

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（総合）

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

分担研究者 津久井 通
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター講師

【研究要旨】

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症における疾患モデルマウスの作製ならびにその生体作用機構の解析を目的とする。多因子性疾患である骨粗鬆症について、その疾患因子候補としてのエストロゲン、ビタミンK関連遺伝子について、集中的かつ網羅的に組換えアデノウイルスおよび遺伝子改変マウスを作製し、生きた試薬を準備することができた。また、これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに骨組織で過剰発現をさせる系を確立した。この遺伝子改変モデルマウスを利用して、それぞれの因子の生体内での骨作用に関してカスケードおよびシグナル伝達を中心とした解析をおこない、分子レベルで骨組織におけるエストロゲン・ビタミンKシグナルの作用メカニズムの解明を目指す。さらに、これら研究より明らかにされた骨粗鬆症に対する新たな作用点の治療法への応用について考察する。

A. 研究目的

骨粗鬆症の治療薬としてその有効性または可能性が高いことが報告されている物質についてカルシトニン、ビタミンD、ビタミンK、PTH、エストロゲン、ビスホネートが治療薬として考えられており、また実際に臨床におけるデータよりその有効性が示されているが、その作用機序・骨代謝以外のリスク等については、未だ不明な点が多く生体内での機能解析が必須と考えられる。これらの生体内での作用メカニズムを分子レベルで解明し、骨粗鬆症疾患遺伝子の検索、シグナル伝達、および相互作用に関する研究を行うことで、新規の治療法および創薬の可能性を示すことが、今後の重要な研究課題と考えられる。とりわけ将来的な治療法として極めて重要なコンセプトとして、生体内で副作用が少なく骨形成作用を持

つ新規因子の同定が急務と考えられる。

本研究課題における、分担項目としてエストロゲン、ビタミンK関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを作製することにより、動物個体を利用することでしか得られない、重力化での骨代謝における生体機能、薬剤の効果・影響を検討できる点が遺伝子改変マウスを使用する利点と考えられる。その際、実際に骨代謝で重要と考えられる候補因子群について、マウスで遺伝子改変を行った場合、これらの個体においては、種々の理由（例えば、軟骨の石灰化異常により、肺呼吸不全、授乳不可能等）から胎生期で致死となる可能性が高く、遺伝子改変マウスをライン化して、再現性および信頼できるデータとして吟味することが困難であった。それら問題点を改善するため、本研究課題では、コンディショナルトランス

ジェニック (cTg) マウスシステムを開発し、個体での網羅的な解析を行う。

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補因子群を同定し、これらの因子群の生体内における骨作用を解明し、これらの因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、違う作用点を持つと考えられる因子について分子レベルで骨粗鬆症を体系的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される遺伝子改変モデル動物を利用して、これらの因子の骨代謝における生体作用、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指した。

B. 研究方法

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

C. 研究結果

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は名前の通りピ

Figure 1: Vitamin K-dependent biosynthesis of Gla

The diagram illustrates the biosynthesis of Gla (gamma-carboxyglutamate) from gamma-carboxyglutamate (gamma-carboxyglutamate) and Vitamin K (gamma-carboxyglutamate). The process involves the following steps:

- Starting Material:** γ -carboxyglutamate
- Enzyme:** Vitamin K (gamma-carboxyglutamate)
- Intermediate:** γ -carboxyglutamate
- Matrix:** Matrix gla protein (MGP)
- Cofactors:** Conglutination factors II, VII, IX, and X
- Products:** Gla proteins
- Secretion:** Gla proteins are secreted into the blood.
- Target Tissues:** Liver, pancreas, CNS, etc.

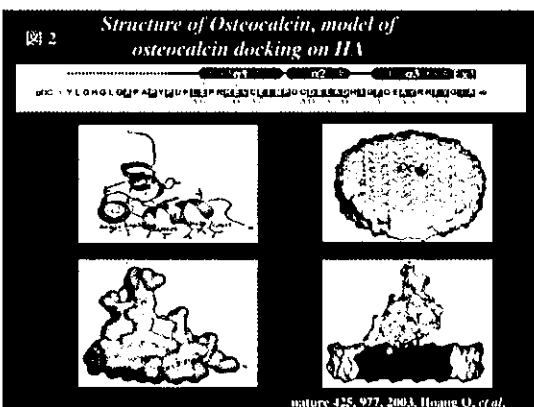
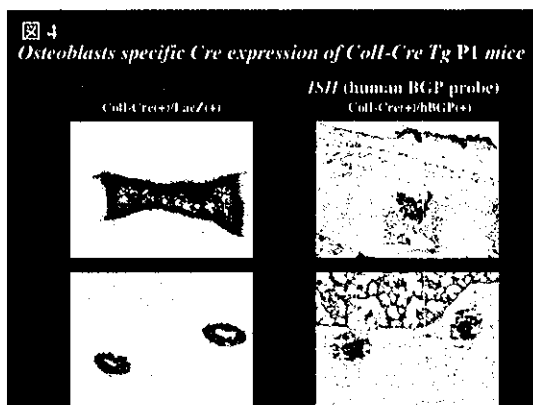


Figure 3 Conditional transgene expression of hBGP Tg mouse

The diagram illustrates the conditional transgene expression of hBGP in a Tg mouse. It shows three stages of the process:

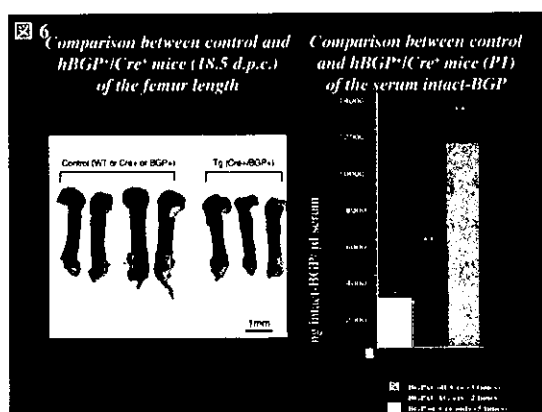
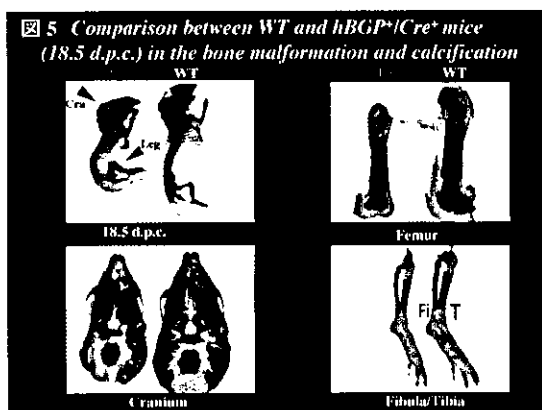
- Initial State:** A C1G promoter drives the expression of a hBGP gene. The hBGP gene contains a U2G::c1P insertion, which is flanked by loxP sites (represented by triangles).
- Induction:** The system is infected with Cre-expressing recombinant adenoviruses. This triggers a recombination event between the loxP sites, excising the U2G::c1P element.
- Final State:** The resulting construct consists of a C1G promoter driving a hBGP gene with a Uu insertion. The expression of hBGP is now "Off" because the U2G::c1P element, which was necessary for expression, has been removed.

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(図4)。



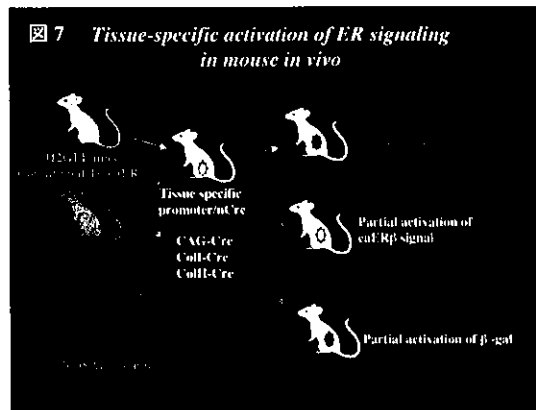
これらの遺伝子改変動物を利用して、生体におけるBGPの骨代謝への作用について解析を行った結果、マウス胎生後期から個体全体において軟骨組織において石灰化の低形成が観察され、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた(図5)。さらに、これらのBGPを過剰に発現するTgマウスは、ほとんどのマウスが出産後1-2日目に死亡することがわかり、血中intact-BGP量も有意に高い値を示した(図6)。

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、ColI-Cre、ColII-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7)。

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。

D. 考察

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。さらに研究を発展させるためには、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。

E. 結論

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を行った結果、ColIプロモーター/Creにより骨芽細胞系譜にBGPを過剰に発現させた場合、マウス胎生後期から軟骨組織において石灰化の遅延する傾向が見られ、また、BGPを過剰発現する仔マウスは、出産後1-2日目にほとんどの胎児で致死であった。胎生期において母方由来の補酵素であるビタミンKの胎盤通過性がほとんどないことが報告されており、それ故、BGPが γ -カルボキシラーゼの修飾がなく非グラ化タンパクとして存在する可能性があると考えられる。今後、骨芽細胞で過剰発現したBGPについて、グラ化の存在の有無、石灰化についてさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

少なくともER α シグナルに関しては、骨芽細胞系に直接エストロゲンシグナルが作用するよりも、むしろ間接的に作用することで骨形成作用を示す可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. Tsukui T, Toyoda Y: Transgenic Techniques, section in "Adenoviral infection." Humana Press. *Methods Mol Biol* 180, 73-82, 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 in decidual cells during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 28, 213-223, 2002
5. Kawakami Y, Tsukui T, Ng JK, Izpisua Belmonte JC: *Pattern Formation in Vertebrate Development*, section in "Insights into the Molecular Basis of Vertebrate Forelimb and Hindlimb identity" *Oxford University Press*, London, 198-213, 2003
 6. 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 TFIID. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003
 7. 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
 8. 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, 6525-35, 2004
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Hisatake K, Fukuda A, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y: Stimulation of Promoter Escape by a Coactivator PC4, 5th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany (2002.8.24-28)
- 【国内学会】
1. 津久井通、清水省志、大羽沙弥佳、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡.: Gain of function によるエストロゲンの生体作用機構の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
 2. 福田綾、床鍋繁喜、濱田光浩、松本征仁、津久井通、禾泰壽、久武幸司: c-fos 遺伝子の転写調節機構の解析 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
 3. 今澤由紀子、久武幸司、中川香をり、光澤浩、津久井通、松本征仁、濱田光浩、石浜明、村松實美、禾泰壽: 分裂酵母 RNA ポリメラーゼ I の新規サブユニットと RPA21, Rm3p との相互作用 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
 4. Hisatake K, Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y: [シンポジウム] A regulatory role for TFIID in transcriptional activation. (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会
 5. 津久井通、井上聡: ビタミン K 依存性 γ-カルボキシラーゼの生体作用機構 (2003.2.15) 第 6 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)
 6. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、浦野友彦、藤田雅代、佐藤美幸、村松正實、井上聡: 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 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 7. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡: 骨芽細胞におけるエストロゲン分子標的の検索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 8. 市川智恵、堀江公仁子、津久井通、堺隆一、井上聡: プロテオーム解析による骨芽細胞様細胞におけるビタミン K 分子標的の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
 9. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、

- 池田和博、堀江公仁子、久武幸司、丕泰壽、村松正實、井上聡：ER α および ER β の生体内 Gain of function による生殖機能の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
10. 池田和博、菱沼俊樹、大羽沙弥佳、津久井通、村松正實、井上聡：ラット脳におけるエストロゲン標的遺伝子網羅的検索 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会
11. 津久井通、井上聡：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 (2004.2.14) 第 7 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)
12. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、村松正實、井上聡：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 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
13. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡：Cre/LoxP システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
14. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、丕泰壽、村松正實、井上聡：トランスジェニックマウスを用いた卵巣におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
15. 津久井通、大羽沙弥佳、今澤由紀子、井上聡：Analysis of ovarian function in conditional transgenic mice by overexpressed ER α and ER β . (2005.1.22-23) 平成 16 年度 内分泌攪乱物質の環境リスク国際シンポジウム (京都)

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）
分担研究報告書（総合）

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

分担研究者 堺 隆一
国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部部長

【研究要旨】

骨粗鬆症の疾患遺伝子の解析において、DNA チップ、マイクロアレイにより得られた情報を正確に理解するためには、同時にそれらの遺伝子産物の蛋白質としての機能を解析することが必須である。本研究は、ゲノム・遺伝子の構造解析では解決できない蛋白質の修飾や複合体形成などが、骨粗鬆症発生においてどのように変化するかを知る目的で、プロテオーム分析による網羅的アプローチと生化学的手法による個別のアプローチとの併用により解析を進めている。これまでにチロシンリン酸化蛋白質や蛋白質複合体の変化を網羅的に解析する手法を確立して、骨代謝系の細胞の解析に用いようとしている。またステロイドホルモンが細胞内シグナル伝達に関わる分子群に直接働きかけ、短時間でその効果を表す non-genomic な細胞内シグナルと Src ファミリー等による蛋白質のチロシンリン酸化を介したシグナルの 2 つの経路に注目して、骨代謝制御機構を明らかにすることを試みており、細胞内シグナル伝達の disorder という立場から新しい骨粗鬆症の診断・治療に役立つモデルを構築した。

A. 研究目的

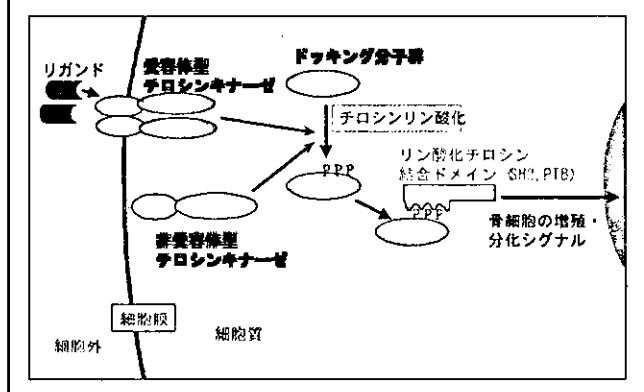
骨粗鬆症とは、主として加齢や生活習慣の変化などにより骨吸収と骨形成からなる骨代謝のバランスが崩れることで、骨量の病的減少が引き起こされた状態と考えられる。その発生に関わるファクターとしては、エストロゲン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンなどのホルモンバランスやカルシウム代謝などが知られており、加齢などによってこれらの正常な調節が崩れると破骨細胞の機能亢進や骨芽細胞の機能低下が引き起こされるものと推定されている。本研究の目的は、このような破骨細胞や骨芽細胞の機能がどのような機構により制御されているかを、細胞内シグナル伝達の解析により明

らかにすることである。近年では、骨芽細胞の BMP 蛋白質群による分化制御に関する詳細な知見に加えて、破骨細胞においては RANKL 蛋白質が膜上の受容体 RANK を介してその分化や活性化を制御していることが分かってきた。このような骨代謝細胞に細胞外から働きかける分子による刺激が、実際にどのような細胞内のシグナル伝達分子を介して、どのように細胞の機能・増殖・生存を制御するのかを明らかにしたいと考えている。そのために、分化刺激などによっておこる蛋白質の変化を網羅的に解析する。これらの解析には、最近広く行われている DNA チップ・マイクロアレイなどを用いた網羅的な発現解析に加えて、二次元

電気泳動による蛋白質発現解析、Flag タグによる複合体解析や二次元電気泳動解析などプロテオミクスの諸手法を用いていくつもりである。エストロゲン、副甲状腺ホルモン、ビタミン D 等の刺激により骨芽細胞、破骨細胞系の培養細胞での発現量に顕著な変化のみられた蛋白質について質量分析により同定し、抗体を用いた生化学的解析や、ノックアウトマウスを用いた発生工学的解析により、実際の生体での骨の形成や吸収における役割を明らかにする。

図 1

骨細胞におけるチロシンリン酸化シグナル

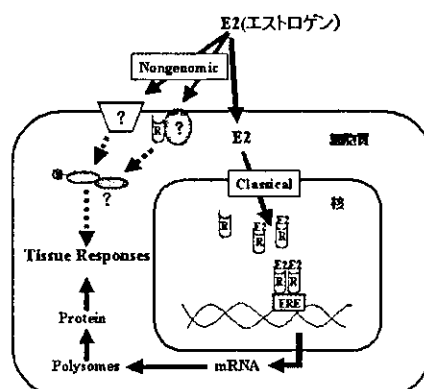


更に蛋白質の修飾については特にチロシンリン酸化を含む蛋白質群について集中的・網羅的に解析を進める。図 1 に示すようにこれらの蛋白質は受容体型チロシンキナーゼや Src ファミリーなどの非受容体型チロシンキナーゼの基質として、細胞の増殖や生存に関わるシグナルを伝える分子が多く含まれることが骨を含め多くの細胞系において知られている。この目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を行う。以上のような手法を用いて各種刺激により骨細胞に起こる細胞内変化に遺伝子発現-蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成の4つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。現時点で特に重要であると考えているのは、

骨粗鬆症の成因の一つである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を明らかにすることである。エストロゲンに関しては図 2 に示したように受容体を介して核内で転写制御に関わる作用 (classical) の他に、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) が血管細胞、骨芽細胞、乳癌細胞などでここ数年提唱されており、シグナル伝達の側面からは後者が特に興味深い。一方で破骨細胞の機能

図 2

エストロゲンの古典的作用と核外作用



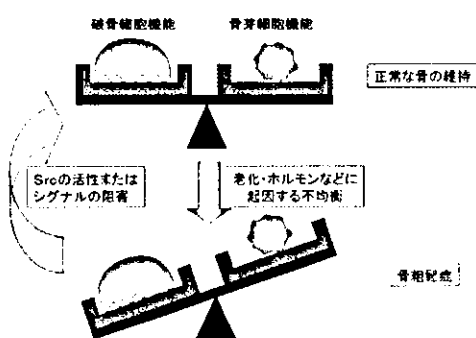
維持や生存に関わると考えられている Src チロシンキナーゼが、破骨細胞でどのような分子群のリン酸化を介してその機能を発揮するのかを解析する。ごく最近、骨以外の系ではあるがステロイドホルモン受容体 ($ER\alpha/ER\beta$) が核外で Src キナーゼの相互作用することを示唆するデータが発表されている。前立腺癌細胞 (LNCaP) や乳癌細胞 (MCF-7) などでは、 $ER\alpha$ と $ER\beta$ が Src キナーゼの調節領域の Src 相同領域 2 (SH2) に結合し、アンドロゲン受容体 (AR) が同じく SH3 領域に結合することが示された。この結合が、通常は分子内結合により不活性化している Src を活性化しその結果として Ras や下流の Erk の活性化と細胞

の増殖亢進モデルが提示された。このような核外の作用が骨代謝細胞においても機能している可能性がある。

破骨細胞の機能制御にも最も深く関わると考えられる Src ファミリーキナーゼとその基質の機能解析については更に重点的に行う。そもそも c-Src のノックアウトマウスが破骨細胞機能障害により骨大理石病を呈することが 1991 年の Cell 誌に報告されて以来、Src の活性化と破骨細胞の機能が密接に関係しているものと予測されて重点的に研究が進められてきたが、多くの状況証拠や関連分子の発見にもかかわらずその分子メカニズムについては現在に至るまで完全に解明されていない。これまでの知見と併せて Src キナーゼの活性またはシグナルの調節による破骨細胞機能の抑制が骨粗鬆症の標的治療として有効であると予測して(図3)、そのような Src の特異的ブロックの系を樹立することを目標の一つとする。

図3

骨粗鬆症における骨細胞の機能障害



Src キナーゼの基質 c-Cbl やもう一つのチロシンキナーゼ Pyk2 が c-Src の下流分子として機能すること、主として Sealing Zone で $\alpha V\beta 3$ インテグリンを介した細胞接着シグナルが Src/Pyk2/p130Cas/c-Cbl/Paxillin などからなるシグナル複合体によって伝えられることなどが破骨細胞が機能を発揮するために重要であると考えられている。c-Src

の一次構造は、C末側のチロシンキナーゼとしての活性を持つキナーゼドメインとその N 末側の機能調節領域に存在する SH2 と SH3 が特徴的である。更に細かい機能解析で N 末端には脂質修飾により膜局在に関わる部位、C 末端側にリン酸化されることに自己のキナーゼ活性を抑えるチロシン（チロシン 527）がある。以上の特徴的な構造、モチーフは種を超えて保存されており、Src ファミリーと呼ばれている蛋白質群に共通して保存されている。Src ファミリーの SH2 はリン酸化チロシンを含むモチーフに、SH3 はプロリンを多く含むモチーフに特異的かつ高親和性な結合をすることが知られている。X 線構造解析によって通常 Src が活性化していない状態では Src の SH2 が C 末のチロシン 527 のリン酸化した形に、SH3 がキナーゼドメインと SH2 の間にある領域と結合することにより 2 重にロックされた形でその活性を封じこめていることが明らかになった。この構造変化による Src 活性化のモデルを図3に示す。

チロシン 527 のリン酸化状態により Src ファミリーは活性化と不活性化の平衡状態にあると考えられる。Csk (C-terminal Src kinase) は、チロシン 527 を特異的にリン酸化することで Src の SH2 とチロシン 527 との分子内結合を誘導するため Src の活性を抑制する方向に作用する。一方これと逆にチロシン 527 の脱リン酸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。

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。それ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

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

上記のような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。そのためにも、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エ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エ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。

1. 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に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。

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。

1. 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

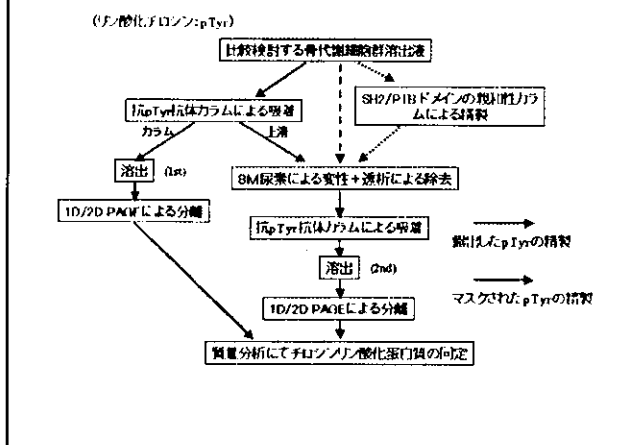
現を抑えることで、骨芽細胞においてはその増殖能や遊走能に、破骨細胞においてはその細胞の生存能や破骨活性にどのような影響が出るかを解析する。我々のクローニングした Src チロシンキナーゼの主要な基質 Cas については破骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作成をすすめており、その骨代謝異常を解析する。

C. 研究結果

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、ウエ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 4 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いで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

図4 チロシンリン酸化蛋白質の網羅的解析



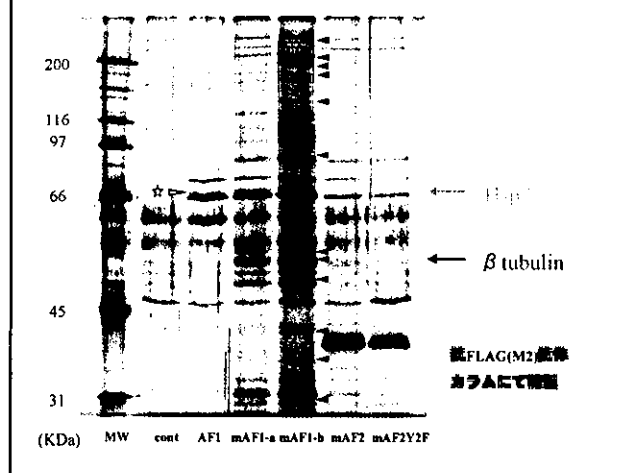
変性の操作を加えた後、再び直接抗リン酸化チロシン抗体カラムにかけ結合分子をとることで、ドッキング分子などのチロシンリン酸化部位で複合体を作る蛋白質群を効率的に濃縮できることを見出した。蛋白質の絶対量が少ないため質量分析で同定できなかったものも多く、質量分析に十分な量を集めるためには、かなり大量の細胞溶出液と抗体カラムを用いて精製を行うことが必要であることが明らかになった。

1. 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経由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に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5に示す通り AF-1 ドメインに特異的に結合する多くの蛋白質群が銀染色により観察され、そのうち2つを同定することに成功した。質量分析の結果図5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

図5 ER 結合分子の銀染色による同定



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ェ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。

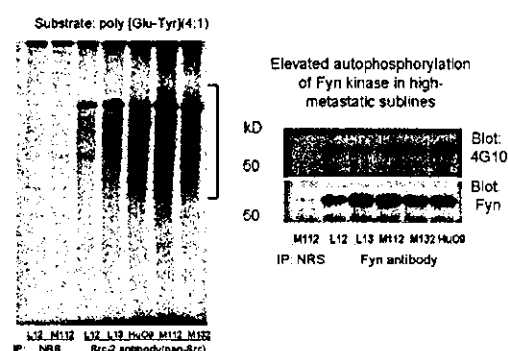
1. 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

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 の蛋白質は解析の結果 Paxillin であった(図 6)。Paxillin は発現レベルチロシンリン酸化レベルとも亢進していた。また Paxillin と共に Src キナーゼの基質として知られる 130kD の Cas 蛋白質もチ

ロシンリン酸化の亢進した蛋白質としてリン酸化が亢進していた。実際これらの細胞における Src ファミリーのキナーゼ活性を poly[Glu-Tyr]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 7)。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 7 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 7

HuO9 高転移株での Src キナーゼ活性の上昇



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

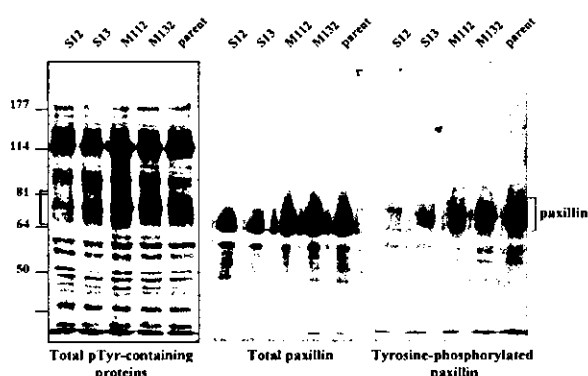
1. Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

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

図 6 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



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。

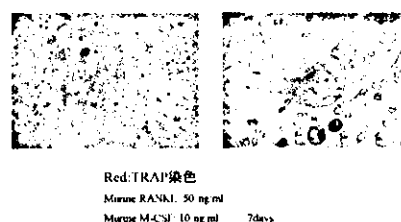
もう一つ変化が確認された Cas については、Src チロシンキナーゼの主要な基質であり、破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されている。Src チロシンキナーゼはそもそもノックアウトマウスが骨大理石病を示すことから、破骨細胞の活性化や生存に重要であることが早くから示されてきた。Src-Cas 経路は固形腫瘍など他の細胞系では Src の活性化を伝えるメインの経路であることが証明されてきていることから破骨細胞においてもその機能や存続維持のための主要な経路である可能性が考えられる。Src-Cas 経路の下流分子を明らかにする目的で Cas を欠損する細胞と、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増えることなどから、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。

2. 破骨細胞系細胞の調整法の確立

実際に破骨細胞におけるシグナルの制御を観察するために 2 種類の方法で破骨細胞の調整を試みてきた。一つは前駆細胞であるマウス RAW 細胞を破骨細胞分化因子 RANKL による刺激で破骨細胞様細胞に分化させる方法である。図 8 に示したように RANKL 刺激後 1 週間ですべての細胞が破骨細胞のマーカーである TRAP の発現を示す。ただしこの方法では未分化細胞がかなりの比率で混入してしまい生化学的解析に限界がある。そのため、純粋な箱湯細胞の調整にはラットからの初代培養細胞の調整を行っている。どちらの方法も蛋白質精製に必要な細胞数の確保にかなりの手間がかかり、これらの材料を使った実験は立ち後れてしま

図 8 RAW 細胞の RANKL 刺激による
破骨細胞様細胞への分化



ったが、この細胞における確認は極めて重要である。

D. 考察

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

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求めるだけでなく、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。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 論文発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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.
1. 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.

学会発表

【国際学会】

1. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on modification of signaling cascades in cancer. Tokyo, Japan (2003.1.8-11)
2. Sakai R: Roles of Src-binding molecules in the control of cancer progression. The eighteenth workshop on France-Japan cooperative cancer research program, Osaka, Japan (2003.10.28-11.1)
3. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: "Involvement of Eph receptor tyrosine kinase and ephrin ligand in the regulation

of cell-to-cell adhesion by interaction with claudins” 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa, Hawaii, USA (2004.1.25-29)

4. 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)
5. 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. 堺隆一、黄錦鴻、濱崎裕子、浅輪珠恵：ドッキング分子 Cas の各リン酸化部位の腫瘍における役割 (2002.10.1-3) 第 61 回日本癌学会総会 (東京)
2. 三宅泉、箱守裕子、中舘尚也、松浦信夫、坂本亨宇、堺隆一：ALK の活性化した神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC の造腫瘍性への影響 (2002.10.1-3) 第 61 回日本癌学会総会 (東京)
3. 箱守裕子、三宅泉、中川原章、堺隆一：神経芽腫における ALK 活性化の生物

学的意義 (2002.12.11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)

4. 黄錦鴻、浅輪珠恵、高戸毅、堺隆一：マウス高転移性メラノーマ細胞の細胞運動における Fyn と cortactin の協調的役割 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
5. 東浩太郎、堀江公仁子、井上聡、大内尉義、堺隆一：細胞膜近傍におけるエストロゲン受容体 α の機能解析 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
6. 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 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
7. 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)
8. 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)
9. 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, 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.	<i>Nature</i>	417	871-875	2002
6	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.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	299	222-228	2002
13	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.	<i>Toxicol Appl Pharmacol</i>	185	98-110	2002
26	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.	<i>J Mol Endocrinol</i>	28	213-223	2002
37	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.	<i>J Neuroendocrinol</i>	14	836- 842	2002
44	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.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	2	138-142	2002
49	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.	<i>J Bone Miner Res</i>	17	1744-1751	2002
57	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.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>	3	101-105	2003
62	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.	<i>J Bone Miner Res</i>	18	419-423	2003
67	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.	<i>J Hum Genet</i>	48	77-81	2003