

苦痛を与えないよう安眠死させた。

C. 研究結果

- 1) PTH および IL-11 は DEX およびエトポン
トで誘導されたアポトーシスをほぼ十分に抑
制した。
- 2) 1) の効果は用量依存性であった。
- 3) 1) の効果はERK依存性であった。
- 4) PTH の抗アポトーシス効果は転写阻害薬
によりブロックされたか、IL-11の効果は抑
制されなかった。
- 5) DEX は bcl-2 の発現を抑制したか、PTH
および IL-11 はこの抑制を解除した。
- 6) PTH の効果は IL-11 の中和抗体により一
部抑制された。
- 7) DEX は IL-11 の発現を転写レベルで強力
に抑制した。
- 8) PTH は IL-11 の転写を AP-1 依存性に促進
した。
- 9) PTH は Smad1 を活性化した。
- 10) この効果は PKC 抑制薬で抑制されたこと
から、PKC に依存していると考えられた。
しかし BMP-2 による Smad1/5 の活性化は
PKC 抑制薬により影響を受けなかった。
- 11) AP-1 転写因子の一つで in vivo で骨形成促
進能を有する delta-fosB は、Smad1 と協調
的に IL-11 遺伝子の転写を促進した。

D. 考 察

PTH の骨形成促進作用には骨芽細胞に対す
る抗アポトーシス作用が関与していることが示
唆された。この PTH の作用は ERK 依存性で、
転写を必要とし、一部は IL-11 の発現促進を介
するものと考えられた。また、PTH によるア
ポトーシスの抑制には bcl-2 発現の促進が関与

している可能性が考えられた。PTH は IL-11
を in vitro および in vivo で誘導し、DEX はこ
れを強力に抑制することから、PTH の骨形成
促進作用およびクルコルチコイトによる骨形
成抑制作用には IL-11 が関与している可能性か
ある。

一方、骨形成誘導因子 BMP-2 のシグナルを
媒介する Smad1/5 は生理的な骨形成におい
ても重要な役割を果たすと考えられている。
PTH は BMP-2 非依存性に Smad1/5 を活性化
し得ることが示された。Smad1/5 そのものの
骨形成促進作用からも、この新たに見いだされ
たシグナル伝達経路の重要性が示唆されるか、
Smad1/5 は AP-1 と協調的にも作用することか
ら、IL-11 を含む骨における AP-1 標的遺伝子
による骨形成の制御に大きな役割を果たしてい
る可能性がある。

E 結 論

PTH は AP-1 転写因子を誘導する一方、
BMP 非依存性に Smad1/5 を活性化することか
明らかとなった。さらにその下流では IL-11 の
発現促進を介して骨芽細胞のアポトーシスが抑
制される。AP-1 および Smad 転写因子は協調
的に IL-11 などの標的遺伝子の転写を促進す
ると考えられ、PTH の骨作用を媒介するのみ
ならず骨の PTH 反応性をも規定している可能性
がある。

F 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

1 Kido S, Inoue D, Hiura K, Javier W, Ito Y and
Matsumoto T Expression of RANK is

Dependent upon Differentiation into the Macrophage/Osteoclast Lineage Induction by 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 and TPA in a Human Myelomonocytic Cell Line, HL60 BONE 32(6) 621-629, 2003

2 Tohjima, E, Inoue, D, Yamamoto, N, Kido, S, Ito, Y, Kato, S, Takeuchi, Y, Fukumoto, S, and Matsumoto, T Decreased AP-1 Activity and Interleukin-11 Expression by Bone Marrow Stromal Cells May be Associated with Impaired Bone Formation in Aged Mice J Bone Miner Res 18(8) 1461-1470, 2003

3 Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, and Matsumoto T Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors Endocrinology 144 (12) 5138-5144, 2003

4 Iuchi, T, Akaike, M, Mitsui, T, Ohshima, Y, Shintani, Y, Azuma, H, Matsumoto, T Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction Circ Res 92 81-87, 2003

5 Kitagawa, H, Fujiki, R, Yoshimura, K,

Mezaki, Y, Uematsu, Y, Matsui, D, Ogawa, S, Unno, K, Okubo, M, Tokita, A, Nakagawa, T, Ito, T, Ishimi, Y, Nagasawa, H, Matsumoto, T, Yanagisawa, J, Kato, S The Chromatin-Remodeling Complex WINAC Targets a Nuclear Receptor to Promoters and Is Impaired in Williams Syndrome Cell 113 905-917, 2003

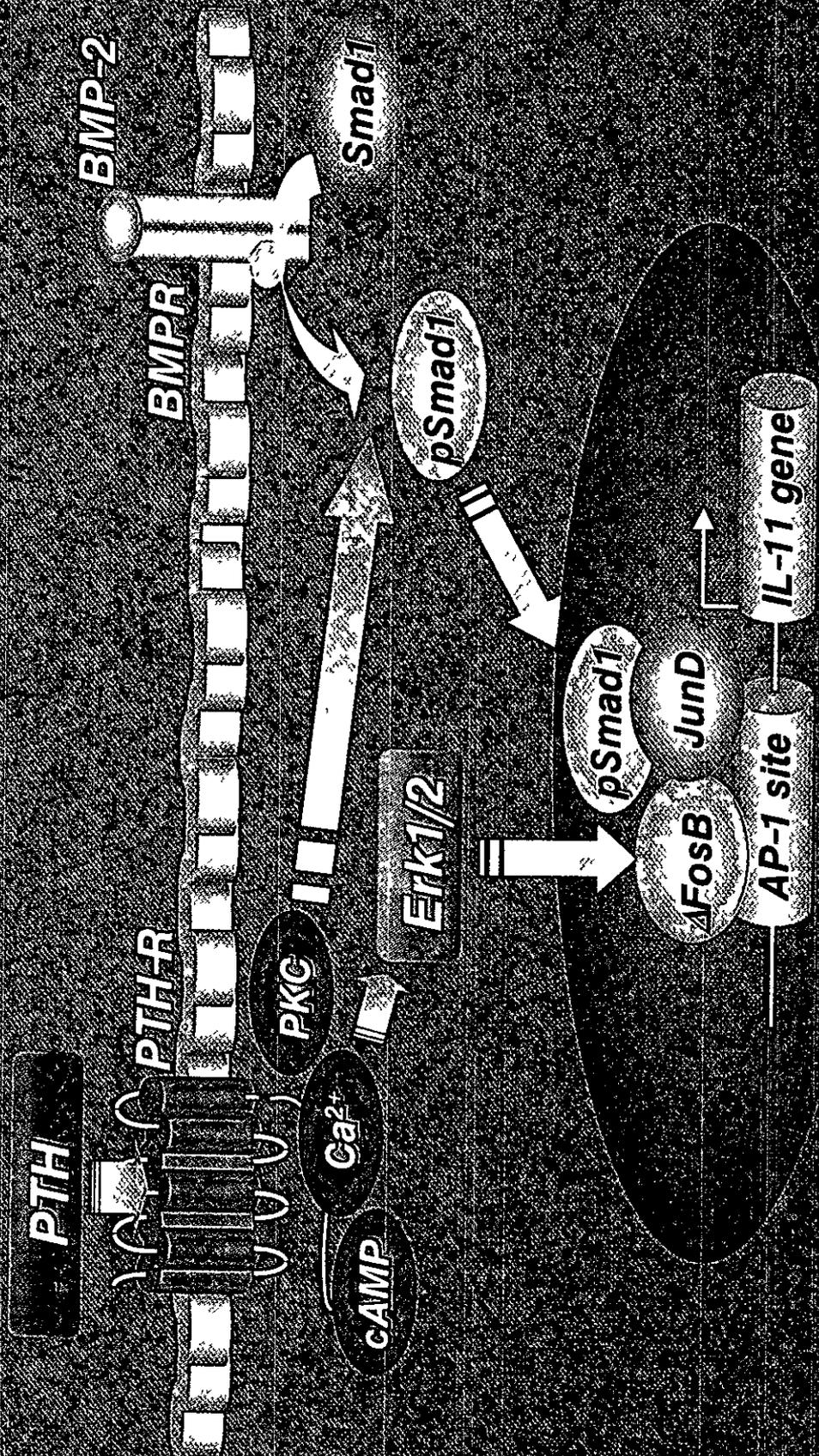
6 Toshihiro Hashimoto, Masahiro Abe, Takashi Oshima, Hironobu Shibata, Shuji Ozaki, Daisuke Inoue and Toshio Matsumoto Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 α correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma Br J Haematol 125 38-41, 2004

7 Inoue D and Matsumoto T Reduced AP-1 Mediated Transcription of Interleukin-11 Gene in Marrow Stromal Cells As a Mechanism of Senile Osteoporosis Lessons from SAMP6 Proceedings of the 2nd International conference on Senescence The SAM Model International Congress Series (Elsevier)1260 61-65, 2004

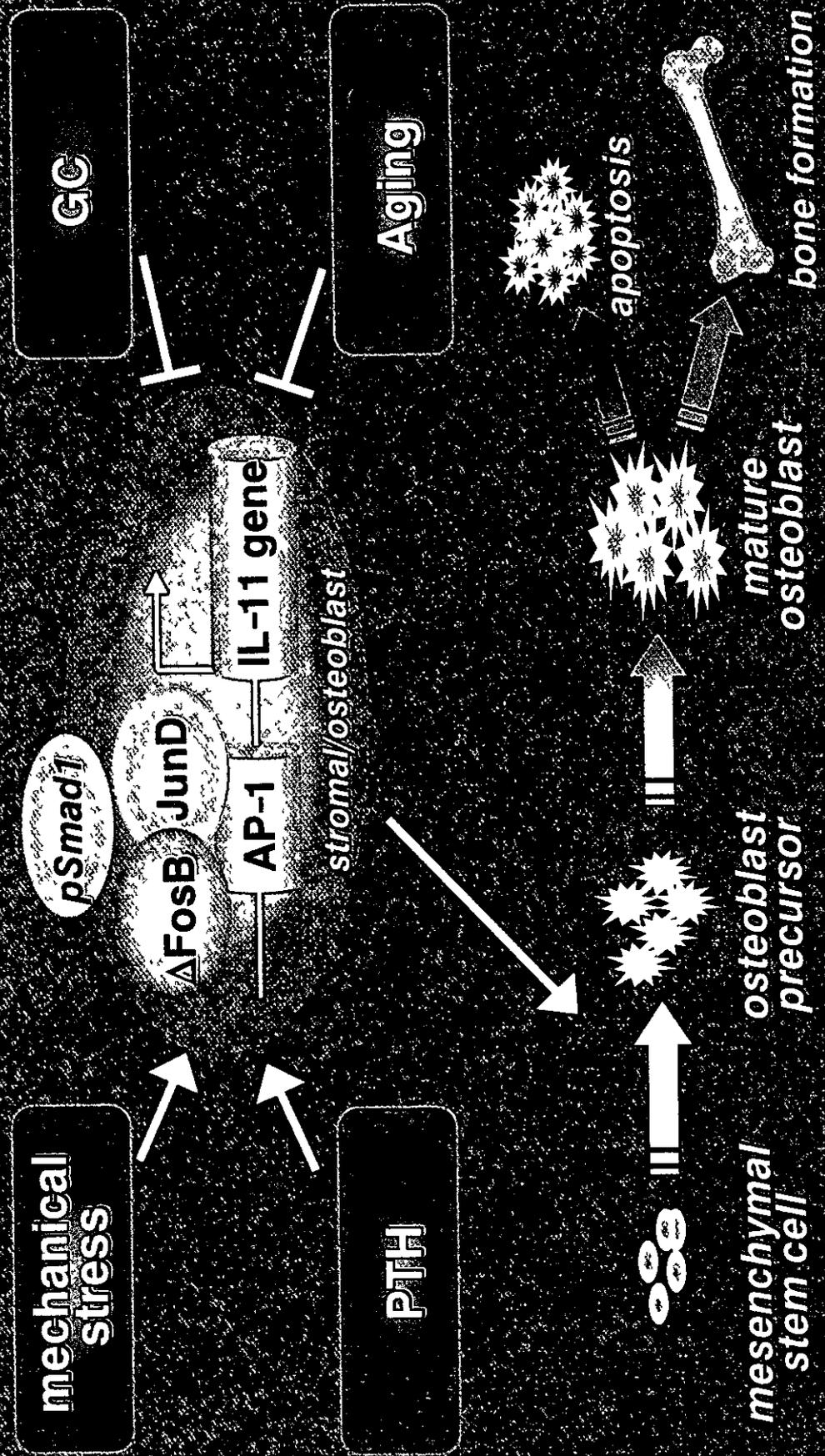
H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

PTHによるBMP非依存性のSmad1の活性化および
 そのAP-1との協調作用によるIL-11転写の促進



骨形成におけるAP-1/IL-11カスケードの役割



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

副甲状腺と骨におけるカルシウム感知受容体の受容機構と役割に関する研究

研究協力者 杉本 利嗣 神戸大学大学院医学系研究科内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科 助教授
共同研究者 山内 美香 神戸大学大学院医学系研究科内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科
共同研究者 山口 徹 神戸大学大学院医学系研究科内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科

研究要旨

副甲状腺と骨におけるカルシウム感知受容体 (CaR) の受容機構と役割の研究として、CaSR の副甲状腺細胞増殖調節への関与と、骨芽細胞分化における CaSR の役割について検討した。原発性副甲状腺機能亢進症 (pHPT) 例の副甲状腺においても続発性と同様に CaSR 発現と増殖能は高い負の相関を示し、CaSR が副甲状腺細胞増殖の調節に関与することか示された。また骨芽細胞に CaSR のアンチセンス (AS) やトミナントネカティブ (DN) ヘクターを導入した検討で、ALP活性、osteocalcin発現、および石灰化能が AS 株、DN 株で低下していた。これらのことから CaSR の役割は骨芽細胞の分化段階で異なり、主に分化後期に作用することで石灰化能に関与することか示唆された。

A. 研究目的

カルシウム感知受容体 (CaSR) agonist および antagonist は様々なカルシウム代謝異常症に対する治療薬として研究、開発が進められている。その臨床応用にあたり各組織での CaSR の受容機構と役割を明らかにすることが必要である。今回、我々は副甲状腺と骨における CaSR の役割について検討した。CaSR の副甲状腺細胞増殖調節への関与と、骨芽細胞分化における CaSR の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

原発性副甲状腺機能亢進症 (pHPT) 例と正常コントロールとして甲状腺癌症例について同意を得た上、手術で摘出した副甲状腺組織を用いて CaSR と増殖能の関係の検討を行った。

CaSR、ビタミンD 受容体 (VDR)、Ki67 の免疫染色を行いそれぞれの発現を定量化した。また、ヒト副甲状腺培養細胞を用いて副甲状腺細胞増殖への Ca、CaSR agonist、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の影響を検討した。一方、骨芽細胞での検討として、MC3T3-E1 マウス骨芽細胞様細胞を用いた。マウス CaSR の翻訳開始点の 5bp 上流からの 324bp を、pcDNA3 ヘクターに逆方向に組み込み、CaSR アンチセンス (AS) ヘクターを得た。また、ヒト CaSR の不活性型変異トミナントネカティブ効果か証明されている R185Q 変異を有した CaSR トミナントネカティブ (DN) ヘクターを用いた。MC3T3-E1 細胞にヘクターのみ、AS ヘクターあるいは DN ヘクターを transfection し恒常的発現株を作成した。ALP 活性は ALP 染色で、石灰化能は Alizarin Red

法と von Kossa 法にて検討した。加えて、I 型 collagen (COL1)、osteopontin (OPN)、osteocalcin (OCN) の発現を Northern Blot 法、及び RT-PCR 法にて検討した。

C 研究結果

副甲状腺組織所見では Ki67 染色による増殖能が正常に比し pHPT で有意に亢進し、CaSR と VDR の発現は pHPT で有意に低下していた。増殖能は血中 Ca、intact PTH、アルカリフォスファターゼ、摘出腺重量といった疾患重症度を示す指標と高い正の相関を有した。CaSR と VDR 発現は増殖能と強い負の相関を有した。Ca、CaSR agonist は 1, 25(OH)₂D₃ と比較してもより強い増殖抑制効果を示した。

骨芽細胞による検討では AS 株と DN 株はいずれもコントロール株と比較して ALP 活性の低下を認めた。AS ヘクターと DN ヘクターを一過性に transfection したときの ALP 活性は濃度依存性に抑制された。また、骨基質蛋白のうち COL1、OPN の発現に明らかな差を認めなかったが、骨芽細胞分化の後期に発現する OCN はコントロール株と比較して AS 株と DN 株で著明な発現の低下を認めた。Alizarin Red 法と von Kossa 法による石灰化能はいずれの株もコントロール株に比し低下を認めた。

D. 考 察

CaSR の副甲状腺細胞増殖調節への関与についてこれまでに我々は腎不全患者における続発性副甲状腺機能亢進症や家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (FHH) 例の検討から、ヒト副甲状腺において CaSR が細胞増殖の調節に重要な役割を担っていることを示してきた。今回 pHPT 患者副甲状腺でも同様に CaSR 発現

低下が副甲状腺細胞増殖亢進に関与することを示した。CaSR agonist は PTH 分泌を抑制するのみならず、副甲状腺の腫瘍性疾患に対する細胞増殖抑制作用を有することが示唆され、臨床応用の可能性が考えられた。一方、骨芽細胞において CaSR 発現が細胞増殖や化学走化性に関与することを示してきたが、今回の検討から骨芽細胞の分化段階で CaSR の役割が異なる可能性があり、CaSR は骨芽細胞の主に分化後期に作用しその石灰化能に重要である可能性が示唆された。これまでに CaSR agonist を腎不全ラットに投与すると海綿骨量の上昇を認めたとの報告があり、この原因として PTH の oscillation が anabolic 作用に関与している可能性が示唆されているか、今回の結果からこれに加えて CaSR agonist が骨芽細胞に直接作用し骨形成に働く可能性も示唆された。CaSR agonist や antagonist の臨床応用にあたり各組織への影響を明らかにするという点において、骨については CaSR agonist は骨石灰化に関して少なくとも悪影響は及ぼさないことが示された。

E. 結 論

pHPT 症例の副甲状腺においても CaSR の発現が副甲状腺細胞増殖の調節に関与することが示唆された。また骨芽細胞における CaSR の役割は分化段階で異なり、主に分化後期に作用することによって石灰化能に関与する。

F. 研究危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Chihara

K, Kobayashi A, Kitazawa S, Maeda S, Kitazawa S Decrease in vitamin D receptor and calcium-sensing receptor in highly proliferative parathyroid adenomas Eur J Endocrinol 148, 403-411, 2003

2 学会発表

Yamauchi M, Yamaguchi T, Sowa H, Yano S, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K The

extracellular calcium-sensing receptor (CaR) is indispensable for expression of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) as well as mineralization in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells J Bone Miner Res 18, S289, 2003 Twenty-fifth annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Minneapolis)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

骨・カルシウム代謝異常症の病因、病態の解明

分担研究者 福本 誠二 東京大学医学部附属病院検査部 講師

研究要旨

Fibroblast growth factor(FGF)-23 は Arg179 と Ser180 の間でプロセッシングを受ける。そこでプロセッシングを受けていない全長 FGF-23 のみを測定する ELISA と、全長 FGF-23 と共にプロセッシングを受けた C 端フラグメントも測定すると考えられる ELISA により、血中 FGF-23 濃度を測定した。X 染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia XLH) 患者の血中 FGF-23 は、どちらの ELISA でも高値を示すものか多かった。ただしこれらの測定値の比は、XLH 患者と腫瘍性くる病/骨軟化症患者でことならなかった。これらの結果は、XLH 患者において FGF-23 蛋白のプロセッシングには異常は存在しないこと、一方 FGF-23 は XLH の発症にも重要な役割を果たしていることを示唆している。

A. 研究目的

X 染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia XLH)、常染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia ADHR)、および腫瘍性くる病/骨軟化症 (tumor-induced rickets/osteomalacia TIO) は、いずれも尿細管リン再吸収障害による低リン血症を特徴とする類似疾患である。このうち、ADHR の原因遺伝子として fibroblast growth factor(FGF)-23 がクローニングされ、TIO においても FGF-23 の高値が報告された。しかし、ビタミン D 抵抗性くる病/骨軟化症の中で最も頻度の高い XLH の発症機序には不明な点が残されている。そこで XLH の発症における FGF-23 の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

FGF-23 蛋白は、Arg179 と Ser180 の間でプロセッシングを受けることが明らかにされている。そこで、このプロセッシングを受けていない全長 FGF-23 を測定する ELISA (全長 ELISA) と、全長 FGF-23 と共にプロセッシングを受けた C 端フラグメントも測定すると考えられる ELISA (C 端 ELISA) の 2 種類の測定系を用い、血中 FGF-23 濃度を測定した。

C. 研究結果

全長 ELISA でも C 端 ELISA でも、XLH 患者の FGF-23 濃度は高値を示すものか多かった。ただし、血中 FGF-23 濃度が基準値上限を越える割合は、C 端 ELISA に比較し全長 ELISA のほうが多かった。さらに C 端 ELISA と全長 ELISA の測定値の比は、XLH 患者と TIO 患者では、異ならなかった。

D. 考 察

XLH の原因遺伝子として、ホソシヨナルクローニンクにより phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (PHEX) が同定されている。PHEX 遺伝子産物はエントペプチターズファミリーに属すると考えられたことから、PHEX が FGF-23 蛋白のプロセッシングを媒介し、PHEX 遺伝子に変異を有する XLH 患者では FGF-23 のプロセッシングが障害されるとの仮説が提唱されてきた。しかし本検討では、XLH 患者の多くで FGF-23 は高値を示したものの、C 端 ELISA と全長 ELISA の比は TIO 患者と異ならなかったことから、XLH 患者で FGF-23 蛋白のプロセッシングには異常は存在しないものと考えられた。

E. 結 論

XLH 患者では、FGF-23 蛋白のプロセッシングには異常はない。しかし XLH の発症においても、FGF-23 は重要な役割を果たしている可能性がある。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1) Chikatsu N et al A family of autosomal dominant hypocalcemia with an activating mutation of calcium-sensing receptor gene

Endocr J 50(1) 91-96, 2003

2) Fukumoto S et al Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia N Engl J Med 349(5) 505, 2003

3) Nakayama K et al Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells J Bone Miner Res 18(5) 827-835, 2003

4) Watanabe S et al Decrease in serum leptin by troglitazone is associated with preventing bone loss in type 2 diabetic patients J Bone Miner Metab 21(3) 166-171, 2003

2 学会発表

1) Fukumoto S The physiological and pathophysiological roles of FGF-23 in phosphate and bone metabolism 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (Osaka, Japan)

2) Fukumoto S et al Venous sampling for FGF-23 confirms the diagnosis of and locates the responsible tumor for tumor-induced osteomalacia (TIO) International Conference on Metabolic Bone Disease (Coomer, Australia)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ビタミンDの骨に対する直接作用に関する研究

分担研究者 田中 弘之 岡山大学大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨

1,25dihydroxyvitamin D₃ (1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考え、VDRKO骨の野生型マウスへの移植実験を行い、1,25の骨に対する直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制であることを示してきた。今年度は胎仔期の骨の骨発生の解析を行い、1,25の骨に対する直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制であることが明らかになった。さらに、この過程に関与するrunx2遺伝子発現調節についても検討した。

A. 研究目的

1,25dihydroxyvitamin D₃(1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。即ち、VDRKO マウスは出生直後に骨になんら異常を示さないこと、離乳以降重症のくる病を発症するか、これは食餌中のCaやPiを調節することによって、血清Ca、Piの正常化とともに正常化することなどから、骨病変はVDRKOによって生じたミネラル調節の異常か原因であると考えられるからである。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考え、VDRKO骨の野生型マウスへの移植実験を行ってきた。この結果、組織学的に異常を示さない生後2週 of VDRKO 骨を野生型に移植すると、VDRKO骨は野生型の骨を野生型マウスに移植した場合よりも著しい骨量の増加を示した。この間一貫してKO骨と野生型骨で差を認めた遺伝子はrunx2遺伝子であり、これらのことより1,25は

骨においてrunx2を負に制御することによって、骨形成を負に調節していることが示唆された。この結論をさらに裏付ける目的で今年度は、①体液中のミネラル異常の影響を木た受けていないと考えられる新生仔頭蓋冠の器官培養②胎仔期の骨発生について骨格標本の検討③runx2遺伝子の5'プロモーター領域の解析を行った。

B. 研究方法

当施設で系統維持を行っているヘテロのVDRKO同士の交配を行い vaginal plug 確認日を day 0として、20dpcの新生仔より頭蓋冠を摘出し、アカロースケルを用いた三次元器官培養をKasentyらの方法に準しおこなった。また、13.5から17.5の各dpcで妊娠マウスより同腹のKO及びWildの胎仔骨格標本を作製し、骨形成の比較を行った。遺伝子型は肝組織より抽出したDNAを鋳型に既報の方法でタイピングした。

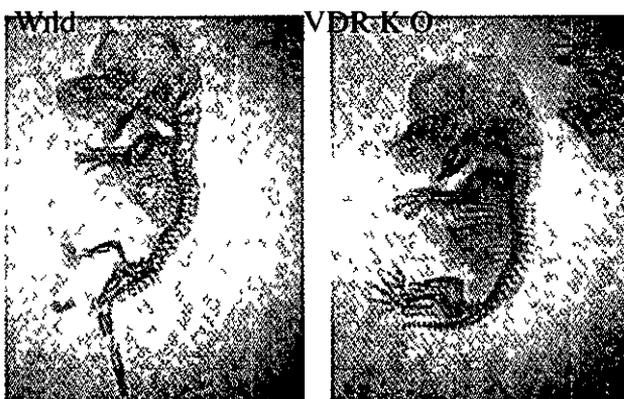
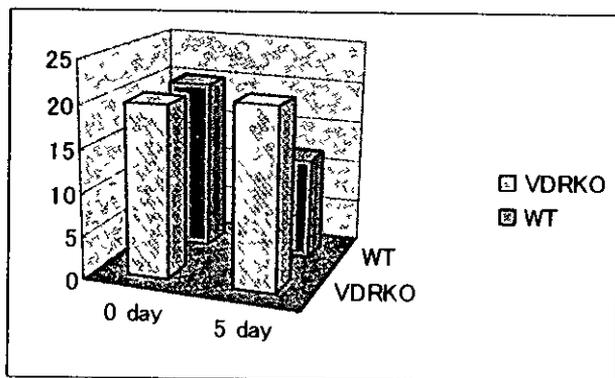
pGL3 basic vector にマウス runx2 遺伝子の

上流の約4.6kbを組み込んだレポーターヘクターを作製した(-4579~-8 pGL3.4.6)。これをもとに5'側から様々な長さの塩基を削除した Truncation mutant を作製した。また、転写開始コトンの近傍に位置する DR3 配列 (AGTACTGTGAGGTCA -98~-84) に変異を加えた mutant (DR3 mutant) を作製した。これらのコンストラクトを用いヒタミンDの転写活性に対する効果を luciferase 活性で検討した。

C. 研究結果

① 出生直後の頭蓋冠の定量的解析と器官培養

培養後の頭頂骨は KO では厚さに変化が認められなかった ($20 \pm 1 \rightarrow 21 \pm 2 \mu\text{m}$) 一方、Wild では培養前より厚さが減少していた。 ($20 \pm 2 \rightarrow 12 \pm 2 \mu\text{m}$) また、破骨細胞数は両者間で有意な差はなかった。



② 骨格標本における検討

この頭頂骨厚の減少が D₃ の膜性骨形成抑制効果によるものか否か検討するため胎児骨格標本を作製した。その結果、13.5 dpc で KO の頭頂骨及び上、下顎骨のアリサリンレノトによる染色域は WT より広く、ヘテロではその中間型を示した。

③ runx2 のプロモーター活性の検討

Runx2 遺伝子の転写活性は転写開始点近傍に位置する DR3 配列を削除することによって失われた。

転写開始点からプロモーター領域約1.8kb までをサブクローニングしたコンストラクトでは VD3 により転写活性の抑制は認められなかったが、1.9kb をサブクローニングしたコンストラクトで初めて転写活性の抑制が認められるようになった。またこれらのコンストラクトの DR3mutant では抑制作用の増強を認めた。

D. 考 察

1,25-dihydroxyvitamin D₃ の VDR を介した骨に対する作用は体液中の Ca、リン濃度の影響を受けるため、通常の KO マウスの骨所見からは断定的なことはいいがたい。この欠点を克服するために、① VDR 欠損骨の正常個体への移植②器官培養を行ってきた。この結果は 1,25-dihydroxyvitamin D₃ の膜性骨化抑制効果を示唆するものであった。今回はさらに Ca、リン濃度、副甲状腺ホルモン濃度に差を認めない胎仔期の骨を中心に検討を加えた。この結果、1,25-dihydroxyvitamin D₃ は骨の石灰化のタイミングを制御している可能性を示すものであった。1,25-dihydroxyvitamin D₃ は少なくとも胃芽細胞の初期分化を直接抑制すると考えられ

た。一方、その作用に介在する runx2 の 1,25-dihydroxyvitamin D₃ による抑制の分子メカニスムについては、他の 1,25-dihydroxyvitamin D₃ により抑制を受ける遺伝子発現とは異なり、プロモーター上には正負の調節領域が存在することが示唆された。

E. 結 論

1,25-dihydroxyvitamin D₃ の VDR を介した骨に対する直接作用は骨芽細胞の分化の抑制である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1 論文発表

1 Yamanaka Y, Tanaka H, Koike M, Nishimura R, Seino Y PTHrP Rescues ATDC5 Cells from Apoptosis Induced by FGF Receptor 3 Mutation J Bone Miner Res 18 1395-1403, 2003

2 Yamashita N, Tanaka H, Moriwake T, Nishiuchi R, Oda M, Seino Y Analysis of linear growth in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia J Bone Miner Metab 21 172-178, 2003

3 Kanazawa H, Tanaka H, Inoue M, Yamanaka Y, Namba N, Seino Y Efficacy of growth hormone therapy on patients with skeletal dysplasia J Bone Miner Metab 21 307-310, 2003

4 H Tanaka Growth hormone treatment in achondroplasia Clin Pediatr Endocrinol 12 (Suppl 20) 19-22, 2003

5 Koike M, Yamanaka Y, Inoue M, Tanaka H, Nishimura R, Seino Y Insulin-like growth

factor-1 (IGF-1) rescues the mutated FGF receptor 3 (G380R) expressing ATDC5 cells from apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase J Bone Miner Res 18 2043-51, 2003

6 Ogawa M, Moriya N, Ikeda H, Tanae A, Tanaka T, Ohyama K, Mori O, Yazawa T, Fujita K, Seino Y, Kubo T, Tanaka H, Nishi Y, Yoshimoto M Clinical evaluation of recombinant human growth hormone in Noonan syndrome Endocrine J 51 61-68, 2004

7 Tanaka H, Seino Y Direct action of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone, VDRKO bone shows excessive bone formation in normal mineral condition J Steroid Biochem Mol Biol (in press)

8 Y Ichinose, H Tanaka, M Inoue, S Mochizuki, E Tsuda, Y Seino Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin Reduced Bone Loss Induced By Mechanical Unloading Calcif Tissue Int (in press)

2 学会発表

H Tanaka, N Inoue, K Kinuta, S Kato, Y Seino VITAMIN D SUPPRESSES PERIOSTEAL BONE FORMATION THROUGH SUPPRESSING RUNX2 GENE EXPRESSION the 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR)

N Inoue, H Tanaka, K Hasegawa, M Inoue, S Kato, Y Seino VITAMIN D RECEPTOR NULL BONE SHOWS HIGHER PERIOSTEAL BONE FORMATION the 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS)

and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR)

H. Tanaka, Y Seino DIRECT ACTION OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ON BONE, VDRKO BONE SHOWS EXCESSIVE BONE FORMATION IN NORMAL MINERAL CONDITION 12th Workshop on Vitamin D Maastricht, Netherland July/2003

K Hasegawa, H Tokumaru, H. Tanaka, Y Seino 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D3 SUPPRESSES RUNX2/ CBFA1 GENE PROMOTOR ACTIVITY, BUT NOT VIA VDRE 12th

Workshop on Vitamin D Maastricht, Netherland July/2003

K Ueda, Y Yamanaka, E Yamagami, D Harada, Y Seino, H. Tanaka Parathyroid Hormone Rescues Disturbed Bone Growth Induced by Mutated FGFR3 25th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research Minneapolis, MN, USA 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ビタミンD受容体の骨組織における高次機能に関する研究

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

本研究では、カルシウムの間接的作用のない骨芽細胞特異的にVDR遺伝子を欠損するマウスを作出することでビタミンDの骨芽細胞を介した骨へのビタミンD直接作用の検証を試みた。我々はVDRを介したビタミンD作用は単にカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞のVDRが骨吸収と骨形成の両面から骨代謝の制御に直接関与していることを明らかにした。

A 研究目的

ビタミンDは古くから骨代謝、骨形成の主要調節因子として知られてきたか、他にカルシウム代謝調節や細胞の増殖抑制・分化誘導を調節することも証明されている。一般にこれらのビタミンD作用は活性型の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がカルシトニン依存性の転写調節因子であるビタミンD受容体(VDR)に結合し、標的遺伝子の転写を制御することによって発揮される。これまでに吉澤らはVDRの生体内での高次機能を解明するため、VDR遺伝子欠損(KO)マウス(Conventional-VDRKO)を作製した。Conventional-VDRKOマウスは成長障害、低カルシウム・低リン血症、高PTH血症、血清 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の著しい増加、骨量減少および脱毛といった典型的なクル病症状を離乳後に示した。しかしConventional-VDRKOマウスの骨で観察された骨量減少は低カルシウム・低リン血症を伴うPTH過剰産生状態(二次性副甲状腺機能亢進症)によって間接的に引き起こされた可能性が否定できなかった。このようにビタミンDが

血中カルシウム代謝を介し少なくとも間接的に骨代謝を制御することは明らかにすることかてきたか、ビタミンDの骨細胞の増殖分化への直接作用の可能性は証明することができなかった。そこで本研究では、カルシウムの間接的作用のない骨芽細胞特異的にVDR遺伝子を欠損するマウスを作出することでビタミンDの骨芽細胞を介した骨へのビタミンD直接作用の検証を試みた。

B. 研究方法および結果

1) VDRfloxedマウスの作出

P1ファーン由来のCreリコンビナーゼ(Cre)がloxP配列で挟まれた領域を切り出す性質を利用したCre-loxPシステムによる骨芽細胞特異的VDRKOマウスの作出を試みた。まずラットVDR cDNA(exon 2-3) 235bpをプローブとし、TT2 ES細胞株ゲノムライブラリーのスクリーニングを行いマウスゲノム断片を取得した。このマウスゲノム断片について制限酵素地図を作成し、VDR遺伝子座の翻訳開始点及び

DNA 結合領域の存在する exon 2 の両側に loxP 配列を挿入したターゲティングベクターを構築した。このベクターを TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し、ササンフロット法により相同組換え体を同定した。得られた ES 細胞相同組換え体を CD-1 マウス 8 細胞期胚にアクリケーション法により導入し VDR^{flox} キメラマウスを作出した。これらのキメラマウスと C57BL/6 マウスとの交配により VDR^{flox} マウス (VDR^{L2/L2}) を得た。

2) 骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO) マウスの作出

骨芽細胞特異的に Cre を発現する Collagen $\alpha 1(I)$ -Cre Tg マウスと VDR^{flox} マウスとの交配により Ob-VDRKO マウスの作出を行った。まず始めに Ob-VDRKO マウスの各組織において、Cre による VDR 遺伝子座の切り出しをササンフロット法により検討したところ、骨芽細胞の存在する頭蓋骨、大腿骨、頸骨のみで切り出しが起きており、カルシウム代謝に関わる腎臓や小腸等の組織における骨芽細胞非特異的な切り出しは観察されなかった。Ob-VDRKO マウスの成長曲線は野生型と有意な差異は見出されず、正常であった。また Conventional-VDRKO では併に低カルシウム血症、低リン血症、高 PTH 血症、更に血清 $1\alpha,25(OH)_2D_3$ の著しい増加が観察された。しかしながら骨芽細胞特異的 VDRKO マウスにおいてはいずれも正常値を示した。

3) 骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO) マウスの骨組織の解析

骨量最大となる 16 週齢のマウスの大腿骨の X 線解析を行なったところ、Conventional-VDRKO マウスでは著しい骨量の減少が観察されたか、Ob-VDRKO マウスは予想に反し野生

型と比較し骨量が増加することを見出した。また骨密度も野生型に比へ有意に上昇していたか、この傾向は骨端部よりも骨幹部でより顕著であった。次に骨組織形態計測を詳細に解析したところ、Ob-VDRKO マウスは野生型に比へ海綿骨の骨形成および骨吸収が抑制され、皮質骨の骨形成が促進されていることが明らかになった。

次に十数種類の骨代謝関連遺伝子発現を検討した結果、Ob-VDRKO マウスにおける、破骨細胞形成誘導因子である RANKL 遺伝子発現量の減少と阻害因子である OPG 遺伝子発現量の増加を見出した。

これらのことから VDR は単にカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞の VDR が骨量および骨代謝の制御、骨芽細胞分化制御に直接関与していることが明らかになった。

C. 研究考察

本研究では、カルシウムの間接的作用のない、Ob-VDRKO マウスを作出し解析することによりビタミン D の骨芽細胞を介した骨への直接作用の解明を試みた。作出した Ob-VDRKO マウスの血中ホルモン濃度はいずれも正常値を示したため、従来は不可能であった体内におけるビタミン D のカルシウム作用と骨の細胞に対するビタミン D の直接作用の分離に初めて成功した。吉澤らの作出した Conventional-VDRKO マウスでは著しい骨量の減少が観察されており、抗クル病因子として発見されたという歴史的背景から考えても、Ob-VDRKO マウスも同様の表現型を示すと考えられた。しかしながら Ob-VDRKO マウスは驚くべき事に、骨量および骨密度が上昇するという表現型を示した。こ

のことから Conventional-VDRKO マウスの骨量減少は血中ホルモン濃度の変動によって引き起こされたと考えられる。中でも PTH は間欠的投与では骨量を増やすか、連続投与では骨量を減少させることが知られており、Conventional-VDRKO マウスでは PTH が高値を示すことから、骨量減少の原因は持続的な PTH の分泌にあることが示唆された。竹田らは Conventional-VDRKO マウスを用いた実験により、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨芽細胞の VDR を介して破骨細胞形成を誘導する作用をもつか、この作用が欠損した場合には PTH や IL-1 の刺激により破骨細胞が形成されることを明らかにしており、Conventional-VDRKO は PTH による破骨細胞形成が亢進していると考えられる。よって VDR は PTH の発現を調節することにより間接的な骨吸収促進作用を持つことが示唆された。

一方 Ob-VDRKO マウスの PTH 濃度は正常であるため、野生型に比べ骨芽細胞の VDR を介した破骨細胞形成が抑制された分だけ骨吸収が減少し、骨量が増加したものと考えられた。VDR の破骨細胞形成の誘導は PTH 同様、RANKL の発現促進によるものであることが *in vitro* の研究では明らかになっているか、遺伝子発現検討により Ob-VDRKO マウスでは野生型に比べ RANKL の発現が減少していることが明らかになった。さらに RANKL がその受容体である RANK に結合するのを阻害する作用をもつテコイ（おとり）受容体である OPG の発現が増加していた。これらの結果から VDR は骨芽細胞において RANKL の発現を促進させることによって破骨細胞形成を誘導するという、直接的な骨吸収促進作用を持つことが示唆された。

さらに Ob-VDRKO マウスでは野生型に比

へ、海綿骨の骨形成が抑制され、皮質骨の骨形成が促進されていることが明らかになった。よって VDR は骨芽細胞において海綿骨の骨形成促進作用および、皮質骨の骨形成抑制作用を持つことが示唆された。

D 結 論

以上の研究より、VDR を介したビタミン D 作用は単にカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞の VDR が骨吸収と骨形成の両面から骨代謝の制御に直接関与していることを明らかにした。

E. 研究発表

1 論文発表（原著）

Sato, T, Matsumoto, T, Kawano, H, Watanabe, T, Uematsu, Y, Sekine, K, Fukuda, T, Aihara, K, Krust, A, Yamada, T, Nakamichi, Y, Yamamoto, Y, Nakamura, T, Yoshimura, K, Yoshizawa, T, Metzger, D, Chambon, P, Kato, S Brain masculinization requires androgen receptor function *Proc Natl. Acad Sci USA*, 101, 1673-1678, 2004

WuQiang, F, Yanase, T, Yin, W, Kawate, H, Saitoh, M, Oba, K, Nomura, M, Okabe, T, Goto, K, Yanagisawa, J, Kato, S, Takayanagi, R, Nawata, H Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1 a laser confocal imaging study in living KGN cells *Mol Endocrinol*, 18, 127-141, 2004

- Murayama, A , Kim, M , Yanagisawa, J , Takeyama, K , Kato, S Ligand-induced transrepression by a nuclear receptor mediated by a bHLH-type activator through co-regulator switching *EMBO J.*, 2004 (in press)
- Kitagawa, H , Fujiki, R , Yoshimura, K , Mezaki, Y , Uematsu, Y , Matsui, D , Ogawa, S , Unno, K , Okubo, M , Tokita, A , Nakagawa, T , Ito, T , Ishimi, Y , Nagasawa, H , Matsumoto, T , Yanagisawa, J , Kato, S The chromatin remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams Syndrome *Cell*, 113, 905-917, 2003
- Ohtake, F , Takeyama, K , Matsumoto, T , Kitagawa, H , Yamamoto, Y , Nohara, K , Tohyama, C , Krust, A , Mimura, J , Chambon, P , Yanagisawa, J , Fujii-Kuriyama, Y , Kato, S Modulation of estrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor *Nature*, 423, 545-550, 2003
- Suzawa, M , Takada, I , Yanagisawa, J , Ohtake, F , Ogawa, S , Yamauchi, T , Kadowaki, T , Takeuchi, Y , Shibuya, H , Gotoh, Y , Matsumoto, K , Kato, S Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade *Nature Cell Biol* , 5, 224-230, 2003
- Kawano, H , Sato, T , Yamada, T , Matsumoto, T , Sekine, K , Watanabe, T , Nakamura, T , Fukuda, T , Yoshimura, K , Yoshizawa, T , Aihara, K , Yamamoto, Y , Nakamichi, Y , Metzger, D , Chambon, P , Nakamura, K , Kawaguchi, H , Kato, S Suppressive function of androgen receptor in bone resorption *Proc Natl Acad. Sci USA*, 100, 9416-9421, 2003
- Ishitani, K , Yoshida, T , Kitagawa, H , Ohta H , Nozawa, S , Kato, S p54^{nrb} acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor *Biochem Biophys Res Commun* , 306, 660-665, 2003
- 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
- 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
- Matsumoto, T , Takeyama, K , Sato, T , Kato, S Androgen receptor functions from reverse genetic models *J Steroid Biochem Mol. Biol* , 85, 95-99, 2003
- Endo, I , Inoue, D , Mitsui, T , Umaki, Y , Akaike, M , Yoshizawa, T , Kato, S , Matsumoto, T Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors

Endocrinology, 144, 5138-5144, 2003

Taketani, Y, Nomoto, M, Yamamoto, H, Isshiki M, Morita, K, Arai, H, Miyamoto, K, Kato, S, Takeda E Increase in IP₃ and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK₁ cells *Biochem. Biophys Res Commun*, 305, 287-291, 2003

Fujishima, T, Kittaka, A, Yamaoka, K, Takeyama, K, Kato, S, Takayama, H Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxy-vitamin D₃ A-ring structural motif that

modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators *Org Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003

Masuyama, R, Nakaya, Y, Katsumata, S, Kajita, Y, Uehara, M, Tanaka, S, Sakai, A, Kato, S, Nakamura, T, Suzuki, K Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption *J. Bone Miner Res.*, 18, 1217-1226, 2003

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ビタミンD受容機構異常症の分子生物学的病態解析と治療法の開発

研究協力者 榎島 誠 大阪大学大学院生命機能研究科 個体機能学 助教授

研究要旨

ビタミンD受容体（VDR）のリカント受容機構を解明するために、活性化型ビタミンD3と最近生理的リカントとして同定されたリトコール酸のVDRに対する結合様式の相違を解析した。リカント選択的なVDR変異体を作成し、活性化型ビタミンD3及びリトコール酸に相互作用するVDRリカント結合ポケットのアミノ酸の違いを明らかにした。VDRのリカント結合ポケット変異体への効果の解析によってリトコール酸代謝産物3-ケトコラノ酸の結合様式を明らかにした。さらにリトコール酸よりも30倍以上強くVDRを活性化する誘導体リトコール酸アセテートを見出した。これらの結果は、ビタミンD受容機構異常症の病態解明及び治療法の開発へ応用できる。

A. 研究目的

ビタミンD受容体（VDR）の機能障害は、ビタミンD受容機構異常症の原因として重要である。我々の研究によって、活性化型ビタミンD3の受容体として知られていたVDRか、ニ久胆汁酸であるリトコール酸にも応答することが明らかになった。本研究では、生理的リカントとして同定されている活性化型ビタミンD3とリトコール酸のVDRに対する作用機構の相違を解明することを目的とする。

B 研究方法

全長VDR、VP16キメラVDR、GAL4キメラVDR、及びそれらの変異体の発現ベクターを作成し、それぞれに応答するルンフェラーセレポーターと共に、HEK293細胞にトランスフェクションし、活性化型ビタミンD3、リトコール酸及び種々のリトコール酸誘導体に対する応答性を比較評価した。得られた結果及び報告さ

れているVDRの結晶構造データをもとに、VDRとリカントとの結合様式をコンピューターを用いてモデリングした。

C 研究結果

リカント選択的なVDR変異体を解析した。VDR-S237M変異体は、リトコール酸には応答するか活性化型ビタミンD3には反応しなかった。一方、VDR-S278V変異体は、活性化型ビタミンD3に反応するがリトコール酸には反応しなかった。これらの変異体及び他の変異体に対する効果に基づきVDRとリカントの結合様式を解析した結果、VDRのリカント結合ポケットを構成するヘリックス3に位置するS237か、活性化型ビタミンD3の結合に重要であるか、リトコール酸の結合にはあまり関わっていないことが明らかになった。

VDRのリカント結合ポケットを構成するアミノ酸のアラニン変異体を複数解析した結果、

リトコール酸は、活性型ビタミンD3と同様に側鎖かヘリックス12の方向でトッキングするか、リトコール酸の代謝産物である3-ケトコラン酸は、側鎖が β -シート側とリトコール酸とは反対方向に入り込んでいることか明らかになった。

各種リトコール酸の誘導体のVDRに対する効果を検討した結果、リトコール酸アセテートか、リトコール酸よりも少なくとも30倍以上効果的にVDRを活性化することを見出した。

D. 考 察

リカント選択的なVDR変異体の解析によって、活性型ビタミンD3とリトコール酸のVDRリカント結合ポケットへの結合様式、つまりリカントと相互作用するアミノ酸残基に相違のあることが明らかになった。VDR変異体への効果を解析することで、リトコール酸の誘導体である3-ケトコラン酸の結合様式も予測可能である。リトコール酸及びその誘導体とVDRとの構造活性相関を研究することで、VDRの活性化機構を今までの研究とは異なった視点で解析することかてき、ビタミンD受容機構異常症の病態解明及び治療法の開発への応用が期待できる。

E. 結 論

活性型ビタミンD3とリトコール酸のVDRリカント結合ポケットへの結合様式の相違を明らかにし、3-ケトコラン酸の結合様式を解析した。さらにリトコール酸よりも効果的にVDRを活性化するリトコール酸誘導体を見出した。

G. 研究発表

1 論文発表

1 Choi, M, Yamamoto, K, Itoh, T, Makishima, M, Mangelsdorf, D J, Moras, D, DeLuca, H F, and Yamada, S Interaction between vitamin D receptor and vitamin D ligands two-dimensional alanine scanning mutational analysis Chem Biol 10 261-270, 2003

2 Adachi, R, Shulman, A I, Yamamoto, K, Shimomura, I, Yamada, S, Mangelsdorf, D J, and Makishima, M Structural determinants for vitamin D receptor response to endocrine and xenobiotic signals Mol Endocrinol 18 43-52, 2004

3 榎島誠 脂質代謝と核内レセプター 生化学 75 391-395, 2003

4 榎島誠 核内レセプターによる生体異物 脂質代謝調節 医学のあゆみ 206 911-914, 2003

5 榎島誠 胆汁酸センサーとして機能する核内レセプターFXRとVDR THE BONE 18 155-160, 2004

2 学会発表

1 女達竜太郎、山田幸子、下村伊一郎、榎島誠 核内レセプターVDRによるビタミンD 胆汁酸認識機構の解析 平成15年度生理学研究所研究会「ハイオ分子センサー研究会」、岡崎、2003 5

2 Makishima, M New function of vitamin D receptor as a bile acid sensor (Lunch Symposia New aspects of vitamin D action) 1st Joint Meeting of International Bone and Mineral Society and Japanese Society of Bone and Mineral Research, Osaka, Japan, 2003 6

3 Yamada, S, Yamamoto, K, Shimizu, M, Choi, M, Abe, D, Mihori, M, Makishima, M,