

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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成17(2005)年4月

目 次

I.	総合研究報告 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 - 12
	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 - 19
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

総合研究報告書

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）
総合研究報告書

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した。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 LRP5、DBP、GnRH、QPCT、ALOX15 をはじめとする 20 を超える 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た。ゲノム医学の手法を応用し、DNA チップ・マイクロアレイ法、プロテオーム解析と主任研究者が考案した 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、蛋白質化学、遺伝子改変動物、SNP を用いたヒト遺伝学を活用して骨粗鬆症の病態を明らかにし、診断・治療・予防への応用から、国民の健康、医療、福祉の増進を目指した。

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) エストロゲン応答遺伝子の検索と骨粗鬆症における役割 (分担：井上)

閉経後骨粗鬆症の主要な原因は、卵巣機能廃絶に伴うエストロゲン分泌低下によって、エストロゲンへの応答が不足することによる。エストロゲンへの応答には、二つのエストロゲン受容体 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ が媒介している。 $ER\alpha$ と $ER\beta$ 両方のシグナルを阻害する ER 変異体を発現させたトランスジェニックラットを作製し、雄における骨代謝に対する ER の役割を検討した。これらエストロゲン低応答性トランスジェニックラット胎児頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞ならびに野生株由来の初代培養骨芽細胞から mRNA を採取し、その mRNA から DNA チップ法を用いて発現に差違のある遺伝子をリストアップすることにより骨芽細胞によるエストロゲン応答遺伝子を探索した。さらに、Genomic binding site cloning 法、マイ

クローレイ法、DNA チップ法によりエストロゲン応答遺伝子を網羅的に同定し、それらの機能と骨粗鬆症との関連を検討した。

- (2) 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) α 、 β 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。

- (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、 β 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) 骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下における分子機構 (分担：井上)

ラット初代培養骨芽細胞を 1:2ratio で継代することにより細胞の passage を増加させ細胞老化を誘導した。各 passage における 10%FCS での増殖能ならびに TGF β を添加後 48 時間後の細胞数の変化率を測定した。各条件下での細胞抽出

液を用いて細胞周期制御因子の発現を Western blot 法を用いて検討した。

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

p57^{Kip2} 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、発現に違いのある遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。

- (6) 骨における新しい TGF β 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 β (10 ng/ml)、Wnt3A (50 ng/ml) もしくは TGF β 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。

- (7) 骨芽細胞における老化応答遺伝子の探索と老化応答遺伝子 Metallothionein が骨量に及ぼす影響 (分担：井上)

老人性骨粗鬆症の主要な要因として、骨芽細胞の老化があげられる。継代を重ねることにより細胞老化が誘導された 8 passage でのヒト由来骨芽細胞から mRNA を抽出し、老化に至っていない 2 passage の mRNA をコントロールとしてマイクロアレイ法を用いて、骨芽細胞の細胞老化により発現上昇する遺伝子ならびに発現低下する遺伝子をリストアップした。そのリスト中の Metallothionein (MT) に注目し、BALB/C マウスにリコンビナント MT を 5 回注射し、体内に抗 MT 抗体を産生させた。抗 MT 抗体産生マウスに塩化水銀 (1 mg/kg) を週に一回 3 週間皮下に注射した後に骨量を測定した。

- (8) 骨粗鬆症疾患遺伝子の遺伝学的探索 (分担：井上)

1) 骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

骨粗鬆症発症に関わる遺伝的因子の解明を目指し、性ホルモン、老化、骨代謝、骨粗鬆症治療薬シグナル経路に関連する遺伝子を対象に、遺伝子多型と骨量、骨代謝マーカーの関連を解析した。DBP、osteocalcin、IL6、TNF α 、IL1RA、 β 3AR、Klotho、BNP、GnRH、TNFR1、TNFR2、DKK1、LRP5/6 の遺伝子多型と、骨量もしくは骨代謝マーカーとの相関を解析した。

2) Wnt- β 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

LRP5/6、DKK1 と関連して 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 β -グリセロリン酸添加 α -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。

3) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症

WNT-LRP5 シグナル伝達調節因子である WNT10B、FRZB、DVL3 ならびに β -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。

4) 骨における ALOX15-PPAR γ 経路と骨粗鬆症

ヒト ALOX15 の 5'上流領域ならびに PPAR γ 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 β -グリセリン酸添加 α -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。ALOX15、ALOX15B、ALOX12、COL2A1、ALP 遺伝子発現の変化を経時的に SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。骨芽細胞にデキサメタゾン(10^{-7} M)を添加し、添加 6 時間後の RNA を採取し同様の解析を行った。

(9) 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反応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 K₂ (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、ウエスタンブロットにより発現量の変化を解析した。

(10) 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 K₂ 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 K₂ (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。

(11)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_{CT}-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 K₂ (メナキノ-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_{CT}-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_{CT}-SXR 安定発現細胞(MG-63/VP16 AD_{CT}-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_{CT}-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。

(12)核内受容体とその共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割 (分担：加藤)

エストロゲン受容体リガンド結合ドメインをプローブ蛋白とし、エストロゲン存在下でいくつかの吸着カラムとグリセロールグラジエント密度勾配遠心法を用いて AF-2 転写共役因子複合体の単離を行なった。また、同様に、エストロゲン受容体の AF-1 活性を担う AB 領域をプローブ蛋白としたアフィニティークロマトグラフィーとグリセロールグラジエント密度勾配遠心法により AF-1 転写共役因子複合体の単離を行った。さらに、full length のエストロゲン受容体を恒常的に発現する細胞株の樹立を行い、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。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。

単離された複合体構成因子とエストロゲン受容体との相互作用の解析は免疫沈降法と GST プルダウン法により行った。また、複合体の構成因子の細胞内での機能解析は、RNAi 法、アンチセンス法、

レポーターアッセイ法、クロマチン免疫沈降法、細胞増殖測定法等により行った。

(13)動物モデル活用した骨粗鬆症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子・標的因子の同定、機能解析(分担:津久井)

分担者の研究分担項目のうち、受容体・酵素系等を介して作用する骨粗鬆症疾患の治療薬であるビタミンKおよびエストロゲンシグナル経路について網羅的に遺伝子改変動物の作製を行った。特に分担者は、本研究でビタミンK関連因子としての γ -カルボキシラーゼおよびそ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う。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 α および ER β)、およびその下流応答遺伝子群との関係について焦点を絞り解析を行っていく。なお、ビタミンDに関しては、本研究課題の分担者である加藤茂明(東大・分生研・教授)が既にその受容体の遺伝子改変マウスを作製しており、分担項目として分かれている。それ故、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う。

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

1. リガンド非依存性の変異エストロゲン

レセプターである(caER α および caER β)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 γ -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

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する。

(14)細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割(分担:堺)

1) 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

種々の刺激で細胞内のチロシンリン酸化にどのような変化が起こるのかを解析する。実際には、リン酸化チロシンを含むスポットの変化をただ観察するだけではなく、未知のスポットは切り出して質量分析によって同定を行う必要があり、総タンパク量に対するリン酸化蛋白質の比率がきわめて低いことから、リン酸化チロシンを含む蛋白質を精製してから解析することが望ましい。そのためにまず、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する。このようにして各種基質・ドッキング蛋白質のスポットを可能な限り同定し、刺激による発現量、リン酸化の程度の変化を記録する。また主要ドッキング蛋白質Shc、IRS-1、FRS2、Cas、Dok、Gab-1などに

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する。

2) 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する。さらに同定したエストロゲン受容体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。

3) 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。

4) 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/SK3 アナログなどのように活性化分子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。

(倫理面への配慮)

東京大学医学部附属病院ならびに各共同研究機関には外部委員を含めた倫理委員会が機能しており、ヒト遺伝子、遺伝子組換え実験、実験動物の取り扱いを含む本研究については国ならびに公的機関が示す法律、指針に従って厳密に審議される。特に患者の遺伝子を扱う研究においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、患者のプライバシーの保護に基づきインフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただく体制を整え、倫理委員会承認を得ており、倫理面の問題は無いと判断された。

C. 研究結果

(1) エストロゲン応答遺伝子の検索と骨粗鬆症における役割

エストロゲンは、性ホルモンとして女性の生殖機能に必須であるのみならず、脳や心血管系、骨代謝においても様々な作用を及ぼしている。骨代謝に関しては、エストロゲンは特に重要な役割を担っており、閉経後や卵巣摘出による低エストロゲン状態において骨密度が減少し、エストロゲン補充によってその減少が阻止される。骨の細胞にはエストロゲン受容

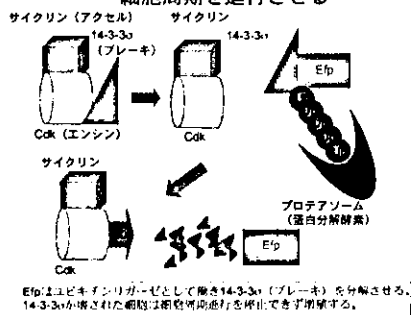
体 ER α 、ER β が発現している。

我々は、ER α と ER β 両方のシグナルを阻害する ER 変異体を発現させたトランスジェニックラットを作製し、骨代謝に対する ER の役割を検討した。雌ラットにおいて骨におけるエストロゲン補充による骨量減少予防効果に関して抵抗性を示すことが明らかにし、エストロゲンの骨量減少予防作用に ER α 、ER β が重要な役割を果たすことを直接示した。さらに雄トランスジェニックラットを用い、雄の骨代謝における ER の関与を検討した。トランスジェニックラットおよび野生ラットをエストロゲン投与群、プラセボ投与群に分け、大腿骨遠位部骨密度を測定したところ、野生ラットでは有意な骨密度の増加が認められたのに対し、トランスジェニックラットでは、エストロゲン投与による有意な骨密度の増加は認められなかった。このことから、卵巣摘出後の雌で ER を介した骨量維持作用が認められたのと同様に、雄の場合でもエストロゲン補充による骨代謝への作用は ER を介していることが示唆される。さらに、このラットの骨芽細胞初代培養系を用いて DNA チップ解析を行い、骨芽細胞における ER の下流応答遺伝子群を探索したところ、サイクリン D2 を含むいくつかの候補遺伝子を同定した。サイクリン D2 は細胞周期の正の進行役として CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し、その酵素活性を上昇させることが知られている。そこで、骨芽細胞に生理的濃度のエストロゲンを添加し、その増殖が誘導されるときにサイクリン D2 の発現変化を Western blot 法を用いて検討したところサイクリン D2 の発現増加が確認された。さらにそのファミリーであるサイクリン D3 の発現も同時に増多することも確認した。同時に免疫沈降法を用いてエストロゲン添加により骨芽細胞内でサイクリン D2 と D3 が CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し CDK4 ならび

に CDK6 の酵素活性を上昇させることも確認した。以上よりエストロゲンによる骨芽細胞増殖にはサイクリン D2、D3/CDK4、CDK6 を介した経路が機能していることが示された。

さらに、本研究において、新しい標的遺伝子を探索する目的で、ヒトゲノム上に存在する ER が結合する DNA 断片を単離し、その近傍に、複数の新規エストロゲン応答遺伝子を同定し(Genomic binding-site cloning)、並行して、mRNA レベルの発現の差を指標に、DNA チップ法、マイクロアレイ法を活用してエストロゲン応答遺伝子を複数単離した。なかでも、骨芽細胞のエストロゲン応答遺伝子であることを明らかにした Efp の乳癌細胞における分子作用機構を解明した。エストロゲン応答性乳癌細胞に Efp を発現させたところ増殖を促進し、エストロゲン非依存性の増殖能を獲得した。逆に Efp の発現を抑えると増殖が抑制された。Efp は細胞周期のブレーキ役 14-3-3 σ の破壊を担うユビキチンリガーゼであることを示し、細胞周期進行の新しい分子メカニズム、癌耐性獲得の新しい病態モデルを提唱した(図 1)。このことから Efp

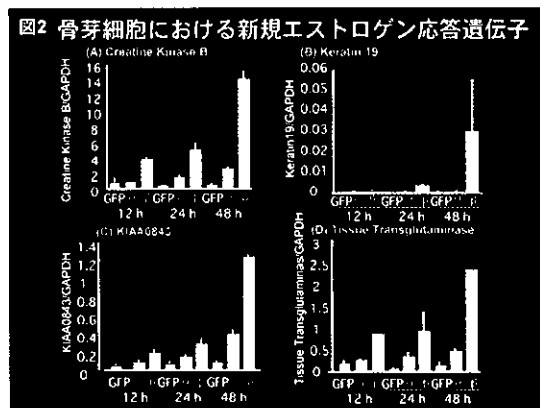
図1 Efpは14-3-3 σ の蛋白分解を誘導することにより細胞周期を進行させる



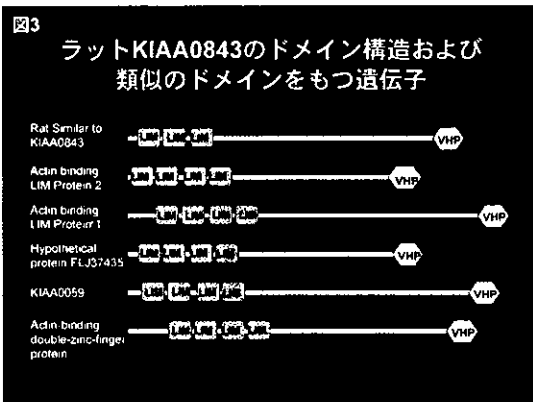
は癌治療、創薬の新規分子標的であることを示した。これは、骨粗鬆症治療薬としてのエストロゲンの副作用を減らすための標的分子としても注目される。

(2) 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 α 、 β 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 α 、 β 共通の応答遺伝子であることが示唆された(図 2)。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 3 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。

(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

グルココルチコイドは薬剤性の骨粗鬆症を引き起こし、続発性骨粗鬆症の大きな成因となっている。本研究では、増殖期、培養 2 週、培養 4 週それぞれにおけるその応答遺伝子をマイクロアレイで解析し、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を複数得た(表 1)。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 δ (C/EBP δ)、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異なってくるが見出された(表 1)。実際の発現を C/EBP δ 、NGFI-B についてリアルタイム PCR で確認したところ、図 4 のように発現の増加が認められた。

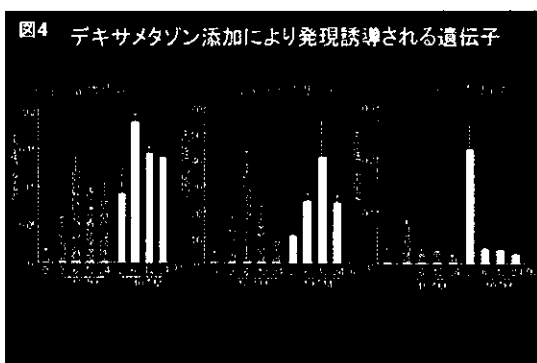
(4) 骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下における分子機構

老化骨芽細胞においては血清下での増殖能の低下に先立って、TGF β による細

表1 マイクロアレイ解析より得られた骨芽細胞におけるデキサメタゾン誘導遺伝子とその作用

増殖期	分化誘導後(2週)	分化誘導後(4週)	機序
IGF II mRNA BP			IGF II抑制
C/EBP δ			IGF I抑制
MGP			石灰化抑制
KLF9			転写因子
CTGF			骨形成促進
Endothelin1			大動脈血管壊死
Adrenomedullin			骨形成促進
Follistatin			Activin 阻害抑制
NGFI-B			アポトーシス誘導

発現増加 発現増加なし



胞増殖応答性ならびに ALP 活性能の低下が出現した。細胞周期制御因子に関しては細胞周期の負の制御因子であるはずの p57 の発現が継代とともに劇的に減少し、8 passage 以後では検出が出来なくなった。これら細胞に TGF β を添加すると、添加 24 時間後には p57^{Kip2} 蛋白が 90%以上減少した。継代とともに TGF β 添加前の p57 の発現量は減少していったが TGF β によるその発現の減少率に変化はなかった。一方、他の CDK 阻害因子である p27 の発現が継代とともに増加し、TGF β 添加後も発現減少を認めなかった。さらに免疫沈降を用いてこれら蛋白とその阻害標的である CDK2 や CDK4 ならびにサイクリン D2 との結合を確認したところ継代とともにこれら蛋白は p57 との結合から p27 との結合にシフトした。

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

p57 は骨粗鬆症薬であるビタミン D に

応答することを主任研究者は見出している。当研究では、p57^{Kip2} 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を施行した。その結果 p57^{Kip2} ノックアウトマウスにより発現増加(表 2)ならびに減少(表 3)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。

(6) 骨における新しい TGF β 応答経路の探索

TGF β /BMP シグナルは、Wnt シグナルとともに骨形成ならびに骨粗鬆症の病態に深く関わっている。ラット初代培養骨芽細胞では FGF2 遺伝子は TGF β 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 TGF β 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 TGF β 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 TGF β 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。

(7) 骨芽細胞における老化応答遺伝子の探索と老化応答遺伝子 Metallothionein が骨量に及ぼす影響

ヒト由来骨芽細胞における老化応答遺伝子を表 4 に記した。興味深いことに Metallothionein (MT) が老化骨芽細胞で激減していることが示された。

MT は、水銀をはじめとする金属の解毒作用に関連する因子として知られている。その一方で、骨にもその発現が確認されている。今回、この MT が骨代謝に及ぼす影響に関して検討を加えた。MT

を注射することにより抗 MT 抗体を産生し、血清中の抗 MT 抗体が高値であるマウスを作成した。この抗 MT 抗体高値のマウスに水銀(HgCl)を添加すると骨量が劇的に減少することを発見した。

(8) 骨粗鬆症疾患遺伝子の遺伝学的探索

1) 骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

骨粗鬆症発症に関わる遺伝的因子の解明を目指し、骨粗鬆症疾患候補遺伝子の遺伝子多型と骨量、骨代謝マーカーの関連を解析した。DBP、IL6、TNF α 、 β 3AR、Klotho、BNP、GnRH、TNFR1、LRP5/6 の遺伝子多型において、骨量もしくは骨代謝マーカーとの有意な相関を認めた。特にこれらのうち、複数の遺伝子多型で、p 値が 0.01 を下回る有意差を得ており、遺伝子診断のための新しいマーカーとしての活用、オーダーメイド医療への応用が期待された。

2) Wnt- β 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 \rightarrow 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)。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 5)。

3) 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 β -catenin 遺伝子のイントロン 1 に

表 2 p57^{Kip2} 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	Adams2	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 (fascin 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3 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	Dbp	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

表4a 骨芽細胞老化にて発現上昇する遺伝子

Transcription Factor
 human forkhead gene, freac-6 (FKHL10)= mouse Fkh10
 NFRKB (Nuclear factor related to kappa B binding protein)
 Smad1

Cancer related gene
 TAN-1 (the human homolog of the Drosophila notch gene,
 Notch (Drosophila) homolog 4)
 Bcl-2
 Bcl-3 (B-cell CLL/lymphoma 3)
 IPL/Tssc3 (Tumor suppressing subtransferable candidate 3)
 c-abl

Cell cycle
 Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kD, elongin C)
 p21^{Cip1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) *

Cell adhesion molecule
 DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule)
 ALCAM/CD166 (Activated leucocyte cell adhesion molecule)
 Integrin alpha 7 chain
 Desmoplakin (DPI, DPII)
 WD-repeat protein 1 (actin interacting protein 1)

NAD related gene
 NADH:ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit homolog
 Lactate dehydrogenase A
 SCO (cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog 2 (SCO2)

Collagen
 Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)*
 Collagen, type IV, alpha 2
 Collagen, type VI, alpha 1*
 Collagen, type VI, alpha 2
 Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)
 Fibronectin 1*
 Osteonectin / SPARC (Secreted protein, acidic, cysteine-rich)*

Chaperone
 BiP (glucose-regulated 78K protein)*
 Crystallin alpha B chain

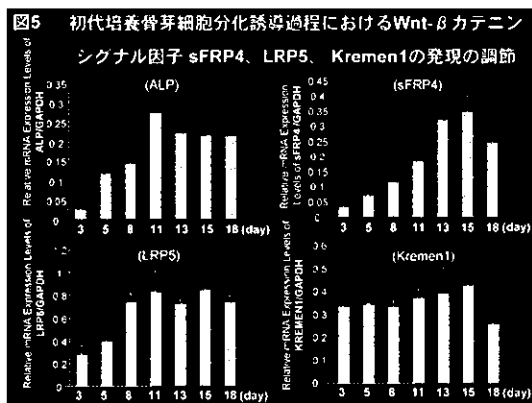
Others
 NIK (Nck interacting kinase)
 FKBP12 (FK506-binding protein 1A (12kD))
 PAF-AH2 (Platelet-activating factor acetylhydrolase 2)*
 Parathyroid hormone receptor 1
 human serum amyloid A (SAA2)
 Oxysterol binding protein (OSBP)
 Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
 Dihydropyrimidine branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)
 Coagulation factor XIII, A1 polypeptide
 Poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)
 carbonic anhydrase VI (CA6)

*は過去に老化応答遺伝子として報告のあった遺伝子

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 6 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

表4b 骨芽細胞老化にて発現低下する遺伝子

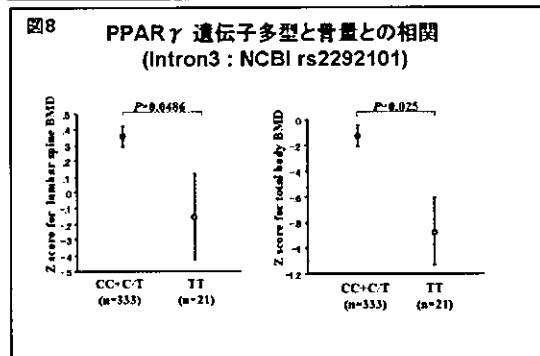
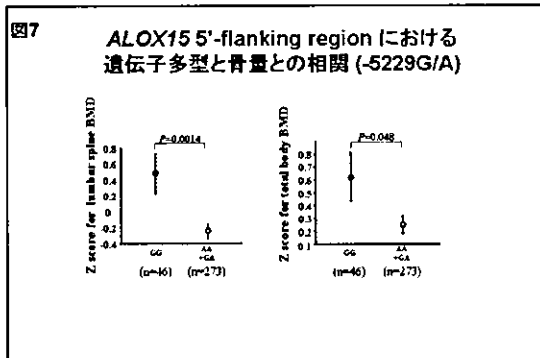
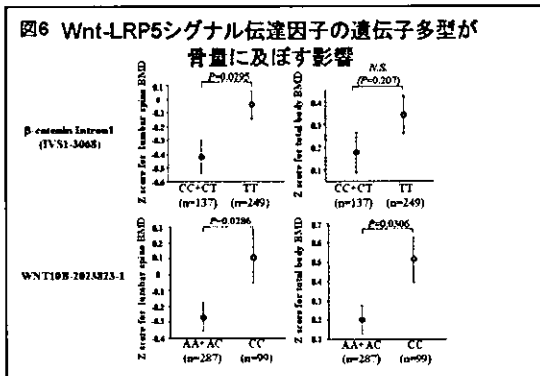
Metallothionein 1H
 Metallothionein 2A
 Mitochondrial ribosomal protein S15
 Mad4 homolog
 Cytochrome c-1
 Olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 47 pseudogene
 Glioma-associated oncogene homolog (zinc finger protein)
 Latent transforming growth factor beta binding protein 2
 Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease
 Glutaminyl-tRNA synthetase
 Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 (epsilon, 82kD)
 ADP-ribosylation factor-like 1
 Serologically defined colon cancer antigen 28
 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2
 Aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)
 Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
 POU domain, class 3, transcription factor 4
 X-linked retinopathy protein
 RAB2, member RAS oncogene family
 Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
 Laminin, alpha 4
 Neuropeptide Y receptor Y5



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 6 下段)。

4) 骨における ALOX15-PPAR γ 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 γ 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 7、8)。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

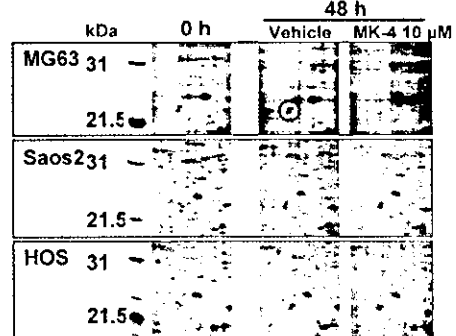


ルで確認された。

(9) 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

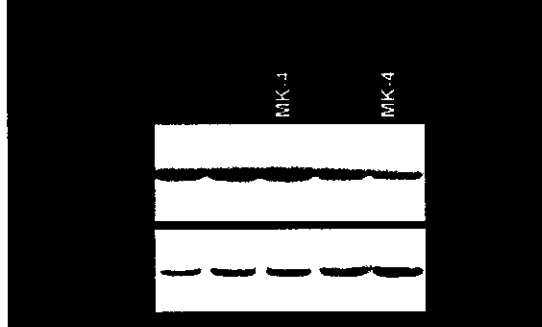
骨芽細胞様細胞株 MG63 をビタミン K₂(MK-4)で処理し、2次元電気泳動を応用したプロテオーム解析を行った。その結果、発現量が減少する2つの蛋白質スポットが認められた(図9)。このスポットは、銀染色およびCBB染色ともに減少が認められた。両スポットは約23 kDaでpI 5付近に隣接して存在しており、MALDI-TOF/MSによる解析の結果、どちらも70kDaの熱ショック蛋白(Hsp70)ファミリーの一つであるheat shock 70kDa protein 8 (heat shock cognate

図9 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



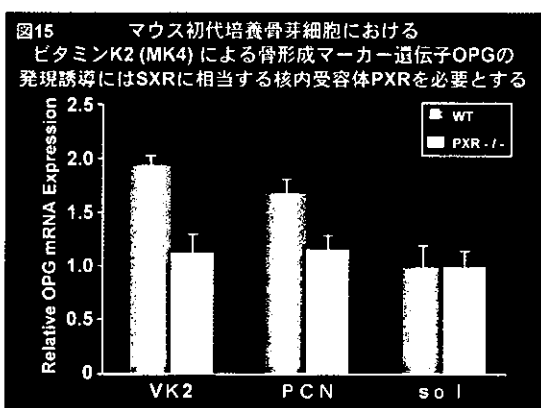
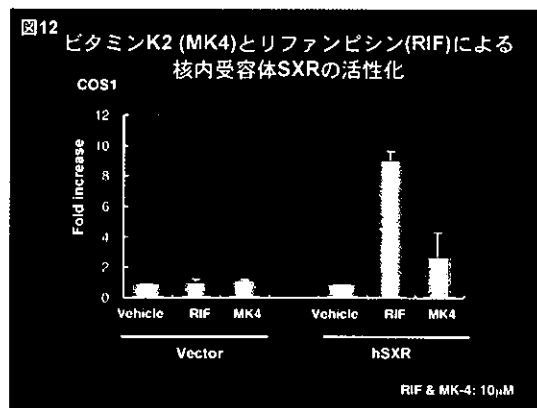
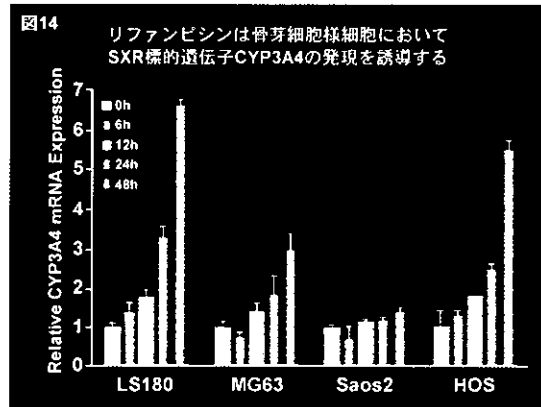
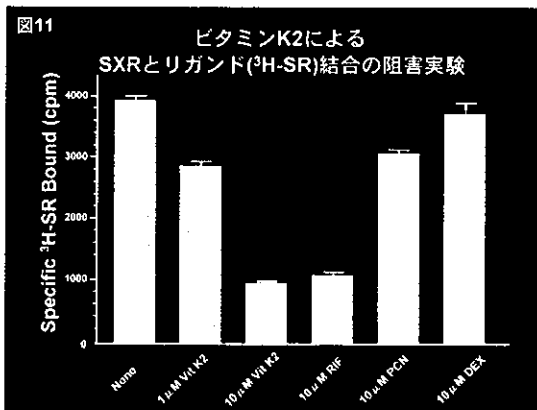
protein: Hsc70) のカルボキシル末端に相当する蛋白質であることが示された。Hsc70 自身の発現量の変化を調べるため、Hsp70/Hsc70 抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、Hsp70/Hsc70 の発現量が低下していることが示された(図10)。

図10 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



(10) 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

ビタミン K の新しい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11)。図12に示すように、レポー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 K₂(MK-4)により SXR の転写活性が上昇したことからビタミン K₂(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

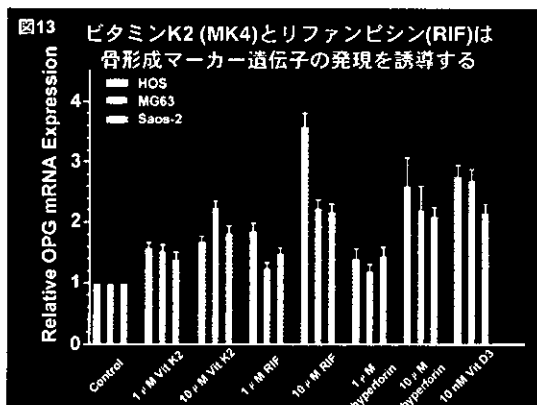


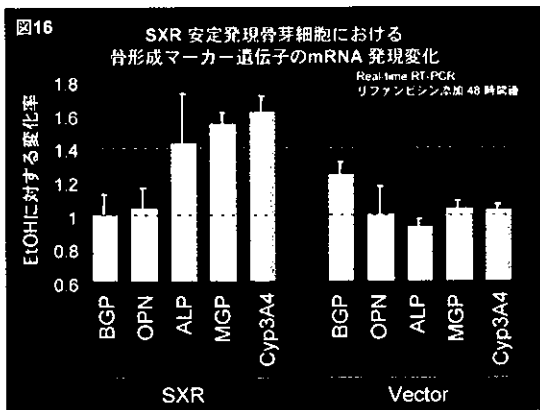
様細胞において、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)、オステオプロテジェリン(OPG)、MGPなどの骨形成に関連するマーカー遺伝子がビタミンKにより転写レベルで誘導される(図13)。一方で、SXRのリガンドとして知られるリファンピシもこれらの骨形成マーカーを誘導するとともに(図13)、既知の標的遺伝子であるCYP3A4を骨の細胞においても誘導することが明らかになった(図14)。図15には、OPGの転写レベルでの誘導にマウスにおいてSXRに

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16)。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。

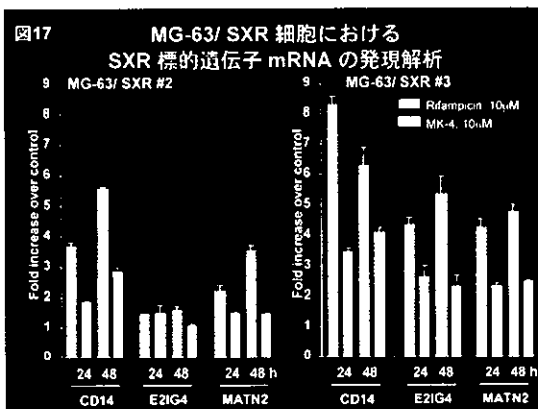
(1)骨芽細胞におけるビタミンKならびにSXRの標的遺伝子の解析

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

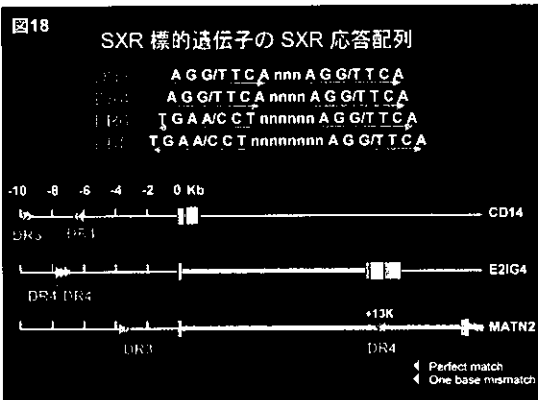




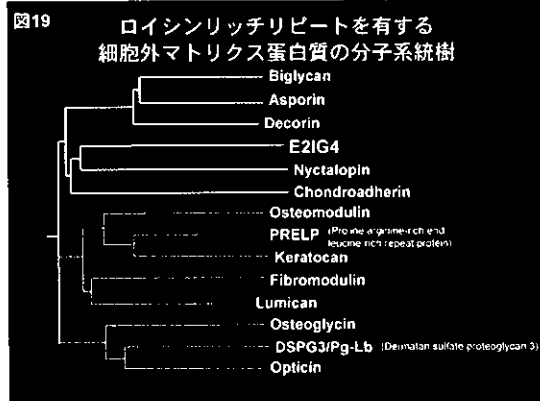
いてさらに解析を行った。これら遺伝子は real-time RT-PCR による解析の結果、リガンド刺激後 12 時間から発現上昇が確認され、MG-63/SXR 細胞においてもリガンド添加により mRNA の発現量の増加が認められた (図 17)。また、シク



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 18)。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 19)。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。

(12)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

HeLa 細胞核抽出液からエストロゲン受容体 AF-2 転写共役因子複合体の精製を行ったところ、TRRAP 及び GCN5 を含む複合体がエストロゲン受容体にリガンド依存的に結合し、転写活性を促進することが明らかとなった。更にこの複合体は、エストロゲン受容体のみならずアンドロゲン受容体やビタミン D 受容体などにも作用することが判明し、p300/p160 複合体、DRIP/TRAP 複合体に引き続く、第 3 のクラスの新たな転写共役因子複合体であった(Yanagisawa et al., 2002)。更にこの複合体のエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖における役割を検討したところ、TRRAP が鍵分子であることが判明した。

また HeLa 細胞核抽出液からエストロゲン受容体 AF-1 転写共役因子複合体の精製を行ったところ、p54 および PSF を含む複合体がエストロゲン受容体にリガ