

化を誘導する複数のホスファターゼは Src を活性化する方向に働く。基本的な Src ファミリーの活性は Csk の活性とホスファターゼの活性のバランスによって調節されていると考えられる。ここに SH3 や SH2 と結合する分子 (図3のX) が結合することにより Src ファミリーは開かれた状態に保たれ恒常的活性化が引き起こされると考えられる。このような Src ファミリーの活性化のメカニズムに基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいはシグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

一方、前年度から継続しての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についても本年度でこれまで得られた成果をまとめる。特に骨芽細胞、乳癌細胞、血管細胞などで見つかったエストロゲンの新しい作用、すなわち核外のシグナル伝達分子に働きかけ RNA や蛋白質の合成を伴わずに短時間で起こる作用 (nongenomic) に関わる分子の同定が前年度から進んでいる。このようなエストロゲンの nongenomic な作用のメカニズムの一つとして、前述した Src キナーゼがステロイドホルモン受容体 (ER α /ER β) と直接作用することによるメカニズムも発表されており、またエストロゲンとの結合が、通常は分子内結合により不活性化している Src を活性化することも考えられるので、骨粗鬆症の成因にもつながる可能性があり興味深い。以上のような解析により骨粗鬆

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

これまで幾つかの異なるアプローチを用いて新規の骨代謝シグナル制御分子の同定を試みてきたが、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。

(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。ウエスタンブロット、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。

(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

目的にも述べたように 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 3 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。

(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

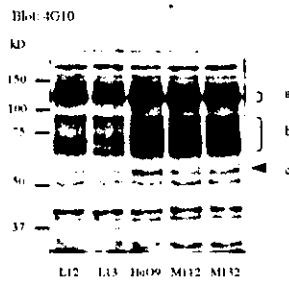
骨細胞においてはエストロゲンの核内における作用については精力的に研究が進められてきており、核外での作用についても即時的反応を示唆するデータは上がってきているものの、具体的なシグナル経路について多くは知られていない。2001 年に Kousteni らは、骨細胞のエトポシドによるアポトーシスが、エストロゲンやアンドロゲンを介して抑制されるという現象に、受容体の膜への局在や即時的な細胞内シグナル伝達が関与していることを明らかにした。我々はこのデータに基づき、膜局在型のエストロゲンが伝えているシグナルを明らかにする目的でエストロゲン機能ドメインを Flag タグを付加した形で膜に発現するコンストラク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

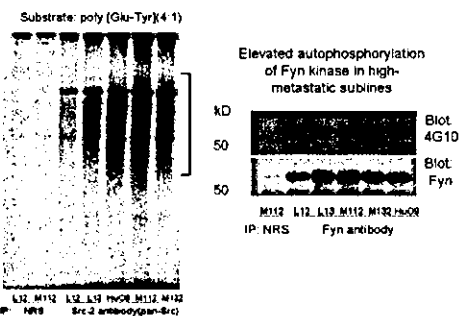
細胞の転移能の異なる同系の骨肉腫細胞株についてのチロシンリン酸化の相違を進めてきた。転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質 (図 4) は解析の結果 Paxillin であった。Paxillin は発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた。また Paxillin と共に Src キナーゼの基質として知られる 130kD の Cas 蛋白質もチロシンリン酸化の亢進した蛋白質としてリン酸化が亢進していた。実際こ

図4 HuO9細胞株のチロシンリン酸化蛋白質群の解析



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]の合成アミノ酸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 5)。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 5 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。

図5 HuO9高転移群でのSrc活性の上昇



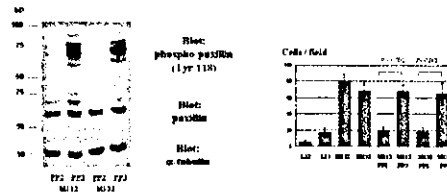
Paxillin の細胞内局在は高転移群でも低転移群でも接着班にみられ、発現量、リン酸化量に変化はあるもののどちらの群でもインテグリンを介した細胞-基質間の接着に関わっていることが確認された。

(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 6)。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。

図6 Src阻害剤によるPaxillinのリン酸化と細胞運動能の変化



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

早急に破骨細胞の機能における役割の確認を行う必要がある。

E. 結論

骨粗鬆症のような老化などの過程で起こる代謝性変化は、特定の遺伝子の変異や発現の ON/OFF のようなはっきりとしたスイッチがあると考えるよりも、いくつかの蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で「疾患遺伝子」を研究する際に、疾患の引き金となる遺伝子変化を追いかけるだけでなく、疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。その中で特に細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の解析は、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る。治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考えられる。Src キナーゼに関わる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が可能になると考える。現在、癌などの分野で進められている Src のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究と比較しても、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。今後最も重要な点は、骨代謝機能を特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

F. 発表

1. 論文発表

1. Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura

H: Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J* 23, 1075-1088, 2004.

2. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Tubulin association and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor at the plasma membrane. *FEBS Let* 577, 339-344, 2004.
3. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori M: Hippocampal Synaptic Modulation by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor. *J Neuroscience*, in press.
4. Miyake I, Hakomori Y, Musu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene*, in press.
5. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene*, in press.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Analysis of estrogen receptor signaling complex at the plasma membrane. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal (2004.8.31-9.4)
2. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: "Biological roles of hyperphosphorylated ShcC docking protein in neuroblastoma cells." 11th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Genova, Italy, (2004.6.16-19)

【国内学会】

1. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一: Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析

(2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)

2. 東浩太郎、田中正光、井上聡、横田淳、大内尉義、堺隆一：骨肉腫細胞の転移性に関わる paxillin のチロシンリン酸化亢進 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
3. 堺隆一、三宅泉、箆島裕子、浅輪珠恵：神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC のリン酸化の意味 (2004.11.21-22) 第 20 回日本小児がん学会 (京都)

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

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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.	<i>J Bone Miner Metab</i>	in press		
13	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.	<i>Geriatr Gerontol Int</i>	4	175-180	2004
19	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.	<i>J Bone Miner Metab</i>	22	341-345	2004
24	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.	<i>Mol Endocrinol</i>	18	1131-1143	2004
37	Ezura Y, Kajita M, Ishida Y, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M	Association of Multiple Nucleotide Variations in the Pituitary Glutaminyl Cyclase Gene (QPCT) With Low Radial BMD in Adult Women.	<i>J Bone Miner Res</i>	19	1296-1301	2004
43	Sudo Y, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M	Association of a single-nucleotide polymorphism in the promoter region of leukemia inhibitory factor receptor gene with low bone mineral density in adult women.	<i>Geriatr Gerontol Int</i>	4	245-249	2004
48	Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H	Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues.	<i>Mol Cell Endocrinol</i>	218	147-153	2004
55	Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N	Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation.	<i>Clin Cancer Res</i>	10	2687-2693	2004
62	Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S	Identification and functional analysis of consensus adnrgen response elements in human prostate cancer cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	325	1312-1317	2004

68	Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Mario M	Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling.	<i>J Cell Physiol</i>	203	193-201	2005
77	Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S	Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma.	<i>Cancer Res</i>	in press		
101	Ikeda K, Inoue S	Estrogen receptors and their downstream targets in cancer.	<i>Arch Histol Cytol</i>	in press		
109	Kato S, Fujiki R, Kitagawa H	Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	89-90	173-178	2004
115	Aihara KI, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Yamashita M, Sudo T, Hayashi H, Yamada Y, Endoh F, Fujimura M, Yoshida T, Yamaguchi H, Hashizume S, Kato M, Yoshimura K, Yamamoto Y, Kato S, Matsumoto T	Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice.	<i>J Biol Chem</i>	279	35798-35802	2004
120	Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S	BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220.	<i>Oncogene</i>	23	6000-6005	2004
126	Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shirode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S	In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation.	<i>Genes Cells</i>	9	983-992	2004
136	Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J	Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor.	<i>EMBO J</i>	23	4813-4823	2004
147	Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S	Wnt/beta -catenin and estrogen signaling converge in vivo.	<i>J Biol Chem</i>	279	40255-40258	2004
151	Yamada T, Kawano H, Sekine K, Matsumoto T, Fukuda T, Azuma Y, Itaka K, Chung UI, Chambon P, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H	SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females.	<i>J Bone Miner Res</i>	19	1452-1461	2004

161	Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K	Function of androgen receptor in gene regulations.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	89-90	627-633	2004
168	Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K	Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16.	<i>Mol Cell Biol</i>	24	6525-6535	2004
179	Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H	Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2.	<i>EMBO J</i>	23	1075-1088	2004
193	Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R	Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane.	<i>FEBS Lett</i>	577	339-344	2004
199	Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori M	Hippocampal Synaptic Modulation by the Phosphotyrosine Adapter Protein ShcC/N-Shc via Interaction with the NMDA Receptor.	<i>J Neuroscience</i>	25	1826-1835	2005
209	Miyake I, Hakomori Y, Musu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R	Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells.	<i>Oncogene</i>	in press		
219	Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R	Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma.	<i>Oncogene</i>	in press		

刊 行 物 の 別 刷

Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxigenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density

Tomohiko Urano¹⁾, Masataka Shiraki²⁾, Masayo Fujita^{1, 3)}, Takayuki Hosoi⁴⁾, Hajime Orimo⁵⁾, Yasuyoshi Ouchi¹⁾, Satoshi Inoue^{1, 3)}

1) Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan, 2) Research Institute and Practice for Involuntal Diseases, 1609 Meisei, Misato-mura, Minami-Azumi-gun, Nagano, 399-8101, Japan, 3) Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, 1397-1, Yamane, Hidaka-shi, Saitama, 350-1241 Japan, 4) Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0015, Japan, 5) Health Science University, 7187 Kodachi, Kawaguchiko-machi, Minami-Tsuru-gun, Yamanashi, 401-0380, Japan

Offprint requests to: S. Inoue (Email: INOUE-GER@h.u-tokyo.ac.jp)

Short title: Association of an SNP in *ALOX15* gene with BMD

Abstract

The 12/15-lipoxygenase gene *Alox15* has been identified as a susceptibility gene for bone mineral density in mice through combined genetic and genomic analyses. Here, we studied the association between bone mineral density and an *ALOX15* gene single nucleotide polymorphism to assess the potential involvement of the human *ALOX15* gene in the postmenopausal osteoporosis. Specifically we examined the association between a single nucleotide polymorphism at -5299G/A in the *ALOX15* 5'-flanking region with BMD in 319 postmenopausal Japanese women (66.7 ± 8.9 years, mean \pm SD). We found that subjects bearing at least one variant A allele (GA + AA; n=273) had significantly lower Z scores for lumbar spine and total body bone mineral density than did subjects with no A allele (GG; n=46) (lumbar spine, -0.25 ± 1.34 versus 0.48 ± 1.70 ; $p = 0.0014$; total body, 0.25 ± 1.01 versus 0.62 ± 1.11 ; $p = 0.048$). These findings suggest that the *ALOX15* gene is one of the genetic determinants of BMD in postmenopausal women. Accordingly, this polymorphism could be useful as a genetic marker for predicting the risk of osteoporosis.

Key words adipogenesis, *ALOX15*, PPAR γ , osteoporosis, bone mineral density, polymorphism

Introduction

Osteoporosis is characterized by low bone mineral density (BMD), increased bone fragility, and consequently increased risk of fracture [1]. Studies of twins and siblings have shown that BMD is under genetic control, with estimates of heritability ranging from 50% to 90% [2,3]. BMD is regulated by interaction of multiple environmental and genetic factors, each having modest effects on bone mass and bone turnover [4,5]. Polymorphisms of several genes have been investigated to clarify the determinants of BMD [6,7]. These genes of which polymorphisms were associated with BMD include those implicated in bone formation by regulation of osteoblast growth and function, such as *vitamin D receptor* gene [8], *transforming growth factor beta1 (TGFβ1)* gene, *collagen type Ia1 (COL1A1)* gene [9], *peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPARγ)* gene [10] and *low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)* gene [11]. Identification of candidate genes that affect bone mass will be useful for early detection of individuals who are at risk of osteoporosis and early institution of preventive measures.

The decrease in bone volume associated with osteoporosis is accompanied by an increase in marrow adipose tissues [12, 13]. Indeed, an increase in marrow adipocytes is observed in several conditions that lead to bone loss, such as ovariectomy [14], immobilization [15], and treatment with glucocorticoids [16]. Recent studies have identified rodent quantitative trait locus associated with increased BMD in the mouse gene encoding 12/15-lipoxygenase [17], the enzyme that converts linoleic acid and arachidonic acid into endogenous ligands for the PPARγ [18-20]. Activation of this pathway in marrow-derived mesenchymal progenitors stimulates adipogenesis and inhibits osteoblastogenesis [21, 22]. Mice that are deficient in this gene or have been treated with 12/15-lipoxygenase inhibitors demonstrate increased bone mass as compared with controls [17]. These findings suggest that genetic variants of the 12/15-lipoxygenase encoding gene may affect the BMD in humans as well as mice. The mouse 12/15-lipoxygenase enzyme corresponds to at least three lipoxygenases in humans. 15-lipoxygenase has two isoenzymes: type 1 (human *ALOX15*, encoded by a gene at chromosome 17p13.3) and type 2 (human *ALOX15B*, encoded by a separate gene at 17p13.1). 12-lipoxygenase (human *ALOX12*, encoded by a gene at chromosome 17p13.1) is predominantly expressed in platelets and macrophages and is distinct from 15-lipoxygenase [23]. In the present study, we examined the possibility that there is an association between a polymorphism in the human *ALOX15* gene and BMD in Japanese women to investigate possible contribution of the lipoxygenase in the bone metabolism.

Materials and methods

Subjects

We analyzed genotypes in DNA samples from 319 healthy postmenopausal Japanese women (66.7 ± 8.9 years, mean \pm SD). We excluded women having endocrine disorders such as hyperthyroidism, hyperparathyroidism, diabetes mellitus, liver disease, and renal disease; those who used medications known to affect bone metabolism (e.g., corticosteroids, anticonvulsants, and heparin); and those with an unusual gynecologic history. All subjects were unrelated volunteers. Each subject was provided informed consent before entering the study.

Measurement of bone mineral density and biochemical markers

We measured the lumbar spine BMD and total body BMD of participants by dual-energy X-ray absorptiometry using the fast-scan mode (DPX-L; Lunar, Madison, WI). The BMD data were recorded as Z scores, as the deviation from the weight-adjusted average BMD for each year of age, based on data from 20,000 Japanese women. We also measured subjects' serum concentrations of alkaline phosphatase (ALP), intact osteocalcin (I-OC), intact parathyroid hormone (PTH), calcitonin, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, total cholesterol (TC) and triglyceride (TG). We also measured urinary ratios of deoxypyridinoline (DPD) to creatinine using the HPLC method.

Determination of a single nucleotide polymorphism in the ALOX15 gene

We extracted a polymorphic variation of the putative *ALOX15* gene promoter/enhancer region from the Assays-on-Demand™ SNP Genotyping Products database (Applied Biosystems, Foster City, CA) and, according to its localization on the gene, denoted it -5299 G>A. We determined the -5299G/A polymorphism of the *ALOX15* gene using the TaqMan (Applied Biosystems) polymerase chain reaction (PCR) method [24]. To determine the *ALOX15* SNP we used Assays-on-Demand SNP Genotyping Products C_926671_10 (Applied BioSystems), which contains sequence-specific forward and reverse primers and two TaqMan MGB probes for detecting alleles. During the PCR cycle, two TaqMan probes competitively hybridize to a specific sequence of the target DNA and the reporter dye is separated from the quencher dye, resulting in an increase in fluorescence of the reporter dye. The fluorescence levels of the PCR products were measured with the ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems), resulting in clear identification of three genotypes of the SNP.

Statistical analysis

We divided subjects into those having one or two chromosomes of the major A-allele and those with only the minor G-allele encoded at the same locus. Comparisons of Z scores and biochemical markers between these two groups were subjected to

statistical analysis (Student's *t*-test; StatView-J 4.5). A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Association of ALOX15 Gene Polymorphism With Bone Mineral Density

Among our 319 subjects, 46 were GG homozygotes, 155 were GA heterozygotes, and 118 were AA homozygotes. Allelic frequencies were 0.613 for the A allele and 0.387 for the G allele in this population. The allelic frequencies of this SNP in the present study were in Hardy-Weinberg equilibrium.

We compared the 273 subjects bearing at least one chromosome with the A allele (genotype GA + AA) and the 46 subjects having no A allele (GG) with respect to their Z scores for lumbar spine and total body BMD. Those with the A allele had significantly lower Z scores for lumbar spine BMD (-0.25 ± 1.34 versus 0.48 ± 1.70 ; $p = 0.0014$) (Fig. 1A) and total body BMD (0.25 ± 1.01 versus 0.62 ± 1.11 ; $p = 0.048$) (Fig. 1B). As shown in Table 1, the background and biochemical data did not significantly differ between these groups.

Discussion

Various regulating elements have been identified within the *ALOX15* 5'-flanking promoter/enhancer region, including a site for binding with Sp1 [25], AP1 [25], and GATA [26], as well as sites for methylation [27] and acetylation [28, 29] and a Stat6 response element [29], suggesting that 15-lipoxygenase expression is directly regulated through transcription regulation. In the present study, we observed a significant association between BMD and a G/A SNP at the -5299 site in the *ALOX15* 5'-flanking region. This is the first report to our knowledge that a common SNP in the *ALOX15* gene affects on BMD. One possible explanation for this effect is that this 5' -flanking region polymorphism may be involved in the newly defined transcriptional regulating element of the *ALOX15* promoter/enhancer. Alternatively, the 5'-flanking region polymorphism may have a linkage with another base of the *ALOX15* promoter/enhancer that may control transcription of the *ALOX15* gene. It is also possible that this SNP may be linked with mutation of the *ALOX15* exons or another unidentified gene adjacent to the *ALOX15* locus, which affect on the bone mass.

Although there are three lipoxygenases in humans, *ALOX15*, *ALOX15B*, and *ALOX12*, that correspond to 12/15-lipoxygenase in mice [23], we know little of their

roles in human bone metabolism. Our results suggest that the 15-lipoxygenase type1, the *ALOX15*, may have a specific function in the regulation of bone mass in human. It should be required to determine how signals from 15-lipoxygenase can be transduced to the regulation of the bone metabolism.

Three major cellular events are involved in senile osteoporosis; they are declining levels of osteogenesis, increasing numbers of apoptotic osteoblasts and osteocytes, and increasing levels of bone marrow adipogenesis [30-32]. The bone marrow adipogenesis that occurs with aging may be due to alterations in cell differentiation, in part by PPAR γ activation [33-35] and increasing lipid oxidation [36]. Previous reports demonstrated that 12/15-lipoxygenases are involved in this system [17, 18, 37, 38], suggesting that 12/15-lipoxygenase may increase with aging in progenitor cells and activate adipogenesis. It has been also shown that 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease, which is the most common neurodegenerative disorder of the elderly [39]. Therefore, it is tempting to speculate that 12/15-lipoxygenase is increased associated with aging and senile osteoporosis. To test this hypothesis, measurement of 12/15-lipoxygenase activity and association study between BMD and the *ALOX15* gene SNP in older subjects would be desired.

In conclusion, our finding suggests that the *ALOX15* gene may be a genetic determinant of BMD in postmenopausal women. Examining the variation in the *ALOX15* gene will hopefully enable us to elucidate one of the mechanisms of involutional osteoporosis. Furthermore, the variation may be a potential genetic susceptibility factor that need to be further evaluated with regard to the risk of other diseases in which 15-lipoxygenase have been clearly implicated, including atherosclerosis [40], asthma [41], cancer [42] and glomerulonephritis [43].

Acknowledgments

This work was partly supported by grants from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare and the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. We thank Ms. E. Sekine, C. Onodera, and M. Kumasaka for expert technical assistances.

References

1. Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N (1994) The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9:1137-1141
2. Flicker L, Hopper JL, Rodgers L, Kaymakci B, Green RM, Wark JD (1995) Bone density determinants in elderly women: a twin study. *J Bone Miner Res* 10:1607-

1613

3. Young D, Hopper JL, Nowson CA, Green RM, Sherwin AJ, Kaymakci B, Smid M, Guest CS, Larkins RG, Wark JD (1995) Determinants of bone mass in 10 to 26 year old females: a twin study. *J Bone Miner Res* 10:558-567
4. Krall EA, Dawson-Hughes B (1993) Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner Res* 8:1-9
5. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G (1995) Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res* 10:2017-2022
6. Nelson DA, Kleerekoper M (1997) The search for the osteoporosis gene. *J Clin Endocrinol Metab* 82:989-990
7. Liu YZ, Liu YJ, Recker RR, Deng HW (2002) Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *J Endocrinol* 177:147-196
8. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284-287
9. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Ralston SH (1998) Relation of alleles of the collagen type I α 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 338:1016-1021
10. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. (1999) Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPAR γ expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 260:122-126.
11. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S (2004) 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
12. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G (1971) Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop* 80:147-154
13. Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg T (1987) Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8:157-164

14. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA (1986) Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7:119-123
15. Miniare P, Meunier PJ, Edouard C, Bernard J, Courpron J, Bourret J (1974) Quantitative histological data on disuse osteoporosis. *Calcif Tissue Res* 17:57-73
16. Wang GW, Sweet D, Reger S, Thompson R (1977) Fat cell changes as a mechanism of avascular necrosis in the femoral head in cortisone-treated rabbits. *J Bone Joint Surg* 59A: 729-735.
17. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES (2004) Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene *Alox15*. *Science* 303:229-232
18. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK (1999) Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400:378-382
19. Kuhn H, Walther M, Kuban RJ, Wiesner R, Rathmann J, Kuhn H (2002) Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69:263-290
20. Nosjean O, Boutin JA (2002) Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal* 14:573-583.
21. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL (2002) Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* 143:2376-2384
22. Khan E, Abu-Amer Y (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med* 142:29-34
23. Krieg P, Marks F, Furstenberger G (2001) A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics* 73:323-330
24. Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, Higaki J, Fu Y, Fukuda M, Hozawa A, Matsubara M, Kitaoka H, Tsuji I, Araki T, Satoh H, Hisamichi S, Imai Y, Ogihara T (2001) Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. *Hypertension* 38:1321-1324
25. Kelavkar U, Wang S, Montero A, Murtagh J, Shah K, Badr K (1998) Human 15-lipoxygenase gene promoter: analysis and identification of DNA binding sites for IL-13-induced regulatory factors in monocytes. *Mol Biol Rep* 25:173-182
26. Kamitani H, Kameda H, Kelavkar UP, Eling T (2000) A GATA binding site is involved in the regulation of 15-lipoxygenase-1 expression in human colorectal

Figure legends

Figure 1. Z scores of lumbar spine and total body BMD in subject groups with each genotype of *ALOX15* gene polymorphism in the 5'-flanking region (-5229G/A). **A** Z scores for lumbar spine BMD are shown for genotype AA+ GA and genotype GG. Values are expressed as mean \pm SE. Numbers of subjects are shown in parentheses. **B** Z scores for total body BMD are shown in the same manner as in **A**.

Table 1. Comparison of background, BMD and biochemical data between subjects bearing at least one A allele (AA + GA) and subjects with no A allele (GG) in the *ALOX15* gene 5'-flanking region (-5299G/A).

Items	Genotype (mean \pm SD)		<i>P</i> value
	GG	GA+AA	
Number of subjects	46	273	
Age (years)	69.0 \pm 8.9	66.3 \pm 8.9	NS
Height (cm)	149.5 \pm 6.9	150.3 \pm 6.1	NS
Body weight (kg)	49.6 \pm 8.6	50.3 \pm 7.9	NS
Lumber spine BMD (Z score)	0.48 \pm 1.70	-0.25 \pm 1.37	0.0014
Total body BMD (Z score)	0.62 \pm 1.12	0.25 \pm 1.01	0.048
ALP (IU/L)	185.6 \pm 63.9	193.4 \pm 66.0	NS
I-OC (ng/mL)	8.2 \pm 3.2	7.8 \pm 3.6	NS
DPD (pmol/ μ mol of Cr)	7.0 \pm 3.0	7.6 \pm 2.7	NS
Intact PTH (pg/mL)	38.6 \pm 20.0	35.2 \pm 15.1	NS
Calcitonin (pg/mL)	16.6 \pm 4.5	23.1 \pm 11.4	NS
1,25 (OH) ₂ D ₃ (pg/ mL)	33.0 \pm 7.7	35.7 \pm 11.8	NS
TC (mg/dL)	193.0 \pm 45.0	199.4 \pm 36.5	NS
TG (mg/dL)	142.5 \pm 74.0	142.4 \pm 81.8	NS
% fat	32.1 \pm 6.6	31.9 \pm 7.7	NS
BMI	22.1 \pm 3.0	22.1 \pm 3.1	NS

BMD, bone mineral density; ALP, alkaline phosphatase; I-OC, intact-osteocalcin; DPD, deoxypyridinoline; PTH, parathyroid hormone; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; BMI, body mass index; NS, not significant. Statistical analysis was performed according to the method described in the text.