

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ならびに変形性関節症疾患遺伝子の
同定・機能の解明とその診断・治療への応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成18(2006)年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに変形性関節症疾患遺伝子の 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、核内受容体共役因子の骨粗鬆症・変形性関節症に おける機能解析	
	－破骨細胞における男性ホルモン受容体の高次機能－	
	加藤 茂明 -----	II - 1
	2. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症 ならびに変形性関節症における機能解析	
	堺 隆一 -----	II - 7
	3. 骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報 制御因子、標的因子の検索と機能解析	
	津久井 通 -----	II - 16
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

総括研究報告書

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）
総括研究報告書

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに変形性関節症疾患遺伝子の
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】

高齢者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、ならびに 700 万人以上といわれる変形性関節症に対する対策が急務となっている。これらの疾患は加齢にともなう骨量の減少、もしくは骨格系の変形・変性が病的に亢進し腰痛や骨折、運動障害、寝たきりをひきおこす症候群で、特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。しかし、骨粗鬆症の診断・治療は未だ確立されているとはいえず、変形性関節症に至っては診断法・治療法とも模索段階である。したがってこれらの疾患遺伝子とその分子機能の解明が待ち望まれている。骨疾患の治療薬である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、その他遺伝子情報制御分子が骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子として関与していることを想定されることから、本研究は、それら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する。本研究事業により、骨量ならびに変形性関節症の指標に相関する遺伝子の SNP を POMC、LRP5、WISP1、WNT10B などに複数同定した。骨代謝と密接に関連したエストロゲン、ビタミン K、アンドロゲンにおいて新規シグナル経路、TSK、MATN2 などの分子標的を見出し、新しい骨関節疾患モデル動物を作製解析した。これらの新規シグナル経路、分子標的の探索機能解析と、作製した新しい骨関節疾患モデル動物の病態解析から、疾患遺伝子の解明が期待される。すなわち、ゲノム医学の手法を取り入れ、独自の方法を加味して骨粗鬆症・変形性関節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、それら分子の機能を明らかにする。倫理面に配慮しつつ、分子生物学、蛋白生化学、遺伝子改変動物、SNP を用いたヒト遺伝学を駆使して骨粗鬆症・変形性関節症の病態を解明し、診断・治療・予防への応用から、国民の健康増進を目指す。

分担研究者氏名：所属機関名・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核内情報・教授

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

津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター実験動物施設・講師

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、それに基づく腰痛や骨折などの臨床症状からなる症候群である。一方、変形性関節症は骨、軟骨、靭帯、滑膜の変形・変性、石灰化、炎症を伴い、高齢者腰痛のもうひとつの大きな要因となっている。これらの疾患は、罹患者の生活の質を著しく低下させる骨折や運動障害、寝たきり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しており、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。骨疾患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。その他、同様な核内受容体は、グルココルチコイド、アンドロゲン、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、種々の治療薬が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・変形性関節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・変形性関節症の病態解明、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) ゲノム医学ならびに独自の手法を活用し、骨関節系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) 遺伝子改変動物とゲノムワイドの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・変形性関節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) 骨における IGF シグナル経路と SNP (分担：井上)

インフォームドコンセントをえられた日本人非血縁閉経後女性 295 人を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法によりヒト IGF1R における遺伝子型を決定した。特に骨代謝マーカー、骨密度(全身ならびに腰椎)に関して測定し、以上より得られたデータに関し統計学的な解析を行なった。

(2) 骨軟骨における NRII サブファミリーの発現と骨粗鬆症 (分担：井上)

ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞から mRNA を採取し、これら細胞の各分化段階でのラット VDR、SXR、CAR、アルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

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 -グリセロリン酸添加 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。メディアウム交換を0、2、5、7日目に行い、培養2日、5日、10日後にRNAを回収し、それぞれの時点でのヒトSXR、CAR、Col2a1、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。

インフォームドコンセントをえられた日本人非血縁閉経後女性354人を対象として末梢血DNAを抽出し、TaqMan PCR法によりヒトSXRならびにCARにおける遺伝子型を決定した。特に骨代謝マーカー、骨密度(全身ならびに腰椎)に関して測定し、以上より得られたデータに関し統計学的な解析を行なった。

(3) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血DNAを抽出し、TaqMan PCR法によりWnt-LRP5シグナル伝達調節因子であるヒトWnt10B遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR法を用いてgenotypeの分類を行い、BMDとの相関を検討した。

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血DNAを抽出し、TaqMan PCR法によりWnt-LRP5シグナル伝達調節因子であるヒトLRP5ならびにWnt-LRP5シグナル伝達応答遺伝子であるWISP1におけるSNPを決定した。対象者の胸腰椎X線写真を撮影し、変形性脊椎症の指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関しても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行なった。

(4) 骨芽細胞様細胞 SaOS2 におけるステロイド受容体の発現とその応答エレメントの同定による標的遺伝子の解

析(分担：井上)

1. バイオインフォマティクスによるヒトゲノム上のステロイドホルモン応答配列(HRE)の検索

ヒトゲノム情報は Ensembl Genome Browser (NCBI 35 assembly, <http://www.ensembl.org/>)よりダウンロードし、Perl言語によるプログラムとEMBOSSパッケージに含まれるdregプログラム(<http://emboss.sourceforge.net/apps/dreg.html>)を用いて、コンセンサスHREの探索を行った。コンセンサスHREは、転写因子データベースTRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/>)によるGR結合部位配列5'-AGAACA_{nnn}TGTTCT-3'を用いた。

2. ヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2 における HRE へのグルココルチコイド受容体 (GR)結合能の検討

SaOS2細胞において、ホルモン枯渇3日後合成ステロイドDexamethasone(10 nM)または溶媒(0.1%エタノール)による刺激を24時間行い、GR特異的抗体(Santa Cruz Biotechnology社：H-300)を用いてクロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)を行った。得られたDNAを用いて、バイオインフォマティクスによりゲノム上に同定されたコンセンサスHREのうち、既知遺伝子の転写開始点から5'側10 kb以内に存在する5'HRE 26カ所について、ホルモン依存的GR結合能をリアルタイムPCRにより定量した。コントロール実験としては、FKBP51(FK506 binding protein 5, UniGene Hs.558328)イントロン1(long isoformにおける+360 ~ +427)とENaC α (sodium channel, nonvoltage-gated 1 α , UniGene Hs.130989)近位プロモーター(-762 ~ -868)に存在するコンセンサスHREにおいてGR結合能を検討した。用いたPCRプライマーは表1に示す。

表1

ChIPアッセイPCRプライマーの一覧表

標的遺伝子	Forwardプライマー	Reverseプライマー
ホルモン応答配列(HRE)		
HRE1	5'-CCAAATATGTCCATTCATCCAACA-3'	5'-GGAAACATACGCATTGCCTAGAA-3'
HRE2	5'-CCAACAACACTAGCAGAACATTATG-3'	5'-AGAGGGCATCTGAACAATAGAAGA-3'
HRE3	5'-CAAGGCCTGGGACATTTAA-3'	5'-CGAAGCTGCTGGGAGGTATC-3'
HRE4	5'-TCAAAGGTGGTGCTTATCAT-3'	5'-GAACTGAGTTCAGGAAATATG-3'
HRE5	5'-AAGGGAAAAGATCTCATATTGCA-3'	5'-CACGGCAATTTTAATACTCATCA-3'
HRE6	5'-GACCATACCTTGGTATGACCCCTT-3'	5'-TCTGTGGTTATCCTGCAAGTCAGT-3'
HRE7	5'-AAGAAACCATTTTGAATGTGCC-3'	5'-CAGGTCAGTTAGGCTCTGATAAAACC-3'
HRE8	5'-TACTTACCCAGTGCTTCCCAATC-3'	5'-GAGCACCTGAGGTGTTTTTTT-3'
HRE9	5'-AGCGAGACTCCGCTCTTAA-3'	5'-GGAGGAGTTACTGTTACAATTAT-3'
HRE10	5'-ACACTGTGGTGGGACAGGATT-3'	5'-GCTCAAACAACAGGCTAAGACA-3'
HRE11	5'-TGTCTTCTGAAGACTTCCATTCC-3'	5'-TACAGGCACACACCACCAGATTG-3'
HRE12	5'-CTTGACAGTGAAGACTTCCATTCC-3'	5'-TTCTGGAGGAGTTACTGTTACAATTA-3'
HRE13	5'-CCTGCTCTTTGATTTTCGTAAGA-3'	5'-TGAAGCCAAATGCTGAAGTG-3'
HRE14	5'-TTGACAGTATATTTAGAGCGTGTATCT-3'	5'-GTTAATTCTCTTCCCTATGGTAGAAT-3'
HRE15	5'-TGTGCAAGAAATGCCATCCT-3'	5'-CATCATAGCTGCATGGGTGTT-3'
HRE16	5'-TGAAAATAATTTCACTTATCCTTTAAGC-3'	5'-AATGACTTGCTGACCAAATCC-3'
HRE17	5'-GGCCTATTTTAAATCAGCATTTTCA-3'	5'-ATCCTCATTCTCACCAGCATCT-3'
HRE18	5'-ACATCAGTGGCTCTTAAAGCACTG-3'	5'-CAGAGAGAATAAAAAAACTAGCCAAA-3'
HRE19	5'-AATGCTGCTCAAGAAATCAGA-3'	5'-TTTAATCCAAATGCATTTTAGAAC-3'
HRE20	5'-CTCCATGTTTGAAGGCGGAGA-3'	5'-CATCCCACTTTGTGCGTAACTTT-3'
HRE21	5'-CTCCAGGGCTGTACTGGTATCTG-3'	5'-CAGGTGTGGGCCCTCTGT-3'
HRE22	5'-TCTTAAGCAAAGGCCAACAA-3'	5'-TCTATCATTACAAGAAAGTTGGTTATCTG-3'
HRE23	5'-GCCAGCACTCACGTGGCTAT-3'	5'-CTGCGGTGCCGTGACA-3'
HRE24	5'-TGTACACAAAACTGCTAGAACTCT-3'	5'-GCTCAGCCATGGGTTGGT-3'
HRE25	5'-GGGAGCTGGCTAGAACACTCA-3'	5'-CATGCTGGGCTAAAGCAGAAC-3'
HRE26	5'-TGTGTGCTCAAAGAGTAGATTGG-3'	5'-TCATCACTATTGCCTGAACATCA-3'
FKBP51 イントロン 1	5'-TGCAAGAGCGGTTGATCTG-3'	5'-GCGAGAACAGCCTGACTCA-3'
ENaC α プロモーター	5'-CCTCTGGTTGCCACATTC-3'	5'-GGGCCCTAGGACATTTCTGTT-3'
PSA 近位プロモーター	5'-TCTGCCTTTGTCCCCTAGAT-3'	5'-AACCTTCATTTCCCAAGACT-3'
PSA 遠位プロモーター	5'-ACAGACCTACTCTGGAGGAAC-3'	5'-AAGACAGCAACACCTTTTT-3'

表2

RT-PCRプライマーの一覧表

標的遺伝子	上流 HRE	Forwardプライマー	Reverseプライマー
IQSEC2	HRE1	5'-ACATCACAGAAGTGGAGACTCCTT-3'	5'-AGGGCTTCGTCGATGGATTC-3'
MELL1	HRE2	5'-GAGATCACGCACGGCTTTG-3'	5'-CCAATCCATCATGTTGCCATT-3'
HS163_HUMAN	HRE3	5'-GATGGAGGCGGTGGTGTTC-3'	5'-GTAATTATGAAGTAGACCAGAGGAAGAT-3'
DISP1	HRE4	5'-CATGGAGCTGAAAGGAGTACAG-3'	5'-CACCACTGCCCTGATAGTATCATT-3'
EXTL2	HRE5	5'-AGGCAGCCAGCTGTTCTATTG-3'	5'-TTAACGCAGCAAAACAGTCACT-3'
NP_689710.1	HRE6	5'-GAGGGCAGTGGCGTGATC-3'	5'-CAGTAGAATGGCGTGAAGTCA-3'
B3GALT3	HRE7	5'-TGCAAGCCATGGCTTTTC-3'	5'-GGCATGTGGTGTCTCTTAGCA-3'
SLC36A1	HRE8	5'-CGGAAGGCCTCAACAACCT-3'	5'-CCATGTTGTGCTATTGCTTTGAC-3'
DAXX	HRE9	5'-GCCCTTACCAGTGTCTTAGAGA-3'	5'-GAGACGCCTCCATTGAAGGA-3'
ULBP3	HRE10	5'-CGGACTGACCACCTTCTTCAA-3'	5'-TGCATCAGGAAGTCCCTAAGC-3'
KIF13A	HRE11	5'-GCTGCTATGGAGTTAGTATTACGAAAAC-3'	5'-CTTCAAACCTCTGCGTGAAGTCTGT-3'
ZNF297	HRE12	5'-CCTCTCAAGGATGCGCTCTT-3'	5'-GGGAATTTCCACGGGAAGTC-3'
GIMAP5	HRE13	5'-CAGGTGAAACAGGAACATGGA-3'	5'-GGCCTGTGACTCAAAGATGGA-3'
ZNF398	HRE14	5'-GAGCTTCGCTACAAACAGACA-3'	5'-ACCCCAACAGCCTCCATT-3'
NP_055096.2	HRE15	5'-CAGTGACCTCTGCGTGACA-3'	5'-AACCCAGAGGAACAAGGAACA-3'
Q9C0D7_HUMAN	HRE16	5'-CCAGCTGTCTGGCGACTAC-3'	5'-AGTCGAGAGTCAGAGATGCTGTCTATT-3'
OR8D4	HRE17	5'-GCTTTTATCCTCACCAGCATCCT-3'	5'-GAGCTACAGGTGCTAAACGCTTT
ENSG00000182203	HRE18	5'-ACACCAACAGGATACACTGAAAGC-3'	5'-GCACATTTAACTTGCAAGTTTTTG-3'
ENSG00000185439	HRE19	5'-TGCCTTCATGGTGGACAATG-3'	5'-GGATGCTCGATGCTCCAGGTT-3'
CV106_HUMAN	HRE20	5'-CACAAATTTAACTTACGAACCTTCAACTC-3'	5'-GCCAACTGAGCTCTAGTTAATGTCTTG-3'
SRP14	HRE21	5'-GTTGTTGGAGAGCGAGCAGTT-3'	5'-CCGACGTCGGGCACTTC-3'
NP_874362.2	HRE22	5'-TGCAAGCAGCTTGTGGACATC-3'	5'-CGAATGCAGGGGAGTCA-3'
MVD	HRE23	5'-TGGCGGCACTGCTGTGACA-3'	5'-CGCGCTTGCCCAAGTA-3'
ENSG00000189289	HRE24	5'-GCCTGCTCCACCCAGAGAA-3'	5'-AACAGGTTCCAGCAGCTCAGA-3'
NP_775751.1	HRE25	5'-CACCAAGTGCAGGACAGTCTTC-3'	5'-GGTGTCTTTTGTCCACAGTGA-3'
NP_689725.2	HRE26	5'-CTTTACTAGCAACACCTCTTCCAT-3'	5'-TGCACCCGAAAGATTACAACCTT-3'
FKBP51 coding領域		5'-CTGCAGAGATGTGGCATTCACT-3'	5'-TCCAGAGCTTTGTCAATTTCAA-3'
ENaC α coding領域		5'-CGCATGAAGACGGCTTCT-3'	5'-CGCATGAAGACGGCTTCT-3'
PSA coding領域		5'-GCCCTGCCGAAAGG-3'	5'-GATCCACTTCCGGTAATGCA-3'
GAPDH coding領域		5'-GGTGGTCTCTGACTTCAACA-3'	5'-GTGGTCTGTGAGGGCAATG-3'

3. ヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2 における HRE 近傍遺伝子のグルココルチコイド (GC) 応答性の検討

5'HRE 近傍遺伝子について、SaOS2 細胞における GC 応答性遺伝子発現を検討した。ホルモン枯渇 3 日後、Dexamethasone(10 nM)または溶媒(0.1%エタノール)による 6 h および 24 h の刺激を行った。コントロール実験としては、FKBP51 と ENaC α 発現における GC 応答性を検討した。用いた PCR プライマーは表 2 に示す。

(5) 骨におけるビタミン K /SXR 応答経路の解析 (分担：井上)

骨芽細胞におけるビタミン K/ SXR の応答遺伝子を解析するため、SXR および VP16 活性化ドメインのアミノ末端欠失体を結合した SXR(VP16 AD_{CR}-SXR)を作製し、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_{CR}-SXR 安定発現細胞(MG-63/VP16 AD_{CR}-SXR)をリファンピシンおよびビタミン K₂ (メナキノロン-4 : MK-4) で刺激して DNA チップ解析を行い、得られた SXR 標的分子、CD14 antigen (CD14)、matrilin-2 (MATN2) および tsukushi (TSK)についてさらに解析を行った。MG-63/SXR 細胞および、その親株である MG-63 細胞を用いて、siRNA により SXR をノックダウンした条件における、SXR 標的遺伝子の発現誘導を解析した。コントロールには luciferase 遺伝子に対する siRNA を使用した。細胞外マトリクス蛋白質である TSK および MATN2 について、Flag-あるいは Myc-tag を付加したコンストラクトを作製した。COS1 細胞に tag を付加した分子を発現させ、tag 抗体を用いて免疫染色を行い、蛋白質の局在を解析した。さらに、tag 抗体を用いて免疫沈降および Western blot 解析を行い、分子同士の結合性を解析した。コンフルエントになった MG-63 細胞を MK-4 を添加した分化培地で培養し、Sirius-Red 染色に

より細胞表層に蓄積するコラーゲン量を解析した。MG-63 細胞を用いて TSK 安定発現細胞株を作製し、コラーゲン蓄積量を解析した。また、siRNA により TSK をノックダウンし、MK-4 によるコラーゲン蓄積における TSK の関与を検討した。

(6) 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症・変形性関節症における機能解析—破骨細胞における男性ホルモン受容体の高次機能— (分担：加藤)

破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスとして、Cathepsin K-Cre ノックインマウス(Ctsk-Cre)系統の樹立を行った。次に、floxed AR マウスと交配する事で、破骨細胞特異的 ARKO マウスを得た。12 週齢のオスマウスを用いて、DEXA 法による骨密度測定、 μ CT による骨構造解析、さらに骨形態計測法による骨組織の動態について解析を行った。

(7) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症ならびに変形性関節症における機能解析 (分担：堺)

これまでのチロシンリン酸化蛋白質群の網羅的解析等のアプローチは、蛋白質試料の量的制限から推進するのに多くの困難を伴った。そのため新規のシグナル伝達分子の同定で成功したのは、サンプルの大量調整が可能な系に限られた。具体的には骨肉腫細胞を初めとする固形腫瘍の細胞株から、その増殖や運動性に関わるチロシンリン酸化分子群を解析するというのが初めのステップとなる。

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。

2. Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

Src 機能の調節系を樹立するにあたって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。これまでの研究で Src と基質との結合様式が徐々に明らかになってきたので、Src キナーゼの基質の一つを標的としてブロックする系が確立できれば 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。さらに選択的な効果が期待できる。

我々は以前、癌化した細胞の中で Src チロシンキナーゼの主要な基質となる蛋白質 Cas をクローニングしたが、Cas は 1) インテグリンシグナルにおける Src の主要な基質として破骨細胞の分化・機能維持に重要である。2) エストロゲン受容体と直接結合してその nongenomic 作用に関わる分子である可能性がある。3) 乳癌における BCAR1/p130Cas の過剰発現が、タモキシフェン耐性獲得につながる、などのこれまでの研究から、基質特異的な阻害のモデルとして最適である。単純に RNAi を用いた発現抑制を用いて Cas のシグナルが腫瘍の特性にどのような影響を与えているか解析するとともに、Src との結合部位のみを発現するアデノウイルスベクターを用いて、Src から Cas に来るシグナルだけを選択的にブロックする系の樹立を試みる。このようなことを既知の基質やこの研究中に得られた新規の基質について行い、Src の基質特異的シグナル阻害のシステムを拡げていく。

3. ephrin-B1 のインテグリンシグナルにおける役割

ephrin-B ファミリーはもともと受容体型チロシンキナーゼである Eph のリガンドとして取られたものであるが、それ自体が膜貫通領域を持ち、Src によってチロシンリン酸化を受けることから、Src の基質としての機能に興味を持たれてきた。

ephrin-B ファミリーの分子の中でも ephrin-B1 は骨肉腫細胞の転移性とその発現量に相関を認め、またヒトにおける遺伝子変異は頭蓋骨形成異常などの異常が見られ、発生過程で神経堤由来の細胞の

運動能や運動方向を制御していると考えられる。今までの研究は Eph-ephrin の受容体ーリガンド相互作用によって細胞間接着で接触した細胞同志に双方向性のシグナルを送り repulsion や adhesion の指令を出すことがこの系の主要な役割として解析が進められてきたが、インテグリン刺激により局所的に活性化した Src キナーゼが、基質として ephrin-B1 をリン酸化することによって、どのように細胞の接着能・運動能に影響を与えるのかについてはまだわかっていないことが多い。特に骨・軟骨系におけるこの分子の Src 基質としての働きを推し量るために、細胞モデルを用いて解析を進める。

(8) 骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子、標的因子の検索と機能解析 (分担：津久井)

分担者の研究分担項目のうち、骨粗鬆症疾患の治療薬であるビタミンK、エストロゲン等の遺伝子情報制御因子について網羅的に遺伝子改変動物を作製し、その動物個体における骨作用について解析を行い始めた。特に分担者は、本年度にビタミンK関連因子としてのγ-カルボキシラーゼのグラ化標的蛋白である BGP (Bone Gla Protein) について、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(ERαおよびERβ)を介する生体での骨作用について焦点を絞り解析を行う。分担研究者は新規遺伝子情報制御因子・標的因子候補としてエストロゲンおよびビタミンKのシグナル因子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。

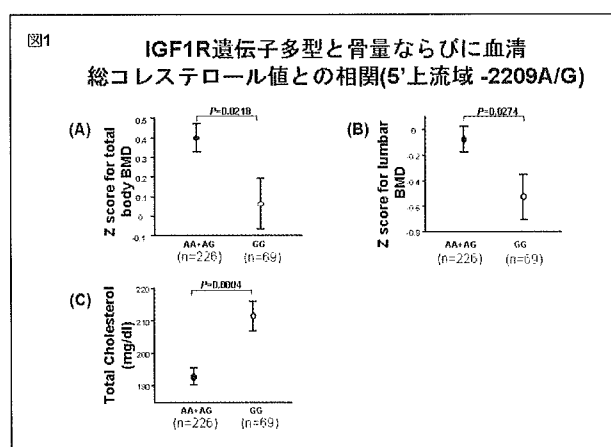
疾患遺伝子および標的遺伝子群の候補について、生体における gain of function を行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、エストロゲン・ビタミンKシグナルの骨組

織における作用メカニズムおよび病態メカニズム解明、最終的に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4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い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

1. 活性型caER α、およびcaER β Tg 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BoneグラProtein) BGP、のビタミンK関連遺伝子のTg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. 結果

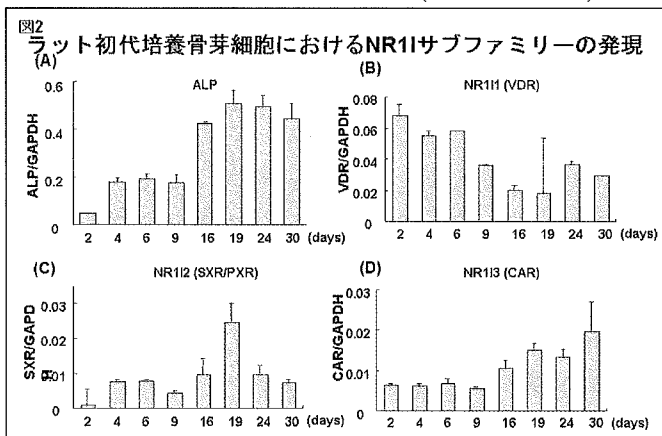
(1) 骨における IGF シグナル経路と SNP
ヒト IGF1R 遺伝子の 5'上流域に存在する遺伝子多型では、全身骨、腰椎骨密度において有意差を呈していた(図 1A、B)。興味深いことに骨密度が高い IGF1R の遺伝子群(AA+AG)では骨密度が低い



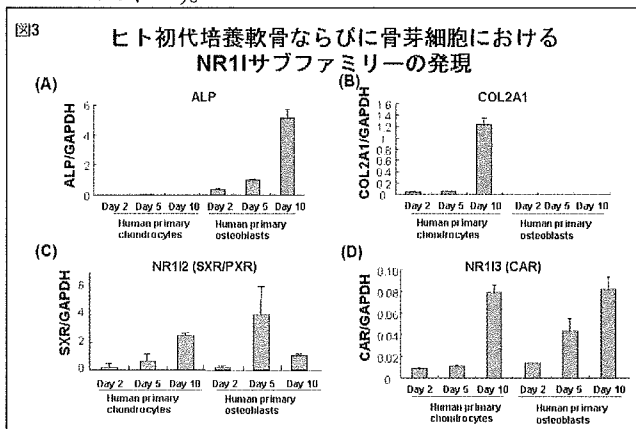
IGF1R の遺伝子群(GG)と比して有意に血清コレステロール値が低下していた(図 1C、P=0.0004)。

(2) 骨軟骨における NR1I サブファミリーの発現と骨粗鬆症

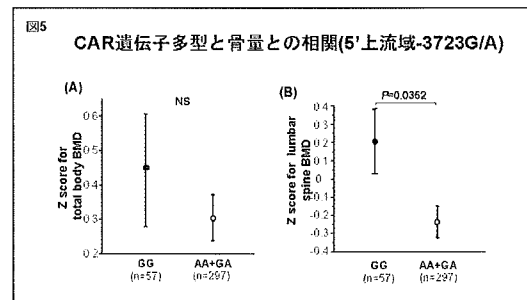
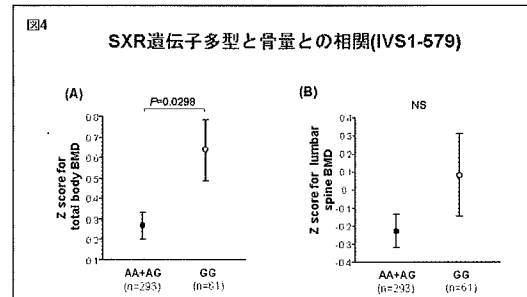
定量的 RT-PCR 法により骨芽細胞の分化マーカーの一つである ALP の発現はラット初代培養骨芽細胞の培養期間に伴い上昇することが確認された(図 2A)。ラット初代培養骨芽細胞において SXR ならびに CAR の mRNA レベルでの発現が VDR と同様に確認された(図 2B、C、D)。



定量的 RT-PCR 法により骨芽細胞の分化マーカーの一つである ALP の発現はヒト初代培養骨芽細胞の培養期間に伴い上昇し、軟骨細胞の分化マーカーの一つである COL2A1 の発現はヒト初代培養軟骨細胞の培養期間に伴い上昇することが確認された(図 3A、B)。ヒト初代培養骨芽細胞ならびに軟骨細胞において SXR ならびに CAR の mRNA レベルでの発現がラット骨芽細胞同様に確認された(図 3C、D)。

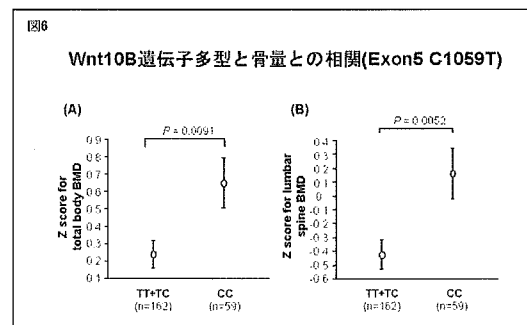


ヒト SXR 遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP では、全身骨骨密度と有意に相関した(図 4)。ヒト CAR 遺伝子の 5'上流域に存在する SNP では、腰椎骨密度において有意差を呈していた(図 5)。



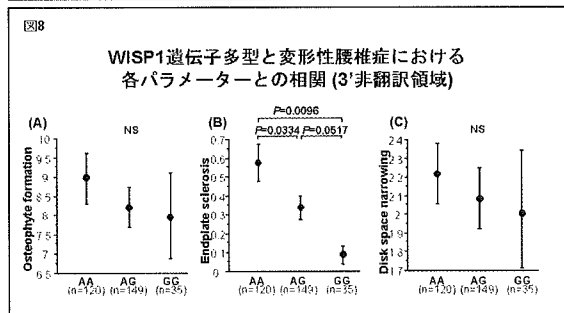
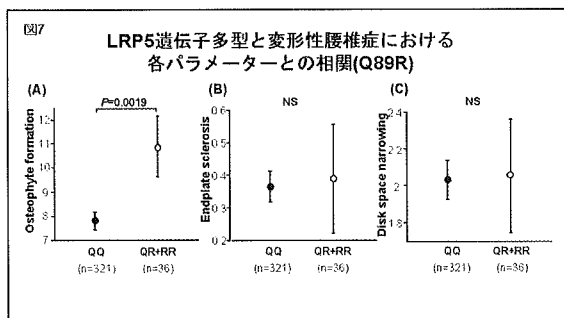
(3) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10B のエクソン 5 上流域に存在する遺伝子多型(C1059T)においては全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた(図 6A、B)。



LRP5 遺伝子のアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)では、変形性関節症の指標である骨棘形成において(図 7A)、また WISP1 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する SNP においては終板硬化において(図 8B)

有意差を呈していた。LRP5 ならびに WISP1 遺伝子におけるこれら遺伝子多型は骨量に関しては有意差を示さなかった。



(4) 骨芽細胞様細胞 SaOS2 におけるステロイド受容体の発現とその応答エレメントの同定による標的遺伝子の解析

1. ヒトゲノム情報に基づくステロイドホルモン応答配列(HRE)の網羅的同定

Ensembl ゲノムブラウザより取得されたヒトゲノム配列(NCBI 35 assembly)による解析において、565 個の完全マッチコンセンサス HRE(パーフェクト HRE)が同定された。ヒトゲノム配列旧バージョンの NCBI 34 assembly になく、今回のバージョンで同定されたパーフェクト HRE が 1 番と 14 番染色体の 2 カ所存在した。

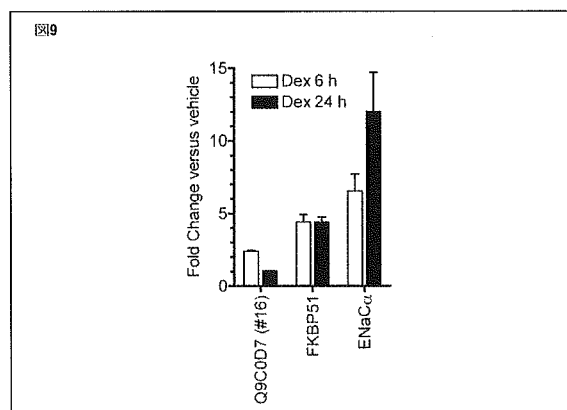
パーフェクト HRE の分布は概ね染色体サイズに相当しており、平均 100 Mb あたり 17.4 カ所存在した。最も HRE の密度が高い染色体は 8 番の 28.0 カ所/100 Mb であり、最も密度が低い染色体は Y 染色体の 6.9 カ所/100 Mb であった。

パーフェクト HRE のうち、既知遺伝子の転写開始点から 5'側 10 kb 以内に存在する応答エレメントを 5'HRE と定義し、

565 中 26 カ所(4.6%)同定された (HRE1 ~HRE26)。表 3(次頁)に 26 カ所の 5'HRE と近傍遺伝子について示す。5'HRE は全ゲノム中 14 本の染色体にのみ分布しており、最長染色体である 1 番では 5 カ所、ついで 6 番と 11 番染色体に 4 カ所ずつ分布していた。

2. SaOS2 細胞における 5'HRE のグルココルチコイド受容体(GR)結合性

ChIP により得られた SaOS2 細胞ゲノム DNA サンプルを用い、コントロール実験として、FKBP51 イントロン 1 と ENaC α 近位プロモーターに存在するコンセンサス HRE において GR 結合能を検討した。DNA-蛋白架橋を行い、超音波処理した後の断片化 DNA をインプット DNA とし、Dexamethasone(Dex 10 nM)または溶媒コントロールによる刺激を行った各群において、インプット DNA に対する ChIP 後 DNA の GR 結合能を数値化した。FKBP51 イントロン 1 上の HRE における Dex 依存性 GR 結合能はコントロールに比して~6.3 倍、ENaC α 近位プロモーター領域上の HRE における Dex 依存性 GR 結合能は~3.3 倍であった (図 9)。



ヒトゲノム情報から同定された 5'HRE について、Dex 依存性 GR 結合能を検討した。ENaC α 近位プロモーター領域上の HRE における GR 結合能をこえる応答エレメントはなかったが、26 カ所の 5'HRE 中、HRE16 において~2.5 倍の Dex 依存性 GR 結合能を認めた(図 9)。

表 3

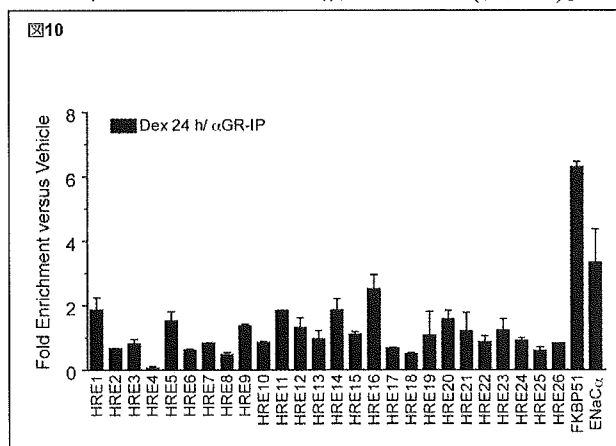
既知遺伝子近位プロモーター領域に存在する
完全マッチステロイドホルモン応答配列(5' HRE)の一覧表

HRE ID	染色体位置	ストランド		HRE起点	HRE配列	近傍遺伝子Ensembl ID	HRE-遺伝子間	
		方向					距離 (kb)	近傍遺伝子
HRE1	Xp11.22	-		53237415	AGAACA ^t taTGTTC	ENSG00000124313	3.9	IQSEC2
HRE2	1p36.32	-		2603985	AGAACA ^a gcTGTTC	ENSG00000142606	7.4	MELL1
HRE3	1q42.12	+		220841360	AGAACA ^g ttTGTTC	ENSG00000143771	9.9	HS163_HUMAN
HRE4	1q41	+		219495172	AGAACA ^g taTGTTC	ENSG00000154309	9.4	DISP1
HRE5	1p21.1	-		101079768	AGAACA ^a aaTGTTC	ENSG00000162694	6.2	EXTL2
HRE6	1p36.11	-		25913162	AGAACA ^g ctTGTTC	ENSG00000177493	9.9	NP_689710.1
HRE7	3q26.1	-		162310806	AGAACA ^t tcTGTTC	ENSG00000169255	5.0	B3GALT3
HRE8	5q33.1	+		150798127	AGAACA ^g ccTGTTC	ENSG00000123643	9.2	SLC36A1
HRE9	6p21.32	-		33401650	AGAACA ^t tcTGTTC	ENSG00000007565	3.0	DAXX
HRE10	6q25.1	-		150487454	AGAACA ^a taTGTTC	ENSG00000131019	5.1	ULBP3
HRE11	6p22.3	-		18101058	AGAACA ^t gcTGTTC	ENSG00000137177	5.4	KIF13A
HRE12	6p21.32	-		33401650	AGAACA ^t tcTGTTC	ENSG00000168351	8.2	ZNF297
HRE13	7q36.1	+		149868965	AGAACA ^c aaTGTTC	ENSG00000196329	3.2	GIMAP5
HRE14	7q36.1	+		148274989	AGAACA ^t taTGTTC	ENSG00000197024	7.5	ZNF398
HRE15	8q24.3	-		144987498	AGAACA ^c cgTGTTC	ENSG00000179950	8.9	NP_055096.2
HRE16	11q22.3	+		109509863	AGAACA ^t ttTGTTC	ENSG00000149289	1.9	Q9COD7_HUMAN
HRE17	11q24.1	+		123276891	AGAACA ^a agTGTTC	ENSG00000181518	5.5	OR8D4
HRE18	11q24.2	+		125433385	AGAACA ^a aaTGTTC	ENSG00000182203	9.3	ENSG00000182203
HRE19	11q12.3	+		62569237	AGAACA ^a atTGTTC	ENSG00000185439	1.8	ENSG00000185439
HRE20	14q21.2	-		44792647	AGAACA ^t ttTGTTC	ENSG00000129534	0.5	CV106_HUMAN
HRE21	15q15.1	-		38128202	AGAACA ^a acTGTTC	ENSG00000140319	9.5	SRP14
HRE22	15q22.3	+		62987265	AGAACA ^g atTGTTC	ENSG00000166839	3.9	NP_874362.2
HRE23	16q24.3	-		87266241	AGAACA ^a ctTGTTC	ENSG00000167508	9.2	MVD
HRE24	17q21.32	-		44836359	AGAACA ^c tcTGTTC	ENSG00000189289	3.2	ENSG00000189289
HRE25	19p13.3	+		2844818	AGAACA ^g gaTGTTC	ENSG00000171970	7.1	NP_775751.1
HRE26	22q13.1	-		38616692	AGAACA ^g aaTGTTC	ENSG00000176177	2.4	NP_689725.2

HRE ID	アノテーション
HRE1	IQ motif and Sec7 domain 2
HRE2	Mel transforming oncogene-like 1 (membrane metallo-endopeptidase-like 2)
HRE3	Protein HSPC163
HRE4	Dispatched A
HRE5	Exostosin-like 2 (Glucuronyl-galactosyl-proteoglycan 4-a-N-acetylglucosaminyltransferase)
HRE6	(No description)
HRE7	Beta-1,3-galactosyltransferase 3
HRE8	Solute carrier family 36 member 1 (proton/amino acid transporter 1)
HRE9	Death domain-associated protein 6 (Fas death domain-associated protein)
HRE10	NKG2D ligand 3 precursor (Retinoic acid early transcript 1N)
HRE11	Kinesin-like protein KIF13A
HRE12	Zinc finger protein 297 (Zinc finger and BTB domain containing protein 22A)
HRE13	GTPase, IMAP family member 5, Immunity-associated nucleotide 4-like 1 protein
HRE14	Zinc finger protein 398 (Zinc finger DNA binding protein p52/p71)
HRE15	fuse-binding protein-interacting repressor isoform b
HRE16	(No description)
HRE17	Olfactory receptor family 8, subfamily D, member 4
HRE18	(No description)
HRE19	(No description)
HRE20	Protein C14orf106 (P243)
HRE21	Signal recognition particle 14 kDa protein (SRP14)
HRE22	ENSG00000166839
HRE23	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase (Diphosphomevalonate decarboxylase)
HRE24	(No description)
HRE25	(No description, a putative KRAB-containing zinc finger protein)
HRE26	(No description)

3. SaOS2 細胞における 5'HRE 近傍遺伝子の GC 応答性

完全マッチ 5'HRE 近傍遺伝子のうち、HRE16近傍のQ9C0D7 遺伝子(UniGene Hs. 376289) mRNA 発現における GC 応答性を検討した。コントロール実験の Dex 刺激 6 h 後および 24 h 後の mRNA 発現は、溶媒コントロールに対して FKBP51 ではどちらのポイントでも~4.4 倍、ENaC α では~6.6 倍および~12.0 倍であった。Q9C0D7 遺伝子の GC 依存性発現上昇は Dex 刺激 24 h 後では有意に認めなかったが、6 h では~2.4 倍であった(図 10)。

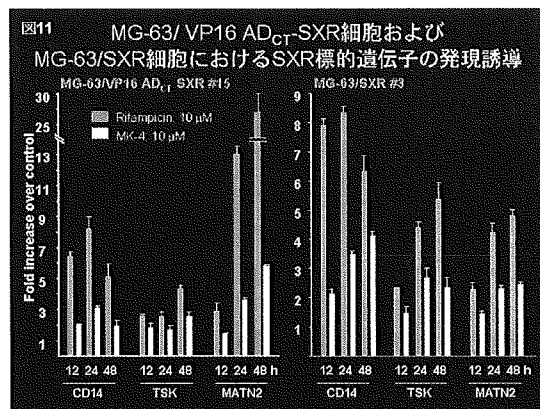


Q9C0D7 遺伝子は CCCH タイプの Zinc フィンガー蛋白と考えられており、この遺伝子における機能は明らかになっていないが、CCCH タイプ Zinc フィンガー蛋白の 1 例として、tristetraprolin(Zinc フィンガー-36 ホモログ、UniGene Hs. 534052) は RNA 転写物の AU リッチエレメントに結合する機能が知られている。

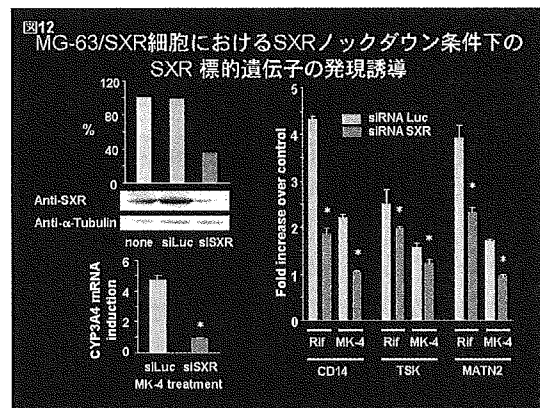
(5) 骨におけるビタミン K /SXR 応答経路の解析

高い転写活性を示した VP16 AD_{CT}-SXR を安定発現させた MG-63/VP16 AD_{CT}-SXR を用いて DNA チップ解析を行った結果、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 14 遺伝子得られ、この中から、CD14 antigen (CD14)、tsukushi (TSK)および matrilin-2 (MATN2)についてさらに解析を行った。これら遺伝子は、

定量的 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 11)。siRNA により SXR

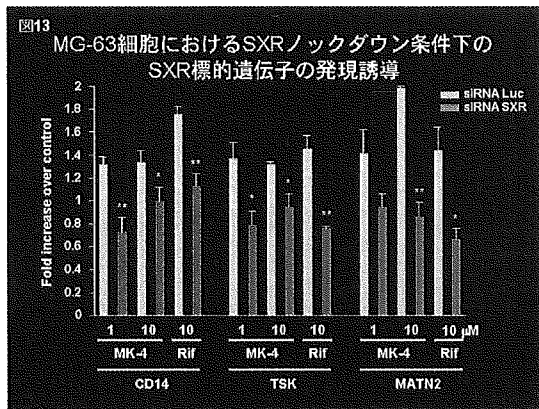


をノックダウンした結果、SXR 蛋白質の発現量が減少し、MK-4 による cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4)の発現誘導が抑制された(図 12)。

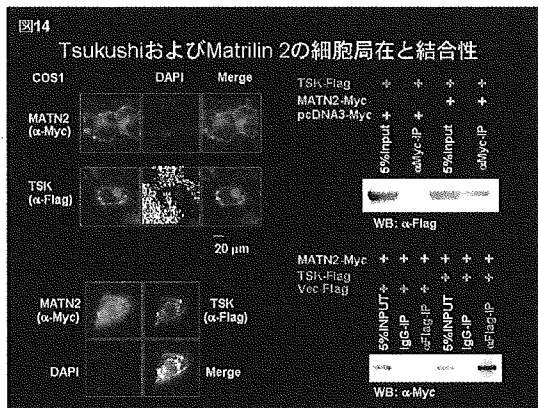


この条件で SXR 標的遺伝子の発現誘導を解析した結果、SXR のノックダウンにより、MG-63/SXR 細胞およびその親株である MG-63 の両者において、遺伝子のリガンド依存的な発現誘導は減少した(図 12、13)。

免疫染色により TSK および MATN2 蛋白質の細胞局在を解析した結果、TSK は核膜周辺、細胞膜、細胞質など広く染色が認められた。MATN2 は細胞膜周辺に局在していた。両者を共発現させた細胞では、細胞膜および核膜周辺に両分子が共発現することが示された(図 14)。免疫沈降法により両者の相互作用を解析した

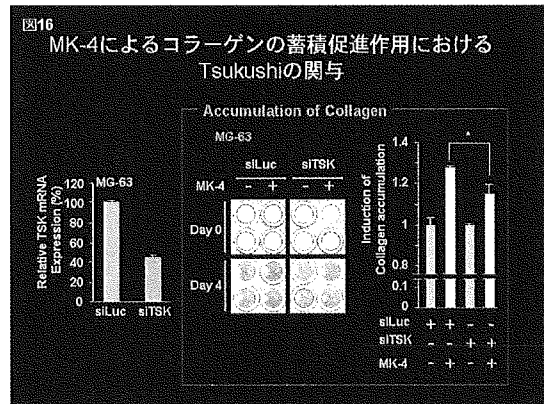
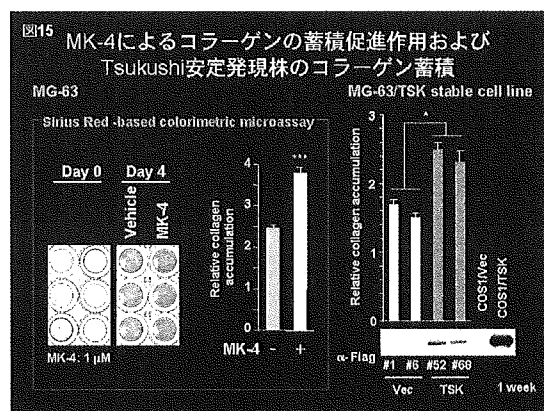


結果、TSK および MATN2 を供発現させた細胞で、両者が互いに結合することが示された(図 14)。



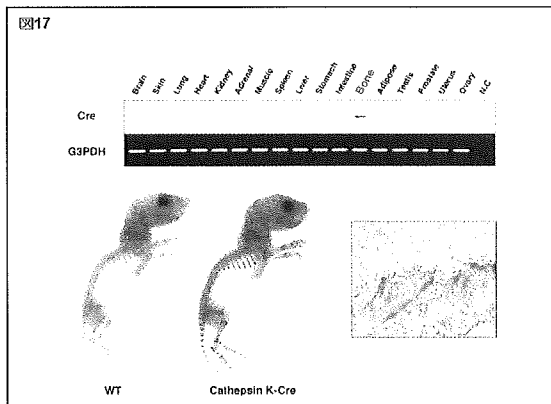
MG-63 細胞を MK-4 を添加して培養した結果、MK-4 添加により Sirius Red の強い染色が認められ、コラーゲンの蓄積が促進されていた。また、tag を付加した TSK 発現プラスミドを作製し、MG-63 細胞で安定発現させて Western blot により発現を確認した。TSK 発現株の TSK 発現量は、mRNA レベルで 5 倍以上の上昇が認められた。TSK 安定発現細胞株を 1 週間培養し、コラーゲンの蓄積量を解析した結果、TSK 安定発現細胞でコラーゲンの蓄積量が増加していた(図 15)。また、MK-4 によるコラーゲンの蓄積促進作用は、siRNA により TSK をノックダウンすると減少することが示された(図 16)。

- (6) 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症・変形性関節症における機能解析
一般的なトランスジェニックマウスの

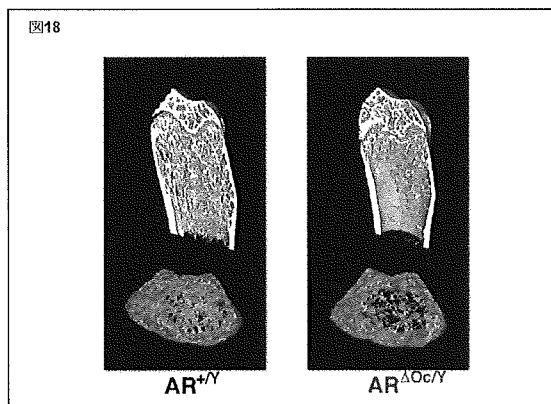


問題点である組織特異性の低さや、成長・継代に伴う発現量低下などの解決を期待し、破骨細胞特異的発現遺伝子である Cathepsin K 遺伝子座に直接 Cre 遺伝子を挿入した Cre ノックインマウスの作出を行った。得られたマウスの各組織での Cre 遺伝子発現を RT-PCR Southern 法にて調べたところ、骨組織特異的な発現を確認した。また、CAG-CAT-Z テスターマウスと交配を行う事で生体での Cre 依存的遺伝子欠損について検討した結果、胎生期・成体で破骨細胞特異的な LacZ 遺伝子の発現が確認された。以上の結果から破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作製に成功したと判断した(図 17)。

樹立した Ctsk-Cre マウスと AR flox マウスの交配により破骨細胞特異的 ARKO (AR^{ΔOc/Y}) 雄マウスを得た。12 週齢雄マウス大腿骨の X 線撮影および 3 次元マイクロ CT による解析を行ったところ、AR^{ΔOc/Y} マウスでは大腿骨遠位の大幅な海綿骨減少が観察された。



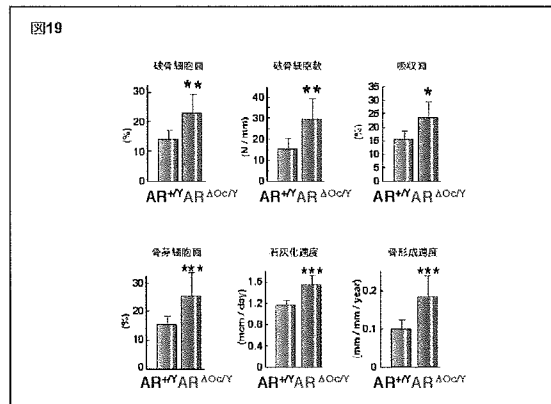
KO群で観察された海綿骨減少について詳細に検討するため、骨形態計測による解析を行った結果、骨組織中の破骨細胞数が大幅に増加し、骨吸収面の増加が観察された(図18)。



更に代表的な骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度が WT 群に対して有意に上昇していた事から、破骨細胞機能亢進による骨吸収速度の増加が起きていると考えられた。興味深い事に骨芽細胞数も増加しており、骨形成速度・石灰化速度が上昇傾向にあった。以上の結果をまとめると、AR Δ Oc/Y マウスでは破骨細胞機能が亢進する事で骨代謝回転が高回転となり、その結果として海綿骨量の減少が起きている事が明らかとなった(図19)。

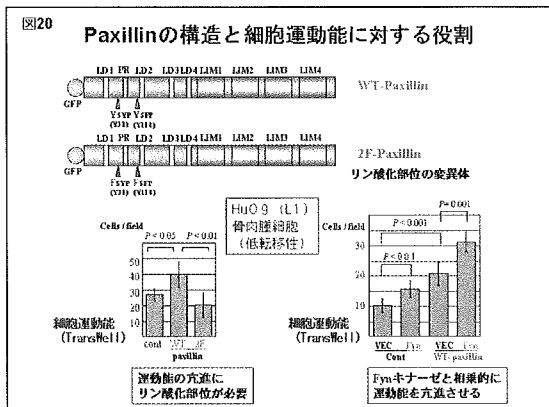
(7) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症ならびに変形性関節症における機能解析

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

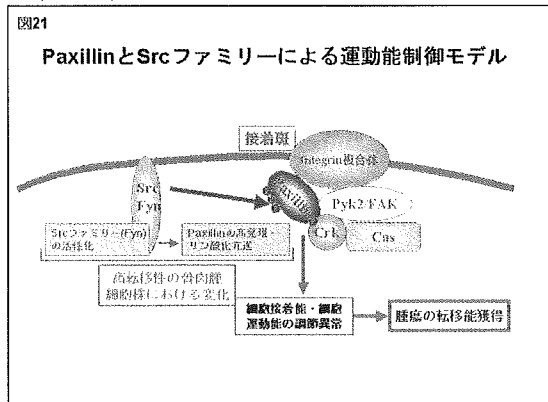


骨肉腫細胞株 Hu-O9 の転移能の異なる亜株群を用いてチロシンリン酸化の相違の検索を進めてきた。転移性の高い群では、どれも低い群よりも Src ファミリーのキナーゼ活性が亢進していたが、それに対応して強くリン酸化している分子として同定された最初の分子は Paxillin であった。Paxillin の細胞内局在は高転移群でも低転移群でも接着斑にみられ、発現量、リン酸化量は高転移群で顕著に増加しているもののどちらの群でもインテグリンを介した細胞-基質間の接着に関わっていることが確認された。高転移群の骨肉腫細胞で Src ファミリーのキナーゼ活性を特異的阻害剤 PP2 を用いて阻害すると Paxillin 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示唆された。PP2 は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。このような運動能の亢進は paxillin の主要なチロシンリン酸化部位 Y31 と Y118 のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体では見られなかった。また paxillin の発現だけでなく Fyn と共発現させることにより相乗的に細胞運動能を亢進させることが示された(図20)。



以上のことをこれまでに分かっている paxillin の機能と合わせて考えると、骨肉腫細胞を用いたモデルにおいて、何らかの要因で活性化した Fyn キナーゼが、同時に過剰発現した paxillin のチロシンリン酸化に働き、結果として細胞の運動能・転移能に関わることが明らかになった(図 21)。



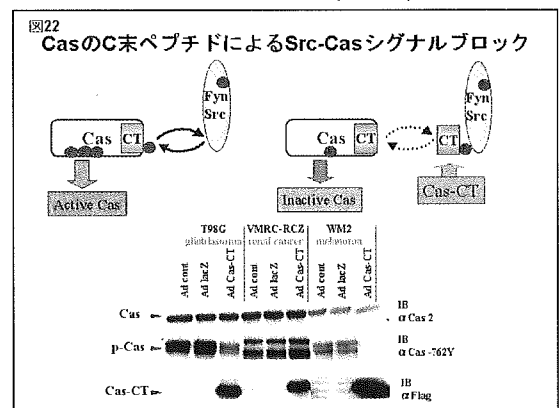
Hu-O9 も含め幾つかの腫瘍細胞株の系でその接着能や運動能とリンクして Src や Fyn と結合するチロシンリン酸化蛋白質を次々に同定している。その中には Cas やコルタクチンなど既知のもの、それ以外に基質として知られていないもの、機能不明の蛋白質などが含まれている。それらの分子の機能解析を行い発現組織を確認すると同時に、骨芽細胞のモデルとなる Raw 細胞の分化誘導系や軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、同様の手法により基質蛋白質の精製・同定を進行中である。

2. Src ファミリーキナーゼのシグナル調節による細胞機能の調節系の樹立

Src ファミリーのうち広範な組織に発

現している Src、Fyn、Yes の発現を抑える siRNA を設計し、それぞれの発現を RNAi により抑える系を樹立した。実際ウエスタンブロットで各チロシンキナーゼの量が 80%以上抑制されているのが確認できた。それらを各種の培養細胞に導入することにより、その細胞の接着能・運動能などの特性に Src ファミリーのどのキナーゼが一番関わっているのか調べる事が可能になった。既に固形腫瘍細胞株を用いて、どの Src ファミリーキナーゼがその転移能・運動能に関わるかを解析・検討中である。

また基質レベルでの阻害のモデルとして、Cas については、そのリン酸化依存シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析している。Cas は C 末領域に Src キナーゼの SH2 及び SH3 ドメインと結合する領域を持つ。これまでの解析でこの領域 (Cas-CT) を欠損した変異体は Src との結合能を失うばかりでなく、チロシンリン酸化のレベルも顕著に低下することがわかっている。今回 Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を樹立した。この領域のペプチドは Src と Cas の結合を阻害することにより Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすると考えられる。実際 Cas の恒常的なチロシンリン酸化亢進が見られるグリオーマ細胞 T98G、メラノーマ細胞 WM2 などこのアデノウイルスを感染させるとコントロールに比べ著明に Cas のチロシンリン酸化が低下した(図 22)。



ただし、腎癌細胞株 VMRC-RCZ のように Cas のリン酸化レベルの変わらない細胞もあり、細胞により違った機序で Cas のチロシンリン酸化が維持されていることが明らかになった。

T98G や WM2 では同時に細胞運動能も顕著に低下し、Cas を介したシグナルの阻害がうまく効果を現していることが確認された。

前述の高転移性の骨肉腫細胞株 Hu-O9 ではやはり Cas の強いリン酸化が認められるので Cas-CT のこの系に対する作用を解析中である。

3. ephrin-B1 の基質接着シグナルにおける役割

これまでに ephrin-B1 のリン酸化メカニズムや、新規の結合分子の同定などから、Src の基質としての ephrin-B1 の機能に迫ろうとしてきた。最近タイトジャンクションの構成成分である claudin が ephrin-B1 と結合能を持ち、細胞間接着に伴い claudin が膜表面に集積することで ephrin-B1 がリン酸化するという新しいメカニズムを見いだした。このような受容体を介さない ephrin-B1 の活性化は、他の機序によっても起こると考えられ、その 1 つとして細胞-基質間接着でインテグリンが活性化することにより、Src ファミリーを介して ephrin-B1 がリン酸化するメカニズムがあると考えられ検証を進めている(図 23)。

実際、胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると細胞運動能は顕著

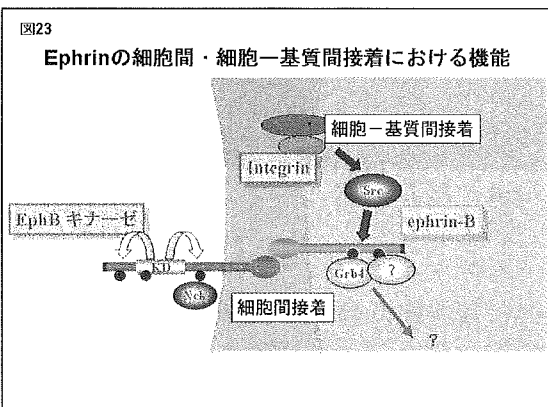
に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加する事が確認された。リン酸化特異的抗体では ephrin-B1 は接着斑に一致してそのリン酸化を認める。現在リン酸化部位の変異体を使ったシグナルの解析や新たな結合分子の探索を行うことによりインテグリンシグナルの担い手としての新しい ephrin-B1 の役割を明らかにしようとしている。

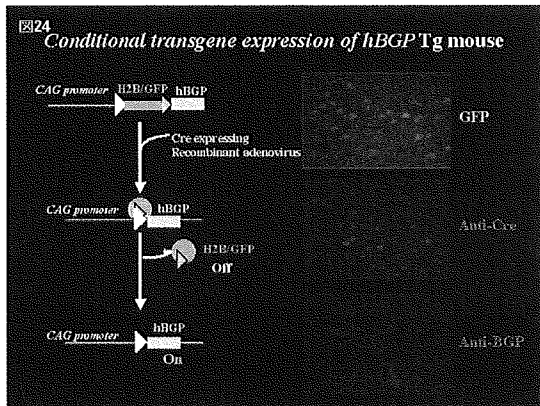
(8) 骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子としての新しい遺伝子情報制御因子、標的因子の検索と機能解析

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

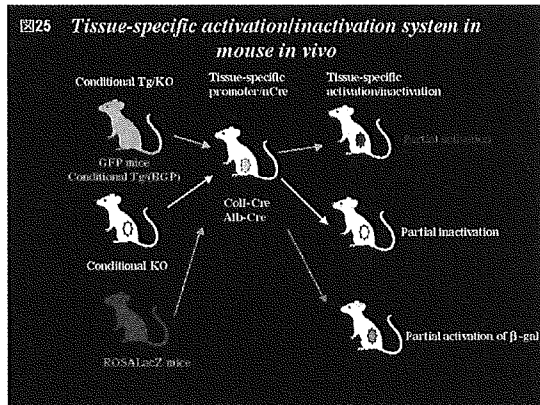
ビタミンKに関連する骨疾患遺伝子の候補として、 γ -カルボキシラーゼのグラ化の標的蛋白であるBGPに関して、cTgマウスの作製を行った結果、数ラインのcTgマウスが得られた。BGP(Bone Gla protein: Osteocalcin)は、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に血中の骨形成の指標とされている。BGP遺伝子のKOマウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。また、BGPは名前の通りビタミンK依存性 γ -カルボキシラーゼのグラ化標的蛋白であり、プロセッシングおよびグラ化修飾を受けて本来の機能を発揮すると考えられる。最近の3次元の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ている。

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をレポータ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である(図24)。骨芽細胞系譜で発現のあるコラーゲンタイプI プロ

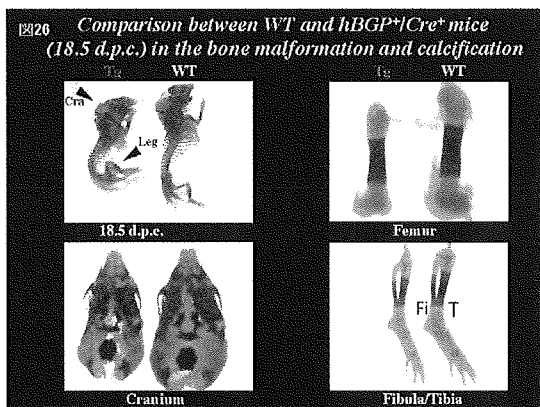




モーター支配下にCreを発現し、BGPを強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して、生体におけるBGPの骨代謝への作用について解析を行った(図25)。BGPを過剰発現した結果、マウ

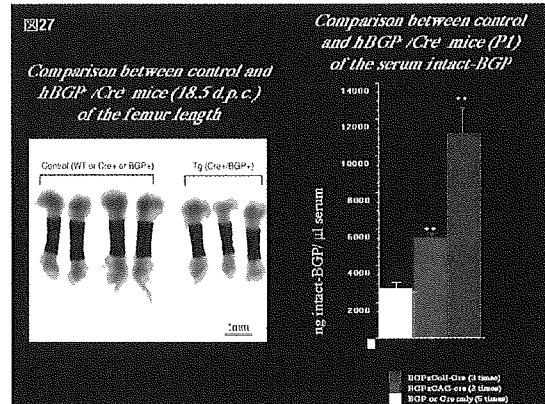


ス胎生後期から骨組織において石灰化異常が観察された、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた(図26)。上記交配により得られたBGPを過剰

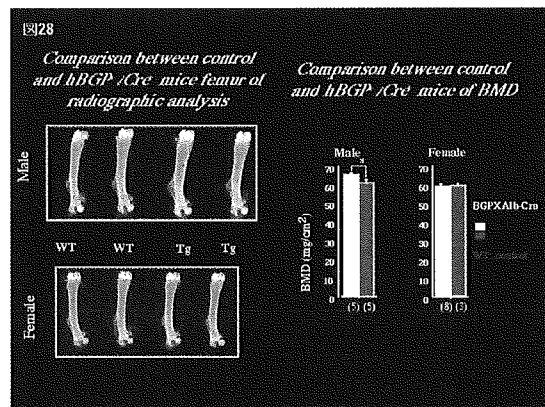


発現するマウスは、ほとんどが出産後1日目—2日目で致死となることを明らかにした。これら出産後1日目—2日目のマ

ウス胎児から血清を集め、血清中のヒトBGP量を測定した結果、これらのマウスで有意に高いintract-BGP値を示した(図27)。しかし、生後直後に致死となるため、



骨代謝における作用を検討することは、問題点として考えられた。それ故、これらの問題点を改善するために、BGPが血中分泌型蛋白であることに着目し、肝臓特異的に遺伝子を発現可能なアルブミンプロモーター支配下にCreを発現するTgマウスと交配することにより、成熟マウス個体を得ることが可能であった。現在、これらのマウスを利用して、血中ヒトBGP量と骨代謝作用の解析に着手し始めた。個体数と再現性の観点からさらに検討する必要があるが、骨密度に有意差が認められた(図28)。

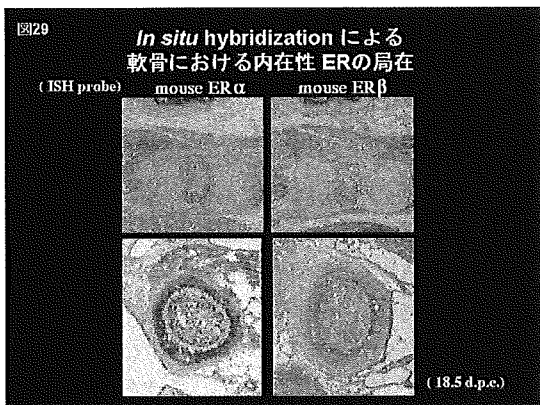


2.ER α およびER β のシグナルと変形性関節症

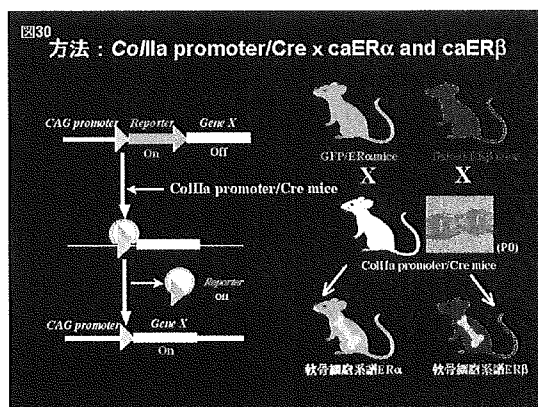
エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨代謝における作用については、選択的にER α またはER β シグナルをGain of functionすることが可能な、cTgマウス

の作製を行い、骨組織で ER α または ER β を過剰発現可能な系を確立した。変形性関節症は、閉経後女性において多く発症しエストロゲン欠乏との関与が推測されているが、その病態メカニズムは未だ明確ではない。それ故、本年度は特に、エストロゲンシグナルと軟骨作用および変形性関節症との関係について、その病態メカニズムの解明を目指すテーマに焦点を絞って研究を遂行した。多くの変形性関節症を呈するマウスモデルは、II型コラーゲンの変異が原因で起こることが知られている。

第Iに、軟骨とエストロゲンシグナルの作用について検討した。マウスの内在性のER α およびER β は、発生初期の肥大軟骨で発現していることを見出した(図29)。エストロゲンの作用としては、性成



熟期や二次性徴段階の骨の成長や骨端線閉鎖に生理的な作用があると想定される。本研究では、軟骨、特にタイプIIコラーゲンとエストロゲンシグナルの作用について検討するために、コラーゲンタイプII (ColII) -Cre マウスとcTg マウスの交配を行った(図30)。現在まだ統計的処理が可能な数ではないが、独立したTgマウスラインから、同じ成長不全を伴う表現型が得られていることより、骨長の制御や骨の成長に作用していることは明らかと考えられる。また、骨組織での表現型の解析を行った結果、3週齢幼若マウスの軟骨成長盤での短縮が観察され、骨端線閉鎖(軟骨成長盤の消失)と骨長への作用の



可能性が示唆された。さらに、大腿骨と頸骨の関節腔の滑膜領域において解析を進めている。

D. 考察

(1) 骨における IGF シグナル経路と SNP

インスリン様成長因子 (Insulin like growth factor: IGF) は骨代謝において重要な役割を果たす。IGF は IGF1 ならびに IGF2 の2種類のサブタイプが存在する。特に IGF1 は加齢においてその血中レベルが低下することや、閉経後女性において骨量と血中の IGF1 レベルが相関することからも、加齢に伴う骨粗鬆症との関連が示唆されてきた。当研究室では、既に IGF1 の遺伝子多型が閉経後女性の骨量と相関することを報告している (Calcif Tissue Int 63: 306-311, 1998)。IGF1R は IGF の受容体として中心的な役割を果たすことが知られている。特に骨代謝においては、骨芽細胞特異的な過剰発現マウスでは骨量が増加し、骨芽細胞特異的なノックアウトマウスでは骨量が劇的に減少することから、骨芽細胞における骨形成を介して IGF1R は骨量を制御する因子であることが示唆されてきた。本研究では、IGF1R の 5'上流域に存在する一塩基置換遺伝子多型性 (SNP) が骨量と相関していることを見出した。このことにより IGF1R 遺伝子多型は閉経後女性の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示された。

興味深いことに、この SNP は血清総コ