

レステロール値とも相関した。IGF1 は骨ばかりでなく肝臓から大量に産生され、血清コレステロール値を低下させる作用があることが知られている。これらのデータやモデルマウスにおける骨の表現型をあわせ考えると、本研究において骨量が高い IGF1R の遺伝子群(AA+AG群)は、同時に血清総コレステロール値が有意に低いことから、AA+AG 群は IGF1-IGF1R シグナルが亢進している可能性がある。本 SNP は IGF1R 遺伝子の 2209bp5' 上流にあることから、今後、IGF1R のプロモーター解析を行い、本 SNP が IGF1R の機能に与える影響に関して検討を加える必要があると考える。

本 SNP は血清総コレステロールと骨量を同時に規定する遺伝子である可能性があることから、今後、高脂血症や動脈硬化を有する患者群などを対象とした新たな探索が望まれる。

(2) 骨軟骨における NR11 サブファミリーの発現と骨量との関連

Vitamin D receptor(VDR: NR111)、steroid and xenobiotic receptor(SXR、NR112)、constitutive androstane receptor(CAR: NR113) の 3 種類は、核内受容体のなかでも NR11 サブファミリーを構成する。VDR はビタミン D シグナルを媒介し骨代謝に大きく関与するばかりでなく、そのヒト遺伝子多型が骨密度と関連することが以前より報告されてきた。同じファミリーに属する SXR や CAR に関しては肝臓に高発現し薬物代謝や脂質ならびに胆汁酸代謝における報告がなされている。しかしながら SXR や CAR による骨代謝における役割に関しては、未だ十分な理解がなされていない。最近、SXR は骨芽細胞においてビタミン K に対する受容体として機能し、ビタミン K による骨芽細胞の分化マーカーの転写制御に関わることを報告した(J Biol Chem 278: 43919-43927, 2003)。従って、SXR においては VDR 同様にその遺伝子多型がヒト骨密

度に影響をもたらす可能性がある。CAR に関しては骨組織における発現の検討および骨代謝との関連の報告はなされていない。本検討において、我々は骨芽細胞での SXR ならびに CAR 遺伝子がラット骨芽細胞、ヒト骨芽細胞ならびにヒト軟骨細胞において発現することが RT-PCR の検討により明らかにされた。さらにヒト SXR 遺伝子ならびに CAR 遺伝子における SNPs が骨量と相関することも同時に見出した。

従って、SXR ならびに CAR 遺伝子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。その一方で、SXR や CAR を介したシグナルが骨芽細胞をはじめとした骨代謝においてどのように機能しているかは未だ不明の部分が多くさらなる検討が期待される。

(3) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症との関連

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。我々は今までに、LRP5 の SNP と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は腰椎骨密度と有意に相関することを発見した(Urano et al., J Bone Miner Metab, 2004)。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)が腰椎骨密度と有意に相関することも見出した(Ezura et al., Bone, *in press*)。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、他の因子につい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。そこで今回、我々は

Wnt-LRP シグナル伝達因子である 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。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の一つである。近年 Wnt10B 遺伝子のトランスジェニックマウスにおいて骨量増加を示し、ノックアウトマウスでは骨量減少を示すことが報告されている。このマウスのデータと今回の我々の遺伝子多型での解析から、多数存在する Wnt-LRP シグナル制御因子の中で Wnt10B-LRP5 経路が骨形成においては他の Wnt シグナルでは代償できない重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

前述したように、我々は LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示してきた。その一方、中国や韓国では LRP5 のエクソン 2 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)の大腿骨頸部における骨密度との相関が報告されている。我々は今回この SNP に関して、本研究において検討したところ、腰椎骨密度との有意な相関は見出されなかった。その一方で、本研究においてこの Q89R の SNP に関して変形性脊椎症におけるパラメータ(骨棘形成、椎間板狭小、終板硬化)との相関を検討したところ、骨棘形成との間に有意な相関を見出した。以上より本研究において LRP5 の遺伝子多型が骨量ばかりでなく骨棘形成に関与することを発見した。従って LRP5 は骨芽細胞の増殖や分化制御ばかりでなく、軟骨の変成にも関与することが示唆された。さらに我々は Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである WISP1 と変形性脊椎症におけるパラメータとの相関を検討したところ、終板硬化との間に有意な相関を見出した。

以上より、Wnt-LRP5 シグナル伝達因子は脊椎変形を規定する遺伝子であることが示唆された。LRP5 ならびにその下流シグナルである WISP1 が脊柱変形に

果たす役割を探求することで、新たな変形性脊椎症における遺伝子マーカーや治療薬の応用や開発が期待される。

(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

本研究はヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2 をモデルとして、ヒトゲノム情報に基づくステロイドホルモン応答エレメント(HRE)の解析と実験的検討の両面から、新しいグルココルチコイド(GC)標的遺伝子を同定する試みである。理論的に機能的 HRE であることが最も期待される遺伝子近位 5'領域にある 26 個の HRE (5'HRE)について、グルココルチコイド受容体(GR)結合性を検討し、最も GR 結合性が強かった 5'HRE 近傍遺伝子である Q9C0D7 遺伝子発現において、GC 応答性を認めた。本研究に先立ち、ヒト前立腺癌細胞 LNCaP における X 染色体上の完全マッチコンセンサスのアンドロゲン応答エレメント(ARE)21 個を解析したところ、8 個において PSA 遺伝子の近位プロモーター領域の ARE 部位より強いアンドロゲン受容体(AR)結合能があり、これら AR 結合能を有する完全マッチ ARE の近傍の 3 つの遺伝子領域において、アンドロゲン応答性発現が認められた。ARE の解析結果と比較して、本研究における機能的 5'HRE の頻度が特に高いとは言えないものの、ゲノム上のコンセンサス HRE に近い配列がステロイドホルモン応答エレメントとなる可能性は、コンセンサス HRE を含まないゲノム上の他の部位よりもはるかに高いことが予想される。

また、SaOS2 細胞における GC 応答性遺伝子発現について、Q9C0D7 遺伝子以外にも完全マッチ 5'HRE の近傍で 2 倍以上の GC 依存性発現上昇が認められた遺伝子が 4 つ同定された (data not shown)。これら 4 遺伝子に対応する 5'HRE の GR

結合能は強くなかったものの、これら遺伝子の他の転写調節領域において、機能的 HRE 部位が存在し、これら遺伝子が GC 標的遺伝子である可能性も考えられる。例えば、エストロゲン応答遺伝子として知られている遺伝子の転写調節領域についてゲノム検索した報告によれば、転写開始点の近位と遠位プロモーター領域の両方に ERE をもつ遺伝子が多数見つかっている。

HRE は GR のみならず、AR、プロゲステロン受容体(PR)、ミネラルコルチコイド受容体(MR)を共通に認識する応答エレメントであり、異なる細胞系および受容体系において様々に機能する可能性が考えられ、また今回の GR 解析のコントロールに用いた FKBP51 および ENACαが少なくとも PR に対しても標的遺伝子となることから、共通の HRE が複数の受容体系において機能する可能性が考えられる。本研究で解析した 26 カ所の 5'HRE のうち、ヒト前立腺癌細胞 DU145 においては HRE15 および HRE20 が有意なホルモン依存性 GR 結合能を示したが、SaOS2 細胞で結合性が強かった HRE16 では有意なホルモン依存性 GR 結合能は示さなかった。したがって、同じ GR であっても、異なる臓器系においては標的遺伝子が異なることが予想される。また、HRE20 は SaOS2 細胞においてホルモン依存性 GR 結合能は示さなかったが、AR 陽性 LNCaP 細胞、PR 陽性乳癌細胞 T47D、GR 陽性 DU145 細胞においていずれも有意な受容体結合能を示しており、近傍遺伝子として検討した CV106 はこれら細胞においてホルモン標的遺伝子としては同定されなかったが、5'HRE の近傍に他の標的遺伝子あるいは noncoding RNA が存在する可能性も考えられる。

SaOS2 細胞において、GC 応答性が認められた Q9C0D7 遺伝子の生物学的意義は現時点では不明であるが、CCCH タイプ Zinc フィンガー蛋白の 1 種をコードす

ることが考えられ、RNA 転写機構への関与などが予想される。

今後、既知遺伝子上および近位 3'側に存在するコンセンサス HRE について検討を行うことにより、骨芽細胞系における新規ステロイドホルモン一次標的遺伝子の同定されることが期待され、それら遺伝子の発現調節を行うことにより骨芽細胞系の機能が明らかになり、骨粗鬆症および変形性関節症疾患の病態と結びつくと考えられる。

(5) 骨におけるビタミン K /SXR 応答経路の解析

SXR 標的遺伝子として、CD14、TSK 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 の標的分子であると考えられた。siRNA を用いて SXR をロックダウンした結果、遺伝子のリガンド応答性が減少したことから、これら遺伝子が SXR を介して発現調節されることが示された。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。ヒト TSK は最近 chicken tsukushi (C-TSK) の ortholog として同定された細胞外マトリクス蛋白質で、TSK とクラスターを形成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。biglycan 欠損マウスや biglycan/decorin 両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おり、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。また、MATN2 も細胞外マトリクス蛋白質の一つで骨芽細胞で産生される I 型コラーゲンと結合することが報告されている。Matrilin ファミリーは、軟骨においてコラーゲンや biglycan などとの結合が報告されている

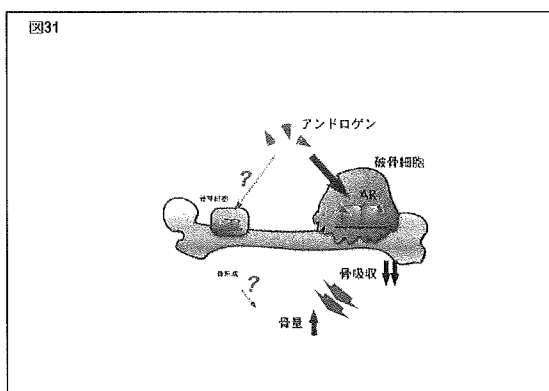
ことから、MATN2 が TSK と結合して細胞外基質形成に関与する可能性が考えられた。そこで、両者の細胞局在と結合性を検討した結果、TSK と MATN2 は細胞膜周辺に局在し、互いに結合することが示された。これらの結果から、骨芽細胞により産生される分子としては、TSK と MATN2 が複合体を形成し、コラーゲンと結合することにより、細胞外基質の形成に関与する可能性が示された。また、MG-63 において MK-4 添加によりコラーゲン蓄積が促進され、TSK をノックダウンすることでその作用が減少したことから、TSK がコラーゲン蓄積に関与することが示された。これらの結果から、ビタミン K の作用として、SXR を介して細胞外マトリクス蛋白質の発現を促進し、それに伴いコラーゲンなど骨基質の形成を促進する新たな作用メカニズムが示唆され、ビタミン K による骨密度の上昇を伴わない骨折率の低下には、これら細胞外マトリクス蛋白質が関与する可能性が示された。

(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

本研究では破骨細胞特異的ARKO雄マウスを作製する事で、生体レベルにおける雄性破骨細胞内AR機能について解析を試みた。

現在、骨吸収機能をもつ唯一の細胞種が破骨細胞であると考えられている。in vitroの実験系を通じてこれまで多くの骨吸収制御因子が報告されているが、培養破骨細胞を用いた検証には限界が有り、それら因子が破骨細胞で特異的に機能しているか証明する手段が存在しなかった。本研究で樹立したCtsk-Creノックインマウスを用いた成熟破骨細胞特異的な遺伝子欠損が可能となった事で、今後、これら因子群の詳細な作用メカニズムの解析が可能となった(図31)。

現在まで破骨細胞での明確な AR 発現



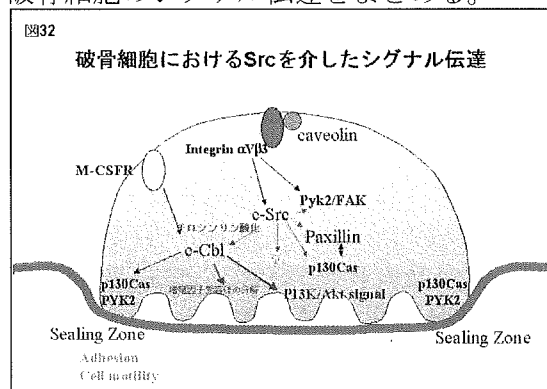
報告がないにも関わらず、実際に破骨細胞特異的 ARKO マウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。この結果は破骨細胞機能亢進による直接の結果であり、破骨細胞内 AR が破骨細胞機能を直接抑制する事を示していると考えられた。

(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

元来、Src キナーゼはレトロウイルスの中で恒常的に活性化した形になることで腫瘍性異常増殖の原因分子として同定されたもので、正常の Src 蛋白質は細胞の秩序の取れた増殖や運動を維持する働きがあると考えている。正常細胞では、細胞内の限られた場所で、限られた時間の間活性化する事で細胞を正しくコントロールするので、必要がない状態では非活性型として存在している。活性が強く遷延する場合には腫瘍のような異常増殖につながるし、一方活性或いは蛋白質それ自体が無くなった場合にも、その臓器に他の Src ファミリーの相補的作用がなければ各種の病態を引き起こしうる。

c-Src のノックアウトマウスが破骨細胞の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はいない。

Src キナーゼの基質 c-Cbl や Cas、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。図 32 にこれまでに分かっている Src を介した破骨細胞のシグナル伝達をまとめる。



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、我々の開発してきた 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。ここまでのところ試料の大量調整の技術的問題もあり、実際の破骨細胞や軟骨細胞株でなく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でしかできなかった事が残念な点であり、早急に破骨細胞・軟骨細胞の機能における役割の確認を行う必要がある。

(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

ビタミンKおよびエストロゲン受容体に関連した遺伝子に関して、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がでることが想定され、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、cTg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。したがって、閉経後ならびに老人性骨粗鬆症・変形性関節症疾患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・組織特異的な関連遺伝子群の Gain/Loss 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。すなわち、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。さらにこれらの研究を進展させるためには、マウス個体において、より厳密に組換え酵素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に関しては、疾患モデルマウスの作製、その受容体の同定やグラ化標的蛋白の同定・解析を中心に研究を進めることにより、骨

代謝におけるビタミンKの必要性やその作用機序を明確にすることにより、老人性骨粗鬆症の新しい作用メカニズムや創薬および治療法の開発の鍵と考えられる。

エストロゲンシグナルに関しては、閉経後女性において変形性関節症が多く発症することから、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。多くの変形性関節症のモデルマウスでは、コラーゲン II 型の変異、細胞外マトリックスの変異、およびコラーゲン分子の分解に関与する因子により引き起こされることが報告されている。つまり、変形性関節症の 1 つの原因として膝関節等においてコラーゲン分子および細胞外マトリックスの枯渇や異常により引き起こされると考えられる。それ故、軟骨におけるエストロゲンシグナルの作用機序の解明、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。また、ヒトと違い齧歯類では骨端線閉鎖はほとんど起こらないが、未成熟個体においてエストロゲンを付加すると、未成熟の骨において骨端線閉鎖が亢進することが報告されている。リガンド非依存的に活性型エストロゲンレセプターを過剰発現するトランスジェニックマウスを使用して、分子レベルで直接エストロゲンシグナルが軟骨に直接作用することが考えられた。本研究により、エストロゲンシグナルの軟骨作用に関して、二次性徴にともなう骨長の制御、骨端線閉鎖、および変形性関節症に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

POMC、LRP5、WISP1、WNT10B をはじめとして複数の新しい骨粗鬆症・変形性関節症関連遺伝子の 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、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、破骨細胞特異的なノックアウト動物を開発して、アンドロゲン受容体の骨代謝における極めて新しい役割を示した。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、骨肉腫細胞における興味深いシグナル伝達を明らかにした。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、骨と軟骨における病態を明らかにした。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ならびに変形性関節症の予防、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. 発表

1) 論文発表

1. Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoyxygenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 23, 226-230, 2005.
2. 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* 65, 3700-3706, 2005.
3. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S: Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 6148-6154, 2005.
 4. Sudo Y, Ezura Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Emi M: Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the pro-opiomelanocortin gene (POMC) with low bone mineral density in adult women. *J Hum Genet* 50, 235-240, 2005.
 5. Sakuma M, Akahira JI, Suzuki T, Inoue S, Ito K, Moriya T, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N: Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 99, 664-670, 2005.
 6. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalancia 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.
 7. Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1950-1956, 2005.
 8. Ito K, Suzuki T, Akahira J, Sakuma M, Saitou S, Okamoto S, Niikura H, Okamura K, yaegashi N, Sasano H, Inoue S: 14-3-3 sigma in endometrial cancer – A possible prognostic marker in early stage cancer -. *Clin Cancer Res* 11, 7384-7391, 2005.
 9. 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. (2005) Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function. (Edited by Iuchi S, Kuldell N), Landes Bioscience, Georgetown, (pp 106-113)
 10. 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* 24, 4754-4764, 2005.
 11. Aoki T, Imamura H, Makuuchi M, Inoue S: Immunohistochemical detection of EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma. 2005, Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas Volume 3. Molecular genetics, liver carcinoma, and pancreatic carcinoma (Edited by M.A. Hayat) Elsevier Academic Press, New Jersey, (pp261-268)
 12. Horie-Inoue K, Takayama K, Bono H, Ouchi Y, Okazaki Y, Inoue S: Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 99-106, 2006.
 13. Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* (in press)
 14. Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T,

- Inoue S, Shiraki M, Emi M: Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone* (in press)
15. Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine* (in press)
 16. Masuhiro Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'Malley BW, Kato S: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 8126-8131, 2005.
 17. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Masuda H, Kobayashi M, Kawamura K, Kamiya A, Ando J: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine* 12, 133-137, 2006.
 18. Fujiki R, Kim M, Sasaki Y, Yoshimura K, Kitagawa H, Kato S: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J* 24, 3881-3894, 2005.
 19. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and phosphorus *in vivo*. *J Biol Chem* 280, 2543-2549, 2005.
 20. Yamamoto K, Uchida E, Urushino N, Sakaki T, Kagawa N, Sawada N, Kamakura M, Kato S, Inouye K, Yamada S: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D₃ whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J Biol Chem* 280, 30511-30516, 2005.
 21. Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, Kato S, Kanayama H, Miyamoto K: Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J* 390, 325-331, 2005.
 22. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 138, 105-110, 2005.
 23. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 224-229, 2005.
 24. Miyake I, Hakomori Y, Misu Y, Nakadate H, Matsuura N, Sakamoto M, Sakai R: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 3206-3215, 2005.
 25. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R: Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol* 167, 213-222, 2005.
 26. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori N: Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J Neurosci* 25, 1826-1835, 2005.
 27. Seo S, Asai T, Saito T, Suzuki T, Morishita Y, Nakamoto T, Ichikawa M, Yamamoto G, Kawazu M, Yamagata T, Sakai R, Mitani K, Ogawa S, Kurokawa

- M, Chiba S, Hirai H: Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol* 175, 3492-3501, 2005.
28. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J* 24, 3700-3711, 2005.
29. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J Biol Chem* 280, 42375-42382, 2005.
30. Imazawa Y, Hisatake K, Mitsuzawa H, Matsumoto M, Tsukui T, Nakagawa K, Nakadai T, Shimada M, Ishihama A, Nogi Y. The fission yeast protein Ker1p is an ortholog of RNA polymerase I subunit A14 in *Saccharomyces cerevisiae* and is required for stable association of Rrn3p and RPA21 in RNA polymerase I. *J Biol Chem* 280: 11467-11474, 2005.
- 2) 学会発表
【国際学会】
1. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: In silico genomic approach of consensus androgen response elements combined with experimental verification enable to identify novel hormone-responsive genes in prostate cancer cells. Keystone Symposia; Hormonal regulation of tumorigenesis, Monterey, CA, USA (2005.2.19-24)
2. Horie-Inoue K, Takayama K, Inoue S: Identification of novel hormone-responsive genes through the combination of bioinformatics and functional analysis in cells derived from different tissues. Tissue-selective Nuclear Receptors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Breckenridge, CO, USA (2005.9.18-22)
3. Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spine osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
4. Inoue S: [Luncheon Seminar] Novel mechanism of vitamin K action via transcriptional regulation. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, Awaji, Japan, (20005. 11. 7-11)
5. Kato S: Co-regulator complexes for VDR. XXXV International Congress of Physiological Sciences, San Diego, USA (2005. 3.31-4.5)
6. Kato S: The function of steroid receptors in bone. The 2nd Advanced Bone and Joint Symposium, Tokyo, Japan (2005.6.13-14)
7. Takada I, Suzawa M, Takezawa S, Yogiashi Y, Mezaki Y, Igarashi M, Kato S: Differentiation switch of mesenchymal stem cells through suppression of PPARgamma function by NLK, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
8. Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y, Azuma Y, Yoshimura K, Matsumoto T, Fukuda T, Ochiai E, Metzger D, Chambon P, Sato T, Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
9. Kato S: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through

- chromatin remodeling/modification complexes, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
10. Fujiki R, Kim MS, Sasaki Y, Kitagawa H, Kato S: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression on 1α -hydroxylase gene promoter is mediated by chromatin remodeling through WINAC, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
 11. Kato S: The role of Williams Syndrome Transcription Factor (WSTF) in gene regulation and chromatin remodeling through vitamin D receptor, Workshop "Epigenetic Mechanisms in Development and Disease", Baeza, Spain (2005.11.13-16)
- 【国内学会】
1. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡: ビタミン K は核内受容体 SXR を介し転写レベルで応答遺伝子の発現を制御する (2005.5.26-27) 日本ビタミン学会第 57 回大会 (三重)
 2. 井上聡: [シンポジウム] 骨粗鬆症と未病ーゲノムからのアプローチ (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 3. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡: 脂肪細胞分化制御因子における遺伝子多型が骨量に与える影響 (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 4. 浦野友彦、大内尉義、井上聡: 前立腺肥大と前立腺癌における $14\text{-}3\text{-}3\sigma$ の発現に関する検討 (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 5. 堀江公仁子、高山賢一、大内尉義、井上聡: 前立腺癌細胞株を用いた新規アンドロゲン応答配列の機能解析 (2005.7.1-3) 第 78 回日本内分泌学会学術総会 (東京)
 6. 鈴木貴、三木康宏、森谷卓也、石田孝宣、井上聡、大内憲明、笹野公伸: 乳癌組織における estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) の発現 (2005.7.1-3) 第 78 回日本内分泌学会学術総会 (東京)
 7. 井上聡: [シンポジウム] 脂質代謝に関わる遺伝子の変異・多型と骨病変 (2005.7.21-23) 第 23 回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
 8. 今澤由紀子、津久井通、井上聡: 選択的エストロゲンシグナルの骨代謝における作用: II 型コラーゲンプロモーターを利用した $\text{ER}\alpha$ および $\text{ER}\beta$ コンディショナルトランスジェニックマウスの解析 (2005.7.21-23) 第 23 回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
 9. 井上聡: [シンポジウム] 癌における性ホルモン標的遺伝子の探索とその役割 (2005.9.16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 10. 浦野友彦、大内尉義、井上聡: [シンポジウム] 癌において細胞周期調節に関わるホルモン応答性ユビキチンリガーゼ (2005.9.16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 11. 浦野友彦、白木正孝、白井貴彦、大内尉義、井上聡: ステロイド X 受容体 (SXR) ならびに CAR の遺伝子多型が骨量に与える影響 (2005.10.13-5) 第 7 回日本骨粗鬆症学会 (大阪)
 12. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T: Analysis of the induction of glutaredoxin 1 by estradiol. 第 78 回日本生化学会学術総会 (神戸)
 13. Wei J, Fujita M, Inoue S, Masliah E, Hashimoto M: Beta-synuclein mutants (V70M, P123H) self-aggregate and stimulate alpha-synuclein aggregation *in vitro*. 第 78 回日本生化学会学術総会 (神戸)
 14. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、栗原真紀、堀江公仁子、久武幸司、禾

- 泰寿、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 ER α ・ER β の解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
15. 沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、山形薫、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明：クロマチン構造を介したエクダインレセプター転写制御機構の解明に関する研究 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 16. 目崎喜弘、神津円、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 17. 大矢博之、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明：クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析(2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 18. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 19. 大竹史明、馬場敦史、藤井義明、加藤茂明：ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 20. 藤木亮次、金美善、佐々木康匡、吉村公宏、北川浩史、加藤茂明：新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミン D レセプター転写抑制機構の解明 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 21. 岡田麻衣子、竹沢慎一郎、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：ER α の細胞周期依存的な ER α の機能解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 22. 盛真友、松本高広、秋本千央、加藤茂明：ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 23. 吉村公宏、北川浩史、竹沢慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田亨、山本陽子、渡辺智之、中村貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明：WSTF (Williams syndrome transcription factor)は移動後の神経堤細胞と心臓の発生に必須である (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
 24. 堺隆一、上北尚正、田中正光、浅輪珠恵：Cas ドッキング蛋白質の C 末端領域による腫瘍特性の制御 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 25. 三宅泉、上北尚正、堺隆一：神経芽腫における野生型 ShcC の腫瘍抑制効果の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 26. 上北尚正、堺隆一：がん細胞の足場非依存性増殖における Src 型キナーゼ及び、その基質群を介した新規シグナル伝達機構の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 27. 田中正光、鎌田礼子、佐々木一樹、堺隆一：ephrin-B1 の shedding による細胞外ドメインの分泌機序の解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 28. 二見仁康、梶村直子、堺隆一：RNA 干渉による活性化 Ret 蛋白質の機能解析 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
 29. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、

井上聡：オステオカルシンを異所性に発現させた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 および石灰化作用の解析
(2006.2.18) 第9回 Vitamin K & Aging
研究会（東京）

分担研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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—

分担研究者 加藤 茂明
東京大学分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野教授

【研究要旨】

男性ホルモン（アンドロゲン）は主要な骨代謝調節因子の一つであり、強力な骨量維持作用をもつ。しかしながらその作用機構は未だに不明である。つまり骨組織に対して直接作用するのかどうか、直接作用である場合、破骨細胞・骨芽細胞どちらに対する作用なのか不明確である。特に破骨細胞に対する直接作用の存在については、破骨細胞での性ステロイドホルモン受容体の検出が困難であるために懐疑的である。さらに一般的に用いられている培養破骨細胞の系では結果の再現性に劣るため、直接作用の存在を証明する事は不可能である。そこで破骨細胞特異的なアンドロゲンレセプター遺伝子欠損マウスを新たに作出したところ、著しい骨量低下を認めた。以上の結果から、破骨細胞内 AR を介した骨吸収抑制機構の存在が明らかとなった。

A. 研究目的

骨基質はコラーゲンを主成分とする基質にヒドロキシアパタイトが沈着した硬組織であるにも関わらず、内外からの刺激に応じて常に活発に再構築（骨リモデリング）を繰り返している。この過程は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の正負の調節の上に成立するため、正常な骨組織の維持には骨リモデリングのバランス維持が重要である。骨リモデリングには数多くの代謝制御因子が知られているが、なかでも性ステロイドホルモンは主要制御因子として知られている。実際、近年顕在化している閉経後骨粗鬆症は、女性ホルモン（エストロゲン）欠乏によって引き起こされることが広く知られている。一方、雄性骨組織は雌性に比較して骨長・骨量でも優位であるため、骨粗鬆症や骨折の頻度が少な

い。これは男性ホルモン（アンドロゲン）の同化作用による骨増強効果と考えられている。

アンドロゲンの生理作用はリガンド依存性転写制御因子であるアンドロゲン受容体（AR）を介した標的遺伝子の転写制御により発揮されると考えられている。実際に当研究室の佐藤らによって作製されたAR遺伝子欠損（ARKO）マウスでは顕著な骨量低下が雄のみで観察された。しかしながら、ARKOマウスの解析で明らかとなったARを介した骨増強作用が、骨組織内の骨芽細胞または破骨細胞内の機能であるのか、あるいは骨組織以外の器官からの間接的な機能なのかが不明であった。加えて、骨組織でのAR発現パターンは骨芽細胞での発現が報告されてきたが、破骨細胞については検出限界以下である。よって破骨細胞はARの非標

的細胞と考えられてきた。そのため骨組織に対するアンドロゲンの直接的な作用は骨芽細胞内ARを介したものと考えられてはいるものの、*in vitro*培養系の観察であり、AR機能を個体レベルで解析した報告はない。更に、*in vitro*初代破骨細胞培養系では性ステロイドホルモン作用を直接解析した例に乏しく、破骨細胞内の性ステロイドホルモン受容体機能は不明であった。

そこで本研究では破骨細胞内でのAR高次機能解明を目的に、Cre/loxPシステムを利用した破骨細胞特異的AR遺伝子破壊法を確立し、その骨組織変異を解析した。

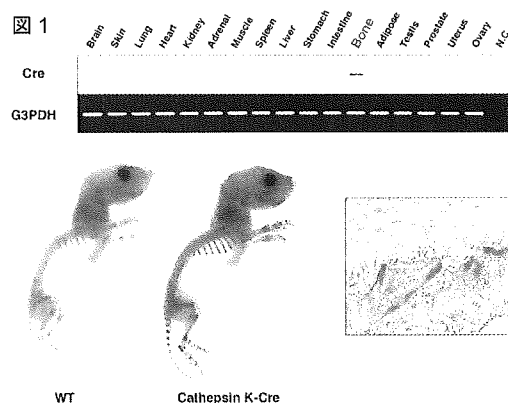
B. 研究方法

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。

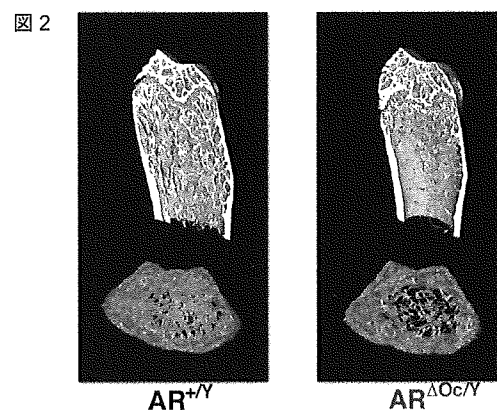
C. 研究結果

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。



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 Δ Oc/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 Δ Oc/Yマウスでは大腿骨遠位の大幅な海綿骨



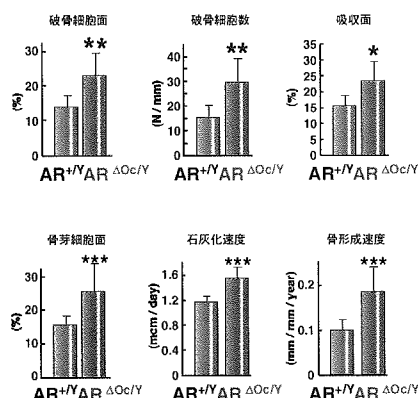
減少が観察された。

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。

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 3



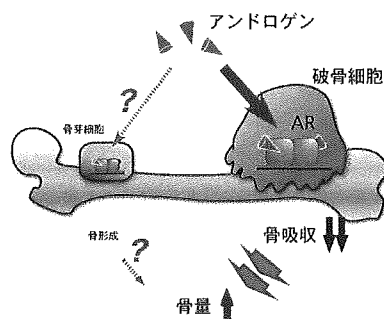
D. 考察

本研究では破骨細胞特異的ARKO雄マウスを作製する事で、生体レベルにおける雄性破骨細胞内AR機能について解析を試みた。

現在、骨吸収機能をもつ唯一の細胞種が破骨細胞であると考えられている。in vitroの実験系を通じてこれまで多くの骨吸収制御因子が報告されているが、培養破骨細胞を用いた検証には限界が有り、それら因子が破骨細胞で特異的に機能しているか証明する手段が存在しなかった。本研究で樹立したCtsk-Creノックインマウスを用いた成熟破骨細胞特異的な遺伝子欠損が可能となった事で、今後、これら因子群の詳細な作用メカニズムの解析が可能となった。

現在まで破骨細胞での明確なAR発現報告がないにも関わらず、実際に破骨細

図 4



胞特異的ARKOマウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。この結果は破骨細胞機能亢進による直接の結果であり、破骨細胞内ARが破骨細胞機能を直接抑制する事を示していると考えられた。

E. 結論

本研究は破骨細胞特異的 ARKO マウスの作製および解析により、破骨細胞内 AR が骨代謝制御に直接関与している事を明らかにし、骨組織に対する性ステロイドホルモン作用メカニズムの一端を解明した。

F. 発表

1. 論文発表

- Oishi H, Kitagawa H, Wada O, Takezawa S, Tora L, Kouzu-Fujita M, Takada I, Yano T, Yanagisawa J, Kato S: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J Biol Chem* 281, 20-26, 2006.
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Masuda H, Kobayashi M, Kawamura K, Kamiya A, Ando J: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine* 12, 133-137, 2006.
- Masuhira Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'Malley BW, Kato S: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 8126-8131, 2005.
- Fujiki R, Kim M, Sasaki Y, Yoshimura K, Kitagawa H, Kato S: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated

- histones. *EMBO J* 24, 3881-3894, 2005.
5. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 224-229, 2005.
 6. Ogawa S, Oishi H, Mezaki Y, Kouzu-Fujita M, Matsuyama R, Nakagomi M, Mori E, Murayama E, Nagasawa H, Kitagawa H, Yanagisawa J, Kato S: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor associates with Hsc70. *Genes to Cells* 10, 1095-1102, 2005.
 7. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 138, 105-110, 2005.
 8. Furutani T, Takeyama K, Koutoku H, Ito S, Taniguchi N., Suzuki E, Kudoh M, Shibasaki M, Shikama H, Kato S: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J Pharm Experim Therapeutics* 315, 545-552, 2005.
 9. Unno A, Takada I, Takezawa S, Oishi H, Baba A, Shimizu T, Tokita A, Yanagisawa J, Kato S: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 933-938, 2005.
 10. Kambayashi H, Odake Y, Takada K, Funasaka Y, Ichihashi M, Kato S: N-retinoyl-D-glucosamine, a new retinoic acid agonist, mediates topical retinoid efficacy with no irritation on photoaged skin. *Br J Dermatol* 153, 30-36, 2005.
 11. Kato S, Sato T, Watanabe T, Takemasa S, Masuhiro Y, Ohtake F, Matsumoto T: Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 (Supple. 7), 4-9, 2005.
 12. Furutani T, Takeyama K, Koutoku H, Ito S, Taniguchi N, Suzuki E, Kudoh M, Shibasaki M, Shikama H, Kato S: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 2236-2239, 2005.
 2. Takada I, Suzawa M, Kato S: Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Pharmcol Sci* 97, 184-189, 2005.
 14. Kato S, Fujiki R, Kitagawa H: Chapter 17, Promoter targeting of vitamin D receptor through a chromatin remodeling complex. In Vitamin D, 2nd Edition, ed. by Feldman D, Pike JW, Glorieux, FH, Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp. 305-312, 2005.
 15. Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T: 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 429-440, 2005.
 16. Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnoud R, Murer H, Biber J: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1 α -OHase deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C429-C434, 2005.
 17. Meindl S, Rot A, Hoetzenecker W, Kato S, Cross S, Elbe-Burger A: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br J Dermatol* 152, 231-241, 2005.
 2. Wada-Hiraike O, Yano T, Nei T, Matsumoto Y, Nagasaka K, Takizawa S, Oishi H, Arimoto T, Nakagawa S, Yasugi

- T, Kato S, Taketani Y: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator or oestrogen receptor a. *Br J Cancer* 92, 2286-2291, 2005.
19. Fan W, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* 54, 1000-1008, 2005.
 20. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus *in vivo*. *J Biol Chem* 280, 2543-2549, 2005.
 21. Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S, Matsumoto T: Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem* 280, 29661-29666, 2005.
 22. Bando T, Sekine K, Kobayashi S, Watabe MA, Rump A, Tanaka M, Suda Y, Kato S, Morikawa Y, Manabe T, Miyajima A: Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol Cell Biol* 25, 4166-4175, 2005.
 23. Nakagawa K, Sasaki Y, Kato S, Kubodera N, Okano T: 22-Oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 1044-1054, 2005.
 24. Kallay E, Bises G, Bajna E, Bieglmayer C, Gerdenitsch W, Steffan I, Kato S, Armbrrecht HJ, Cross HS: Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases-a possible approach for tumor prevention. *Carcinogenesis* 26, 1581-1589, 2005.
 25. Yamamoto K, Uchida E, Urushino N, Sakaki T, Kagawa N, Sawada N, Kamakura M, Kato S, Inouye K, Yamada S: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D₃ whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J Biol Chem* 280, 30511-30516, 2005.
 26. Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, Kato S, Kanayama H, Miyamoto K: Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J* 390, 325-331, 2005.
2. 学会発表
【国際学会】
1. Kato S: Co-regulator complexes for VDR. XXXV International Congress of Physiological Sciences, San Diego, USA (2005. 3.31-4.5)
 2. Kato S: The function of steroid receptors in bone. The 2nd Advanced Bone and Joint Symposium, Tokyo, Japan (2005.6.13-14)
 3. Takada I, Suzawa M, Takezawa S, Yogiashi Y, Mezaki Y, Igarashi M, Kato S: Differentiation switch of mesenchymal stem cells through suppression of PPAR γ function by NLK, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
 4. Nakamura T, Watanabe T, Nakamichi Y, Azuma Y, Yoshimura K, Matsumoto T, Fukuda T, Ochiai E, Metzger D, Chambon P, Sato T, Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in

osteoclasts, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)

5. Kato S: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
6. Fujiki R, Kim MS, Sasaki Y, Kitagawa H, Kato S: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression on 1α -hydroxylase gene promoter is mediated by chromatin remodeling through WINAC, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
7. Kato S: The role of Williams Syndrome Transcription Factor (WSTF) in gene regulation and chromatin remodeling through vitamin D receptor, Workshop "Epigenetic Mechanisms in Development and Disease", Baeza, Spain (2005.11.13-16)

【国内学会】

1. 沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、山形薫、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明：クロマチン構造を介したエクサイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
2. 目崎喜弘、神津円、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
3. 大矢博之、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明：クロマチンリモデリング複

合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析(2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)

4. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
5. 大竹史明、馬場敦史、藤井義明、加藤茂明：ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
6. 藤木亮次、金美善、佐々木康匡、吉村公宏、北川浩史、加藤茂明：新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミン D レセプター転写抑制機構の解明 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
7. 岡田麻衣子、竹沢慎一郎、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：ER α の細胞周期依存的な ER α の機能解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
8. 盛真友、松本高広、秋本千央、加藤茂明：ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)
9. 吉村公宏、北川浩史、竹沢慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田亨、山本陽子、渡辺智之、中村貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明：WSTF (Williams syndrome transcription factor)は移動後の神経堤細胞と心臓の発生に必須である (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)

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

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长

【研究要旨】

骨粗鬆症や変形性関節症を骨細胞系・軟骨細胞系の細胞の増殖・機能の異常としてとらえ、その異常に関わる細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることは、病態の本質的な理解のために極めて重要である。特にチロシンキナーゼである Src ファミリーの分子とその基質群は、破骨細胞においてはその分化と機能維持のために、軟骨細胞においてはインテグリンを介して細胞外基質の情報を受け取り、増殖を維持するために必要であると考えられる。本研究では Src ファミリーの活性変化や組織による基質特異性を解析することにより、骨細胞・軟骨細胞系における Src ファミリーの役割を詳細に解析し、骨粗鬆症・変形し得関節症の病因の理解を目指すとともに、Src のシグナル経路を標的とした治療への発展につながる基盤を作成する。これまでに我々は Src の活性化や Paxillin や Cas などの基質分子群のシグナルを、欠損変異体や RNAi などの手法により特異的にブロックする手法を確立した。この手法を更に押し進めることにより Src のシグナルの中で特に骨粗鬆症や変形性関節症などの疾患に結びつく作用のみを減弱するような、選択的な治療薬開発につながると思う。

A. 研究目的

骨や軟骨の代謝における生理的平衡（ホメオスタシス）は、数多くの因子群でコントロールされる複雑な機構である。骨質における骨新生と骨破壊のバランスが崩れた状態である骨粗鬆症や、関節軟骨の量的・質的異常をその一因とする変形性関節症は、まさしく加齢などの要因で増殖や機能調節のホメオスタシスが崩れた状態であり、ここにはやはりホルモンバランスやカルシウム代謝などの多くの要素が関与していることが明らかになっている。

本研究の目的は、このような骨や軟骨を形成する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、そしてそのメカニズムに基づいて有効な骨粗鬆症・変形性関節症の治療モデルを提唱することである。骨・軟骨細胞において、細胞外から働きかける刺激が、実際に細胞膜・細胞質のどのような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て、正常な代謝のバランスを取り戻すためには骨・軟骨細胞にどのようなシグナル分子を標的とした治療を行うと有効であるかを、細胞モデルを用いて説明することを目指している。

このような骨・軟骨系細胞でのシグナ