

図1 ATMノックアウトマウスにおける骨量低下

取等に伴う動物実験は、国立長寿医療センター動物実験施設指針等に則り、ATM ノックアウトマウス等、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

ATM ノックアウト(ATMKO マウス)では、成長障害が認められるが、体重差に有意差のない 10 週齢のマウスを用いて解析を行った。腰椎についてマイクロ CT 解析を行ったところ、三次元骨体積 (BV/TV) が雌雄とも顕著に ATMKO 群で低下していること

C. 研究結果

ことが明らかとなった(図1)。この傾向は体重差が有意となる 14 週齢ではより顕著となり、加齢に伴い骨量の減少が観察された。また、脛骨近位端を用いた骨形態計測では、骨形成速度 (BFR/BS)ならびに骨芽細胞表面 (Ob.S/BS)といった骨形成指標の顕著な低下が見

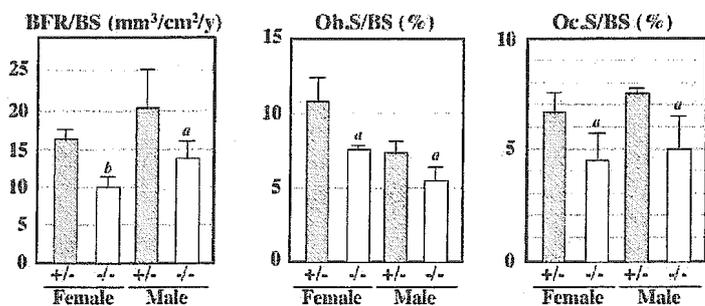


図2 骨形態計測

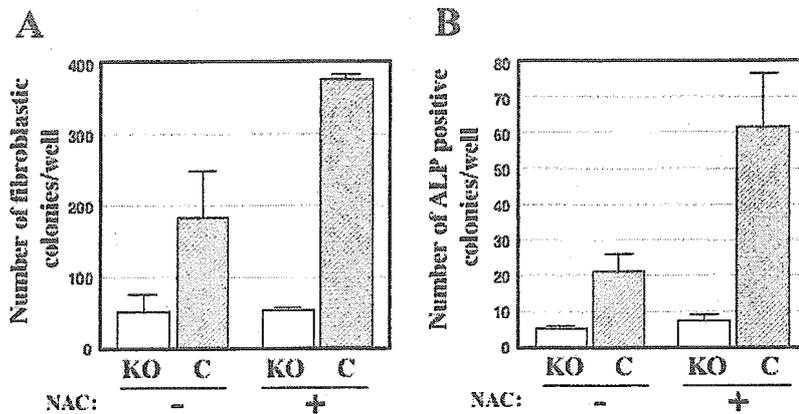


図3 コロニー形成法による骨髄間葉系細胞の解析

られた (図2)。また、骨吸収指標のひとつである破骨細胞面 (Oc.S/BS) においても低下が見られ、典型的な低代謝のパターンを示していた。このことが ATMKO マウスにおける低骨量の原因となっていることが示唆された。

次に、この骨形成の異常が cell

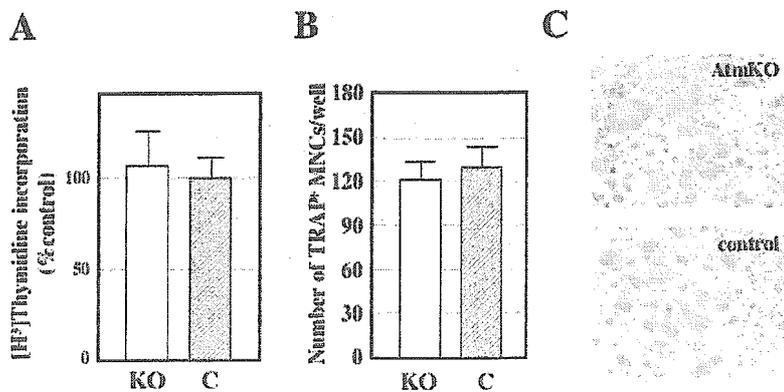


図4 破骨細胞形成能の解析

autonomous な欠陥に依るものかどうかを調べるため、骨髄細胞を用いたコロニー形成能ならびに破骨細胞形成能について検討を行った。骨髄由来間葉系細胞のコロニー形成能、ならびに骨芽細胞系分化

細胞コロニー形成能、脂肪細胞系分化細胞コロニー形成能のいずれも顕著に低下していることが明らかになった。また、これらのコロニー形成は、野生型では抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) の添加により増加したが、ATMKO 由来細胞では効果が見られなかった。それに対し、破骨細胞分化能については、M-CSF 依存性増殖能ならびに RANKL 依存性破骨細胞形成能 (破骨細胞数や形態) は差が見られなかった (図4)。

そこで、この骨芽細胞系細胞の異常について、頭蓋間由来骨芽細胞を用い

た骨芽細胞分化試験を行ったところ、野生型と ATMKO マウス間に差がなかったことから、分化障害の可能性は低いものと考えられた。

さらに、この障害の分子レベルでの解析を行うため、骨由来 RNA を用いてマイクロアレイ法による発現遺伝子プロファイリングを行ったが、病態に関連する顕著な遺伝子発現の差異は認められなかった。

そこで、ATM のシグナル関連分子について、骨髄細胞を用いて検討を行ったところ、MAP キナーゼ p38 の顕著な活性化が検出された。ただ、p53 レベルの差については有意な差が認められなかった(図5)。また、インスリン様成長因子受容体(IGF1R)の発現をウエスタンブロット法により調べたところ、ATMKO 由来細胞で顕著に低下していることが明らかとなった。一方、ATM 下流分子であり、そのノックアウトマウスが骨形成異常を示す Abl キナーゼについて発

現を検討したところ、野生型ならびに KO で同レベルの発現が検出され、差異が認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、ATMKO マウスがヒト AT 症状にみられる加齢性疾患である神経変性、免疫異常、腫瘍形成と染色体不安定化に加え、これらの疾患が顕著になるより早い時期に骨粗鬆症様病態を呈していることを明らかにした。ヒトならびに野生型マウスの加齢個体(20月齢以上)の知見では、加齢に伴う骨形成能の低下が間葉系幹細胞数ならびに増殖能の低下に依るものと示唆されている。これは、ATMKO マウスでよく保存されており、本ノックアウトマウスが老人性骨粗鬆症のモデルとして有効である可能性を意味している。

同様の骨形成低下による骨粗鬆症様病態について、Sca1 ノックアウトマウスならび

に Abl ノックアウトマウス等が報告されている。Sca1 ノックアウトマウスでは間葉系細胞のみならず造血系細胞の幹細胞の低下がみられ、骨量減少は1年齢を過ぎたあたりから顕著となる。Onset の点で ATMKO マ

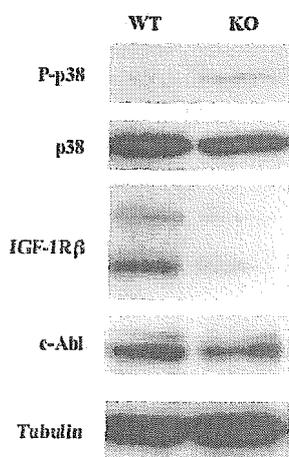


図5 発現解析

ウスとは異なる事や、Sca1 マウスについて他の老化様症状が報告されていないこと、また、ATMKO マウス骨での Sca1 発現が野生型と同等であることから、ATM と Sca1 には直接的な関与が無いように思われる。

また、ATM 下流分子として知られる Abl キナーゼのノックアウトマウスでは、むしろ骨芽細胞の分化異常が示されており、ATMKO とは異なる。また、Abl の発現にも差が認められないことから、Abl 経路とは異なる経路の異常がこの病態を引き起こしている可能性が考えられた。

インシュリン様成長因子 (insulin-like growth factors: IGFs) は、骨の発達や代謝において重要な役割を担っていることが知られている。また、AT 患者由来線維芽細胞ではその受容体の発現が低下しており、IGF 依存性の増殖が低下していることが報告されている。ATMKO マウス骨髄細胞でも同様に IGF1R の発現が顕著に低下しており、その増殖に影響を及ぼしていると考えられた。IGF 経路は酸化ストレスと密接な関係があり、また、マウス個体の寿命とも関連が知られている。ただ、本研究の結果からは直接的な関係について検討を加えることが出来なかったが、この受容体発現が酸化的ストレスを過剰に受けたことによる二次的なものか、また、受容体発現低下が、NAC による *in vitro* での増殖能賦活化への不応性の一因になっているかについて未だ不明である。これらの問題は寿命延長と関与していると考えられるため、更なる検討が必要と考えられる。

## E. 結論

ATMKO マウスは老人性骨粗鬆症様骨病態を呈し、間葉系幹細胞の増殖能低下による組織再生不良がその原因と考えられた。

## F. 研究発表

論文発表

**Watanabe K** and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med.*, *in press.*

Sasaki A, Hinck L, **Watanabe K.**

RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct.*, *in press.*

Hishiya A and **Watanabe K.** Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 22: 399-403, 2004.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

1. 仲 一仁、本山 昇. DNA複製およびダメージチェックポイント. 中山敬一編. キーワードで理解する細胞周期イラストマップ. 羊土社、東京. 2005年. pp124-130.
2. Sawa H, Komagome R: The JC virus-like particle overlay assay. In Lieberman PM (ed) **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ 2004;292:175-186.

### 雑誌

1. Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO Transcription Factors in Cell Cycle Regulation and the Response to Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.*, in press.
2. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 11-16, 2004.
3. Asai S, Sato T, Tada T, Miyamoto T, Kimbara N, Motoyama N, Okada H, Okada N. Absence of Procarboxypeptidase R Induces Complement-Mediated Lethal Inflammation in Lipopolysaccharide-Primed Mice. *J. Immunol.* **173**: 4669-4674, 2004.
4. Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (FKHR)-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **279**: 34741-34749, 2004.
5. Jack MT, Woo RA, Motoyama N, Takai H, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase and Checkpoint kinase 2 synergistically activate a latent population of p53 upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* **279**: 15269-15273, 2004.
6. Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N. Stress-Induced Premature Senescence in hTERT-Expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**: 2030-2037, 2004.
7. Watanabe K and Hishiya A. Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med.*, in press.

8. Sasaki A, Hinck L, Watanabe K. RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct.*, in press.
9. Hishiya A and Watanabe K. Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 22: 399-403, 2004.
10. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T: Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 1073-1078, 2004.
11. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kutrata T, Takahashi H: Nucleolin and the packaging signal,  $\Psi$  promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* 48: 111-118, 2004
12. Matsumoto K, Minamitani T, Orba Y, Sato M, Sawa H, Ariga H: Induction of matrix metalloproteinase-2 by tenascin-X deficiency is mediated through the c-Jun N-terminal kinase and protein tyrosine kinase phosphorylation pathway. *Exp. Cell. Res.* 297: 404-414, 2004
13. Orba Y, Sawa H, Iwata H, Tanaka S, Nagashima K: Inhibition of virus production in JC virus-infected cells by postinfection RNA interference. *J. Virol.* 78: 7270-7273, 2004.
14. Qu Q, Sawa H, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Nagashima K: Nuclear entry mechanism of the human polyomavirus JC virus like particle: role of importins and the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* 279: 27735-27742, 2004.
15. Minamitani T, Ikuta T, Saito Y, Takebe G, Sato M, Sawa H, Nishimura T, Nakamura F, Takahashi K, Ariga H, Matsumoto K: Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen. *Exp. Cell. Res.* 298: 305-15, 2004
16. Chikai K, Ohnishi A, kato T, Ikeda J, Sawamura Y, Iwasaki Y, Itoh T, Sawa H, Nagashima K: Clinico-pathological features of polymyxoid astrocytoma of the optic pathway. *Acta. Neuropathol.* 108: 109-114, 2004
17. Kamioka Y, Fukuhara S, Sawa H, Nagashima K, Masuda M, Matsuda M, Mochizuki N:

A novel dynamin-associating molecule, formin-binding Protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279: 40091-40099, 2004

18. Matsumoto K, Sato T, Oka S, Orba Y, Sawa H, Kabayama K, Inokuchi Ji, Ariga H: Triglyceride accumulation and altered composition of triglyceride-associated fatty acids in the skin of tenascin-X-deficient mice. *Genes Cells* 9: 737-748, 2004
19. Jin M, Sawa H, Suzuki T, Shimizu K, Makino Y, Tanaka S, Nojima T, Fujioka Y, Asamoto M, Suko N, Nagashima K: Investigation of simian virus 40 large T antigen in 18 autopsied malignant mesothelioma patients in Japan. *J. Med. Virol.* 74: 668-676, 2004
20. Tsuda M, Makino Y, Iwahara T, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Hanafusa H, Tanaka S: Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 279: 46843-46850, 2004
21. Aizawa H, Ohtani F, Furuta Y, Sawa H, Fukuda S: Variable patterns of varicella-zoster virus reactivation in Ramsay Hunt syndrome. *J. Med. Virol.* 74: 355-360, 2004
22. Furuta Y, Aizawa H, Ohtani F, Sawa H, Fukuda S: Varicella-zoster virus DNA level and facial paralysis in Ramsay Hunt syndrome. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 113: 700-705, 2004
23. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y-i, Hayashi KY, Minami N, Nishino I, Nonaka I, Takahashi T, Sawa H, Aoki M, Nagashima K: Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology* 24: 341-346, 2004
24. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S-i, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *J. Med. Virol.* 75: 130-136, 2005
25. Henmi C, Sawa H, Iwata H, Orba Y, Tanaka S, Nagashima K: Isolation of a monoclonal antibody recognizing a cell-surface molecule as a receptor for JC virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 242-251, 2005

26. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J. Virol.* 79: 2910-2919, 2005
27. Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M: The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. *J. Cell Physiol.* 2004 Nov 30; [Epub ahead of print]
28. Sawa H, Nagashima T, Nagashima K, Shinohara T, Chuma T, Mano Y, Tachi N, Hall WW. Clinicopathological and virological analyses of familial HTLV-I associated polyneuropathy. *J. Neurovirol.*, in press.
29. Ishida M, Tanaka S, Ohki M, Ohta T. BRM and BRG1 Negatively Regulate Transcriptional Activity of the Synovial Sarcoma Translocation Gene Product. *Genes Cells* 9: 419-428, 2004.
30. Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, Kunitoh H, Saito R, Shimizu K, Hirama C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Misao O, Yokota J. Association of Amino Acid Substitution Polymorphisms in DNA Repair Genes, TP53, POLI, REV1 and LIG4, with Lung Cancer Risk. *Int. J. Cancer*, in press.
31. Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology* 41: 629-636, 2004.
32. Shimada H, Shimizu K, Mimaki S, Sakiyama T, Mori M, Shimasaki N, Yokota J, Nakachi K, Ohta T, Ohki M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Human Genetics* 115: 372-376, 2004.
33. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 25: 1495-1505, 2004.

34. Aihara H, Nakagawa T, Yasui K, **Ohta T**, Hirose S, Dhomae N, Takio K, Kaneko M, Takeshima Y, Muramatsu M, Ito T. Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 18: 877-888, 2004.
35. Kobayashi A, **Ohta T**, Yamamoto M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymology* 378: 273-2786, 2004.
36. Tanaka Y, Sasanuma M, Kawaguchi S, **Ohta T**, Yoda K, Kurumizaka H, Yokoyama S. Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* 33: 3-11, 2004.
37. Goto J, Tezuka T, Nakazawa T, Tsukamoto N, Nakamura T, Ajima R, Yokoyama K, **Ohta T**, Ohki M, Yamamoto T. Altered gene expression in the adult brain of fyn-deficient mice. *Cell Mol Neurobiol.* 24: 49-59, 2004.
38. 仲 一仁、陳 晨、**本山 昇**. DNA ダメージチェックポイントとがん抑制メカニズム. *実験医学* 22: 1793-1799, 2004.