

Y: [シンポジウム]A regulatory role for TFIIH in transcriptional activation. (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会

27. 堀隆一、黄錦鴻、濱崎裕子、浅輪珠恵：[ワークショップ]ドッキング分子 Cas の各リン酸化部位の腫瘍における役割 (2002.10.1-3) 第 61 回日本癌学会総会 (東京)
28. 三宅泉、箱守裕子、中舘尚也、松浦信夫、坂本亨宇、堀隆一：ALK の活性化した神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC の造腫瘍性への影響 (2002.10.1-3) 第 61 回日本癌学会総会 (東京)
29. 箱守裕子、三宅泉、中川原章、堀隆一：神経芽腫における ALK 活性化の

生物学的意義 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)

### 3. 出版物

#### 【和文】

1. 井上聡：核内受容体研究の最近の進歩：日本老年医学会雑誌編集委員会編：老年医学 update2002: メディカルレビュー社 199-207 (2002)
2. 井上聡：骨粗鬆症の分子病態：石川冬木編：老化研究の最前線：シュプリンガーフェアラーク東京 77-86 (2002)

H. 知的財産権の出願・登録予定  
特になし

# 分担研究報告書

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）  
分担研究報告書

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

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】**

タモキシフェンをはじめとする新しい骨粗鬆症治療薬である抗エストロゲン剤の骨組織特異性を明らかにするため、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。転写制御因子である核内受容体はN末端とC末端に2つの転写促進領域を有し、各々AF-1、AF-2と呼ばれている。AF-2機能は主として細胞内に普遍的に存在する転写共役因子群により制御されているため、それら治療薬の組織特異性には、AF-1機能が重要であると考えられている。我々は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。

**A. 研究目的**

骨粗鬆症の治療薬として有効とされているエストロゲンは、核内受容体であるエストロゲン受容体を介してその作用を発揮する。しかしながらエストロゲンの生理作用は骨にとどまらず子宮、乳腺など多岐にわたるため、組織選択的にアゴニスト・アンタゴニスト作用を発揮する選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）が注目を集めている。一方転写制御因子である核内受容体は2つの転写促進領域を有し、各々AF-1、AF-2と呼ばれている。AF-2機能は主として細胞内に普遍的に存在する転写共役因子群により制御される。従って、タモキシフェンをはじめとするSERMが骨組織特異性を発揮するためには、エストロゲン受容体のAF-1機能が重要であると想定されている。このような組織特異的な生理作用

を担う因子として、核内受容体と相互作用する転写共役因子群が最近注目されている。本研究では、エストロゲン受容体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を生化学的手法により精製して機能解析を行い、組織特異的なエストロゲン生理作用メカニズムの解明を目指した。

**B. 研究方法**

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

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。

### C. 研究結果

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 (Yanagisawa et al., 2002)。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。

さらに 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。この複合体はエストロゲン受容体 $\beta$ 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。エストロゲン受容体の 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 が競合的にエストロゲン

受容体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。

### D. 考察

以前から本研究室ではエストロゲン受容体特異的な転写共役因子として DEAD box モチーフを持つ RNA ヘリケース p68、p72 の同定及び機能解析を行ってきた。さらに p68/p72 と既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP/p300、p160 ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにしてきた (Watanabe et al., 2001)。

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。

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。現在核内受容体の転写共役因子複合体の構成因子として当研究室で同定したクロマチン修飾因子のノックアウトマウスの作製が進行中である。また、転写共役因子複合体の個々の構成因子をレポーターアッセイで調べるだけではなく、複合体としての機能を評価するため、クロマチン構造をとった DNA からの *in vitro*

転写系構築が進行中であり、この系を用いてこれまで同定してきた転写共役因子複合体の機能解析およびさらなる新規転写共役因子複合体の探索を行う。

#### E. 結論

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。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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

【英文原著】

1. 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 $\gamma$  function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol* 5, 224-230, 2003
2. 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
3. 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
4. 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 TFIIIC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* 9, 553-562, 2002
5. 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
6. Furutani T, Watanabe T, Tanimoto K, Hashimoto T, Koutoku H, Kudoh M, Shimizu Y, Kato S, Shikama H: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 779-784, 2002
7. Kato S: Androgen receptor structure and function from knock-out mouse. *Clin Pediatr Endocrinol* 11, 1-7, 2002
8. Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A, Takeyama K: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002
9. Kitagawa H, Yanagisawa J, Fuse H, Ogawa S, Yogiashi Y, Okuno A, Nagasawa H, Nakajima T, Matsumoto T, Kato S: Ligand selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol Cell Biol* 22, 3698-3706, 2002
10. Matsui D, Sakari M, Sato T, Murayama A, Takada I, Kim M, Takeyama K, Kato S: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene by

progesterone in brain. *Nucleic Acids Res* 30, 1387-1393, 2002

11. Suzawa M, Tamura Y, Fukumoto S, Miyazono K, Fujita T, Kato S, Takeuchi Y: Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res* 17, 240-248, 2002

## 2. 学会発表

### 【国際】

1. Kato S: Function of Androgen Receptor, Keystone Symposia, "Nuclear Receptor Superfamily "meeting", Snowbird Resort, Snowbird, Utah, USA (2002.4.13-19)
2. Kato S: ER $\alpha$  coactivator complexes and AR KO mice, 12<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, Karuizawa, Japan (2002,5,12-16)
3. Kato S: Lesson from Androgen receptor knockout mouse, 48th NIBB Conference, Okazaki, JAPAN (2002.10.18-20)
4. Kato S: Function of steroid hormone receptors in gene regulations, NUS-IMCB-IMSUT Joint Symposium on Integrative Biotechnology, National University of Singapore, Singapore (2002.11.29)

### 【国内】

1. 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)
2. 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)

3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 津久井 通

埼玉医科大学医学部分子生物・ゲノム医学研実験動物助手

**【研究要旨】**

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症における疾患モデルマウスの作製ならびにその生体作用機構の解析を目的とする。多因子性疾患である骨粗鬆症について、その疾患因子候補としてのエストロゲン、ビタミン K 関連遺伝子について、集中的かつ網羅的に組換えアデノウイルスおよび遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備することができた。また、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに骨組織で過剰発現をさせる系の準備を整えた。この遺伝子改変モデルマウスを利用して、それぞれの因子の生体内での骨機能に関してカスケードおよびシグナル伝達を中心とした解析をすることにより、分子レベルで骨粗鬆症を網羅的に解明する。さらに今後の方向性として、病態のメカニズム、治療法への応用性、骨粗鬆症の治療効果について検討することにより、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症の治療薬としてその有効性または可能性が高いことが報告されている物質について、カルシトニン、ビタミン D、ビタミン K、PTH、エストロゲン、ビスホネートが治療薬として考えられており、また実際に臨床におけるデータよりその有効性が示されているが、その作用機序・骨代謝以外のリスク等については、未だ不明な点が多く明確な解析が待たれている。これらの生体内での作用メカニズムを分子レベルで解明し、骨粗鬆症疾患遺伝子を検索し、カスケード、およびシグナル伝達に関する研究を行うこ

とで、新規の治療法および創薬の可能性を示すことが、今後の重要な研究の方向性であり、課題と考えられる。

本研究課題における、分担項目としてエストロゲン、ビタミン K 関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを作製することにより、動物個体を利用することでしか得られない、生体機能、薬剤の効果・影響を検討できる点が遺伝子改変マウスを使用する利点と考えられる。その際、実際に骨代謝等で重要な生理機能もっている遺伝子改変を行った場合、これらの個体においては、種々の理由（例えば、軟骨の石灰化異常により、肺呼吸が不可能



等) から胎生期で致死となる可能性が高く、遺伝子改変マウスをライン化して、再現性および信頼できるデータとして吟味することが困難であった。それら問題点を改善するため、本研究課題では、コンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスシステムを開発し、個体での網羅的な解析を行う。

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補因子群を同定し、これらの因子群の生体内での骨作用に対する機能を解明し、カスケードおよびシグナル伝達に関する研究を通して、分子レベルで骨粗鬆症を網羅的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される骨粗鬆症疾患モデル動物を利用して、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、実際にこれらの疾患モデル動物を利用して、骨粗鬆症の治療効果について検討することにより、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指す。

## B. 研究方法

平成 14 年度については、分担者の研究分担項目のうち、受容体・酵素系等を介して作用する骨粗鬆症疾患の治療薬であるカルシトニン、ビタミン D、ビタミン K、PTH、エストロゲン、ビスホネートのシグナル経路について集中的かつ網羅的に遺伝子改変動物の作製を行う。特に分担者は、初年度にビタミン K、エストロゲンの経路を集中的に解析する。なお、ビタミン D に関しては、本研究課題の分担者である加藤茂明 (東大・分生研・教授) が既にその受容体の遺伝子改変マウスを作製しており、分担項目として分かれている。それ故、治療薬・新規標的候補としてエストロゲンおよびビタミン K について焦点を絞り、本研究課題での分担項目として以下の研究を行う。

*in vitro* の実験系においては、DNA マイクロレイ技術を利用することにより、エストロゲン受容体の下流応答遺伝子群の発現プロファイル化を検討することにより、エストロゲンの受容体である ER $\alpha$  および ER $\beta$  について、それぞれの受容体特異的な下流応答遺伝子群の同定および *in situ hybridization* (ISH) 法により確認・検討し、診断・治療を目的とした下流応答遺伝子群のリスト化を試みる。さらに骨粗鬆症疾患との関連および標的遺伝子とのシグナル伝達の関連性について検討および吟味する。

ビタミン K についても同様に、グラ化酵素であるビタミン K 依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼについて、その組換えアデノウイルスを作製し、特に個体から初代骨芽細胞または培養細胞株を用いて DNA マイクロレイ・プロテオーム解析を利用することにより、下流遺伝子群およびグラ化標的タンパクの検索を行う。

*in vivo* での実験系では、疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体における *gain of function* を行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、骨代謝におけるエストロゲン・ビタミン K シグナルの解明、および治療法の確立を目指す。以上の研究課題を遂行するために、先ず具体的に大きく分けると 4 つ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う。

1. エストロゲンについては、エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ) 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 $\alpha$ 、caER $\beta$  の組換えアデノウイルスの作製
2. 活性型 caER $\alpha$ 、および caER $\beta$  トランスジェニックマウスの作製
3. ビタミン K 関連遺伝子群としてビタミン K 依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼの組換え

えアデノウイルスの作製

4. ビタミン K 依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼおよびそのグラ化標的タンパクとしての Bone グラ 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

### C. 研究結果

エストロゲンに関しては、活性型エストロゲン受容体 (caER $\alpha$ 、および caER $\beta$ ) 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 caER $\alpha$  および caER $\beta$  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、平成 15 年度以降、これらのマウスを交配させることにより、caER $\alpha$ ・ER $\beta$  のシグナルを同時に活性化させる cTg マウスの作製を予定している。また、DNA マイクロアレイを利用してエストロゲンの関連遺伝子として、初代骨芽細胞から細胞周期制御因子として知られるサイクリン D2、D3 が cdk4/6 を介して骨芽細胞の増殖に関与していることを示した (Fujita *et al.*, 2002)。さらにエストロゲン下流応答遺伝子として骨代謝に関連すると想定される遺伝子としてカルシトニン関連遺伝子の同定に成功した (データ未発表)。

ビタミン K に関連する骨疾患遺伝子の候補として、 $\gamma$ -カルボキシラーゼおよびそのグラ化の標的タンパクである 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。

cTg マウスシステムを利用して、種々の遺伝子を骨組織で特異的に gain of function するために、骨特異的プロモ-

ーター支配下に組換え酵素である Cre を発現させることが必要条件となる。それ故、肥大軟骨ではコラーゲン IIa、石灰化軟骨ではコラーゲン Xa、破骨細胞の分化において時期特異的に発現するプロモーターとして TRAP プロモーターを領域について、既にクローン化を行い破骨細胞株等でのプロモーター活性の有無について検討している。また、別のルートとして Cre を発現する組換えアデノウイルスについて、実際に *in vivo* において骨粗鬆症疾患の遺伝子の骨組織を標的とした gain of function を目的とした系を検討している。

### D. 考察

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した場合、胎生期において骨代謝に影響がでることが想定され、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。つまり、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、今後、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。つまり、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。さらに研究を発展させるためには、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

製も来年度の研究課題として取り組む予定である。

また、本研究課題で使用したコンディショナルトランスジェニックマウスシステムが生体内で実際に機能するかに関しては、cTg マウスにおける GFP や DsRed のレポーター遺伝子の発現を確認し、また遺伝子改変マウス由来の初代培養細胞に Cre を導入した実験結果から、これらの疾患遺伝子群候補の過剰発現もレポーター遺伝子の発現と同様に得ることが可能と示唆され、次年度より機能解析を進めていく。

平成 15 年度以降、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タンパクの同定・解析を中心に研究を進めて行くことが重要と考えられる。

#### E. 結論

エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨代謝における機能については、選択的に ER $\alpha$ 、ER $\beta$ シグナルを Gain of function することが可能な、コンディショナルトランスジェニックマウスを全てそろえることができた。

ビタミン K に関連する遺伝子・制御因子に関しては、同様に gain of function するコンディショナルトランスジェニックマウスを得ることができた。

今後、これらの多因子性疾患である骨粗鬆症疾患の候補遺伝子群の生体機能に関し、骨代謝を中心に解析を行い、個体のみでしか得られない 2 次的な影響等、網羅的な解析を展開する予定である。さらに疾患モデルマウスを生きた試薬として利用して、DNA マイクロアレイ・プロテオーム解析を行い、新規診断マーカーやシグナルカスケードを明らかにするこ

とにより、新規の治療標的の検討を目指す。

#### F. 研究発表

##### 1. 発表論文

【英文原著】

1. 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
2. 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
3. Tsukui T, Toyoda Y: Transgenic Techniques, section in "Adenoviral infection." Humana Press. *Methods Mol Biol* 180, 73-82, 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 in decidual cells during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 28, 213-223, 2002
5. Kawakami Y, Tsukui T, Ng JK, Izpisua Belmonte JC: *Pattern Formation in Vertebrate Development*, section in "Insights into the Molecular Basis of Vertebrate Forelimb and Hindlimb identity" Oxford University Press, London, 198-213, 2003
6. Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 2003 (in press)

2. 学会発表

【国際学会】

1. Hisatake K, Fukuda A, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y: Stimulation of Promoter Escape by a Coactivator PC4, 5<sup>th</sup> EMBL Transcription Meeting,, Heidelberg, Germany (2002.8.24-28)

【国内学会】

1. 津久井通、井上聡：ビタミン K 依存性  $\gamma$ -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)
2. 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
3. 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
4. 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, Rm3p との相互作用 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
5. Hisatake K, Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y: [シンポジウム]A regulatory role for TFIIF in transcriptional activation. (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会

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）

分担研究報告書

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

分担研究者 堺 隆一

国立がんセンター細胞増殖因子研究部部長

【研究要旨】

骨粗鬆症の疾患遺伝子の機能解析においては、細胞内シグナル伝達系からのアプローチが大きな意義を持っている。本研究は、ゲノム・遺伝子の構造解析では解決できない蛋白質の修飾や複合体形成などが、骨粗鬆症発生においてどのように変化するかをプロテオーム分析や生化学的手法により網羅的に解析することを目的とする。さらにDNAチップ、マイクロアレイや遺伝子改変動物の作成と組み合わせることにより病態の理解を深める。特に膜受容体、酵素系の調節機構、特にステロイドホルモンが増殖因子などのシグナル伝達に関わる分子群に細胞膜や細胞質で直接働きかけ、短時間でその効果を表す non-genomic なシグナルやカルシウム代謝のシグナル制御に着目して、その骨代謝制御機構を明らかにすることにより、カルシトニン、PTH、ビスフォスフォネート、ビタミンKやその他の骨粗鬆症治療薬の薬理作用について理解を深め、骨粗鬆症の診断・治療に役立てる。

A. 研究目的

骨粗鬆症の中心となる病態は骨量の病的減少であり、主として加齢や生活習慣の変化などにより骨吸収と骨形成からなる骨代謝のバランスが崩れた状態と考えられる。その発生要因として、エストロゲン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンなどのホルモンバランスやカルシウム代謝などの影響で、破骨細胞の機能亢進や骨芽細胞の機能低下が引き起こされるものと推定されている。本研究の目的は、このような破骨細胞や骨芽細胞の機能がどのような機構により制御されているかを、細胞内シグナル伝達の解析により明らかにすることである。骨芽細胞の BMP 蛋白質群による分化制御に関する詳細な知見に加えて、破骨細胞においては近年

RANKL 蛋白質が膜上の受容体 RANK を介してその分化や活性化を制御していることが分かってきた。このような骨代謝細胞表面に働きかける蛋白質群による作用を、細胞内のシグナル伝達分子の変化としてとらえ、細胞の機能・増殖・生存の制御を理解しようと考えている。現時点で特に重要であると考えているのは、上に述べた分化シグナルに加えて、骨粗鬆症の成因の一つであるエストロゲンがどのようなシグナル伝達分子群を介して骨代謝に関わるかを明らかにすることである。また破骨細胞の機能維持や生存に関わると考えられている Src チロシンキナーゼが、破骨細胞でどのような分子群のリン酸化を介してその機能を発揮するのかを解析する。ごく最近、骨以外の系

ではあるがステロイドホルモン受容体 (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) が核外で Src キナーゼの相互作用することを示唆するデータが発表されている。前立腺癌細胞 (LNCaP) や乳癌細胞 (MCF-7) などでは、ER $\alpha$ と ER $\beta$  が Src キナーゼの調節領域の Src 相同領域 2 (SH2) に結合し、アンドロゲン受容体 (AR) が同じく SH3 領域に結合することが示された。この結合が、通常は分子内結合により不活性化している Src を活性化しその結果として Ras や下流の Erk の活性化と細胞の増殖亢進モデルが提示された。このような核外の作用が骨代謝細胞においても機能している可能性がある。これらの解析には、最近広く行われている DNA チップ・マイクロアレイなどを用いた網羅的な発現解析に加えて、二次元電気泳動による蛋白質発現解析、Flag タグによる複合体解析や二次元電気泳動解析などプロテオミクスの諸手法を用いていくつもりである。エストロゲン、副甲状腺ホルモン、ビタミン D 等の刺激により骨芽細胞、破骨細胞系の培養細胞での発現量に顕著な変化のみられた蛋白質について質量分析により同定し、抗体を用いた生化学的解析や、ノックアウトマウスを用いた発生工学的解析により、実際の生体での骨の形成や吸収における役割を明らかにする。更に蛋白質の修飾については特にチロシンリン酸化を含む蛋白質群について集中的・網羅的に解析を進める。これらの蛋白質は受容体型チロシンキナーゼや Src ファミリーなどの非受容体型チロシンキナーゼの基質として、細胞の増殖や生存に関わるシグナルを伝える分子が多く含まれることが他の細胞系においては知られている。この目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を行う。以上のような手法を用いて各種刺激により骨細胞に起こる細胞内変化に遺伝子発現—蛋白質発現—蛋白質修飾—複

合体形成の4つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。それにより骨粗鬆症の病態をできる限り正確に把握し、骨粗鬆症の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

## B. 研究方法

### (1) 骨芽細胞・破骨細胞の分子発現制御機構の解析

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・蛋白質発現を網羅的に解析する。第一に BMP/TGF $\beta$ ファミリーにより誘導される骨芽細胞への分化や、RANKL または MCSF 刺激により誘導される破骨細胞への分化をモデル系にして、骨芽細胞や破骨細胞の成熟に伴い特異的に発現する分子群を、マイクロアレイによる遺伝子発現解析と蛋白質の 2 次元電気泳動により解析し、発現の変化する遺伝子に関してはデータベース検索よりその遺伝子産物の機能を推定し、蛋白質に関してはスポットを切り出し質量分析から発現の変化する蛋白質の同定を試みる。破骨細胞についてはその機能調節に関わると考えられるエストロゲン、副甲状腺ホルモン、ビタミン D 等による刺激やフィブロネクチンへの接着によるインテグリン刺激により誘導される分子群を同様の手法により解析する。さらに骨粗鬆症の治療薬として使われ、その明確な作用機序がわかっていないビスフォスフォネートやビタミン K などの薬剤についても、誘導される遺伝子蛋白質に関する情報を得る。細胞蛋白質の溶出液の調整においては、可溶性分画と不溶性分画に分けてそれぞれを別個に 2 次元電気泳動で解析することにより、機能調節に伴って細胞質から膜成分への移行する蛋白質群についても情報を得ることを試みる。遺伝子・蛋白質の

発現量に関する情報はデータベース化し、今後の複合体解析などで得られた特定の分子の発現細胞・発現量変化などが参照できるような形にして保存する。

#### (2) 2次元電気泳動・免疫沈降によるチロシンリン酸化の解析

上記のような種々の刺激で細胞内のチロシンリン酸化にどのような変化が起こるのかを解析する。実際には、リン酸化チロシンを含むスポットの変化をただ観察するだけではなく、未知のスポットは切り出して質量分析によって同定を行う必要があり、総タンパク量に対するリン酸化蛋白質の比率がきわめて低いことから、リン酸化チロシンを含む蛋白質を精製してから解析することが望ましい。そのためにも、抗リン酸化チロシン抗体 4G10 を用いて細胞溶出液を効率よく精製する方法論の確立が重要である。精製した蛋白質を2次元電気泳動にかけ、個々のスポットを銀染色で同定するとともに、直接対応する細胞溶出液を抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロットで解析し、チロシンリン酸化蛋白質を検出する。このようにして各種基質・ドッキング蛋白質のスポットを可能な限り同定し、刺激による発現量、リン酸化の程度の変化を記録する。また主要ドッキング蛋白質 Shc、IRS-1、FRS2、Cas、Dok、Gab-1 などについては、免疫沈降後、リン酸化チロシン抗体や特異抗体でウエスタンブロット解析し、リン酸化チロシン含量の変化、結合蛋白質の変化などを観察する。

#### (3) 刺激で誘導される SH2、PTB 結合リン酸化蛋白質の複合体分析

Src、Fyn、Grb2、Shc、Crk 等、主要なシグナル伝達分子の SH2 領域と PTB 領域を RT-PCR で増幅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する。具体的には Crk-SH2、Grb2-SH2、Nck-SH2、Shc-SH2、Shc-PTB の各ドメインを既に

クローニング済みであるのでこれをさらに広げる。これらのリン酸化チロシン結合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により結合するチロシンリン酸化蛋白質群を通常の SDS-PAGE あるいは2次元の SDS-PAGE で解析する。特にインテグリンやエストロゲン刺激によってリン酸化チロシン含有量の変化する蛋白質に着目し、分子量や2次元での位置から予想がつくものについては既存の抗体などを用い、あるいは質量分析により同定し、(2)の結果と併せて骨細胞内のチロシンリン酸化蛋白質データベースを構築する。結合が予想される分子群については、特異抗体を用いて細胞内での直接の結合を確認する。更にどのようなチロシンキナーゼが活性化しているかをみるために Src ファミリーキナーゼ (Src, Fyn, Lyn, Fgr, Lck, Yes) や Abl, Fak などの非受容体型チロシンキナーゼ、FGF-R、PDGF-R Ret などの受容体型チロシンキナーゼのキナーゼ活性の刺激による変化を自己リン酸化ないし、enolase などの外部基質を用いたキナーゼアッセイにより測定する。

#### (4) 蛋白質発現阻害による骨代謝における役割の細胞生物学的解析

ここまでの解析の結果から、特に骨代謝の調節の鍵を握ると予想される蛋白質群を絞り込み、それらの発現を抑えることにより骨形成にどのような影響を与えるかを解析する。In vitro の系としては、近年開発された RNAi の手法を用い、骨代謝細胞内での発現を抑えることで、骨芽細胞においてはその増殖能や遊走能に、破骨細胞においてはその細胞の生存能や破骨活性にどのような影響が出るかを解析する。一部の分子については、ゲノム構造を解析して、発生工学的手法を用いてその遺伝子発現を欠損したノックアウト

トマウスの作成をおこない、骨形成にどのような影響が出るか、加齢やステロイドホルモンの過剰投与による骨粗鬆症の発生の程度が変わるかどうかを解析する。既に Src チロシンキナーゼの主要な基質で破骨細胞に強く発現してリン酸化を受けているドッキング蛋白質 Cas のノックアウトマウスを樹立し、維持しているため、このマウスにおける骨異常の解析も行う予定である。また骨芽細胞、破骨細胞の初代培養を行い詳細にわたる機能解析を行う。

### C. 研究結果

今年度は、大量の試料を調整することが技術的に難しい骨芽細胞系、破骨細胞系の解析に入る準備段階として、大量の準備が可能な骨肉腫細胞株を用いた発現、リン酸化レベルでの解析やノックアウトマウスから調整した初代培養細胞や腫瘍細胞などを用いたエストロゲンの核内・核外の作用の解析やインテグリン-Src 経路の解析を通じて、本研究に用いる手法の確立を行った。同時に解析に用いる骨芽細胞分化系・破骨細胞分化系の樹立も同時に開始している。

#### (1) Cas ノックアウト細胞のマイクロアレイによる解析

前述したように 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 経路は固形腫瘍など他の細胞系では Src の活性化を伝えるメインの経路であることが証明されてきていることから破骨細胞においてもその機能や存続維持のための主要な経路である可能性が考えられる。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、それにさらに 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 $\alpha$ 1、3 $\alpha$ 1、11 $\alpha$ 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ことなどから、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1次元あるいは2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。通常は1次元電気泳動では100 $\mu$ g、2次元電気泳動では500 $\mu$ g程度の蛋白質サンプルまでしか、高解像度で分離することができないので、シグナル伝達分子のように発現量があまり多くない蛋白質の場合は、ウエスタンブロットや蛋白質ラベルによりリン酸化蛋白質の位置を確定できても量的に質量分析による同定のために足りない場合が多い。そのため抗リン酸化チロシン抗体カラムによる粗精製を分離前に行うことを考えたが、細胞内でチロシンリン酸化部位で他の蛋白質と複合体を形成しているものが多いため直接カラムにかけても結合しない分子が多いことがわかった。そのため前もって細胞溶出液全体を高濃度の尿素で変性した後、尿素を徐々にのぞいてやると、Cas など既知のリン酸化蛋白質を指標にすると結合の効率が遥かに上昇することが確かめられた。denature-renature のステップを入れな



いでも抗リン酸化チロシン抗体カラムに結合するこれとは異なる量の多い一群の蛋白質群があることから、直接抗リン酸化チロシン抗体カラムに通した pass through に denature-renature の操作を加えた後、再び直接抗リン酸化チロシン抗体カラムにかけ結合分子をとることで、ドッキング分子などのチロシンリン酸化部位で複合体を作る蛋白質群を効率的に濃縮できることを見出した。例として、転移系・非転移系の同種腫瘍細胞株の比較を行ったところ、メラノーマ細胞株 (K-1735) では、転移性の系で Cortactin のリン酸化の著明な上昇が認められ、骨肉腫細胞株の系 (Hu09) では、高転移性の系で Paxillin, Cortactin, Cas のリン酸化の上昇が認められた。蛋白質の絶対量が少ないため質量分析で同定できなかったものも多く、質量分析に十分な量を集めるためには、かなり大量の細胞溶出液と抗体カラムを用いて精製を行うことが必要であることが明らかになった。

### (3) エストロゲンの骨代謝における作用

骨細胞においては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研究されていない。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徐々に明らかになっている。これからの網羅的なシグナル伝達解析に進む前段階として、このような調節機構が骨代謝細胞でも起こっているのかどうかを検出するため、エストロゲンレセプター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をつけられないものをそれぞれ発現するベクターを構築した。現在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解析中である。

### D. 考察

本研究では mRNA だけでなく蛋白質を標的とした解析が多いことが特色であり、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点、単なる発現解析から一步進んだものであると考えられる。しかもそのような作業をできるだけ網羅的に行うことを試みるつもりであるが、今年度は試料の調整の技術的問題もあり、モデル系を使った技術開発と特定の分子の検出によるプロトコールの確認に留まらざるを得なかった。腫瘍細胞における蛋白質のチロシンリン酸化の変化を検出して、質量分析によって網羅的に同定する新しい手技・手法の開発については、抗リン酸化チロシン抗体を用いた二段階の親和性カラムによる精製でリン酸化チロシン残基を含む蛋白質群を、高い収率と高い特異性をもった方法を開発することに成功した。例としてあげた Cortactin, Cas, Paxillin などは分子量からリン酸化蛋白質も推定も比較的容易であったため、特異抗体を用いてリン酸化の変化も容易に確認することができたが、現時点での大きな問題として、予想のできない新規のシグナル伝達分子などは蛋白質の絶対量が少ないため質量分析で同定できなかったものが多く、質量分析に十分な量を集めるために大量の細胞溶出液と、抗体カラムを要する点がある。ただ質量分析の感度は現在でも更に高くなりつつあるのでこの問題は軽減する可能性がある。どちらにせよ免疫沈降やカラム精製を使った解析は、非常に多くの細胞数を必要とする。そのため初代培養などから必要な蛋白質を得るには膨大な労力を必要とするため、現在いくつかの骨芽細胞系、破骨細胞分化系の細胞株を検討している。

## E. 結論

初年度の為、骨代謝細胞の機能を制御する分子を具体的に同定するまでには至っていないが、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。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2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っている。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ると考える。現在、Src のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究などは始まっているが、細胞内のシグナル媒介・調節分子によるチロシンキナーゼシグナルの制御はその特異性においてはるかに優れているおり、実用的な面でも副作用の少ない薬剤を開発できる可能性がある

## F. 発表

### 1. 論文発表

#### 【英文原著】

1. 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

2. 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

3. 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

### 2. 学会発表

#### 【国際学会】

1. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: 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. 堺隆一、黄錦鴻、濱崎裕子、浅輪珠恵：ドッキング分子 Cas の各リン酸化部位の腫瘍における役割 (2002.10.1-3) 第61回日本癌学会総会 (東京)
2. 三宅泉、箱守裕子、中舘尚也、松浦信夫、坂本亨宇、堺隆一：ALK の活性化した神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC の造腫瘍性への影響 (2002.10.1-3) 第61回日本癌学会総会 (東京)
3. 箱守裕子、三宅泉、中川原章、堺隆一：神経芽腫における ALK 活性化の生物学的意義 (2002.12.11-14) 第25回日本分子生物学会年会 (横浜)

研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                              | 巻名  | ページ       | 出版年  |
|--|--|-----------------------------------|-----|-----------|------|
| 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.  | <i>Biochem Biophys Res Commun</i> | 299 | 222-228   | 2002 |
| 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.   | <i>Nature</i>                     | 417 | 871-875   | 2002 |
| 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.   | <i>Toxicol Appl Pharmacol</i>     | 185 | 98-110    | 2002 |
| 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.   | <i>J Mol Endocrinol</i>           | 28  | 213-223   | 2002 |
| 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.  | <i>J Neuroendocrinol</i>          | 14  | 836-842   | 2002 |
| 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.  | <i>Geriatric Gerontol Int</i>     | 2   | 138-142   | 2002 |
| 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.   | <i>J Bone Miner Res</i>           | 17  | 1744-1751 | 2002 |
| 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. | <i>J Bone Miner Res</i>           | 18  | 419-423   | 2003 |
| 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.                                | <i>J Hum Genet</i>                | 48  | 77-81     | 2003 |
| 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.    | <i>Bone</i>                       | 32  | 185-190   | 2003 |