：ショウジョウバエを用いたヒトエストロゲンレセプター転写制御機構の解明 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
18. 吉田輔、目崎喜弘、北川浩史、加藤茂明：エストロゲンレセプター α (ER α) AF-1 に相互作用する転写共役因子の機能解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
19. 大竹史明、武山健一、柳澤純、松本高広、藤井義明、加藤茂明：ダイオキシン受容体を介した女性ホルモン受容体機能抑制の分子機構の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
20. 吉村公宏、栗飯原賢一、山田高嗣、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明：ビタミン A・D レセプター (RAR・VDR) の骨組織における協調作用の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
21. 竹沢慎一郎、高田伊知郎、清水崇史、北川浩史、柳靖雄、加藤茂明：Identification of a novel co-repressor complex for Photoreceptor cell-specific Nuclear Receptor (PNR) (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
22. 津久井通、井上聡：ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼの生体作用機構 (2002.2.23) 第 5 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)
23. 津久井通、清水省志、大羽沙弥佳、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：Gain of function によるエストロゲンの生体作用機構の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
24. 福田綾、床鍋繁喜、濱田光浩、松本征仁、津久井通、禾泰壽、久武幸司：c-fos 遺伝子の転写調節機構の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
25. 今澤由紀子、久武幸司、中川香をり、光澤浩、津久井通、松本征仁、濱田光浩、石浜明、村松實美、禾泰壽：分裂酵母 RNA ポリメラーゼ I の新規サブユニットと RPA21, Rrm3p との相互作用 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
26. Hisatake K, Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi