

20030352

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

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡  
平成16(2004)年4月

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

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡  
平成16(2004)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 -----	I - 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 ----- 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 ----- 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 -----	II - 1 II - 5 II - 11
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	III - 1
IV.	刊行物の別刷 -----	IV - 1

# 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。骨粗鬆症の診断・治療は未だ確立されているとはいえ、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 は核内受容体を介して作用し、その他の治療薬も主に細胞内の情報制御伝達系、酵素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。本研究は、それら多数の遺伝子情報制御分子の網羅的な機能解析に着目し、新しい情報制御分子、標的因子の系統的同定を行い、その疾患遺伝子としての役割を遺伝子改変動物とヒトゲノム情報を応用して解明し、新しい診断・治療・予防法へ役立てることを目的とする。本研究により、骨量に相関する遺伝子の SNP を多数同定し、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ビタミン D、ビタミン K、アンドロゲンにおいて新しいシグナル経路、分子標的を見出し、骨粗鬆症疾患モデル動物を作製解析した。また複数の SNP と骨粗鬆症との強い関連を遺伝学的に明らかにした。骨粗鬆症に対する多角的アプローチにより、基礎から臨床、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むことは、大変有意義と考えられる。ゲノム医学の手法を活用し、DNA チップ・マイクロアレイ法、プロテオーム解析と申請者らが創出した genomic binding-site cloning 法により骨粗鬆症疾患遺伝子の候補として、遺伝子情報制御分子とその標的因子を探索し、分子機能を明らかにした。本研究を推進することにより、分子生物学、蛋白生化学、遺伝子改変動物、SNP を用いたヒト遺伝学を駆使して骨粗鬆症の病態を解明し、診断・治療・予防への応用から、国民の健康、医療、福祉の増進を目指す。

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

教授

津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

講師

堺 隆一

国立がんセンター研究所

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、それに基づく腰背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。そのほか、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。すなわち、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。このことにより、国民の保健・健康の向上を目指し、特に急速な高齢化社会を迎える我が国の医療、福祉、厚生科学に寄与する事が期待される。

#### B. 研究方法

(1) エストロゲンによる骨形成制御機構に関する検討：骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索（分担：井上）

エストロゲン応答遺伝子の探索は、以下の系を用いて行った。一つは、新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を用い、活性型(constitutive active form) エストロゲンレセプター(ER)  $\alpha$ 、 $\beta$  それぞれをアデノウイルスを用いて過剰発現させ、感染後 12 時間、24 時間後の RNA を回収し、短期で発現が誘導されるエストロゲン応答遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。得られた遺伝子の実際の増加は、リアルタイム PCR 法で確認した。もう一つは、子宮頸癌細胞株である Hela に ER を恒常的に発現させた細胞を作製し、エストロゲン添加後 2 時間で発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにてスクリーニング的に検索し、得られた遺伝子の中から骨芽細胞においてエスト

ロゲンによる発現誘導を受けるものを選択した。

(2) ビタミン D3 応答遺伝子 p57<sup>Kip2</sup> による骨形成制御機構に関する検討：p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウス由来骨芽細胞を用いた p57<sup>Kip2</sup> シグナル下流遺伝子の探索(分担：井上)

p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウス新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を用い、野生型マウスをコントロールとし、RNA を回収し、発現に差違のある遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。

(3) Wnt- $\beta$  カテニンシグナル伝達因子 sFRP4 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響と骨芽細胞分化における発現変化に関する検討(分担：井上)

sFRP4 遺伝子における Arg262 の SNP (CGC $\rightarrow$ CGT) に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 379 人を対象として BMD との関連を検討した。

ラット頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞は、10%FBS、50 mg/ml アスコルビン酸および 5 mM b-グリセロリン酸添加  $\alpha$ -MEM にて培養した。メディアウム交換を週二回のペースで行い、培養 3 日、5 日、8 日、11 日、13 日、15 日、18 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での LRP5、sFRP4、Kremen1、アルカリホスファターゼ(ALP) 遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

(4) プロテオーム解析による骨芽細胞におけるビタミン K 応答蛋白質の探索(分担：井上)

プロテオーム解析法を用いて、骨芽細胞において骨粗鬆症治療薬に応答して発現量の変化する蛋白質を網羅的に探索した。ヒト骨芽細胞様細胞株 MG63、HOS および Saos2 を用いて、骨粗鬆症治療薬であるビタミン K<sub>2</sub> (メナテトレノン、MK-4) の作用を検討した。MK-4 で細胞を処理後、二次元電気泳動法を用いて蛋白質を分離し、クマシーブリリアントブ

ルー (CBB) 染色あるいは銀染色を行い、コントロールと比較して発現量の変化する蛋白質スポットについて質量分析機 (MALDI-TOF/MS) 解析を行い、蛋白質を同定した。同定した蛋白質について、ウェスタンブロットにより発現量の変化を解析した。

(5) ビタミン K の骨芽細胞における作用におけるステロイド X 受容体(SXR)の役割(分担：井上)

骨芽細胞におけるビタミン K<sub>2</sub> の新しい作用を媒介する SXR/PXR の機能を示すため、ルシフェラーゼアッセイと定量的 RT-PCR 法を行った。SXR のリガンドであるリファンピシンとビタミン K<sub>2</sub> (MK-4)処理後のアルカリホスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN)、オステオプロテジェリン(OPG)、オステオカルシン (bone Gla protein; BGP)、マトリクス Gla 蛋白質 (MGP) の遺伝子発現を調べた。SXR の標的遺伝子として知られるチトクローム P450-3A4 (Cyp 3A4) についても解析した。マウスにおいて SXR に相当する受容体 PXR のノックアウトマウス由来の初代骨芽細胞を調整し、骨の細胞における SXR/PXR のビタミン K 依存性転写活性における必要性を解析した。骨形成における SXR の役割を解析するため、ヒト骨芽細胞様細胞株に、ヒト SXR を過剰発現させた安定発現細胞株を作製し、骨形成マーカー遺伝子発現に対する作用を解析した。Flag タグを付加した SXR のコンストラクトを作製し、MG63 で安定発現細胞株を作製した。この細胞に関しても、上記、ルシフェラーゼアッセイと定量的 RT-PCR 法を適用した。

(6) エストロゲン受容体新規共役因子の同定と骨代謝における機能解析(分担：加藤)

FLAG タグを付けた full length エストロゲン受容体発現ベクターを浮遊 HeLa 細胞にトランスフェクションし、ネオマ

イシン耐性を利用して恒常発現株を樹立した。エストロゲンあるいはタモキシフェン存在下でエストロゲン受容体恒常発現株を大量培養し核抽出液を調製した。抗 FLAG ペプチド抗体カラムを用いてエストロゲン受容体転写共役因子を精製し、グリセロールグラジエント法を用いて複合体の大きさを推定した。

(7) ビタミン K、エストロゲンシグナルの骨代謝における生体作用解析 (分担: 津久井)

ビタミンK、エストロゲン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った。具体的に大きく分けると5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った。

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およびその解析
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 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およびその解析
5. 骨組織特異的に遺伝子改変するための組換え酵素Creを発現するマウスの準備および実験系の確立

(8) エストロゲンの骨代謝における non-genomic 作用の解析 (分担: 堺)

膜局在型のエストロゲンが伝えているシグナルを明らかにする目的でエストロゲン機能ドメイン (AF1、AF2) に Flag タグを付加した形で膜に発現するコンス

トラクトを作製した。これらのコンストラクトを用いて結合蛋白を明らかにするために、同じように核外の作用が報告されている乳癌細胞 (MCF-7) に導入して安定発現株を樹立した後、大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白を精製した。精製した蛋白質はTOF-MS法により同定を行った。

(9) 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 (分担: 堺)

骨へのシグナルをもたらず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した。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るため、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。そのためにまず、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ェ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した。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した。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ェ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した。

(10) Cas ノックアウトマウス細胞のマイクロアレイによる解析 (分担: 堺)

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

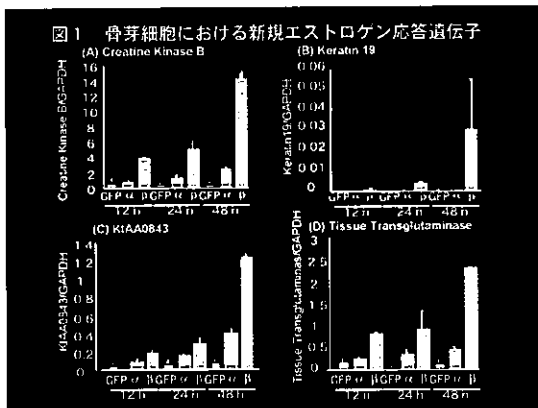


ウトマウスを樹立し、維持している。このマウスにおける骨異常の解析を行う。特に、ノックアウト細胞と、そのコントロール細胞についてマイクロアレイ法を用いて、発現に差異のある遺伝子を網羅的に解析した。

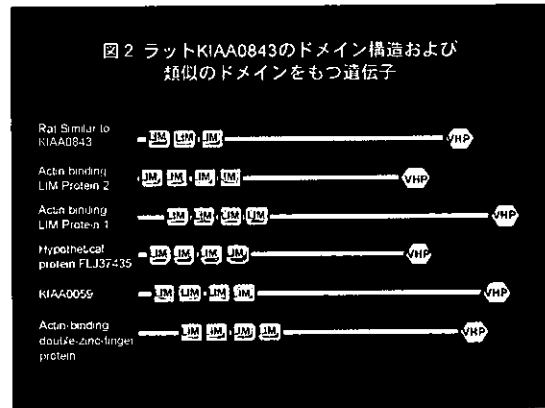
### C. 研究結果

#### (1) エストロゲンによる骨形成制御機構に関する検討：骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索

骨芽細胞においてエストロゲンによる発現誘導をうける遺伝子として得られたのは、Creatine Kinase B、Keratin 19、Rat Similar to KIAA0843 protein、Tissue Transglutaminase の4遺伝子であった。これらは、すべて活性型 ER $\alpha$ 、 $\beta$ により、初代培養骨芽細胞において発現の増加が認められ、ER $\alpha$ 、 $\beta$ 共通の応答遺伝子であることが示唆された(図1)。Creatine



Kinase B は、エストロゲンにより発現制御を受けることが既に報告されている遺伝子であり、分化、増殖の際のエネルギー代謝に関する遺伝子である。Keratin 19 および KIAA0843 protein は骨芽細胞での発現やエストロゲン応答の有無に関する過去の報告はなく、今回の実験によって得られた新規の骨芽細胞でのエストロゲン応答遺伝子であった。図2に示すように、KIAA0843 は LIM ドメインとアクチン結合ドメインを有し、それぞれのドメインは蛋白間相互作用、細胞骨格形成に



関与する。本研究により、細胞骨格に関連する因子が骨の細胞においてエストロゲンの分子標的になっている可能性が示され、大変興味深い。Tissue Transglutaminase は、骨芽細胞で発現していることは報告されているが、骨芽細胞でエストロゲンにより発現が促進されることは、今回の解析で新たに見出された。蛋白修飾や、蛋白架橋に関わる因子がエストロゲンシグナルの最終段階で働いていることが窺える知見である。

#### (2) ビタミン D3 応答遺伝子 p57<sup>Kip2</sup> による骨形成制御機構に関する検討

p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウス由来初代培養骨芽細胞における RNA を用いてマイクロアレイ法施行した。その結果 p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウスにより発現増加(表1)ならびに減少(表2)が誘導される遺伝子をリストアップした。この遺伝子群のなかに、ビタミン D シグナルを伝える分子標的が複数含まれることが想定される。

#### (3) Wnt- $\beta$ カテニンシグナル伝達因子 sFRP4 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響と骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

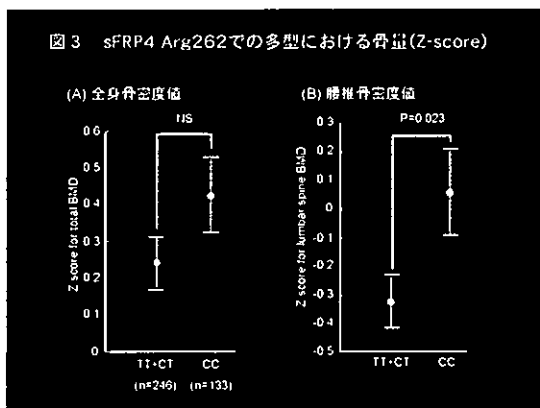
Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) の Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、T アレルを持つ群(CT+TT; n=246)では持たない群(CC; n=133)に比べ有意に腰椎骨密度が低いことを認めた(Z score; -0.33 vs 0.03; p=0.023) (図3)。さらに昨年度報告した遺伝子多型と骨量との間に相関があった LRP5 遺伝子と、今

表 1 p57<sup>kip2</sup> ノックアウトマウス由来初代培養骨芽細胞で  
発現が増加している遺伝子

11.783	1518	128	Igfbp3	Mouse DNA sequence from clone RP23-20C9 on chromosome 11
10.22	3801	371	Dlk1	(delta-like and Gtl2 gene) Mus musculus Dlk1 gene for delta-like and Gtl2 gene
7.403	7083	956	decorin	Mus musculus decorin (Dcn)
6.889	536	77	Adh1	Mus musculus clone rp23-393j8
6.878	362	52	Scg2	Mus musculus, Similar to secretogranin II, clone IMAGE:4481580, mRNA
6.62	125	19	Xist	inactive X specific transcripts, full insert sequence
6.553	1666	254	Adamts2	ADAM-TS 2 precursor (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2) (Procollagen I N-proteinase) (PC I-NP) (Procollagen N-endopeptida)
6.073	3525	580	Gas1	Mus musculus growth arrest specific 1 (Gas1), mRNA
4.847	360	74	Nrg1	Mus musculus odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila) (Odz4), mRNA
4.459	4938	1107	Col1a2	Mus musculus procollagen, type I, alpha 2 (Col1a2), mRNA
4.419	1032	233	Smoc2	Mus musculus secreted modular calcium binding protein 2 (Smoc2), mRNA
4.229	11725	2772	Cbfa1	Mus musculus osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like) (Osf2-pending), mRNA
4.224	8938	2116	Col8a1	Mus musculus procollagen, type VIII, alpha 1 (Col8a1), mRNA
4.222	5365	1270	Gas6	Mus musculus, growth arrest specific 6, clone MGC:6124 IMAGE:3592398, mRNA
4.151	438	105	Prdc-pending	Mus musculus protein related to DAC and cerberus (Prdc-pending), mRNA
4.055	199	49	Agtr2	Mus musculus angiotensin II receptor, type 2 (Agtr2), mRNA
3.905	1439	368	X58196.1	Mus musculus H19 fetal liver mRNA (H19), mRNA
3.777	245	64	Emb	Mus musculus embigin (Emb), mRNA
3.754	340	90	Pdgfra	Mus musculus platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide (Pdgfra), mRNA
3.682	5310	1442	Igf2	Mus musculus insulin-like growth factor 2 (Igf2), mRNA
3.66	51452	14058	MGP	matrix gamma-carboxyglutamate (gla) protein, full insert sequence
3.579	1241	346	Col6a3	Mus musculus clone IMAGE:3486796
3.496	725	207	Pmp22	Mus musculus peripheral myelin protein, 22 kDa (Pmp22), mRNA
3.474	586	168	Nfib	Mus musculus nuclear factor I/B (Nfib), mRNA
3.429	1346	392	Pdgfrl	homolog to PDGF RECEPTOR BETA-LIKE TUMOR SUPPRESSOR, full insert sequence
3.421	976	285	Txnip	Mus musculus thioredoxin interacting protein (Txnip), mRNA
3.363	3264	970	Ramp2	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2, full insert sequence
3.345	431	128	Sepp1	Mus musculus selenoprotein P, plasma, 1 (Sepp1), mRNA
3.34	710	212	Sdf1	Mus musculus stromal cell derived factor 1 (Sdf1), transcript variant 1, mRNA
3.288	654	198	Serping1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, mRNA, complete cds
3.284	440	134	L0901D03-3	Homo sapiens similar to v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian), mRNA
3.203	216	67	Zac1	UNKNOWN: Similar to Mus musculus
3.049	290	95	Nedd4a	Mus musculus neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4a (Nedd4a), mRNA
3.005	4395	1462	Apoe	Mus musculus apolipoprotein E (Apoe), mRNA
2.949	9461	3207	Cst3	Mus musculus cystatin C (Cst3), mRNA
2.902	2703	931	Oxct	Mus musculus 3-oxoacid CoA transferase (Oxct), mRNA
2.886	4081	1414	U54984.1	Mus musculus matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted) (Mmp14), mRNA
2.881	159	55	Clu	Mus musculus clusterin (Clu), mRNA
2.878	694	241	Smoc1	Mus musculus secreted modular calcium binding protein 1 (Smoc1), mRNA
2.872	730	254	Col1a2	UNKNOWN: Similar to Mus musculus procollagen, type I, alpha 2 (Col1a2), mRNA
2.863	312	109	Pcsk5	Mus musculus, clone MGC:18501 IMAGE:4036159, mRNA, complete cds
2.857	3811	1334	Emp1	Mus musculus tumor-associated membrane protein (TMP) mRNA, complete cds
2.852	15989	5606	Osteonectin	Mus musculus secreted acidic cysteine rich glycoprotein (Sparc), mRNA
2.85	110	38	Agpt2	Mus musculus angiopoietin 2 (Agpt2), mRNA
2.842	503	177	A1413331	UNKNOWN: Similar to Homo sapiens LOC157935 (LOC157935), mRNA
2.838	3147	1109	A1115348	Mus musculus, clone IMAGE:5134400, mRNA, partial cds
2.827	1944	687	K0324A06-3	UNKNOWN: Similar to Homo sapiens integrin, alpha 11 (ITGA11), mRNA
2.826	2082	737	A1450948	UNKNOWN: Similar to Mouse DNA sequence from clone RP23-412P21 on chromosome 13
2.822	2423	859	D10Erd73e	UNKNOWN: Similar to Mus musculus clone MGC:38258 IMAGE:5324816
2.817	180	64	Nkd1	Mus musculus naked cuticle 1 homolog (Drosophila) (Nkd1), mRNA
2.812	394	140	Mdk	Mus musculus midkine (Mdk), mRNA
2.808	310	110	F2r	UNKNOWN: Similar to Mus musculus thrombin receptor (Cf2r) gene,
2.598	3086	1187	Rbbp7	Mus musculus, retinoblastoma binding protein 7, mRNA, complete cds
2.567	7253	2825	Igfbp4	Mus musculus clone MGC:29917 IMAGE:5123738
2.555	402	157	Rad21	Mus musculus RAD21 homolog (S. pombe) (Rad21), mRNA
2.553	1714	671	Rac1	Mus musculus, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
2.528	365	144	Col5a1	Mus musculus procollagen, type V, alpha 1 (Col5a1), mRNA

表 2 p57kip2 ノックアウトマウス由来初代培養骨芽細胞で  
発現が減少している遺伝子

0.101	-3.31	4	45	Dby	Mus musculus Yp BAC GSMB-187H15 (Genome Systems Mouse BAC Library)
0.107	-3.222	58	550	K0515B06-3	Similar to Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2060010
0.109	-3.199	34	318	p57Kip2	Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57) (Cdkn1c), mRNA
0.213	-2.229	109	514	Scgn10	Mus musculus superiorcervical ganglia, neural specific 10 (Scgn10), mRNA
0.261	-1.939	46	177	Eif2s3y	Mus musculus eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked (Eif2s3y), mRNA
0.263	-1.925	708	2691	Col2a1	Mus musculus alpha-1 type II collagen (Col2a-1) gene, exons 51 and 52 and partial cds
0.265	-1.916	26	100	H3022G12-3	UNKNOWN: Similar to S.pombe chromosome I cosmid c22H10
0.27	-1.889	23	85	Tnfrsf11b	Mus musculus mRNA for osteoclastogenesis inhibitory factor, complete cds
0.272	-1.88	114	421	L0824B04-3	UNKNOWN: Similar to Homo sapiens chromosome 15, clone RP11-673C5, complete sequence
0.36	-1.474	292	812	Dbnl	Mus musculus drebrin-like (Dbnl), mRNA
0.362	-1.464	99	274	J0416H11-3	UNKNOWN: Similar to Human DNA sequence from clone RP11-185K11 on chromosome 10, complete sequence [Homo sapiens]
0.367	-1.447	77	211	J0908H04-3	UNKNOWN: Similar to Human DNA sequence from clone RP11-396K16 on chromosome 6 Contains ESTs, STSs and GSSs. Contains a mitochondrial 16S rRNA (MTRNR2) pseudogene, complete sequence [Homo sapiens]
0.396	-1.338	70	178	J0248E12-3	UNKNOWN: Similar to Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930500F21:unclassifiable, full insert sequence
0.397	-1.334	100	253	J0426H03-3	UNKNOWN: Similar to Caenorhabditis elegans cosmid C09E7, complete sequence
0.399	-1.324	30	75	L0246D08-3	UNKNOWN: Similar to Humulus lupulus chs3 gene for chalcone synthase, complete cds
0.403	-1.31	18	45	Ctbp2	UNKNOWN: Similar to Mouse DNA sequence from clone RP23-47A2 on chromosome 13, complete sequence [Mus musculus]
0.413	-1.276	19	47	Rgs17	Mus musculus regulator of G-protein signaling 17 (Rgs17), mRNA
0.414	-1.274	15	36	Pbx2	Mus musculus pre B-cell leukemia transcription factor 2 (Pbx2), mRNA
0.414	-1.274	15	36	NM_009465.1	Mus musculus AXL receptor tyrosine kinase (Axl), mRNA
0.418	-1.26	17	41	L0834B03-3	UNKNOWN: Similar to Homo sapiens chromosome 8 clone PAC 87.1 map 8q24.1, complete sequence
0.424	-1.237	162	384	Elk3	Mus musculus, serum deprivation response, clone MGC:25726 IMAGE:3980310, mRNA, complete cds
0.426	-1.23	60	141	J0421D03-3	UNKNOWN: Similar to Homo sapiens 12q BAC RP11-611E13 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence
0.436	-1.197	18	42	K0248G09-3	Mus musculus, Similar to calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta, clone MGC:29431 IMAGE:3675224, mRNA, complete cds
0.445	-1.167	32	72	Pdlim1	Mus musculus PDZ and LIM domain 1 (elfin) (Pdlim1), mRNA
0.449	-1.156	53	118	K0337H07-3	Mus musculus procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (Plod2), mRNA
0.455	-1.137	18	40	Cirbp	Mus musculus cold inducible RNA binding protein (Cirbp), mRNA
0.457	-1.129	30	65	H3148G07-3	RIKEN full-length enriched library, clone:2810481G13:t-complex-associated testis expressed 3, full insert sequence
0.471	-1.086	2831	6010	Osteopontin	Mus musculus secreted phosphoprotein 1 (Spp1), mRNA



回骨量との相関が明らかになった sFRP4、そして関連する Kremen1 の骨芽細胞分化に伴う mRNA レベルでの発現変化に関して検討を行った。その結果 LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 はともに骨芽細胞で発

現しており、その発現量は培養開始、分化誘導後 11-15 日の間でピークを迎えることが明らかとなった (図 4)。

#### (4) 骨芽細胞におけるビタミン K 応答蛋白質の探索

骨芽細胞様細胞株 MG63 を ビタミン K<sub>2</sub> (MK-4) で処理し、二次元電気泳動を応用したプロテオーム解析を行った。その結果、発現量が減少する 2 つの蛋白質スポットが認められた (図 5)。このスポットは、銀染色および CBB 染色ともに減少が認められた。両スポットは約 23 kDa で pI 5 付近に隣接して存在しており、MALDI-TOF/MS による解析の結果、どちらも 70kDa の熱ショック蛋白

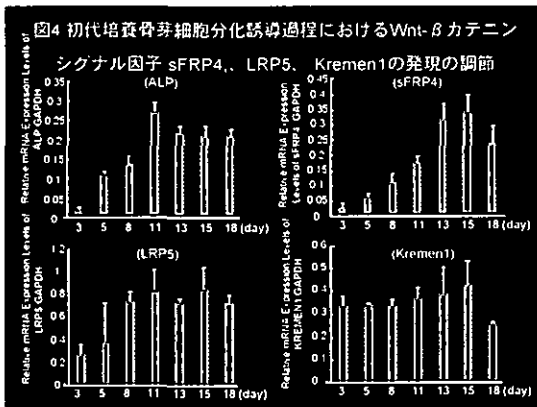


図4 初代培養骨芽細胞分化誘導過程におけるWnt-βカテニンシグナル因子 sFRP4、LRP5、Kremen1の発現の調節

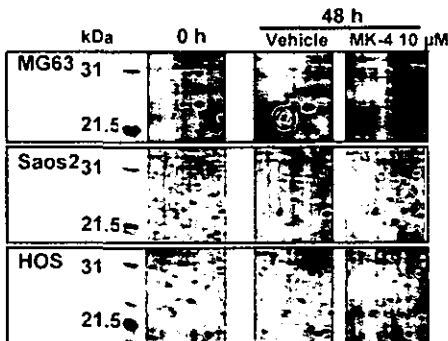


図5 ビタミンK2処理により骨芽細胞様細胞において発現量の変化をきたす蛋白質スポット

(Hsp70) ファミリーの一つである heat shock 70kDa protein 8 (heat shock cognate protein: Hsc70) のカルボキシル末端に相当する蛋白質であることが示された。Hsc70 自身の発現量の変化を調べるため、Hsp70/Hsc70 抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、Hsp70/Hsc70 の発現量が低下していることが示された (図6)。

(5) ビタミン K の骨芽細胞における作用におけるステロイド X 受容体(SXR)の役割

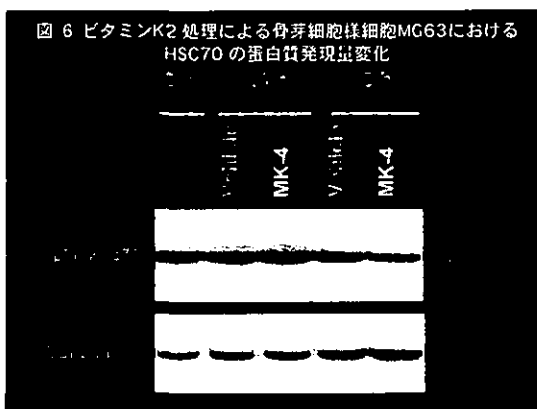


図6 ビタミンK2処理による骨芽細胞様細胞MG63におけるHSC70の蛋白質発現量変化

本年度に、ビタミン K の作用機構として核内受容体のひとつであるステロイド X 受容体(SXR)を介する転写活性化による予期せぬ新規メカニズムを明らかにした。大変興味深いことに、ビタミンKは、SXR にリガンドとして結合することができる (図7)。図8に示すように、レポー

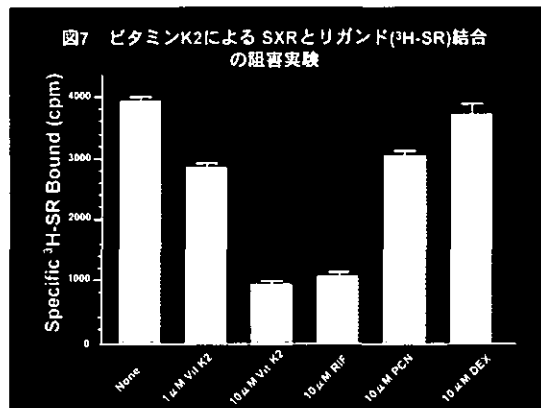


図7 ビタミンK2によるSXRとリガンド(3H-SR)結合の阻害実験

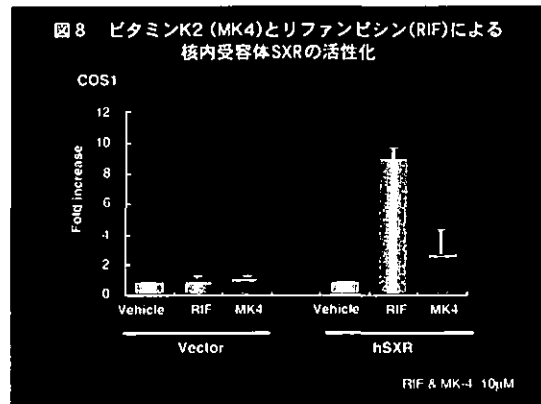
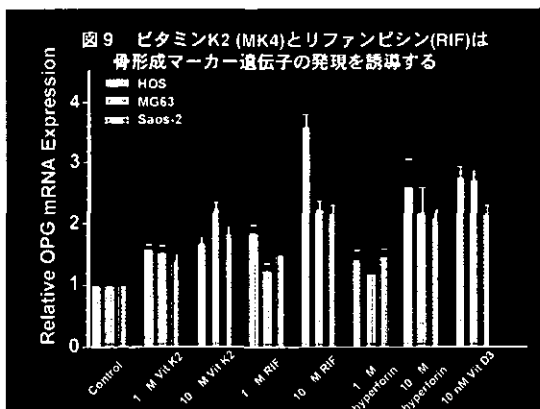
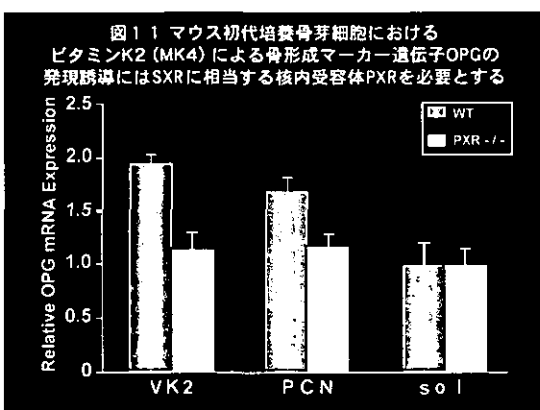
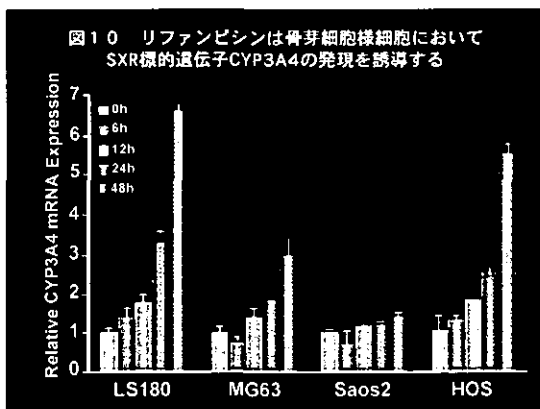


図8 ビタミンK2 (MK4)とリファンピシン(RIF)による核内受容体SXRの活性化

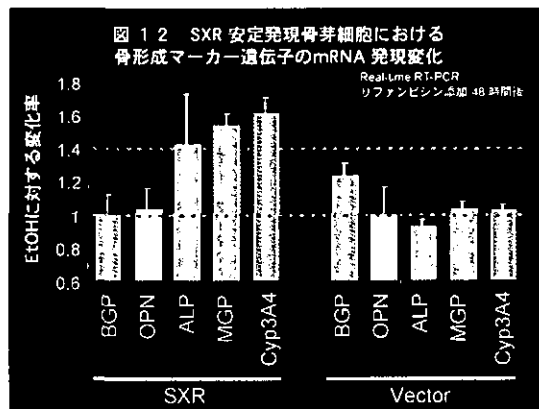
ターアッセイにより、SXR のリガンドであるリファンピシンおよび ビタミン K<sub>2</sub>(MK-4)により SXR の転写活性が上昇したことからビタミン K<sub>2</sub>(MK-4)が SXR を受容体として、下流応答遺伝子の発現を調節する機構が考えられた。骨芽細胞様細胞において、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)、オステオプロテジェリン(OPG)、MGP などの骨形成に関連するマーカー遺伝子がビタミン K により転写レベルで誘導される (図9)。一方で、SXR のリガンドとして知られるリファンピシンもこれらの骨形成マーカーを誘導するとともに(図9)、既知の標的遺伝子である CYP3A4 を骨の



細胞においても誘導することが明らかになった (図 10)。図 11 には、OPG の転



写レベルでの誘導にマウスにおいて SXR に相当する核内受容体 PXR が必須であることを示した。さらに、SXR の骨形成に対する作用を検討する目的で、SXR 安定発現細胞株を用いて Real-time RT-PCR 法により、骨形成マーカーの mRNA 発現を調べた (図 12)。この安定発現細胞株の系においても、ALP、MGP および Cyp3A4 の mRNA の発現が上昇していることから、ALP および MGP は



PXR の下流応答遺伝子として骨形成に関与していることが示唆された。

(6) エストロゲン新規受容体共役因子の同定と骨代謝における機能解析

FLAG タグを付けた full length エストロゲン受容体恒常発現株を 8 クローン樹立した。これらの細胞株のエストロゲン受容体の発現量は、核抽出液 1ml 当たり 0.1~1 μg 程度であり、これは、エストロゲン受容体陽性乳癌細胞株 MCF-7 と比較しておよそ 10 分の 1 の発現量であった。

次に、エストロゲン受容体恒常発現株の発現するエストロゲン受容体が機能的であるかどうかを調べるため、レポーターアッセイを行った。エストロゲン応答配列の下流に TATA box とルシフェラーゼ遺伝子を組み込みエストロゲン受容体恒常発現株にトランスフェクションした。その結果 8 クローンすべてでエストロゲン応答性を示し、おおよそ 10 倍の転写活性化が見られた。これにより、エストロゲン受容体恒常発現株が機能的なエストロゲン受容体を発現していることが確かめられた。

さらに、得られたエストロゲン受容体恒常発現株をエストロゲンもしくはタモキシフェン存在下で大量培養し、核抽出液を調製して転写共役因子複合体の精製を行った。当分担研究者は AF2 もしくは AF1 に結合する新しいエストロゲン受容体共役因子及び複合体を複数同定し報告している。その知見を活用して、現在複

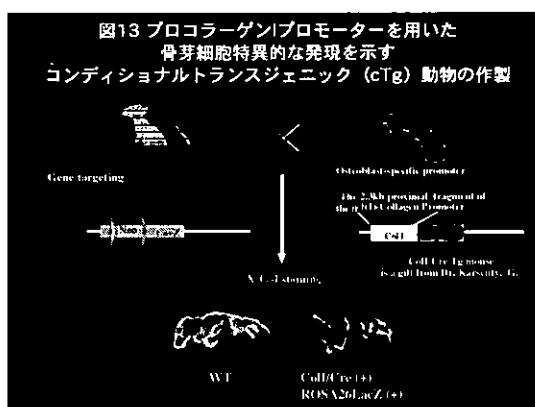
合体構成因子をウェスタンブロットティングと MALDI-TOF MASS を用いて解析中である。

(7) ビタミン K、エストロゲンシグナルの骨代謝における機能解析

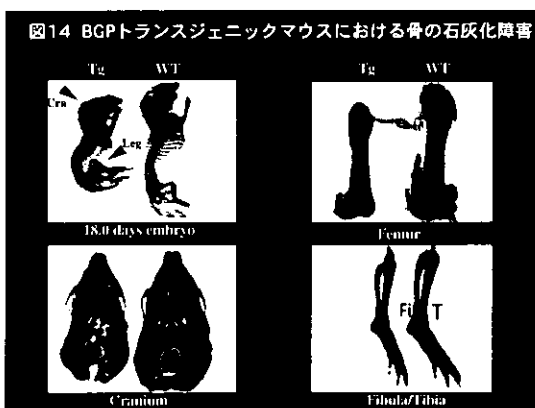
### 1. BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析

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、コンディショナルトランスジェニック (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のcTgマウスが得られた。BGP (Bone Gla Protein: Osteocalcin) は、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に骨形成の指標として臨床的に用いられている。BGP遺伝子のノックアウト (KO) マウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。また、BGPは名前の通りビタミンK依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクであり、プロセッシングおよびグラ化修飾を受けて本来の機能を発揮すると考えられる。最近の3次元の立体構造解析の結果から骨においてBGPは、ビタミンK依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化修飾を受けて、ヒドロキシアパタイトとカルシウムと強固に結合するモデルが報告された。

BGPの骨代謝における役割を検討するために、ヒト BGP cDNA を単離し、Cre/loxP系を利用して、コンディショナルに gain of function できる遺伝子改変マウスを作製した。Cre 処理前では、GFPをマーカー遺伝子として発現しており、Cre 処理後では GFP が除去され BGP が強制発現される系である。骨組織特異的に Cre を発現し BGP を強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して(図 13)、生体における BGP の骨代謝への作用について解析を行った結果、マウス胎生後期から軟骨組織において石



灰化の遅延する傾向が観察され、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた (図 14)。



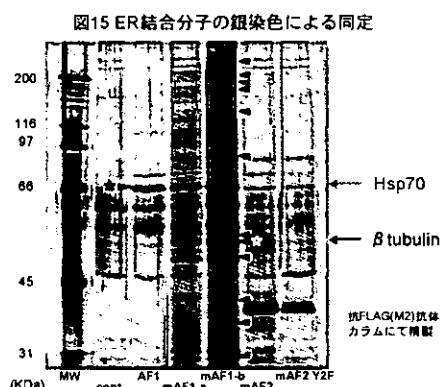
### 2. ER $\alpha$ および ER $\beta$ の生体内 Gain of function による骨機能の解析

エストロゲンは、女性ホルモンとして重要な生殖機能、生理機能を発揮する核内受容体 (ER $\alpha$ および ER $\beta$ ) を介するリガンドとして知られている。特に骨代謝においては、閉経後骨粗鬆症疾患の重要な因子として知られており、エストロゲンに関しては、リガンド非依存性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、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、および KO マウスを利用して骨特異的かつ特異的シグナルを付加・欠損したマウスを交配により得て、生体内でのエストロゲンシグナルを体系的とらえ骨代謝の作用について検討する。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。現在これらの遺伝子について遺伝子改変動物の作製および解析を行っている。

#### (8) エストロゲンの骨代謝における non-genomic 作用の解析

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おり、核外での作用についても即時的反応を示唆するデータは上がってきているものの、具体的なシグナル経路について多くは知られていない。2001年に Kousteni らは、骨の細胞におけるエトポシドによるアポトーシスが、エストロゲンやアンドロゲンにより抑制されるという現象において、受容体の膜への局在や即時的な細胞内シグナル伝達が関与していることを明らかにした。我々はこのデータに基づき、膜局在型のエストロゲンが伝えているシグナルを明らかにする目的で Flag タグと膜移行シグナルをもつエストロゲン受容体機能ドメイン (AF1 もしくは AF2) に Flag タグを付加した形で膜に発現するコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを用いて結合蛋白を精製する条件がうまく行くか知る目的で、同じように核外の作用が報告されている乳癌細胞 (MCF-7) に導入して安定発現株を樹立した後、大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白を精製した。図 15 に示す通り AF1 ドメインに結合する蛋白として Hsp-70 と  $\beta$  チューブリンの同定に成



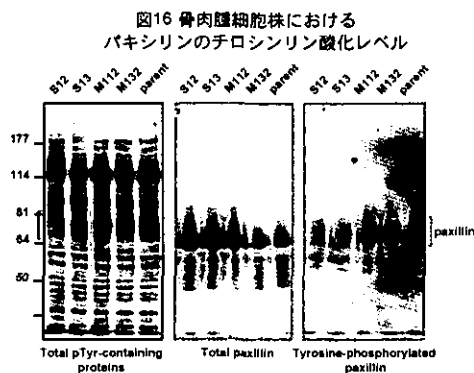
功した。そのうち  $\beta$  チューブリンは膜局在タイプの AF-2 に選択的に結合することが確かめられた。現在これら蛋白質の機能とエストロゲンの骨作用との関わりについて解析中である。

#### (9) チロシンリン酸化蛋白質の分離法の確立

刺激前後など2つの系で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、ウェ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。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。変性のステップを入れなくて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 に尿素による変性の操作を加えた後、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。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。

チロシンリン酸化蛋白質解析の手法の確認のため、最初に細胞の転移能の異なる同系の骨肉腫細胞株についてのチロシンリン酸化の相違を上記手法も使って解析した。転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質 (図 16 パネル左) は解析の結果パキシリンであった。パキシリンは発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた (図 16 パネル中央、右)。



またパキシリンと共に Src キナーゼの基質として知られる Cas 蛋白質もチロシンリン酸化の亢進した蛋白質としてリン酸化が亢進していた。これらの蛋白質は、破骨細胞機能などの制御因子としても Src とともに重要であり幾つかの方法で、骨における機能解析を進めている。

(10) 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 I  $\alpha$ 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。また広島大学の本田浩章先生と共同研究として、胎児致死性を回避し成体での解析を可能とする Cas のコンディショナルノックアウトマウスの作成も進んでおり、骨代謝における機能解析の道具として期待が持てる。

#### D. 考察

本研究において、骨における新規のエストロゲンの分子標的として、Keratin 19、KIAA0843、Tissue Transglutaminase が同定された。Keratin 19 は、中間径フィラ



メントの一種で、骨芽細胞骨格に対する影響が示唆される。また、KIAA0843 protein は、LIM ドメインと、F-actin との結合能をもつと考えられる VHP ドメインを有しており、actin binding LIM と似通った構造をしていることが認められた (図 2)。Actin binding LIM は、神経の軸索伸長の誘導に必要な因子であることが報告されている。この actin binding LIM と相同性の高い KIAA0843 が骨芽細胞において果たす役割に関し、特に細胞骨格、細胞形態の維持や変化に対する役割に対して注目し、機能解析を行っている。

Tissue Transglutaminase は、基質となるタンパクのグルタミン残基とリシン残基との架橋結合を触媒する酵素であり、これ以外にも細胞接着や、細胞内シグナル伝達に関与するという働きも有する。骨芽細胞においては Osteopontin、Bone Sialoprotein、Osteonectin、 $\alpha$  2-HS-glycoprotein といった非コラーゲン性タンパクを基質とすることが報告されており、骨基質タンパクの架橋による石灰化誘導に関わることが示唆される。これらをあわせ考えると、エストロゲンが骨芽細胞において Tissue Transglutaminase の発現を誘導し、細胞外骨基質タンパクの架橋とその後の石灰化促進に関わるという新しいエストロゲンの骨における作用メカニズムが考えられる。現在、Tissue Transglutaminase の骨芽細胞における生理的な役割に関して *in vitro* ならびにモデル動物を用いて検討を行っている。

ビタミン D 応答遺伝子である  $p57^{Kip2}$  に関しては、今回 loss of function の系を用いてその下流遺伝子を検討した。その解析により  $p57^{Kip2}$  ノックアウトマウスで発現が減少する遺伝子として Osteopontin が同定された。Osteopontin は前述したように骨芽細胞から分泌される蛋白であり骨形成に大きく関与する因子である。 $p57^{Kip2}$ 、オステオポンチンはともにビタミン D3 により発現誘導される遺伝子で

あることから、今回の結果はビタミン D3 による骨形成シグナルにおいて Osteopontin の発現制御は  $p57^{Kip2}$  を介して行われることが示唆されるものである。今後、ビタミン D レセプター、 $p57^{Kip2}$ 、Osteopontin ノックアウトマウス由来の骨芽細胞由来の RNA、タンパクを用いてビタミン D3/ $p57^{Kip2}$  /Osteopontin を介した骨形成シグナルに関する詳細を明らかにすることによりビタミン D 作用の新たな下流シグナル経路が明らかとなることが期待される。

Wnt- $\beta$ -catenin シグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LDL receptor-related protein 5(LRP5)遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は昨年度の研究報告書に示したように、LRP5 の一塩基置換遺伝子多型性(SNP)と骨量との関連について検討し、LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する一つの重要な遺伝子マーカーである可能性を示した。Wnt- $\beta$ -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt- $\beta$ -catenin シグナル伝達因子における SNP と骨量との関連について検討した。今回 sFRP4 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした。sFRP4 は、構造から Wnt のレセプターのデコイレセプターとして働くと考えられ、Wnt シグナルの抑制に関与することが示唆される遺伝子である。また Kremen1 は Wnt シグナルを負に制御する因子である DKK1 のレセプターとして働くことが示された因子である。近年、LRP5 の研究により Wnt- $\beta$ -catenin シグナルの骨形成における重要性が注目されるようになってきている

が、多数存在する Wnt- $\beta$ -catenin シグナル制御因子の中でどの因子が骨形成を制御しているのかという疑問に関しては LRP5 以外には未だ重要な因子は同定されていない。さらにこのシグナルが骨芽細胞成熟のどの段階において、機能しているかという問いに対してもその詳細は明らかにされていない現状である。今回の解析から sFRP4 や Kremen1 といった Wnt- $\beta$ -catenin シグナルを負に制御する因子が骨形成に関与している可能性が考えられる。またこれら因子が初代培養骨芽細胞の系において ALP の発現がピークをむかえる分化中期に一致して発現亢進していることから分化のステージによって Wnt- $\beta$ -catenin シグナルの活性が変化していることが示唆された。本研究による遺伝子多型による解析から Wnt- $\beta$ -catenin シグナル伝達因子には閉経後女性の骨量ならびに骨粗鬆症発症を規定する候補遺伝子が複数含まれていることが明らかになり、今後これら制御因子に関してさらなる検索を重ね、骨量を予測する遺伝子マーカー群を確立していく予定である。また、VDP、RIL、I-TRAF などの SNP と骨量の関連もゲノムワイドスクランの成果として明らかにし、研究発表の項目で示すように数多くの論文、学会にて報告している。

ビタミン K は蛋白修飾を引き起こす $\gamma$ -カルボキシラーゼの補酵素としての働きが知られている。したがって、ビタミン K 作用の標的因子を解明するためには、蛋白レベルでの解析が不可欠である。骨芽細胞におけるビタミン K の蛋白レベルでの分子標的を探索するために、二次元電気泳動法を応用したプロテオーム解析からビタミン K<sub>2</sub>(MK-4) 応答分子を明らかにした。同定された蛋白質スポットは Hsc70 のカルボキシル末端側に相当するおよそ 23 kDa の蛋白質であった。そのため、この蛋白質が Hsc70 の分解産物である可能性も考えられ、Hsc70 の

発現量に依存せずに増減している可能性も考えられた。しかし、ウエスタンブロットにおいても Hsp70/Hsc70 の発現量が減少していたことから Hsc70 自身の発現量が減少した結果、カルボキシル末端側の蛋白質も減少したことが示唆された。細胞の増殖過程において、Hsp70 は細胞周期の G<sub>1</sub> 期と S 期に発現が上昇することが報告されている。一方でビタミン K により細胞増殖が抑制されることから、ビタミン K 添加により細胞周期に変化が生じた結果、Hsc70 の発現量が異なった可能性も考えられる。今後、 $\gamma$ -カルボキシラーゼにより蛋白修飾を受ける因子を含め網羅的な標的因子を検索していく。

今回、ビタミン K の予想外の作用機構として、核内受容体 SXR を介する転写レベルでの新規作用メカニズムを明らかにした。その分子標的としては、ALP、OPN、OPG、MGP などの骨形成マーカーに関連する遺伝子が転写レベルで応答していることが判明した。このことから、SXR のリガンド、たとえば抗結核薬として普及しているリファンピシンをはじめとする各種薬剤、ビタミン K の比較検討から新しい骨粗鬆症治療薬を開発できる可能性を明らかにした。

加藤は、浮遊 HeLa 細胞より、エストロゲン受容体恒常発現株を樹立した。この細胞株はエストロゲン添加時に比ベタモキシフェン添加時にやや増殖抑制傾向を示したことから、およびレポーターアッセイの結果から、HeLa 細胞においてはタモキシフェンはアンタゴニストとして作用していると考えられる。現在までに複数のエストロゲン共役因子を新しく単離してきた実績を活用し、SERM 結合時のエストロゲン受容体転写共役因子複合体の構成因子を同定し、それらの因子の骨組織での発現量を検討することにより、SERM の骨組織におけるアゴニスト作用を解明する糸口が得られると思われる。

今後はこれら核内受容体および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解析を行う。既に Cre-loxP システムを用いることによりアンドロゲン受容体ノックアウトマウスの作製に成功しており、骨形成作用に対するアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体の関与について解析している。また、ビタミン D 受容体転写共役因子複合体の構成因子として同定したクロマチン修飾関連因子のノックアウトマウスの作製が進行中である。

また、ノックアウトマウスによる *in vivo* の解析と平行して、転写共役因子複合体の機能を *in vitro* で詳細に解析するために、クロマチン再構成系、リコンビナントヒストン作製系、*in vitro* 転写系などを精力的に進めており、核内受容体とその転写共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割を解明するための強力なツールになると思われる。

津久井は、ビタミン K、エストロゲンシグナルの骨における生体機能を明らかにする目的で各種遺伝子改変動物を作製した。

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。これは、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、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。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が重要となり、現在それらの作製が進行中である。

エストロゲンシグナルに関しては、骨代謝におけるシグナル特異性の検討、下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの骨代謝における作用の解析を中心に行い、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・解析を中心に行い、骨代謝におけるビタミン K の必要性やその作用機序を明確にすることにより、退行期骨粗鬆症の新しい創薬および治療法の開発の鍵を担うと考えられる。

堺は、主に蛋白質を標的として解析を進めてきており、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が、単なる発現解析から一歩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てきている。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 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、絶対量の少ない新規のシグナル伝達分子などは、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。その中でも量的に比較的豊富なチューブリンなどは現時点でも少量の試料から同定可能であることが今回示され、また質量分析の感度は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。刺激による細胞の分化や初代培養などのアプローチでから必要な蛋白質を得るにはかなりの労力を必要とするが、現在までの条件検討により挑戦しうる段階に来ていると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、sFRP4、LRP5、DBPをはじめとして 20 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、そのうちの数個の SNP は特に強力な相関を示し、診断学的価値が期待された。加えて、遺伝子改変動物、DNA チップとプロテオーム解析を活用し、骨粗鬆症治療薬であるエストロゲンならびにビタミン K、ビタミン D 作用経路の標的因子と、新しいシグナル経路を同定した。加藤は、エストロゲン受容体の新規共役因子複合体を明らかにし骨代謝、骨粗鬆症治療薬作用における意義を探るとともに、ノックアウト動物を用いてアンドロゲン受容体の骨代謝における役割を明らかにした。津久井は発生工学、疾患モデル動物を活用して、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、骨における病態を明らかにした。堺は、細胞内シグナル伝達の最先端の研究により、骨代謝における新規リン酸化シグナルを見出し、蛋白修飾の面から解析するとともに、エストロゲンの新しい non-genomic 作用機構を明らかにした。以上の研究で同定した新しい標的因子、シグナル経路、作用メカニズムは新しい骨粗鬆症の予防、診断、治療法の開発に役立てられる。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、その機能の解明を動物モデルとヒトにおいて生物個体レベルで行うことにより、基礎ならびに臨床医学的な研究を進めており、計画に従い順調な成果を得て、最終年度の研究への準備が整っている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

【英文原著】

1. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* (in press)
2. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* (in press)
3. Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function*. (Edited by Iuchi S, Kuldell N), Landes Bioscience, Georgetown, in press
4. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B: Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR. *J Biol Chem* 278, 43919-43917 (2003)
5. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M: Association of