

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡  
平成17(2005)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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡  
平成17(2005)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 -----	II - 1
	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 -----	II - 8
	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 - 13
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。本症の治療薬として有効とされているもののうち、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 ALOX15 をはじめとする複数の 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) 骨における ALOX15-PPAR $\gamma$ 経路と骨粗鬆症 (分担：井上)

ヒト ALOX15 の 5' 上流領域ならびに PPAR  $\gamma$  遺伝子 Intron3 における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性を対象として BMD との関連を検討した。

ヒト大腿骨由来骨芽細胞は、10%FBS、50 mg/ml アスコルビン酸および 5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸添加  $\alpha$ -MEM にて培養した。ヒト膝関節由来軟骨細胞は Clonetics 社の軟骨細胞基本培地ならびに分化誘導培地を用いて培養を行った。メEDIUM交換を 0、2、5、7 日目に行い、培養 2 日、5 日、10 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での ALOX15、ALOX15B、ALOX12、COL2A1、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。培養 2 日目の骨芽細胞にデキサ

メタゾン( $10^{-7}$ M)ならびに control としてエタノールを添加し、添加 6 時間後の RNA を採取し ALOX15、 ALOX15B、 ALOX12 の遺伝子発現を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

(2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症 (分担：井上)

WNT-LRP5 シグナル伝達調節因子である WNT10B、FRZB、DVL3 ならびに  $\beta$ -catenin 遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性を対象として BMD との関連を検討した。

(3) 骨における新しいグルココルチコイド応答経路の探索 (分担：井上)

新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を、増殖期、及びアスコルビン酸、 $\beta$ グリセロリン酸存在下で培養し、培養後 2 週、4 週の各時期にデキサメタゾンを添加し、発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにて探索した。

(4) 骨における新しい TGF $\beta$  応答遺伝子の探索 (分担：井上)

ラット初代培養骨芽細胞、ヒト初代培養骨芽細胞ならびにヒト初代培養軟骨細胞を培養し、TGF $\beta$  (10 ng/ml)、Wnt3A (50 ng/ml) もしくは TGF $\beta$  と Wnt3A を同時に添加し、添加後 6 時間後の mRNA を採取し、リアルタイム PCR 法にて FGF2 ならびに FGF18 遺伝子の発現量を検討した。

(5) 骨芽細胞におけるビタミン K ならびに SXR の標的遺伝子の解析 (分担：井上)

Flag タグを付加した SXR、恒常的活性化型 SXR として VP16 活性化ドメインを結合した SXR (VP16 AD-SXR) ならびに VP16 活性化型ドメインのアミノ末端欠失体を結合した SXR (VP16 AD<sub>CT</sub>-SXR) を作製し、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> (メナキノン-4 : MK-4) による転写活性化を調べた。SXR の標的遺伝子である CYP3A4 の SXR 応答配列を結合したレポーター

を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、高いリガンド応答性を示した VP16 AD<sub>CT</sub>-SXR 発現プラスミドを用いて、ヒト骨芽細胞様細胞株 MG-63 で安定発現細胞株を作製した。VP16 AD<sub>CT</sub>-SXR 安定発現細胞 (MG-63/VP16 AD<sub>CT</sub>-SXR) およびコントロールベクターを導入した安定発現細胞 (MG-63/Vec) をリファンピシンおよび MK-4 で刺激し、DNA チップを行った。DNA チップは Affymetrix 社の Gene chip を用いた。

MG-63/VP16 AD<sub>CT</sub>-SXR 細胞において、溶媒コントロールと比較してリファンピシンおよび MK-4 の両リガンド刺激により発現上昇が認められた遺伝子を SXR 標的遺伝子と考えた。DNA チップの結果を確認するため、標的遺伝子の mRNA 発現変化をリガンド刺激後 12 時間から 48 時間まで real-time RT-PCR により経時的に解析した。これら遺伝子について、SXR 安定発現細胞 (MG-63/SXR) における mRNA の発現誘導を同様に検討した。また、シクロヘキシミド添加により新規の蛋白質合成を阻害した条件において発現量の変化を解析し、各遺伝子の転写調節領域の SXR 応答配列をデータベースから検索した。WEB サイト上の Tcoffee ソフトウェアを用いてアミノ酸配列から分子系統樹を作製し、近縁の分子について mRNA の発現変化を調べた。

(6) エストロゲン受容体共役因子の精製 (分担：加藤)

エストロゲンあるいは SERM 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あるいはゲル濾過法を用いて複合体の大きさを推定した。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、レポーターアッセイ法、クロマチン免疫沈降法等により行った。

(7) ビタミン K、エストロゲンのシグナル経路の遺伝子改変動物 (分担: 津久井)

ビタミンK関連因子としての $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクである BGP (Bone Gla Protein) について、遺伝子改変マウスの作製を行い、骨組織での作用について検討を行った。さらに、エストロゲンのシグナル経路を集中的かつ網羅的に解析するために、エストロゲンレセプター(ER $\alpha$ およびER $\beta$ )を介する生体での骨作用について焦点を絞り解析を行った。すなわち、分担研究者は治療薬・新規標的候補としてエストロゲンおよびビタミンKについてのシグナルを網羅的に解明するために、本研究課題での分担項目として以下の研究を行った。

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い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

1. 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
2. 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

マウスの作製およびその解析

3. 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

4. 1、2、および3で作製した遺伝子改変マウスを交配させることにより、骨組織特異的にGain of functionする系を確立し、骨組織での生体作用について検討した。

- (8) 新規骨代謝シグナル制御分子の同定 (分担: 塚)

チロシンリン酸化蛋白質群の網羅的解析等のアプローチは、蛋白質試料の量的制限から推進するのに多くの困難を伴った。最終年度の本年はこれまでにその重要性が浮かび上がってきた分子にスポットを当ててその生物学的機能の解明や制御モデルを作ることを中心に研究をまとめた。

- (8)-1 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨吸収の過程で破骨細胞が骨に接着し sealing zone を形成することにより隔離された間隙が骨吸収のための“場”となる。この最初のステップは骨吸収のために極めて重要であり、この形成に関わる破骨細胞の接着能と運動能がその機能のために必須なものであると考えられている。我々は蛋白質試料採取のための量的制限の少ない骨肉腫細胞株をモデルに使用して、この接着能や運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の単離を進めてきた。

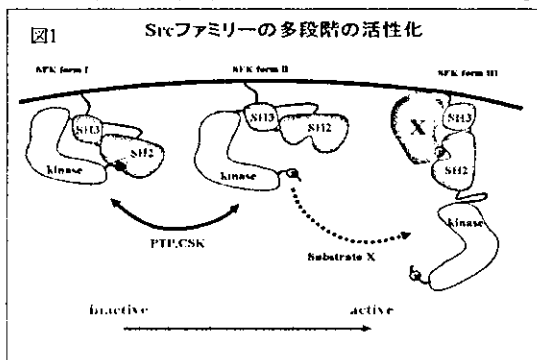
国立がんセンター研究所で樹立された骨肉腫細胞株 Hu-O9 は、高転移群、低転移群の亜株がそれぞれ複数樹立されており、二群の間には細胞運動能や接着能に大きな違いがある。この骨肉腫細胞の運動能や接着能を制御している鍵となる分子を、それぞれの細胞群の蛋白質、特にチロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにすることを目的に研究を進めてきた。この過程で Src ファミリーキナーゼ



と幾つかの基質の蛋白質群が重要であることが明らかになってきた。ウェスタンブロット、キナーゼアッセイ、細胞免疫染色などの手法を用いてこれらの分子や Src ファミリーの接着・運動能への関わりを明らかにする。

#### (8)-2 Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

Src ファミリーは発現量による活性調節の他に、多段階の構造変化で大きくその活性が制御されるという特徴を持つ。従って Src 機能の調節系を樹立するにあたっては複数のアプローチがありこれらの効率、特異性、*in vivo* のシステムへの発展性などから比較・検討していく。最も一般的なキナーゼの阻害はその ATP 結合部位のブロックであり、実験、臨床を含め使われているほとんどのキナーゼ阻害剤がこの作用機序によるものである。入手可能な Src キナーゼの阻害剤もほとんど ATP 結合部位を阻害すると考えられる。問題点はその部位の構造的類似性から他のキナーゼに非特異的効果があることが多いことである。Src キナーゼの構造的活性化を阻害する方法として一つは Csk などの導入により活性抑制性チロシンをリン酸化すること、Src-SH2/SH3 アナログなどのように活性化分子 (図 1 の X) の結合を阻害することが考えられる。



最後に Src キナーゼによってチロシンリン酸化を受ける基質のレベルでリン酸化をブロックする方法、リン酸化により生ずるシグナルを阻害することが考えられる。このためには各基質分子の同定・機

能解析が必要となってくるが、Src キナーゼの持つ多くの生物学的機能の中で特定の機能のみの阻害出来る可能性がある。近年開発された RNAi の手法を用い、骨代謝細胞内での基質分子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。我々のクローニングした Src チロシンキナーゼの主要な基質 Cas については破骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作成をすすめており、その骨代謝異常を解析する。

#### (8)-3 エストロゲンの骨代謝における新しい作用機序の解析

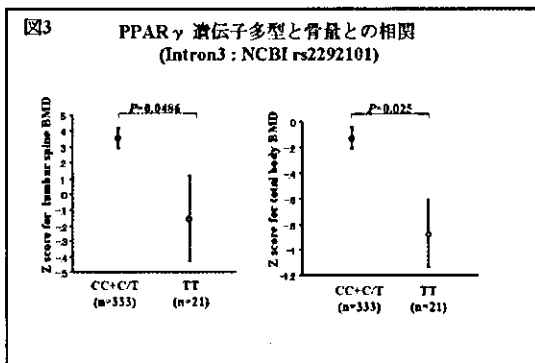
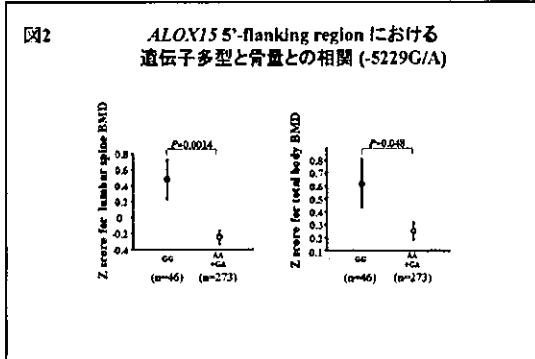
骨細胞においてはエストロゲンの核内における作用については精力的に研究が進められてきており、核外での作用についても即時的反応を示唆するデータは上がってきているものの、具体的なシグナル経路について多くは知られていない。2001年に Kousteni らは、骨細胞のエトポシドによるアポトーシスが、エストロゲンやアンドロゲンを介して抑制されるという現象に、受容体の膜への局在や即時的な細胞内シグナル伝達が関与していることを明らかにした。我々はこのデータに基づき、膜局在型のエストロゲンが伝えているシグナルを明らかにする目的でエストロゲン機能ドメインを Flag タグを付加した形で膜に発現するコンストラクトを作製し膜型受容体に結合する蛋白質を精製し質量分析により同定した。本年度は前年度に同定した AF-1 結合分子とエストロゲン受容体との核外における協調作用について解析を進め、Src キナーゼの活性とのつながりについても調べる。

### C. 研究結果

#### (1) 骨における ALOX15-PPAR $\gamma$ 経路と

## 骨粗鬆症

ヒト ALOX15 遺伝子の 5'上流域ならびにヒト PPAR $\gamma$  遺伝子イントロン 3 に存在する遺伝子多型では、全身骨、腰椎骨密度において有意差を呈していた(図 2、3)。初代培養ヒト軟骨ならびに骨芽細胞

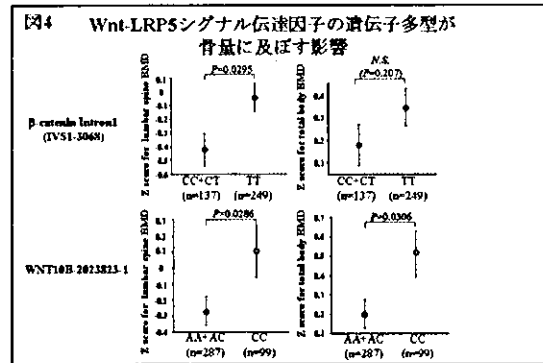


では COL2A1 ならびに ALP といった分化マーカーの上昇に伴い、ALOX15, ALOX15B, ALOX12 の発現上昇が確認された。デキサメタゾン添加においては ALOX15 や ALOX12 と比して ALOX15B において顕著な発現上昇が mRNA レベルで確認された。

### (2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症

Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである  $\beta$ -catenin 遺伝子のイントロン 1 に存在する遺伝子多型では、腰椎骨密度において有意差を呈していた(図 4 上段)。また、LRP5/6 に対してリガンドとして働く WNT10B の遺伝子多型においては腰椎ならびに全身骨骨密度に関して有意差を呈していた(図 4 下段)。

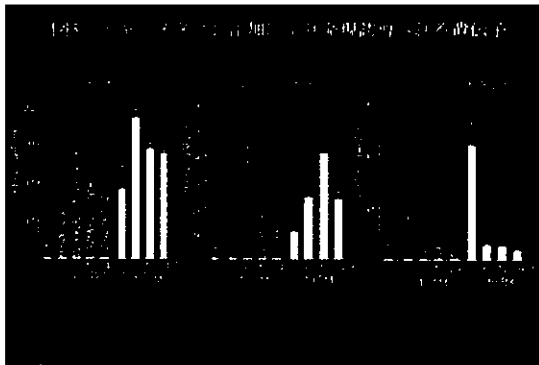
### (3) 骨芽細胞におけるデキサメタゾン応答遺伝子の探索



増殖期、培養 2 週、培養 4 週それぞれにおける応答遺伝子をマイクロアレイで解析したところ、それぞれの時期特異的に発現誘導される遺伝子や、すべての時期において発現が誘導される遺伝子が複数得られた。いくつか機能の類推できるものを抜粋すると、増殖期において発現誘導されていた遺伝子として、IGF-II mRNA binding protein が得られ、増殖期、培養 2 週、4 週すべてにおいて発現誘導された遺伝子として、CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\delta$  (C/EBP $\delta$ )、Matrix Gla Protein (MGP)、Krupel Like Factor 9 (KLF9)、Connective Tissue Growth Factor (CTGF)などが得られた。培養 2 週と 4 週で発現誘導された遺伝子には、Endothelin 1, Adrenomedullin などが含まれていた。さらに、培養 4 週において発現誘導された遺伝子には Follistatin, NGFI-B などが得られ、分化誘導刺激後の培養日数の違いにより、発現誘導される遺伝子もことなってくるが見出された(表 1)。実際

Gene	Expression Change
IGF-II mRNA-BP	↑
C/EBP $\delta$	↑
MGP	↑
KLF9	↑
CTGF	↑
Endothelin1	↑
Adrenomedullin	↑
Follistatin	↑
NGFI-B	↑

の発現を C/EBP $\delta$ 、NGFI-B についてリアルタイム PCR で確認したところ、図 5 のように発現の増加が認められた。



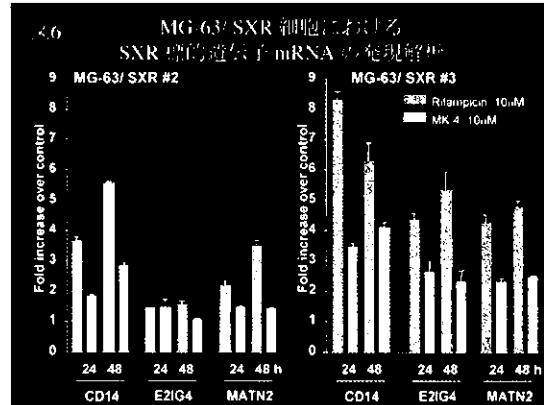
(4) 骨における新しい TGFβ 応答経路の探索

ラット初代培養骨芽細胞では FGF2 遺伝子は TGFβ 添加 6 時間後にて発現上昇し、Wnt3A を同時に添加することにより、その発現はさらに亢進した。ヒト骨芽細胞においても同様の結果が得られた。FGF18 に関してはラット骨芽細胞では TGFβ と Wnt3A を同時に添加した時のみ発現上昇が確認された。ヒト骨芽細胞においては TGFβ 添加にて発現上昇し、Wnt3A を同時に添加することにより、その発現はさらに亢進した。ヒト初代培養軟骨細胞においては TGFβ 添加 6 時間後においてサイトカインである FGF2 ならびに FGF18 遺伝子の劇的な発現増加が認められた。その一方で Wnt3A の同時添加ならびに単独添加において発現に大きな変化はなかった。

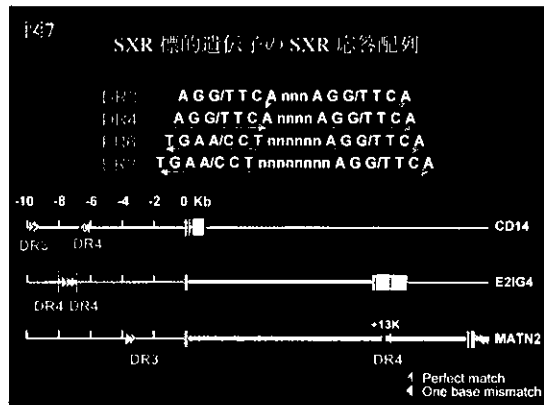
#### (5) SXR 標的遺伝子の解析

DNA チップの結果、溶媒コントロールに対して SXR リガンドにより 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子が重複を除いて 15 遺伝子得られた。この中にはこれまでに SXR 標的遺伝子として報告されている multidrug resistance protein 1 (MDR1) 遺伝子も含まれていた。CD14 antigen (CD14)、matrilin 2 (MATN2) および estradiol-induced gene 4 (E2IG4) についてさらに解析を行った。これら遺伝子は real-time RT-PCR による解析の結果、リガンド刺激後 12 時間から発現上昇が確認され、MG-63/SXR 細胞においてもリガンド添加により mRNA の発現量の

増加が認められた (図 6)。また、シクロ



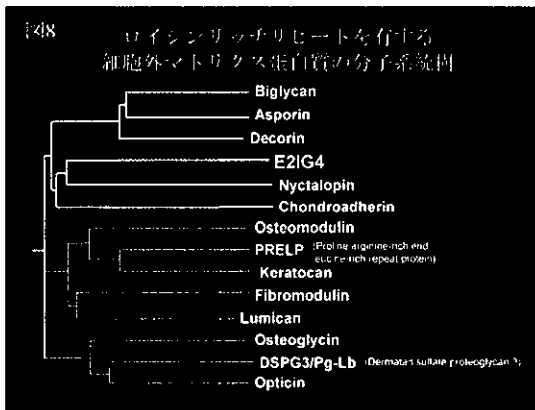
ヘキシミドの添加はリガンド応答性に影響を与えなかった。遺伝子の転写調節領域について SXR 応答配列を検索した結果、遺伝子上流領域あるいはイントロンに SXR 応答配列が存在し、E2IG4 にはコンセンサス配列と完全に一致する SXR 応答配列が存在した (図 7)。E2IG4



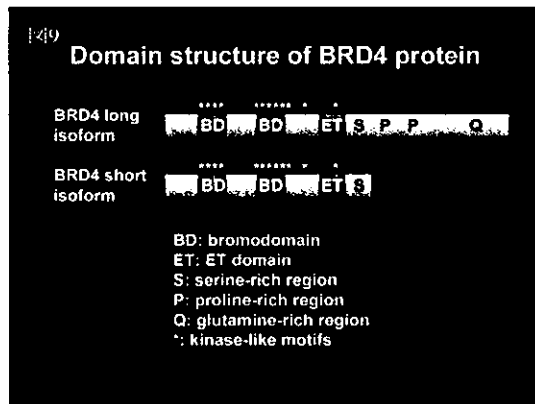
蛋白質はロイシンリッチリピートを有していたことから、細胞外マトリクス蛋白質の一つと考え分子系統樹を作製した結果、ロイシンリッチリピートを持つ他の細胞外マトリクス蛋白質とクラスターを形成した (図 8)。E2IG4 と相同性を有する chondroadherin、decorin および biglycan について mRNA の発現変化を解析した結果、これらは SXR リガンド刺激では顕著な発現量の上昇は認められなかった。

#### (6) エストロゲン受容体共役因子の精製

FLAG アフィニティーとゲル濾過の 2 段階精製で、リガンドの種類によりサイズの異なるコンプレックスが形成される



ことが判明した。また、1-2MDa の分画に各リガンド特有のバンドが存在することを明らかにした。この分画の TOF-MS を行ったところ、ラロキシフェン添加時のバンドからプロモドメイン蛋白質 BRD4 を同定した(図9)。



エストロゲン受容体のコファクターとしての機能を検討したところ、BRD4 は AF-1 コアクチベーターであることが判明した。従来 AF-1 活性がほとんどないことが知られている HeLa 細胞の AF-1 活性をも強く促進することが判明した。

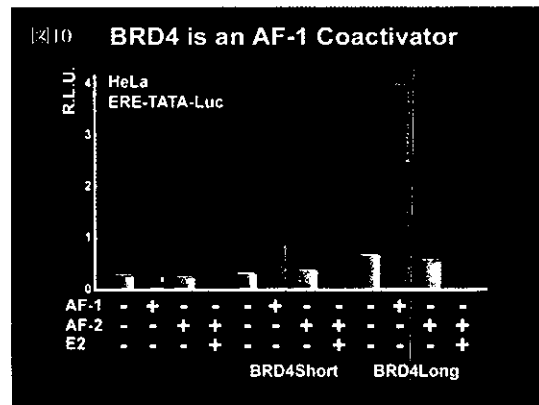
BRD4 のエストロゲン受容体に対する作用の細胞種特異性を検討するため、子宮内膜腫 Ishikawa、骨芽細胞腫 HOS、腎臓 293T を用いて同様のレポーターアッセイを行った。その結果、元々の AF-1 活性の強さに関わりなくその作用を促進することが判明した。また、HOS においてはタモキシフェンの partial agonist 活性をも促進することが判明した。過剰発現系で観察された現象を確認するため、RNAi で発現を減少したときの BRD4 作

用を 293T 細胞を用いて調べた。その結果、BRD4 発現の減少により、AF-1 コアクチベーター活性が減弱し、SERM の partial agonist 活性も減弱する傾向が見られた。これは BRD4 が AF-1 コアクチベーターであり、SERM の partial agonist コアクチベーターであるという過剰発現系の結果と一致した。

次に 293 過剰発現の系でエストロゲン受容体と BRD4 の相互作用を IP-Western 法により検討した。その結果、リガンドの種類によらず両者は結合するが、タモキシフェン添加時には結合が強まることが判明した。さらに BRD4 とエストロゲン受容体の直接相互作用を検討するため GST pull down アッセイを行った。その結果、BRD4 はエストロゲン受容体の AB 領域と直接結合することが判明した。

さらに BRD4 のヒト各組織における発現量をノザンプロットで調べたところ、各臓器でユビキタスに発現していた。

BRD4 は 2 つのプロモドメインと ET ドメインを持つことが知られている。BRD4 の AF-1 コアクチベーター活性に関与するドメインを調べるため、各ドメインを削った deletion construct を作成した。BRD4S とその deletion construct を用いたレポーターアッセイより、BD1 を削ったとき AF-1 コアクチベーター活性が消失することが判明した(図10)。



BRD4 の AF-1 コアクチベーター活性にプロモドメインが関与することが示唆

されたが、プロモドメインはアセチル化ヒストンに結合するドメインであることが知られている。そこで BRD4 プロモドメインがヒストンのどの位置のアセチル化を認識するのかをペプチド pull down アッセイにより検討した。その結果 BRD4 はヒストン H3 のアセチル化は認識せず、ヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を特異的に認識して結合することが判明した。またヒストン H4 の K8、K16 のアセチル化は BRD4 の結合に関与しないが、K5/K8 がアセチル化しているときにはその結合を強める効果のあることが判明した。

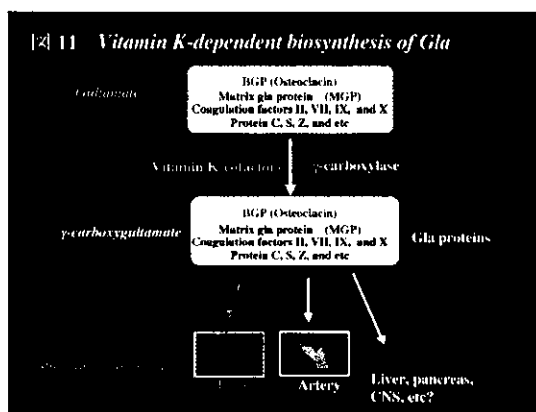
BRD4 がヒストン H4 の K5/12 のアセチル化を認識することが判明したので、エストロゲン受容体のターゲット遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化状態を ChIP アッセイにより調べた。その結果、腫瘍マーカー pS2 のプロモーター領域において、エストロゲン添加時にはヒストン H4 のすべてのリジン残基のアセチル化が亢進するのに対し、SERM 添加時にはヒストン H4 の K12 のみアセチル化が亢進することが判明した。

全長の BRD4L および BRD4S 蛋白をバキュロウイルス発現系で取得し、これを bait として HeLa 細胞核抽出液より BRD4 相互作用因子を精製したところ、hSWI/SNF 複合体および WINAC 複合体の構成因子として知られている BAF250 が同定された。さらに、HeLa 細胞核抽出液中に endogenous に存在する BRD4 蛋白が精製されてきたことから、BRD4 は核内で multimer を形成することが示唆された。

#### (7)-1 BGP コンディショナルトランスジェニック(cTg)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、 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化の標的タンパクである BGP に関して、

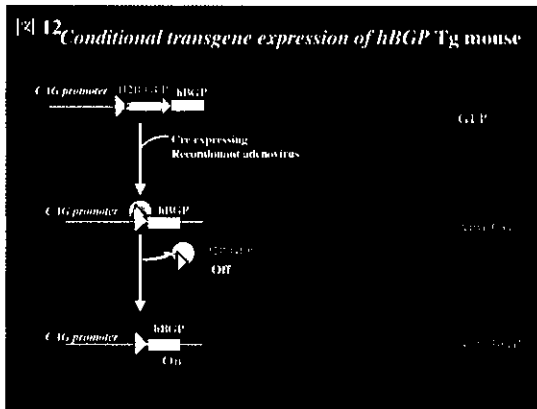
cTg マウスの作製を行った結果、数ラインの cTg マウスが得られた。BGP (Bone Gla protein: Osteocalcin)は、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に骨形成の指標とされている。BGP 遺伝子のKOマウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。また、BGPは名前の通りビタミンK依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化標的タンパクであり、プロセッシングおよびグラ化修飾を受けて本来の機能を発揮すると考えられる (図11)。最近



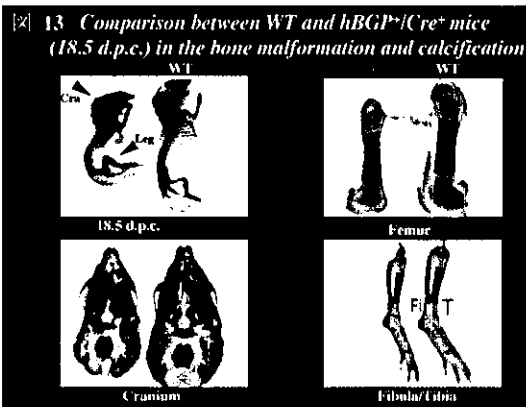
の3次元の立体構造解析の結果から骨において BGP は、ビタミンK依存性 $\gamma$ -カルボキシラーゼのグラ化修飾を受けて、ハイドロキシアパタイトとカルシウムと強固に結合するモデルが報告されている。

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をレポータ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 (図12)。

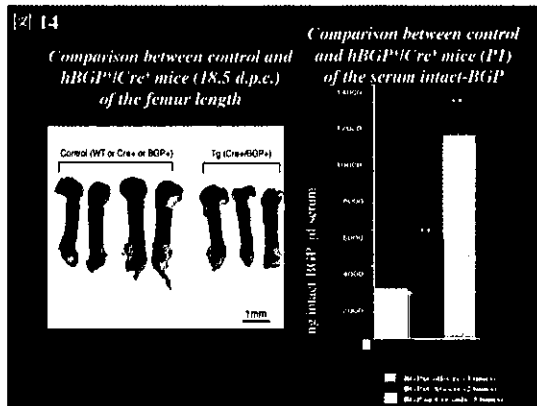
骨芽細胞系譜で発現のあるコラーゲンタイプI プロモーターにCreを発現し、BGP を強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して、生体における BGPの骨代謝への作用について解析を行った結果、マウス胎生後期から骨組織において石灰化が低い傾向が観察された、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の



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13)。

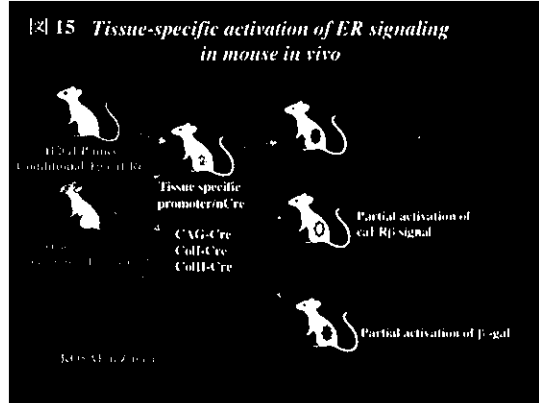


上記交配により得られたBGPを過剰発現するマウスは、ほとんどが出産後1日目-2日目で致死となることを明らかにした。これら出産後1日目-2日目のマウス胎児から血清を集め、血清中のヒトBGP量を測定するとこれらのマウスで有意に高いintract-BGP値を示した (図14)。



(7)-2 ER $\alpha$  および ER $\beta$  の生体内 gain of function による骨機能の解析  
エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨代謝における作用については、選

択的に ER $\alpha$  または 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の作製を行い、骨組織でER $\alpha$  またはER $\beta$  を過剰発現可能な系を確立した (図15)。

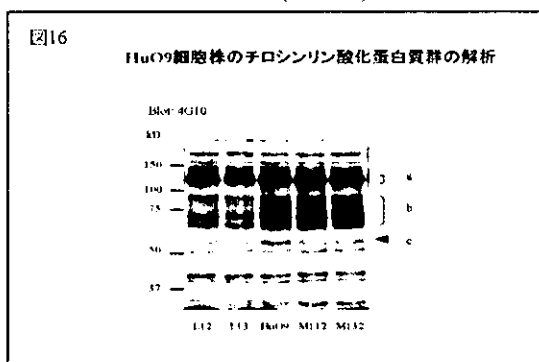


まず、骨形成能をもつ骨芽細胞とエストロゲンシグナルの作用について検討を行った。コラーゲンタイプI (Col1)-Cre マウスとcTg マウスを交配することにより、骨芽細胞系譜にER $\alpha$  およびER $\beta$  シグナルを活性化させた場合は、コントロールマウス群と比較して外見上顕著な表現型は観察されず、加えてこれらの遺伝子改変マウスで体重差には、有意な変化は観察されなかった。また詳細な解析を行うために骨形態計測を検討した結果、少なくともER $\alpha$  シグナルを活性化したマウスラインの骨密度 (BMD: Bone Mineral Density) および骨塩量 (BMC: Bone Mineral Content) に変化は観察されなかった。ER $\beta$  シグナルを活性化させたラインについても検討を行っているが、同様な傾向が観察された。さらに、メスの Tg マウスに卵巣摘出 (OVX) を施し、エストロゲンを枯渇させる環境を雌個体で人工的に付加をかけることにより、骨形成能に保護作用があるか検討を行った結果、少なくとも骨芽細胞でER $\alpha$  シグナルを活性化させた場合においても骨量を保護する結果が得られなかった。また、ER $\beta$  シグナルに関しても同様な手法により、現在検討中である。以上の結果より、今回

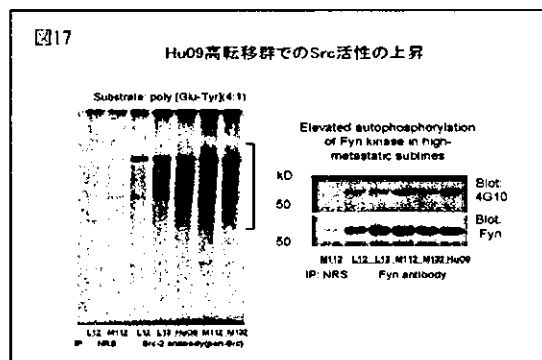
の実験系においてER $\alpha$ シグナルが骨芽細胞に直接作用することは少ないと示唆され、ER $\alpha$ シグナルを介する骨形成作用は、他の細胞系譜に作用することが推測される。

(8)-1 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

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進めてきた。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)は解析の結果



Paxillinであった。Paxillin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。またPaxillinと共にSrcキナーゼの基質として知られる130kDの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。実際これらの細胞におけるSrcファミリーのキナーゼ活性をpoly[Glu-Tyr](4:1)を基質として測定すると、Paxillinのリン酸化に対応してSrcファミリーのキナーゼ活性が亢進していた(図17)。Srcファミリーに属するc-Src、Fyn、Yes、Lck

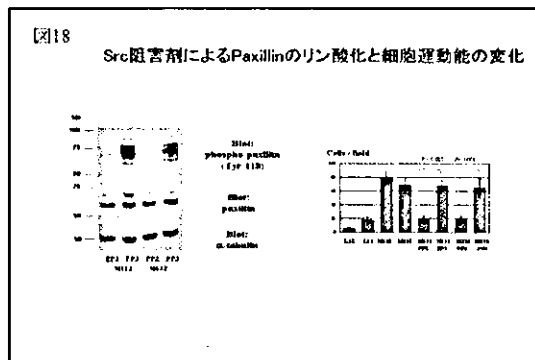


などの特異的抗体でそれぞれの発現量やリン酸化を測定したところ、図17に示すようにFynの自己リン酸化が上昇していることが観察された。

Paxillinの細胞内局在は高転移群でも低転移群でも接着斑にみられ、発現量、リン酸化量に変化はあるもののどちらの群でもインテグリンを介した細胞-基質間の接着に関わっていることが確認された。

(8)-2 Srcファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

高転移群の骨肉腫細胞でSrcファミリーのキナーゼ活性を特異的阻害剤PP2を用いて阻害するとPaxillinのリン酸化が著明に低下したことから、Srcファミリーの活性上昇がPaxillinのリン酸化をもたらしていることが示唆された(図18)。



同時に高転移群の細胞で亢進していた運動能が低転移群の細胞群と同程度以下に低下した。

Paxillinのリン酸化量の変化がこの細胞の接着能・運動能に影響を与えていることを確認するために、まず低転移群の細胞にPaxillinを過剰発現すると、細胞の運動能が亢進した。逆にPaxillinに対するsiRNAを作成して高転移群の細胞に導入すると、Paxillinの発現量が低転移群と同程度まで抑えられると同時に細胞の運動能も抑制された。ただこの際の運動能の変化は低転移群と高転移群の間の運動能の差や、Srcファミリーの阻害剤の影響ほど大きくないことから、Paxillin以外のSrcの基質も幾らかの影響を与え

ていることが示唆された。Paxillin のリン酸化部位を欠く変異体を用いた解析を現在行っている。また実際の破骨細胞に対する siRNA や変異体の影響も調べている。

もう一つ変化が確認された Cas については、そのリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析すると同時に、広島大学の本田浩章先生と共同研究で Cas の遺伝子に loxP を挿入したマウスを作成し、組織特異的なコンディショナルノックアウトを作成に成功した。破骨細胞特異的なプロモーターによる Cre マウスと組み合わせることにより破骨細胞特異的な Cas 欠損マウスの作成・解析が進行中である。

#### (8)-3 エストロゲンの骨代謝における新しい作用機序の解析

前年度までに AF-1 ドメインに特異的に結合する多くの蛋白質群が銀染色により観察され、そのうち 2 つを同定することに成功した。一方 AF-2 ドメインと特異的に結合する蛋白質は本年度も大量精製などにより同定を試みたが、細胞内での結合まで確認できた分子はこれまでに得られていない。AF-1 ドメインに特異的に結合する蛋白質 Hsp-70 と  $\beta$  チューブリンはそれぞれ、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングで結合が確認された。 $\beta$  チューブリンだけでなく  $\alpha$  チューブリンも膜に局在した AF-1 に特異的な結合が認められた、チューブリンの重合阻害剤であるノコダゾールによる処理で AF-1 ドメインとの結合が減弱することから、重合した微小管とエストロゲン受容体が AF-1 ドメインで結合することが示唆された。乳癌細胞株 MCF ではエストロゲン刺激によるエストロゲン受容体の細胞膜への移行に伴い、それと同時に  $\beta$  チューブリンの一部が細胞膜に局在を移しエストロゲン受容体と重なった局在を示すことが観察され、実際にこの 2 つの分子が核外で何らかの生物学的機

能を担うことが示唆された。

#### D. 考察

##### (1) 骨における ALOX15-PPAR $\gamma$ 経路と骨粗鬆症

骨髄間質系細胞は骨芽細胞や脂肪細胞といった様々な細胞への分化能を有する前駆細胞である。加齢に伴いこれら前駆細胞の骨芽細胞への分化能は低下し脂肪細胞への分化能が亢進することが知られており、加齢に伴う骨量低下の一因と考えられている。転写因子 PPAR  $\gamma$  を介したシグナル伝達経路は哺乳動物での脂肪細胞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マウス ALOX15 遺伝子がマウスの骨量を規定する重要な遺伝子であることが示された。このことはヒト ALOX15 遺伝子における骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性が想定される。今回、我々はヒト ALOX15 遺伝子ならびにヒト PPAR  $\gamma$  遺伝子における SNPs と骨量との関連について検討した。

本研究により、ヒト ALOX 遺伝子や PPAR  $\gamma$  に存在するの遺伝子多型と骨密度においてな相関が見出されていた。従って、ヒト ALOX15 と PPAR  $\gamma$  は骨量を予測する遺伝子マーカー群として有用である可能性が示唆された。これら遺伝子以外にも脂肪細胞シグナル伝達因子における遺伝子多型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存在することが示唆された。

マウス Alox15 と同様の機能を有するヒト遺伝子は ALOX15 以外にも ALOX15B ならびに ALOX12 と合計種類が存在する。今回、我々は初代培養ヒト軟骨ならびに骨芽細胞を用いてその発現を検討したところ分化に伴い発現が亢進した。このことから十分に分化していない軟骨や骨芽細胞ではこれら遺伝子の発現抑制を行い脂肪細胞への分化を抑制し



ている可能性が示唆された。加齢においてこれら細胞の分化が十分にすすまない一因として ALOX15 遺伝子群が関与している可能性もあり今後の検討が期待される。一方、デキサメサゾン骨髄間質系細胞において脂肪分化を誘導する因子として知られている。骨芽細胞においてデキサメサゾン添加により ALOX15、ALOX15B ならびに ALOX12 のうち ALOX15B のみが劇的に発現増加が誘導された。従って、骨芽細胞におけるデキサメサゾンによる分化成熟の障害には ALOX15B が特異的に働いている可能性がある。

## (2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症

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。我々は今までに、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-LRP 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  $\beta$ -catenin と WNT10B 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。 $\beta$ -catenin は、Wnt シグナルが活性化されると蛋白が安定化し、そのシグナル伝達最終段階に作用する遺伝子として知られている。また WNT10B は哺乳動物に多数存在する Wnt シグナルのリガンドとして機能する因子である。近年、LRP5 の研究により Wnt-LRP 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-LRP 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。今回の解析から  $\beta$ -catenin や WNT10B といった因子が LRP5 同様に骨形成に関与している可能性が考えられ興味深い。

## (3) 骨芽細胞におけるデキサメタゾン応答遺伝子の探索

初代培養骨芽細胞の分化誘導日数によって、共通にデキサメタゾンに応答して発現誘導される遺伝子や、日数によって発現誘導が異なる遺伝子が得られた。IGF-II mRNA binding protein は、IGF-II の mRNA に結合し、翻訳を抑制する働きをもつことが示唆されている遺伝子である。増殖期から分化誘導日数を通して発現誘導される C/EBP  $\delta$  は、IGF-I 抑制作用を持つことが示唆され、MGP は、石灰化抑制、KLF9 は転写、CTGF は骨形成促進作用をもつと考えられる。分化誘導 2 週、4 週で発現誘導される Endothelin 1 は、大腿骨骨頭壊死の原因因子となり得ることが示唆され、Adrenomedullin は、骨形成促進作用を持つことが示唆される遺伝子である。分化誘導 4 週のみで発現誘導された遺伝子では、Follistatin は Activin, BMP シグナルの抑制的にはたらく因子で、NGFI-B はアポトーシス誘導に関わる因子である。この中で、我々が興味深いと考えているのは、アポトーシス誘導に関する NGFI-B である。ステロイドを生体に投与した場合、成熟骨芽細胞のアポトーシスが誘導されることが知られており、これが骨形成の低下の一要因となることが示唆されている。したがって、今回、マイクロアレイで得られた NGFI-B が、ステロイドによる骨芽細胞のアポトーシス誘導の一メカニズムとして注目している。

## (4) 骨における新しい TGF $\beta$ 応答経路の

## 探索

FGF2 ならびに FGF18 は骨に発現し、骨芽細胞の増殖刺激を行うことが知られている。また FGF2 は TGF $\beta$  に応答することが知られている。その一方で FGF18 の発現制御に関しては未だ十分な理解はなされていない。今回我々は、ヒト骨芽細胞において FGF18 の発現が TGF $\beta$  で誘導されることを見出した。軟骨細胞においては不死化した軟骨細胞株である RCJ 細胞において TGF $\beta$  により発現誘導されることが報告されている。今回我々はヒト初代培養軟骨細胞にて発現誘導されることを示した。興味深いことに骨芽細胞においては TGF $\beta$  と Wnt3A を同時に添加することで FGF18 の発現が強力に誘導されるが軟骨細胞ではその作用がないことが確認された。さらに近年 FGF18 遺伝子のプロモータには Wnt の下流シグナルである  $\beta$ -catenin/TCF 応答配列を有することが示されているが Wnt 単独では FGF18 の反応性はなく骨芽細胞においてのみ TGF $\beta$  の存在下で応答する。したがって骨芽細胞においては Wnt シグナルの伝達に必須である因子が TGF $\beta$  によって惹起され、ヒト軟骨細胞ではこの因子が惹起されていない可能性がある。このような局面で作用する Wnt シグナル伝達因子を同定することは骨芽細胞や軟骨細胞の分化制御のみならず、哺乳動物の増殖と分化制御において重要な役割をはたしている可能性がある。

### (5) SXR 標的遺伝子の解析

SXR 標的遺伝子の候補として、CD14、E2IG4 および MATN2 に着目して解析を行った。いずれの遺伝子も転写調節領域に SXR 応答配列を有することから、これらは骨芽細胞において SXR を介するビタミン K の標的分子である可能性が示された。CD14 は骨芽細胞の分化過程で遺伝子発現の上昇が報告されているが、骨芽細胞における生理作用は明らかにされておらず、今後の解析が期待される分

子である。E2IG4 はエストロゲンにより誘導される遺伝子として同定されたが、その機能については不明であった。つい最近 E2IG4 は chicken tsukushi (C-TSK) の ortholog として再同定された。C-TSK は bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) と結合することが報告されたことから、E2IG4 も BMP と結合すると考えられる。E2IG4 とクラスターを形成するロイシンリッチリピートを有する細胞外マトリクス蛋白質は small leucine-rich proteoglycan (SLRP) と呼ばれ、decorin や biglycan が含まれる。decorin は transforming growth factor, beta (TGF- $\beta$ ) との結合能を有することが知られており、骨芽細胞のミネラル化への関与が報告されている。また、biglycan 欠損マウスは骨粗鬆症様の表現型を示すことが報告されている。biglycan 欠損マウスの骨芽細胞様細胞は BMP-4 結合能が低下し、BMP-4 による分化誘導時にミネラル化の程度が減少するなど、細胞外マトリクス蛋白質と骨粗鬆症との関連が指摘されている。本研究では、SLRR のうち chondroadherin、decorin および biglycan について発現量を解析したが、これらは SXR リガンド刺激によっても mRNA の発現量にほとんど影響が認められなかったことから、E2IG4 は SLRR のなかでもビタミン K により SXR 特異的に発現調節されている可能性が示された。ビタミン K により誘導された E2IG4 は細胞表面で BMP と結合し、BMP の作用を増強することで骨芽細胞の分化や骨形成を促進する重要な分子と考えられる。また、matrilin ファミリーも細胞外マトリクス蛋白質の一つで、コラーゲンや biglycan などとの結合が報告されており、E2IG4 との結合性を含め骨分化を促進することが期待できる。

### (6) エストロゲン受容体共役因子の精製

full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する HeLa 細胞株から、SERM

結合時のエストロゲン受容体転写共役因子複合体を精製したところ、BRD4 と呼ばれるプロモドメイン蛋白質を同定した。

BRD4 蛋白質は他のプロモドメイン蛋白質と異なり、細胞分裂時においても染色体に結合し続けることが知られている。そのため、BRD4 は、転写が活発に行われている遺伝子プロモーター上の分子タグとして機能し、細胞分裂後の転写因子や polIII の速やかな再集合を保証する因子ではないかと考えられている。本研究において BRD4 が SERM 結合時のエストロゲン受容体に強く結合する AF-1 コアクチベーターであることが明らかになり、エストロゲン受容体ターゲット遺伝子において BRD4 が実際に分子タグとして機能している可能性が示された。

さらに、本研究により、BRD4 はヒストン H4 の K5 および K12 のアセチル化を特異的に認識して結合することが判明した。一方染色体複製時に新たに合成されて deposit されるヒストンは、H4 の K5 および K12 が特異的にアセチル化されていることが知られている。また、BRD4 は複製開始複合体 RFC と結合することが知られており、BRD4 と epigenetic なクロマチンメモリーとの関連が強く示唆された。

#### (7) ビタミン K、エストロゲンのシグナル経路の遺伝子改変動物

ビタミンKおよびエストロゲン受容体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・組織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、骨組織特異的にビタミンK・エストロゲン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。さらにこれらの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将来的な研究課題として重要と考えられる。

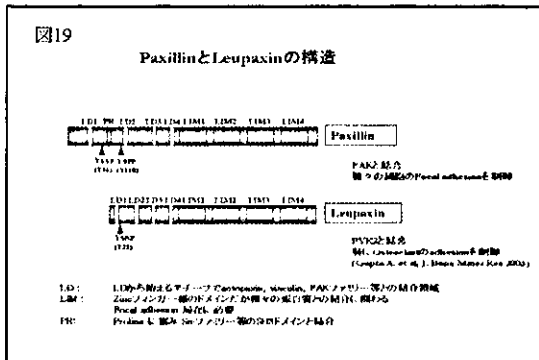
ビタミンKに関しては、疾患モデルマウスの作製、その受容体の同定やグラ化標的タンパクの同定・解析を中心に研究を進めることにより、骨代謝におけるビタミンKの必要性やその作用機序を明確にすることにより、老人性骨粗鬆症の新しい創薬および治療法の開発の鍵と考えられる。

エストロゲンシグナルに関しては、骨代謝における作用機序の解明、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うことが重要と考えられる。

#### (8) 新規骨代謝シグナル制御分子の同定

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。本研究で骨肉腫細胞の解析をきっかけに焦点を当てることとなった接着班に関連する分子 Paxillin は破骨細胞においてもその機能に関連することが示唆されており、われわれの開発してきた Src-Paxillin のシグナルのブロックが破骨細胞にどのような特異的作用を呈するか今後きちんと詰めていく必要があるが、骨粗鬆症治療の有望なターゲットになっていくことは間違いないと考えている。最近になって Paxillin ときわめて類似した構造を持つ

Leupaxin という分子がクローニングされ (図 19)、破骨細胞の接着に関与すること



も示唆されており、Paxillin と Leupaxin がどのような機能分担や協調的作用を持っているのかも解析していく必要がある。一方 Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質として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おり、シグナルの調節機構などは細胞がん化などとの関わりで研究が進んでいるので、破骨細胞におけるコンディショナルノックアウトの解析が待たれる。

### E. 結論

本研究により、ALOX15、WNT10B、 $\beta$ -catenin をはじめとして 20 を超える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ビタミン D ならびに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推進した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

【英文原著】

1. Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxigenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, in press.
2. Fujita M, Urano T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 4, 175-180, 2004.
3. 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* 22, 341-345, 2004.
4. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue