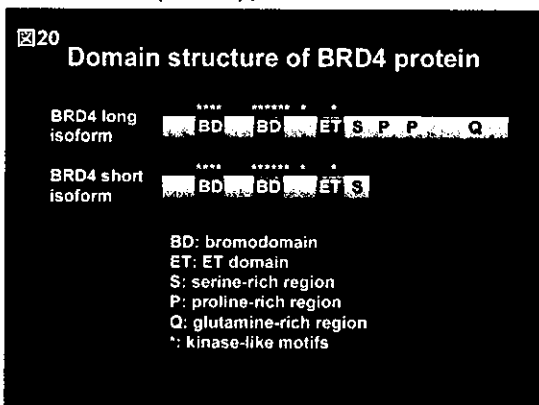
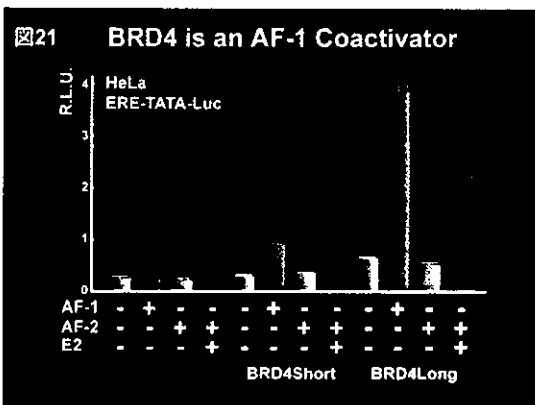


ンド依存的に結合し、転写活性を抑制することが明らかとなった。この複合体はエストロゲン受容体βやアンドロゲン受容体に対しては転写抑制効果を持たなかった。エストロゲン受容体の p54 結合領域は転写コアクチベーターp300 結合領域と一致し、転写抑制因子 p54 と転写活性化因子 p300 が競合的にエストロゲン受容体に結合することにより組織特異的なエストロゲン受容体転写活性化機能が発揮されることが示唆された。更にこの複合体はエストロゲン依存性乳癌細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった。

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ところ、BRD4 と呼ばれるプロモドメイン蛋白質を同定した(図 20)。BRD4 のエストロゲ



ン受容体コファクターとしての機能を検討したところ、BRD4 は AF-1 を促進した(図 21)。次にエストロゲン受容体と



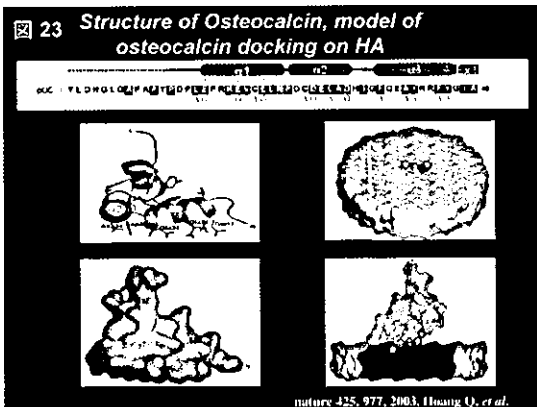
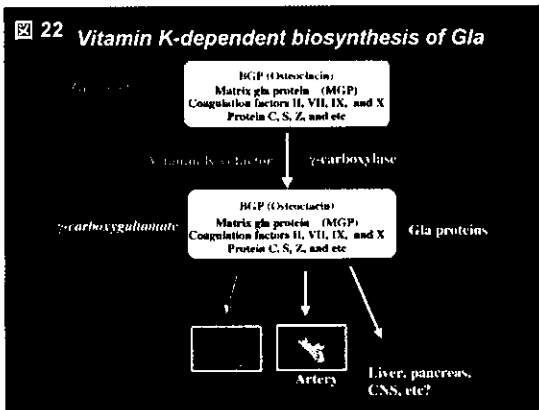
BRD4 の相互作用を IP-Western により検討したところ、タモキシフェン添加時には両者の結合が強まることが判明した。

BRD4 の deletion construct を用いたレポーターアッセイにより、N 末側プロモドメインを削ったとき AF-1 コアクチベーター活性が消失することが判明した。ペプチド pull down アッセイにより、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することが判明した。エストロゲン受容体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ところ、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。

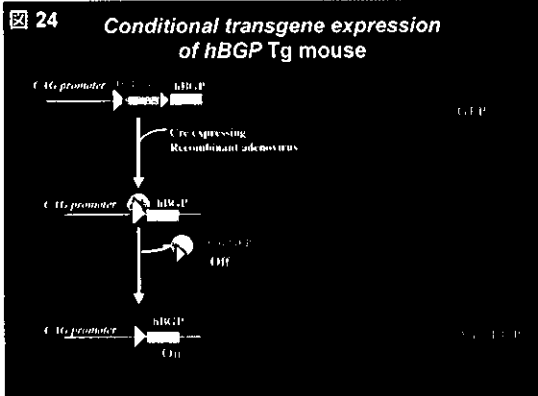
(13)動物モデル活用した骨粗鬆症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子・標的因子の同定、機能解析

1) BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析

ビタミン K に関連する骨疾患遺伝子の候補として、γ-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γ-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 22)。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γ-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た(図

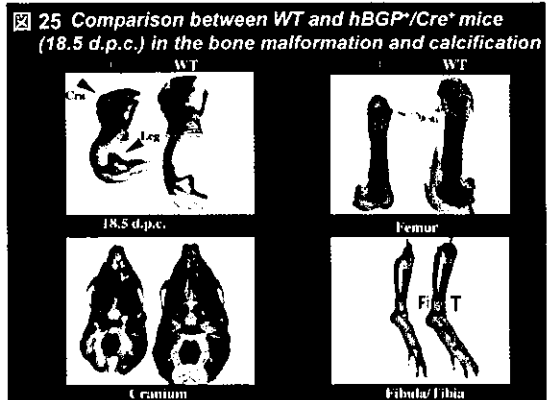


23)。BGP の骨代謝における役割を検討するために、ヒト BGP cDNA を単離し、Cre/loxP 系を利用して、コンディショナルに gain of function できる遺伝子改変マウスを作製した。Cre 処理前では、GFP をマーカー遺伝子として発現しており、Cre 処理後では GFP が除去され BGP が強制発現される系を確立した(図 24)。さらに、骨芽細胞でのヒト BGP の過剰発現系を検討するために、テスターマウス(ROSA26LacZ)により Cre が発現すると LacZ 染色により青く染色されて、かつ骨芽細胞のマーカーであるアルカリフォス

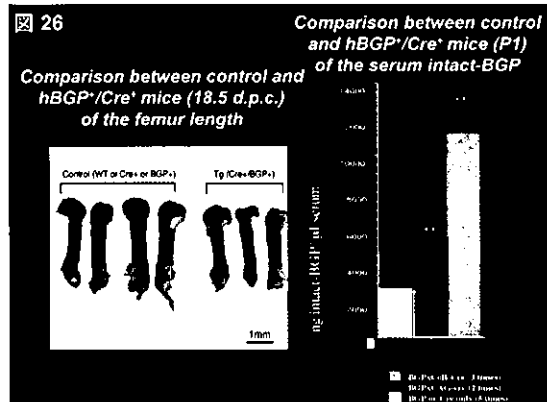


ファターゼ染色されている領域で Cre が発現していることを示し、さらにヒト BGP をプローブにより *in situ* hybridization 法により mRNA の発現分布が LacZ 染色と同一部位であることを確認した。

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個体全体において軟骨組織において石灰化の低形成が観察され、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた(図 25)。さらに、これらの BGP



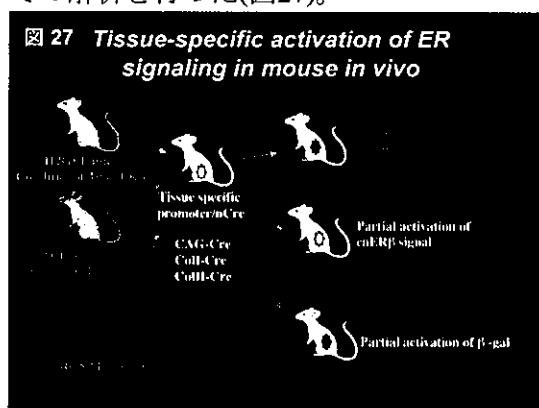
を過剰に発現する Tg マウスは、ほとんどのマウスが出産後 1-2 日目に死亡することがわかり、血中 intact-BGP 量も有意に高い値を示した(図 26)。



2) ER α および ER β シグナルの生体内 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、リガンドであるエストロゲン非存在下でも選択的に ER α または ER β シグナルを

gain of functionすることが可能な変異体のレセプターを作成し、また組換えアデノウイルスベクターを作成することにより、*in vitro*での過剰発現系を確立した。続いて*in vivo*で変異体caER α およびcaER β シグナルを活性化するために、それぞれの変異体レセプターについて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、骨芽細胞、軟骨、および全身性で外来遺伝子を発現するために、Coll-Cre、Col1a1-Cre、およびCAG-Creマウスをそれぞれ交配し、caER α およびcaER β シグナルの過剰発現系における各組織での解析を行った(図27)。



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。骨芽細胞系譜にER α およびER β 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、また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。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 α 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 β 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ている。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 α 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 β 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、我々の実験系においてER α 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 α シグナルを介した骨形成作用が存在する場合は、間接的に作用することが推測される。今後さらなる解析が必要だが、本研究で示唆されたエストロゲンシグナルと骨形成作用は、直接的に骨芽細胞系譜に作用する可能性よりも、むしろ間接的に骨形成に作用する可能性が示唆された。

(14) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・

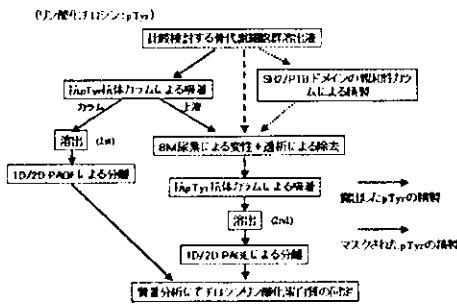
酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

1) チロシンリン酸化蛋白質の分離法の確立

刺激前後など2つの系でのチロシンリン酸化の差異を検出する目的で、まずチロシンリン酸化蛋白質を精製して1次元あるいは2次元電気泳動で分離したのち質量分析により同定する実験系を確立した。通常は1次元電気泳動では100 μ g、2次元電気泳動では500 μ g程度の蛋白質サンプルまでしか、高解像度で分離することができないので、シグナル伝達分子のように発現量があまり多くない蛋白質の場合は、ウェスタンブロットや蛋白質ラベルによりリン酸化蛋白質の位置を確定できても量的に質量分析による同定のために足りない場合が多い。そのため抗リン酸化チロシン抗体カラムによる粗精製を分離前に行うことを考えたが、細胞内でチロシンリン酸化部位で他の蛋白質と複合体を形成しているものが多いため直接カラムにかけても結合しない分子が多いことがわかった。図28に流れ図として示したが、前もって細胞溶出液全体を高濃度の尿素で変性した後、尿素を徐々にのぞいてやると、Casなど既知の

図28

チロシンリン酸化蛋白質の分離方法



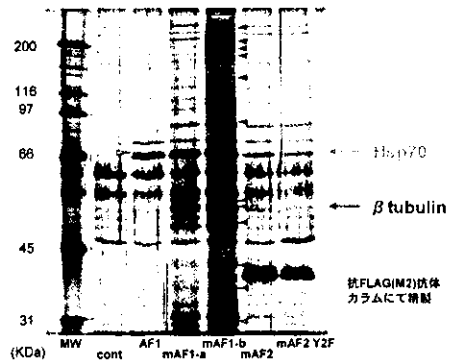
リン酸化蛋白質を指標にすると結合の効率が遥かに上昇することが確かめられた。変性のステップを入れなくても抗リン酸化チロシン抗体カラムに結合するこれとは異なる量の多い一群の蛋白質群があることから、直接抗リン酸化チロシン抗体カラムに通した pass through に尿素による変性の操作を加えた後、再び直接抗リン酸化チロシン抗体カラムにかけ結合分子をとることで、ドッキング分子などのチロシンリン酸化部位で複合体を作る蛋白質群を効率的に濃縮できることを見出した。蛋白質の絶対量が少ないため質量分析で同定できなかったものも多く、質量分析に十分な量を集めるためには、かなり大量の細胞溶出液と抗体カラムを用いて精製を行うことが必要であることが明らかになった。

2) エストロゲンの骨代謝における作用

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通じ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 AF-1 と AF-2 と呼ばれる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た。これらのコンストラクトを用いて結合蛋白質を精製する条件がうまく行くか知る目的で、同じように核外の作用が報告されている乳癌細胞(MCF-7)に導入して安定発現株を樹立した後、大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白質を精製した。図 29 に示す通り AF-1 ドメイン

図29 ER結合分子の銀染色による同定



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。質量分析の結果図 29 に示す Hsp-70 と β チューブリンが AF1 ドメインに結合する蛋白質として同定された。そのうち β チューブリンは膜局在タイプの AF-2 に選択的に結合することが確かめられた。現在これら蛋白質の機能とエストロゲンの骨作用との関わりについても解析中である。一方 AF-2 ドメインと特異的に結合する蛋白質は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 β 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。 β チューブリンだけでなく α 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

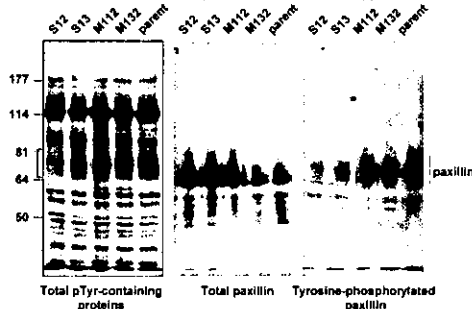
ロゲン受容体が AF-1 ドメインで結合することが示唆された。乳癌細胞株 MCF ではエストロゲン刺激によるエストロゲン受容体の細胞膜への移行に伴い、それと同時に β チューブリンの一部が細胞膜に局在を移しエストロゲン受容体と重なった局在を示すことが観察され、実際にこの 2 つの分子が核外で何らかの生物学的機能を担うことが示唆された。

一方で、既に報告されているエストロゲン刺激による内在性レセプターのリン酸化や、レセプターの膜局在、下流シグナルの活性化などは、多くの条件を試みたが、再現性良く検出することはできなかった。また Src ファミリーキナーゼの活性もエストロゲン刺激による短時間での変化は見られず、Cas、Paxillin など Src の基質蛋白質群のリン酸化状態もリガンドの有無で変化が認められなかった。

3) 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

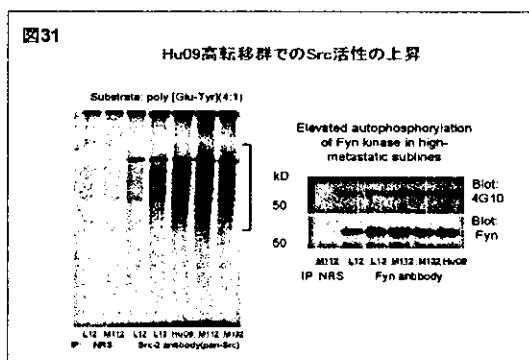
細胞の転移能の異なる同系の骨肉腫細胞株についてのチロシンリン酸化の相違を進めてきた。転移性の骨肉腫細胞において著明にチロシンリン酸化が亢進している 70kD の蛋白質は解析の結果 Paxillin であった(図 30)。Paxillin は発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた。

図30 骨肉腫細胞株におけるパキシリンのチロシンリン酸化レベル



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]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 31)。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 31 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。

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

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。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、Src チロシンキナーゼの主要な基質であり、破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されている。Src チロシンキナーゼはそもそもノックアウトマウスが骨大理石病を示すことから、破骨細胞の活性化や生存に重要であることが早くから示されてきた。Src-Cas 経路は固形腫瘍など他の細胞系では Src の活性化を伝えるメインの経路であることが証明されてきていることから破骨細胞においてもその機能や存続維持のための主要な経路である可能性が考えられる。Src-Cas 経路の下流分子を明らかにする目的で Cas を欠損する細胞と、それにさらに Cas 蛋白質を発現させ直した細胞の間での遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法により解析した。Cas 欠損細胞では Caveolin-1 の発現が顕著に減少する一方、Procollagen 1 α 1、3 α 1、11 α 1、Elastin、Periostin の発現が著明に上昇していた。このなかで特に Periostin は別名 OSF-2(osteoblast-specific factor)と呼ばれ、Src の欠損によっても著明に発現量が上がるなどから、Src-Cas のシグナルから Periostin/OSF-2 の発現制御に至るシグナル伝達経路が、骨代謝に関わる可能性が示唆される。Cas 欠損マウスの発生過程の諸段階での骨組織の Periostin 抗体による免疫染色などによる解析が進行中である。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・解析とともにそのリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響の解析を行っている。

D. 考察

(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

マイクロアレイ、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 を含む複数の候補遺伝子を同定した。特に、エストロゲンは初代骨芽細胞において、サイクリン D2、サイクリン D3 を誘導し、Cdk4/6 のキナーゼ活性を上昇させることに伴い、細胞増殖促進に寄与することが示唆され、骨代謝における ER とその応答遺伝子の重要性が示された。エストロゲン応答遺伝子の機能解析としては、そのノックアウトマウスの子宮におけるエストロゲン依存性増殖が損なわれていることを既に示している、Efp の分子作用メカニズムを明らかにした。Efp は子宮や乳腺などに発現し、エストロゲンによりその発現は制御され、エストロゲン依存性の子宮の発育、増殖や乳癌増殖との関連が示唆される。そればかりでなく、骨芽細胞にもその発現が認められ、エストロゲン応答性が示された。乳癌に Efp を過剰に発現させると、本来エストロゲンが存在しない状態では増殖できない乳癌細胞が、エストロゲン非依存下においても増殖し、腫瘍を形成することが観察された。逆に乳癌細胞の Efp の発現を、アンチセンスオリゴヌクレオタイドを用いて抑制することにより腫瘍形成も抑えられ、乳癌治療の新しい分子標的と

しての役割が示された。そして、Efp は細胞周期進行のブレーキ役である 14-3-3 σ に対してユビキチンを結合させる酵素 (E3) として働き、同蛋白の分解を介して、細胞増殖を引き起こすことを見出した。この新規分子メカニズムの解明は、新しい細胞周期調節機構の発見として注目を浴びている。さらに、Efp は乳癌、特にホルモン療法耐性癌の治療の新しい分子標的として臨床応用が期待される。また、骨粗鬆症薬としてのエストロゲンの副作用のメカニズム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

本研究において、骨における新規のエストロゲンの分子標的として、Keratin 19、KIAA0843、Tissue Transglutaminase が同定された。Keratin 19 は、中間径フィラメントの一種で、骨芽細胞骨格に対する影響が示唆される。また、KIAA0843 protein は、LIM ドメインと、F-actin との結合能をもつと考えられる VHP ドメインを有しており、actin binding LIM と似通った構造をしていることが認められた。Actin binding LIM は、神経の軸索伸長の誘導に必要な因子であることが報告されている。この actin binding LIM と相同性の高い KIAA0843 が骨芽細胞において果たす役割に関し、特に細胞骨格、細胞形態の維持や変化に対する役割に対して注目し、機能解析を行っている。

Tissue Transglutaminase は、基質となるタンパクのグルタミン残基とリシン残基との架橋結合を触媒する酵素であり、これ以外にも細胞接着や、細胞内シグナル伝達に関与するという働きも有する。骨芽細胞においては Osteopontin、Bone Sialoprotein、Osteonectin、 α 2-HS-glycoprotein といった非コラーゲン性タンパクを基質とすることが報告されており、骨基質タンパクの架橋による石灰化誘導に関与することが示唆される。これらをあ

わせ考えると、エストロゲンが骨芽細胞において Tissue Transglutaminase の発現を誘導し、細胞外骨基質タンパクの架橋とその後の石灰化促進に関わるという新しいエストロゲンの骨における作用メカニズムが考えられ、骨粗鬆症における役割が注目される。

(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

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反応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 δ 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から続発性骨粗鬆症に関与する可能性が想定された。

(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

骨芽細胞老化時における細胞周期制御

因子の発現パターンは p57 蛋白が減少し、p27 蛋白が増加した。p57 蛋白は TGF β により劇的な蛋白分解が誘導されることを示したが、p27 に関してはこのような蛋白分解は誘導されない。このことにより老化に伴う不可逆的な増殖停止の一因を明らかにした。

(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

ビタミン D 応答遺伝子である p57^{Kip2} に関しては、今回 loss of function の系を用いてその下流遺伝子を検討した。その解析により p57^{Kip2} ノックアウトマウスで発現が減少する遺伝子として Osteopontin が同定された。Osteopontin は前述したように骨芽細胞から分泌される蛋白であり骨形成に大きく関与する因子である。p57^{Kip2}、オステオポンチンはともにビタミン D3 により発現誘導される遺伝子であることから、今回の結果はビタミン D3 による骨形成シグナルにおいて Osteopontin の発現制御は p57^{Kip2} を介して行われることが示唆するものである。今後、ビタミン D レセプター、p57^{Kip2}、Osteopontin ノックアウトマウス由来の骨芽細胞由来の RNA、タンパクを用いてビタミン D3/p57^{Kip2} /Osteopontin を介した骨形成シグナルに関する詳細を明らかにすることにより骨粗鬆症薬であるビタミン D 作用の新たな下流シグナル経路が明らかとなることが期待される。

(6) 骨における新しい TGF β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β -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 β 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 β 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。

(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

老人性骨粗鬆症の鍵を握る骨芽細胞老化における増殖能低下の分子機構を解明するためマイクロアレイ法を施行したところ、Metallothionein (MT) が激減していることが明らかになった。さらに ER β にて発現増加する遺伝子に MT はリストアップされていた。今回、我々は MT が骨量、骨代謝に関連することを *in vivo* の実験で初めて明らかにした。MT は骨芽細胞に多量に発現していること、ならびに老化骨芽細胞では激減していることと合わせ考えると、MT は金属に対する反応以外にも重要な機能を有している可能性が示唆された。MT のトランスジェニックマウスにおける骨芽細胞の増殖と分化ならびに骨形成に与える影響に興味が

持たれる。

(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及ぼす影響

骨粗鬆症の新しいマーカーの開発と疾患遺伝子の解明を目指し、ゲノムワイドの多数の遺伝子の遺伝子多型を検索するとともに、主に発現調節部位やアミノ酸に変異をもたらす SNP を用いて、骨代謝への関与と骨量予測に用いる遺伝子マーカーとしての有用性を検討した。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、遺伝子診断のための新しいマーカーとしての応用、オーダーメイド医療への応用が期待された。特に、LRP5 と骨形成に関連した研究は、近年飛躍的に進歩した。2001 年には LRP5 が、遺伝性の骨量減少を認める、骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群の原因遺伝子であることが報告された。さらに 2002 年には高骨量の家系調査の結果、LRP5 において活性型変異体が発見されたことから、LRP5 は骨芽細胞の分化を介した骨形成における Key regulator であることが他のグループから示されてきた。さらに興味深いことに、LRP5 のノックアウトマウスでも骨量減少が認められ、骨芽細胞の機能異常も認められたが、この経路においては今まで骨芽細胞の分化において中心的な役割をはたしていると考えられてきた Cbfa1 を介していないことが示されている。今回我々は、LRP5 の遺伝子多型が骨量に劇的な変化を及ぼすことを世界に先駆けて示した。本研究にて、日本人女性における LRP5 遺伝子のヘテロ、ホモを合わせた出現頻度は約 45% と非常に高頻度であることから、骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性が高い。今後、この多型での薬剤による反応性の相違を検討することで、この Wnt-LRP5 に関与する薬剤と関与しない薬剤

との判別が明らかとなる可能性がある。反応性があった薬剤に関しては、骨芽細胞による添加実験を行い Wnt-LRP5 経路のシグナル伝達にどのような影響を与えるかを *in vitro*、*in vivo* の系を用いて明らかにする予定である。

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

Wnt- β -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。1) で述べたように、LRP5 の一塩基置換遺伝子多型性(SNP)と骨量との関連について検討し、LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する一つの重要な遺伝子マーカーである可能性を示した。Wnt- β -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、我々は Wnt- β -catenin シグナル伝達因子における SNP と骨量との関連について検討した。そして sFRP4 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした。sFRP4 は、構造から Wnt のレセプターのデコイレセプターとして働くと考えられ、Wnt シグナルの抑制に関与することが示唆される遺伝子である。また Kremen1 は Wnt シグナルを負に制御する因子である DKK1 のレセプターとして働くことが示された因子である。近年、LRP5 の研究により Wnt- β -catenin シグナルの骨形成における重要性が注目されるようになってきているが、多数存在する Wnt- β -catenin シグナル制御因子の中でのどの因子が骨形成を制御しているのかという

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

3) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症

Wnt- β -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。Wnt- β -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており、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を探った。1)、2)に引き続き、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、 β -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。 β -catenin は、Wnt シグナルが活性化されると蛋白が安定化し、そのシグナル伝達の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 β -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。

4) 骨における ALOX15-PPAR γ 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 γ 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。そこでヒト ALOX15 遺伝子ならびにヒト PPAR γ 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 γ 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 γ 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。

(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 ビタミン K は蛋白修飾を引き起こす

カルボキシラーゼの補酵素としての働きが知られている。したがって、ビタミン K 作用の標的因子を解明するためには、蛋白レベルでの解析が不可欠である。骨芽細胞におけるビタミン K の蛋白レベルでの分子標的を探索するために、2 次元電気泳動法を応用したプロテオーム解析からビタミン K₂(MK-4) 応答分子を明らかにした。同定された蛋白質スポットは Hsc70 のカルボキシル末端側に相当するおよそ 23 kDa の蛋白質であった。そのため、この蛋白質が Hsc70 の分解産物である可能性も考えられ、Hsc70 の発現量に依存せずに増減している可能性も考えられた。しかし、ウエスタンブロットにおいても Hsp70/Hsc70 の発現量が減少していたことから Hsc70 自身の発現量が減少した結果、カルボキシル末端側の蛋白質も減少したことが示唆された。細胞の増殖過程において、Hsp70 は細胞周期の G₁ 期と S 期に発現が上昇することが報告されている。一方でビタミン K により細胞増殖が抑制されることから、ビタミン K 添加により細胞周期に変化が生じた結果、Hsc70 の発現量が異なった可能性も考えられる。γカルボキシラーゼにより蛋白修飾を受ける因子を含め網羅的な標的因子の探索が有用と考えられた。

(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

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

可能性を明らかにした。

(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

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 はエストロジオール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-β) 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 は細胞表層で BMP と結合し、BMP の作用を調節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、骨分化を促進することが期待できる。

(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

以前から本研究室ではエストロゲン受容体特異的な転写共役因子として DEAD box モチーフを持つ RNA ヘリケース p68、p72 の同定及び機能解析を行ってきた。さらに p68/p72 と既知転写共役因子複合体との相互作用を検索した結果、CBP/p300、p160 ファミリーを含む複合体と相互作用することを明らかにしてきた。

今回新たに HeLa 細胞核抽出液から AF-2 転写活性化因子複合体および、AF-1 転写抑制因子複合体の精製を行った。特に今回同定した AF-1 転写抑制因子複合体はリガンド依存的にエストロゲン受容体に結合することから、AF-1 と AF-2 の機能的相互作用を解明するための有力な鍵因子である可能性が示唆された。これらの新規転写共役因子複合体と既知転写共役因子複合体が生体内で複雑に相互作用することにより、組織特異的なエストロゲン受容体の転写活性化が起こると考えられる。

さらに、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 polII 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。

現在、これら核内受容体転写共役因子複合体構成因子の生体内高次機能を明らかにするため、ノックアウトマウスの作成が進行中である。我々は既に Cre-loxP システムを用いることによりアンドロゲン受容体ノックアウトマウスの作製に成功しており、骨形成作用に対するアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体の関与について解析中である。また、当研究室で同定されたビタミン D 受容体転写共役因子複合体 WINAC の主要構成因子 WSTF ノックアウトマウスの作製にも成功している。さらに、エストロゲン受容体 AF-1 特異的な転写共役因子として当研究室で同定した DEAD box モチーフを持つ RNA ヘリケース p68 および p72 のノックアウトマウスも得られている。今後これらのノックアウトマウスを用いて骨粗鬆症疾患との関連について検討を進める予定である。

また、ノックアウトマウスによる *in vivo* の解析と平行して、転写共役因子複合体の機能を *in vitro* で詳細に解析するため

に、クロマチン再構成系、リコンビナントヒストン作製系、*in vitro* 転写系などが当研究室において精力的に進められており、核内受容体とその転写共役因子の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割を解明するための強力なツールになると思われる。

(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

ビタミンKおよびエストロゲン受容体に関連した骨作用に関しては、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することが想定され、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・分化特異的な関連遺伝子群のgain of functionを行うかが、今後の研究課題の鍵となると考えられる。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。さらに研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組織交換酵素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関連の因子では、ビタミンKが疫学調査の研究より、骨粗鬆症の予防に重要な因子であることが報告されているように、その作用メカニズムの解明が今後の重要な研究課題と考えられ、骨の構成タンパクのうちコラーゲンを除いた場合、主要な構成タンパクであるBGP

(オステオカルシン)の骨作用を生体内で検討した結果、骨組織における石灰化作用に重要な作用をもつことが示唆され、治療を目的とした場合、他の臓器(特に血管)における石灰化作用等についても今後十分に検討することは、意義があると考えられる。

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。

(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

本研究は、主に蛋白質を標的として解析を進めてきており、さらにシグナル伝達という複雑な蛋白質の動きについても、蛋白質の局在と複合体形成の両面から情報を得ようとする点が、単なる発現解析から一歩進んだものであると考えられる。しかもそのような作業をできるだけ網羅的に行うことを試みてきているが、ここまでのところ試料の大量調整の技術的問題もあり、骨肉腫細胞などのモデル系を使った技術開発と特定のコントロール分子の検出による実験手法の確認が中心になっているのが残念な点である。腫瘍細胞における蛋白質のチロシンリン酸化の変化を検出して、質量分析によって網羅的に同定する新しい手技・手法の開発については、抗リン酸化チロシン抗体を用いた二段階の親和性カラムによる精製でリン酸化チロシン残基を含む蛋白質群を、高い収率と高い特異性をもった方法を開発することに成功した。例としてあげたCas、Paxillinなどは分子量からリン酸化蛋白質も推定も比較的容易であったため、特異抗体を用いてリン酸化の変化も容易に確認することができたが、絶対量の少ない新規のシグナル伝達分子などは、質量分析に十分な量を集めるために大量の細胞溶出液と、抗体カラムを要する。そ

の中でも量的に比較的豊富なチューブリンなどは現時点でも少量の試料から同定可能であることが今回示され、また質量分析の感度は更に高くなりつつあるのでこの問題は軽減する可能性がある。

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

LRP5、DBP、TNFR1、 β 3AR、LRP6、IRAK1、GnRH、QPCT、RIL、BNP、Klotho、ALOX15、WNT10B、 β -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、骨粗鬆症治療薬ならびに関連物質であるエストロゲン、ビタミン K、ビタミン D、アンドロゲン、グルココルチコイド作用経路の新規標的因子と、新しいシグナル経路を発見した。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、ノックアウト動物を用いてビタミン D、アンドロゲン受容体ならびに共役因子の骨代謝における役割を示した。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開発し、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規標的因子、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. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 【英文原著】

1. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Efp targets 14-3-3sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*

- 417, 871-875, 2002
2. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 222-228, 2002
 3. Jin B, Inoue S, Urano T, Cho S, Ouchi Y, Cyong JC: Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 185, 98-110, 2002
 4. Fujita M, Ogawa S, Fukuoka H, Tsukui T, Nemoto N, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Differential expression of secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) in decidual cells during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 28, 213-223, 2002
 5. Vasudevan N, Kia HK, Inoue S, Muramatsu M, Phaff D: Isoform specificity for oestrogen receptor and thyroid hormone receptor genes and their interactions on the NR2D gene promoter. *J Neuroendocrinol* 14, 836-842, 2002
 6. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of amino acid variation (Trp64Arg) in the beta3-adrenergic receptor gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 2, 138-142, 2002
 7. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector T, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H: Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 17, 1744-1751, 2002
 8. Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 3, 101-105, 2003
 9. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Iwasaki H, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H: Association of a haplotype (196Phe/532Ser) in the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK1) gene with low radial bone mineral density in two independent populations. *J Bone Miner Res* 18, 419-423, 2003
 10. Kajita M, Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Yoshida H, Kodaira M, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M: Association of -381T/C promoter variation of brain natriuretic peptide gene with low bone mineral density and rapid postmenopausal bone loss. *J Hum Genet* 48, 77-81, 2003
 11. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H: Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing. *Bone* 32, 185-190, 2003
 12. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B: Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR. *J Biol Chem* 278, 43919-43917, 2003
 13. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M: Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density. *J Bone Miner Res* 18, 1642-1649, 2003

14. Omasu F, Emi M, Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H: Association of genetic variation of gene encoding LIM domain protein (RIL) with low bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Hum Genet* 48, 342-345, 2003
15. Ishida R, Ezura Y, Emi M, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H: Association of a promoter haplotype (-1542G/-525C) in the tumor necrosis factor receptor associated factor-interacting protein gene with low bone mineral density in Japanese women. *Bone* 33, 237-241, 2003
16. Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T: Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1333-1340, 2003
17. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer* 106, 310-315, 2003
18. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M: EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer* 39, 1552-1561, 2003
19. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 101-104, 2003
20. 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
21. 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
22. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18, 1131-1143, 2004
23. 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 Glutaminy Cyclase Gene (QPCT) With Low Radial BMD in Adult Women. *J Bone Miner Res* 19, 1296-1301, 2004
24. 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. *Geriatric Gerontol Int* 4, 245-249, 2004
25. 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. *Mol Cell Endocrinol* 218, 147-153, 2004
26. 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. *Clin Cancer Res* 10, 2687-93, 2004
27. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1312-1317, 2004
 28. 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. *J Cell Physiol* 203, 193-201, 2005
 29. Ikeda K, Inoue S: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*, in press
 30. Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoygenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, in press
 31. 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. *Cancer Res*, in press
 32. Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function*. (Edited by Iuchi S, Kuldell N), Landes Bioscience, Georgetown, in press
 33. Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A, Takeyama K: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research* 57, 73-78, 2002
 34. Kato S: Androgen receptor structure and function from knock-out mouse. *Clin Pediatr Endocrinol* 11, 1-7, 2002
 35. Yanagisawa J, Kitagawa H, Yanagida M, Wada O, Ogawa S, Nakagomi M, Oishi H, Yamamoto Y, Nagasawa H, MacMahon SB, Cole MD, Tora L, Takahashi N, Kato S: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* 9, 553-562, 2002
 36. Takeyama K, Ito S, Yamamoto A, Tanimoto H, Furutani T, Kanuka H, Miura M, Tabata T, Kato S: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron* 35, 855-864, 2002
 37. Sato T, Matsumoto T, Yamada T, Watanabe T, Kawano H, Kato S: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 167-171, 2003
 38. Nakamichi Y, Shukunami C, Yamada T, Aihara K, Kawano H, Sato T, Nishizaki Y, Yamamoto Y, Shindo M, Yoshimura K, Kawaguchi H, Hiraki Y, Kato S: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* 23, 636-644, 2003
 39. Suzawa M, Takada I, Yanagisawa J, Ohtake F, Ogawa S, Yamauchi T, Kadowaki T, Takeuchi Y, Shibuya H, Gotoh Y, Matsumoto K, Kato S: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPARgamma function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol* 5, 224-230, 2003
 40. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S: Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-

- dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917, 2003
41. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Modulation of estrogen receptor signaling by an association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550, 2003
 42. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K, Kawaguchi H, Kato S: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9416-9421, 2003
 43. Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology* 144, 5138-5144, 2003
 44. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 23, 1598-1608, 2004
 45. Sato T, Matsumoto T, Kawano H, Watanabe T, Uematsu Y, Sekine K, Fukuda T, Aihara K, Krust A, Yamada T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yoshimura K, Yoshizawa T, Metzger D, Chambon P, Kato S: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1673-1678, 2004
 46. Aihara K, 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. *J Biol Chem* 279, 35798-35802, 2004
 47. Wada O, Oishi H, Takada I, Yanagisawa J, Yano T, Kato S: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene* 23, 6000-6005, 2004
 48. Ito S, Takeyama K, Yamamoto A, Sawatsubashi S, Shiode Y, Kouzmenko A, Tabata T, Kato S: *In vivo* potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells* 9, 983-992, 2004
 49. 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. *EMBO J* 23, 4813-4823, 2004
 50. 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*. *J Biol Chem* 279, 40255-40258, 2004
 51. 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. *J Bone Miner Res* 19, 1452-1461, 2004
 52. Kato S, Matsumoto T, Kawano H, Sato T, Takeyama K: Function of androgen receptor in gene regulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 627-633, 2004
 53. Tsukui T, Toyoda Y: Transgenic Techniques, section in "Adenoviral infection." *Methods Mol Biol* 180, 73-82,

- 2002
54. Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIF. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003
 55. 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. *Mol Cell Biol* 24, 6525-6535, 2004
 56. Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, Gamou T, Saito M, Iwamatsu A, Sakai R: Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 21, 5823-5834, 2002
 57. Nakamoto T, Suzuki T, Huang J, Matsumura T, Seo S, Honda H, Sakai R, Hirai H Analysis of gene expression profile in p130Cas-deficient fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 635-641, 2002
 58. Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, Takato T, Sakai R: Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization and cell transformation by functional domains of Cas. *J Biol Chem* 277, 27265-27272, 2002
 59. Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R: Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J Biol Chem* 278, 48367-48376, 2003
 60. 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
 61. 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
 62. 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
 63. 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
 64. 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. Inoue S: [Workshop] Differential growth control of cells via multiple estrogen-responsive pathways. 12th International vascular biology meeting, Karuizawa, Japan (2002.5.12-16)
 2. Inoue S: [Symposium] Mechanism of Estrogen Action in Breast Cancer and Vascular Cells. 5th Vascular Biology Conference, Osaka, Japan (2002.8.3)
 3. Inoue S: [Symposium] Role of estrogen responsive RING finger protein in growth control of breast cancer. 11th International Congress on Hormonal Steroids and 7th International Congress on Hormones and Cancer, Fukuoka, Japan (2002. 10. 21-25)
 4. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive RING finger protein controls breast cancer growth, 2nd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka, Japan

- (2003.2.15-16)
5. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive genes and breast cancer, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2003, Kanazawa, Japan (2003.3.12-13)
 6. Ishida R, Ezura Y, Yoshida H, Iwasaki H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: A single Nucleotide Polymorphism of interleukin-1-receptor-associated kinase Associate with Bone Mineral Densities of Adult Women. American Society of Bone and Mineral Research, San Antonio, Texas, USA (2002.9.20-24)
 7. Amano H, Suzuki K, Nara A, Takahashi K, Tomita T, Urano T, Inoue S, Yamada S: The role of p57^{kip2} gene in bone metabolism. American Society of Bone and Mineral Research, San Antonio, Texas, USA (2002.9.20-24)
 8. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D. International Bone and Mineral Society 2003, Osaka (2003.6.3-7)
 9. Ishida R, Sudo Y, Ezura Y, Yoshida H, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium within the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Adult Bone Mineral Density. American Society of Bone and Mineral Research 25th Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA (2003.9.19-23)
 10. Urano T, Fujita M, Shiraki M, Hoshino S, Ouchi Y, Inoue S: Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 11. Hoshino S, Inoue S, Ouchi Y: Monitoring bone resorption by serum type I collagen N-telopeptides (NTX) predicts change of bone mineral density in postmenopausal Japanese women. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 12. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie K, Usui T, Muramatsu M, Inoue S: Negative regulation of transcription activity of estrogen receptor by protein phosphatase 5. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
 13. Inoue S: [Invited Seminar] The role of 14-3-3sigma proteolysis in breast cancer growth. Biology of 14-3-3 Proteins. Gordon Research Conferences, Ventura, CA, USA (2004.2.22-27)
 14. Inoue S: [Workshop] Estrogen responsive genes and breast tumors. The US-Japan Workshop on "The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis", Maui, HA, USA (2004.3.21-23)
 15. Inoue S: [Symposium] Estrogen responsive gene in the growth control of breast tumors. 3rd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka (2004.4.15-18)
 16. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: [New Investigator Award] SNP detection implicated in Wnt-beta-catenin signaling molecules as a genetic marker for involuntional osteoporosis. The American Geriatrics Society, 2004 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, NV, USA (2004.5.17-21)
 17. Inoue S: [Symposium] "Molecular and cellular analysis of steroid hormone receptor: Expression and its role in reproductive organs" Estrogen receptors and their downstream targets in breast