

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成19（2007）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 - 8
	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・機能解析とその診断・治療への応用

主任研究者 井上 聡
東京大学大学院医学系研究科 抗加齢医学講座客員教授

【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、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。骨疾患の治療薬の作用に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一塩基置換遺伝子多型性(SNP)を LRP5、WISP1、WNT10B、IGF1R などに複数同定し、ゲノムワイドスキャンで P 値の極めて低い SNP を明らかにした。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、グルココルチコイドにおいて新規シグナル経路、TSK、MATN2、GDF15、SC2 などの分子標的ならびに標的細胞を見出し、特にビタミン K の核内ステロイド X 受容体(SXR)を介する新しい作用メカニズムの解明は国内外の注目を集めた。さらに、破骨細胞特異的もしくは軟骨細胞特異的コンディショナル遺伝子改変動物の開発により、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ことが期待される。

B. 方法

(1) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症 (担当：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 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 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(椎間板狭小化、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する同時測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

(2) IGF-I シグナル経路と変形性関節症 (担当：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 IGF-I シグナル伝達調節因子であるヒト 1 型 IGF-I 受容体(IGF1R1)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(椎間板狭小化、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する同時測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

(3) ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症ならびに変形性関節症関連遺伝子の探索 (担当：井上)

55-83 歳の閉経後女性 253 名の血液より DNA を抽出し、遺伝子多型を決定する。調べる対象となる遺伝子は、AFFYMETRIX 社の GeneChip Mapping 100K Set に含まれる、5 万 SNP について同社 GeneChip Mapping Assay 法を用いて決定する。腰椎ならびに全身骨骨密度、胸腰椎 X 線写真から評価された変形性脊椎症の指標(椎間板狭小化、骨棘形成、終板硬化)との相関解析を行い、骨量ならびに脊椎変形を制御する候補遺伝子を選択する。本解析によって着目された候補遺伝子については対象者数を増やし、再解析を行う。

(4) 骨芽細胞系における SXR 応答遺伝子の解析 (担当：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、Flag タグ標識の SXR および VP16 活性化ドメインのカルボキシル末端を結合した Flag タグ標識の SXR (Flag-VP16C-SXR)を作製し、ヒト骨芽細胞様細胞株 MG63 にて安定発現細胞株を作製した。VP16C-SXR 安定

発現細胞(MG63/ Flag-VP16C-SXR)をリファンピシンおよびビタミン K₂(メナキノン-4 : MK-4)で刺激して、Affymetrix 社の U133A GeneChip アレイを用いてマイクロアレイ解析を行い、2 つの薬剤で共通に発現上昇した遺伝子を SXR 標的遺伝子として同定した。2 倍以上の発現上昇した 14 遺伝子のうち、tsukushi(TSK)、matrilin-2(MATN2)、CD14 antigen(CD14)についてさらに解析を行った。MG63/Flag-SXR 細胞および、その親株である MG63 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。コンフルエントになった MG63 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。MG63 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。TSK、MATN2、CD14 のプロモーター領域において、SXR 結合性をクロマチン免疫沈降法(ChIP)にて検討した。

(5) 骨芽細胞系におけるビタミン K 応答遺伝子の解析 (担当：井上)

Flag-VP16C-SXR およびベクターを安定発現させた MG63 細胞をビタミン K₂(メナキノン-4 : MK-4)で刺激し、2 細胞系で共通して発現が誘導され、かつ SXR 応答遺伝子には含まれない遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。MK-4 により発現上昇が認められた遺伝子について、親株である MG63 細胞と MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞を用いて、SXR のリガンドであるリファンピシンと MK-4 で刺激した時の mRNA の発現変化を定量的 RT-PCR により比較し、SXR の関与を検討した。また、ビタミン K の種類による効果を検討するため、Gla 化作用に必要な基本骨格である 2-メ

チル-1,4-ナフトキノンを持たないゲラニルゲラニオールと、同一の基本骨格を有するが側鎖構造の異なるビタミン K₁ および MK-4 より側鎖の長い MK-7 を用いて、同様に遺伝子の発現誘導を解析した。ビタミン K 依存性γカルボキシラーゼ (GGCX) の関与を検討するため、GGCX siRNA による発現誘導への効果を解析した。

(6) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析 (担当: 井上)

グルココルチコイド受容体(GR)は、アンドロゲン受容体(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)と共通したゲノム上のステロイドホルモン応答配列(HRE)を認識し、ホモ二量体として HRE に結合して、下流の応答遺伝子の転写制御を行っている。我々はヒト前立腺癌細胞 LNCaP における AR 結合部位について、クロマチン免疫沈降により得られた DNA を DNA アレイにより解析する ChIP-on-chip 法を用いて解析を行っており、AR 結合部位として機能するゲノム領域のうち、ヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2 および GR 安定発現 293 細胞 (293GR) において GR 結合部位として機能するものがあるかについて検討を行った。方法は、SaOS2 および 293GR 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 1 時間行い、GR 特異的抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社: H-300) を用いて ChIP を行い、ChIP を行っていない Input DNA をコントロールにして、ホルモン刺激による GR 結合の濃縮倍率を Real-time PCR にて検討した。GR 結合部位の最も近傍の遺伝子発現におけるステロイド応答性について、24 時間まで経時的に各細胞より RNA を調整して、定量的 RT-PCR にて遺伝子発現量を検討した。

(7) 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—破骨細胞における性ホルモン受容体の高次機能— (分担: 加藤)

昨年度報告した破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスである Cathepsin K-Cre ノックインマウス (Ctsk-Cre) と floxed ER マウスと交配することで、破骨細胞特異的 ERKO マウス (OcERKO) を得た。12 週齢の雌マウスを用いて、DEXA 法による骨密度測定、μCT 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。

(8) 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 (担当: 堺)

これまで続けてきたリン酸化蛋白質の総合的解析の過程で、疾患に関わる数多くの Src キナーゼの基質分子の発現変化やチロシンリン酸化の変化を見出し、その機能解析を行ってきたが、疾患治療のための分子標的を見つけるという最終的な目的に沿って、その中から骨軟骨系において極めて重要な役割を果たす可能性のある幾つかの蛋白質とその機能に焦点を絞るような形で最近の研究を進めてきている。

1. ephrin-B 1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

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—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、昨年になって破骨細胞の細胞膜で発現する ephrin-B と骨芽細胞の表面で発現する EphB が細胞間接着により同時に活性化され、破骨細胞を分化誘導の方向に、骨芽細胞を分化抑制の方向に導くことが示され、骨代謝における EphB と ephrin-B の重要性があらためて浮き彫りになった。

我々も Src キナーゼの基質としての ephrin-B1 の機能については以前から幅広く研究を進めてきており、ephrin-B1 が EphB の刺激に応じて Rac 蛋白質の活性化を引き起こし細胞運動の制御に関わること、細胞膜上の claudin と結合して EphB の刺激無しにも細胞間接着によるチロシンリン酸化を引き起こし、細胞間接着の程度を調節する働きがあること、などを見出し報告してきた。最近になって 2 細胞間の EphB と ephrin-B の相互作用で起こる生理作用についてさらに解析を進めたところ、ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことがわかった。ephrin-B1 によってメタロプロテアーゼ分泌が制御されるという観察は、それを発現する破骨細胞においても極めて重要な機能と考えられるので、そのメカニズムの詳細について解析を拡げる。

2. メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わりの解析

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、骨

粗鬆症や変形性関節症などの骨・軟骨疾患においても、その成因に関与するのではないかと以前から考えていた。そのため、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てきた。一方で、米コロンビア大学の澤田泰宏先生との共同研究で、細胞に物理的な外力すなわちメカニカルストレスをかけたときに、細胞内の Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が大きく変化する現象について解析を進めてきた。そのようなメカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、澤田先生の開発した細胞外基質の伸長による解析法と、我々の樹立した Cas の各ドメインに対する抗体やリン酸化特異的抗体、RNAi の手法を用いて解析を進めた。

(9) 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 (担当: 津久井)

骨粗鬆症疾患・変形性関節症の関連因子として考えられるエストロゲン等の遺伝子情報制御因子について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った。また、本年度にエストロゲン関連因子としてのエストロゲンレセプター(ER α および ER β)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。また、ビタミンK関連因子としてのGGCX(ビタミンK依存性 γ カルボキシラーゼ)の骨作用について検討を行う。さらに、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シグナルおよびビタミンK関連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

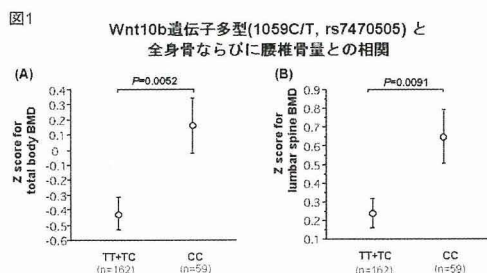
について、生体におけるgain of functionを行う実験系の確立、および遺伝子改変モデル動物の作製を行うことにより、エストロゲンシグナルの骨組織における作用メカニズムおよび病態メカニズム解明、最終的に治療法の確立を目指す。以上の研究課題を遂行するために、先ず具体的に大きく分けると3つ研究材料が必要となり、これらの材料および疾患モデル動物の作製を行い、さらにこれらの生きた試薬を交配により、骨組織または肝臓特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序に迫る。

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. 骨組織または肝臓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
3. ビタミンK依存性GGCXのcTgマウスの作製およびその解析
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、骨組織または肝臓特異的にgain of functionする系を確立し、生体における骨代謝作用について検討する。

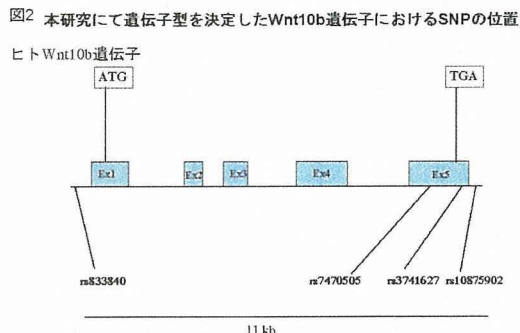
C. 結果

(1) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症

LRP5/6 に対してリガンドとして働くWnt10b のエクソン 5 に存在するアミノ酸置換を伴わない SNP (1059C/T, His353His, rs7470505)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 1A, B)。また、Wnt10b の 5'上



流域に存在する SNP (rs833840)、3'非翻訳領域における SNP (rs3741627)、さらには 3'下流領域における SNP (rs10875902) も同時に決定し(図 2)、これら遺伝子多



型間の連鎖不平衡に関して検討を行った。その結果これら遺伝子多型は連鎖不平衡にあることが示された(表 1)。

表1

Wnt10b遺伝子における各遺伝子多型間における連鎖不平衡に関する解析(D')

SNP ID	rs833840	rs1051886	rs3741627
rs1051886	0.893		
rs3741627	0.910	0.994	
rs2023825	0.917	0.994	1.000

次に WISP1 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する SNP と変形性脊椎症の各パラメーター(骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化)を検討した。その結果、この SNP は終板硬化と有意に相関した(表 2)。脊椎

表2

WISP1遺伝子3'非翻訳領域での遺伝子多型(2364A/G)における遺伝子型(AA, AG, GG)と各臨床パラメーターとの相関解析

Item	AA	Genotype(mean±SD) AG	GG	P value (ANOVA)	P value (Kruskal-Wallis)
Number of subjects	120	149	35		
Age (years)	66.1 ± 9.2	66.3 ± 8.5	67.1 ± 10.6	NS	NS
Height (cm)	150.7 ± 5.6	150.2 ± 6.8	150.0 ± 5.0	NS	NS
Body weight (kg)	50.3 ± 7.6	50.2 ± 8.3	48.0 ± 5.4	NS	NS
BMI	22.1 ± 2.9	22.2 ± 2.9	21.3 ± 3.3	NS	NS
Endplate sclerosis	0.58 ± 1.09	0.34 ± 0.74	0.09 ± 0.28	0.006	0.024
Osteophyte	5.89 ± 3.93	5.72 ± 3.40	5.57 ± 4.08	NS	NS
Disk narrowing	2.21 ± 1.79	2.09 ± 2.00	2.03 ± 1.86	NS	NS

BMI: body mass index, NS: not significant

変形は年齢の影響を受けることから、さらに我々は年齢補正後に再解析を行なった(表 3)。WISP1 遺伝子の本 SNP(2364A/G)において G アレルを有する群(AG+GG)と

表3

WISP1遺伝子3'非翻訳領域での遺伝子多型(2364A/G)における遺伝子型(AA, AG, GG)と年齢補正後の終板硬化との相関解析

Group compared	AA vs. AG+GG		
	OR	P value	95%CI
Endplate sclerosis (>1)(n=235) versus no endplate sclerosis (=0)(n=69)	1.78	0.044	1.01-3.13
Higher endplate sclerosis (>2)(n=271) versus Lower endplate sclerosis (<=0)(n=33)	2.91	0.0069	1.34-6.30

OR, Odds ratio; 95%CI, 95% confidence intervals.

G アレルを有さない群(AA)との 2 群間での比較を行った。終板硬化を複数有する群(n=271)においては複数有さない群(n=33)と比較し、AA 群の頻度が有意に高かった(P=0.0069, オッズ比=2.91)。終板硬化を有する群(n=235)と有さない群(n=69)との比較でも同様に、AA 群の頻度が有意に高かった(P=0.044, オッズ比=1.78)。

(2) IGF-I 経路と変形性関節症

IGF-I シグナルに対して受容体として働く 1 型 IGF-I 受容体(IGF1R)遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP と変形性脊椎症の各パラメーター(骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化)を検討した。その結果、この SNP は椎間板狭小化と有意に相関した(表 4)。脊椎変形は年齢の影響を受ける

表4

1型IGF-I受容体遺伝子(IGF1R1)イントロン1での遺伝子多型における遺伝子型(CC, CG, GG)と各臨床パラメーターとの相関解析

Item	Genotype(mean±SD)			P value (ANOVA)	P value (Kruskal-Wallis)
	AA	AG	GG		
Number of subjects	144	229	61		
Age (years)	65.9 ± 8.1	66.6 ± 8.8	66.9 ± 9.3	NS	NS
Height (cm)	150.6 ± 6.1	150.1 ± 6.3	150.4 ± 6.1	NS	NS
Body weight (kg)	50.6 ± 7.4	49.5 ± 8.1	50.6 ± 8.7	NS	NS
BMI	22.3 ± 2.8	21.8 ± 3.0	22.6 ± 3.2	NS	NS
Endplate sclerosis	0.40 ± 0.96	0.35 ± 0.63	0.42 ± 1.04	NS	NS
Osteophyte	5.69 ± 3.68	5.31 ± 3.44	6.10 ± 3.58	NS	NS
Disk narrowing	1.63 ± 1.70	2.19 ± 1.92	2.26 ± 1.89	0.015	0.0051

BMI, body mass index; NS, not significant.

ことから WISP1 遺伝子多型の時と同様に、さらに我々は年齢補正後に再解析を行った(表 5)。IGF1R 遺伝子の本 SNP において G アレルを有する群(CG+GG)と G アレルを有さない群(CC)との 2 群間での比較を行った。椎間板狭小化を複数有する群(n=223)においては複数有さない群(n=211)と比較し、CC 群の頻度が有意に

表5

1型IGF-I受容体遺伝子(IGF1R1)イントロン1での遺伝子多型における遺伝子型(CC, CG+GG)と年齢補正後の椎間板硬化との相関解析

Group compared	AA vs. AG+GG		
	OR	P value	95%CI
Multiple Disk narrowing (>2)(n=223) versus 1 or no disk narrowing (=1 or 0)(n=211)	0.54	0.0043	0.36-0.83
Higher disk narrowing (>3)(n=140) versus Lower disk narrowing (<=2)(n=294)	0.49	0.0033	0.31-0.79

OR, Odds ratio; 95%CI, 95% confidence intervals.

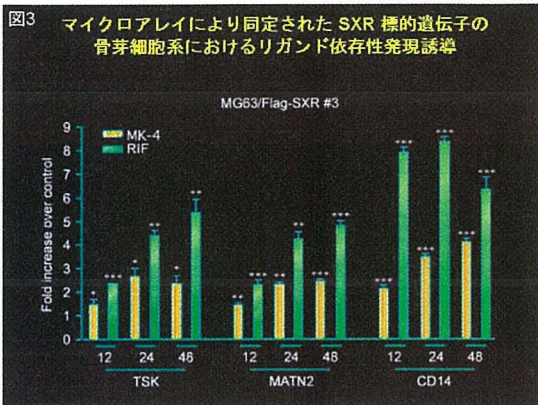
低かった(P=0.0043, オッズ比=0.54)。椎間板狭小化を 3 個以上の脊椎で有する群(n=140)と有さない群(n=294)との比較でも同様に、CC 群の頻度が有意に低かった(P=0.0033, オッズ比=0.49)。

(3) ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症ならびに変形性関節症関連遺伝子の探索

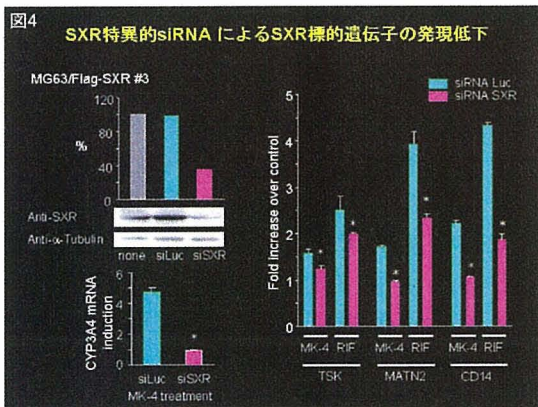
本解析により日本人閉経後女性 253 名の遺伝子上にランダムに存在する約 5 万 SNP における genotype を決定した。さらに、本解析により有意差が見出された SNP に関して、対象者数を約 700 名まで増やし相関解析を行った。その結果、複数の特に P 値の低い SNP を見出し、いくつかの骨量規定遺伝子の候補遺伝子が選定された。さらに変形性関節症のパラメーターに関連する有意に P 値の低い SNP も同定している。

(4) 骨芽細胞系における SXR 応答遺伝子の解析

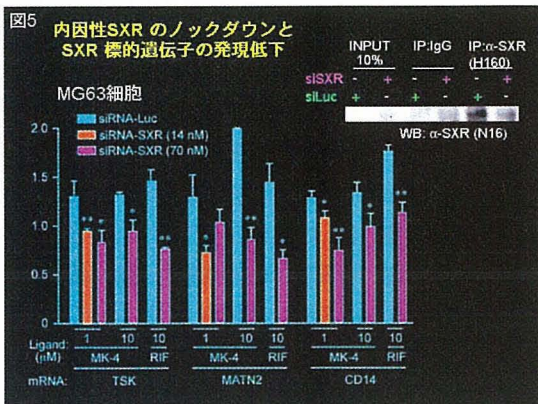
転写活性が高い Flag-VP16C-SXR を安定発現させた MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、溶媒コントロールに対して SXR リガンドにより 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子が 14 個同定され、この中から、TSK、MATN2、CD14 についてさらに解析を行った。これら遺伝子は、定量的 RT-PCR による解析の結果、リガンド刺激後 12 時間から発現上昇が確認され、MG63/Flag-SXR 細胞においてもリガンド添加により mRNA の発現量の増加が認められた(図 3)。siRNA により



SXR mRNA をノックダウンした結果、SXR 蛋白質の発現量が減少し、SXR の代表的標的遺伝子である CYP3A4(cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4)の MK-4 による発現誘導が抑制された(図 4)。この条

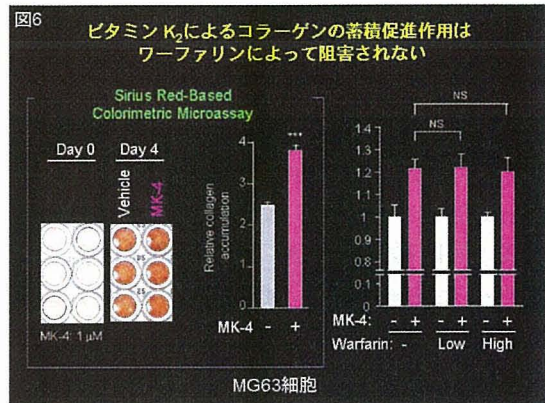


件で SXR 標的遺伝子の発現誘導を解析した結果、SXR のノックダウンにより、MG63/Flag-SXR 細胞およびその親株である MG63 の両者において、遺伝子のリガンド依存的な発現誘導は減少した(図 4, 5)。

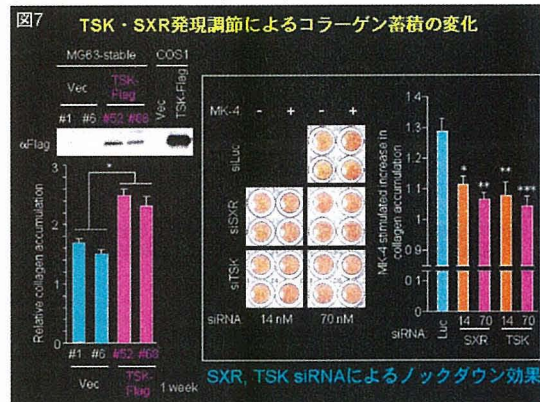


MG63 細胞は MK-4 添加により、コラ

ーゲンの蓄積を示す Sirius Red の強い染色が認められる。この反応はビタミン K 代謝サイクル阻害薬であるワーファリンによっては抑制されないことから、GGCX 非依存性の経路を介することが示唆された(図 6)。また、TSK 安定発現 MG63 細



胞株を作製し、これを 1 週間培養してコラーゲンの蓄積量を解析した結果、TSK 安定発現細胞ではコントロールのベクター発現細胞に比してコラーゲンの蓄積量が増加していた(図 7)。また、MK-4 によ



るコラーゲンの蓄積促進作用は、siRNA により SXR と TSK をノックダウンすると減少することが示された(図 7)。

TSK、MATN2、CD14 の近位プロモーター領域(転写開始点より 10 kb 以内)において、リガンド依存性の SXR 結合性を ChIP アッセイにて検討したところ、TSK の上流 400 bp 以内の近傍に MK-4 およびリファンピシンによる SXR 結合性上昇が認められる領域と、CD14 の上流~6 kb にリファンピシンによる軽度 SXR 結合性上昇が認められる領域が検出された。

TSK 上流および CD14 上流とも、SXR 応答配列の可能性が高い配列を含んでいる。MATN2 については、リガンド依存性の SXR 結合性が上昇する領域を検出できていないが、ゲノム配列の *in silico* 解析により SXR 応答配列の可能性が高い配列も見つかっており、さらに検討を要する。

(5) 骨芽細胞系におけるビタミン K 応答遺伝子の解析

マイクロアレイ解析の結果、溶媒コントロールに対して MK-4 により 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子が 14 個同定され、その中で、骨代謝への関与が予想される growth differentiation factor 15 (GDF15) と stanniocalcin 2 (STC2) に注目した。どちらも MK-4 刺激後 36 時間までは発現量の上昇はほとんど認められず、48 時間以降にかけて発現誘導が認められた。また、これら遺伝子は SXR のリガンドであるリファンピシンでは誘導されず、MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞と MG63 親株細胞において同等の発現誘導を示した。マウスの初代培養骨芽細胞およびマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 においても MK-4 による発現への作用を解析した結果、GDF15 および STC2 とも発現誘導が認められた。また、MG63 細胞を用いて γ -カルボキシラーゼの関与を検討した結果、ゲラニルゲラニオール、ビタミン K₁ および MK-7 刺激による発現誘導は認められなかった。MK-4 による GDF15 および STC2 の発現誘導は、GGCX siRNA によっても影響を受けなかったことから、ビタミン K には SXR および GGCX 非依存性の新しい作用があることが示唆される。

(6) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

ChIP-on-chip 法により LNCaP 細胞における AR 結合部位(しきい値: $P < 1e-5$)として同定されたゲノム上の ENCODE 領域(米国におけるヒトゲノムの機能解析計画において、パイロット研究の領域とし

て選択されたゲノムの約 1%にあたる 30 Mb の領域)における 10 箇所(表 6)につい

表6 ゲノムENCODE領域におけるChIP-on-chip法により同定されたアンドロゲン受容体結合部位(ARBS) ($P < 1e-5$)

ARBS 番号	ENCODE 領域番号	染色体番号	開始部位	終了部位	近傍遺伝子	転写開始点からの距離 (bp)	近傍遺伝子における ARBS の位置
1	ENr131	2	234,433,433	234,433,823	UGT1A1	-17,300	5' upstream
2	ENr334	6	41,823,411	41,823,433	POC	-323	5' upstream
3	ENr042	7	26,807,344	26,807,568	SCAP2	-129,874	5' upstream
4	ENr013	7	89,501,530	89,501,614	STEAP2	15,822	intron 3
5	ENr013	7	89,980,295	89,980,399	PFTK1	-9,019	5' upstream
6	ENr001	7	116,551,216	116,551,473	TES	168,664	2' downstream
7	ENr001	7	118,022,667	118,022,822	MET	118,336	intron 17
8	ENr233	15	41,840,443	41,840,990	KAA0377	23,671	intron 27
9	ENr233	15	41,738,874	41,740,486	CATSPER2	-11,894	5' upstream
10	ENr213	18	23,990,311	23,990,793	CDH2	20,637	intron 1

*各ARBSにおける転写開始点の近傍の転写開始点からの距離 (UCSCゲノムブラウザ NCBI Build 35に基き)

て、SaOS2 細胞および GR 安定発現 293 細胞(293GR)におけるステロイド依存性の GR 結合部位として機能するものがあるかについて検討を行った。少なくとも半数の 5 箇所において、SaOS2 細胞と 293GR 細胞ともに Dexamethasone 依存性の GR 結合性上昇を認めている。現在、SaOS2 細胞において Dexamethasone 刺激により発現変動する遺伝子をマイクロアレイ解析で同定し、それらステロイド応答遺伝子の近傍に ChIP-on-chip 法による AR 結合部位が存在するかを探索した上、ステロイド依存性の GR 結合性について検討を進めており、Dexamethasone 高濃度と低濃度における作用点の相違について検討する予定である。

(7) 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—破骨細胞における性ホルモン受容体の高次機能—

OcERKO マウスでは全身性 ERKO マウスで観察される血中テストステロン値上昇等の内分泌系異常を示さないことから、間接的な骨組織への作用を排除した系統であると考えられた。12 週齢マウスの骨密度を測定した結果、メス OcERKO マウスで顕著な骨密度の低下が見られた(図 8)。

さらに骨形態計測の結果、破骨細胞機能の亢進に伴う高回転型の骨代謝が行われていることが明らかとなった(図 9)。

図 8
Female OcER α KO mice develop osteopenia

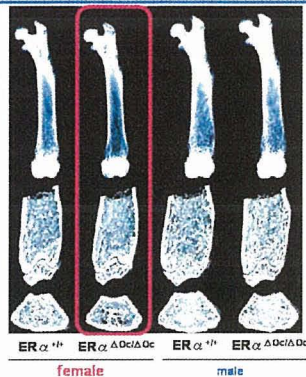
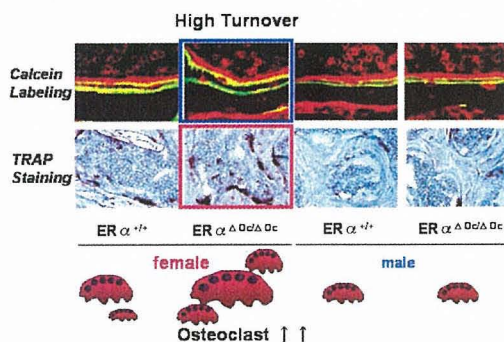


図 9
Female OcER α KO mice develop osteopenia



また、このマウスではエストロゲン過剰投与による海綿骨量の増加が著しく阻害されていることがわかった。一方、オス OcERKO マウスにおいてこれらの異常は観察されないことから、生理的条件下において ER はメス特異的な骨吸収制御因子として機能すると考えられた。また卵巣摘出後にエストロゲンを投与したところ、対照群では骨密度の回復を認めたものの、OcERKO では骨量の有意な変化を認めなかった(図 10, 11)。

(8) 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. ephrin-B1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

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

図 10
E2 Replacement Effect Doesn't Occur in Female OcER α KO

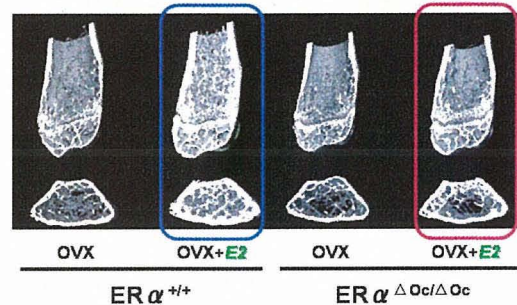
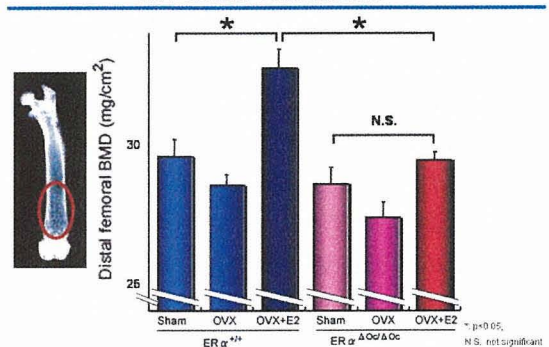


図 11
E2 Replacement Effect Doesn't Occur in Female OcER α KO

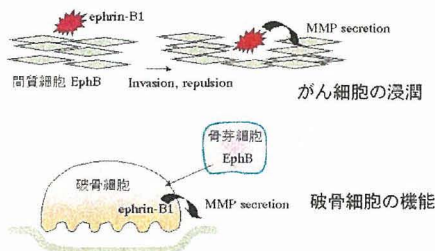


ephrin-B1 と結合能を持ち、細胞間接着に伴い claudin が膜表面に集積することで ephrin-B1 がリン酸化するという新しいメカニズムを見出した。このような受容体を介さない ephrin-B1 の活性化は、他の機序によっても起こると考えられ、その 1 つとして細胞-基質間接着でインテグリンが活性化することにより、Src ファミリーを介して ephrin-B1 がリン酸化するメカニズムがあると考えている。

ephrin-B1 を高発現する膀胱癌細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを発見した。各種阻害剤を用いてその切断がマトリックスメタロプロテアーゼ、特に MMP8 の働きによることがわかった。ところが、EphB で細胞を処理しても MMP8 の mRNA や蛋白質レベルでの変動は認められず、蛋白質合成阻害剤を用いてもその切断はブロックできなかったことから、このような MMP8 の活性化は

転写・翻訳の活性化を伴わないシグナルによるものではないかと考えられた。実際、細胞外への MMP8 の分泌は EphB によって誘導され、分泌の阻害剤などでブロックされた。以上のことから ephrin-B1 は EphB の刺激によってマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を誘導するという新しい機能が明らかになり、現在そのシグナルの解明を急いでいる。破骨細胞に発現する ephrin-B1 も骨芽細胞と接触するなどの刺激でマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を介してその機能に関与することが示唆された(図 12)。

図12 ephrin-B1を介したシグナルによるMMP分泌の制御

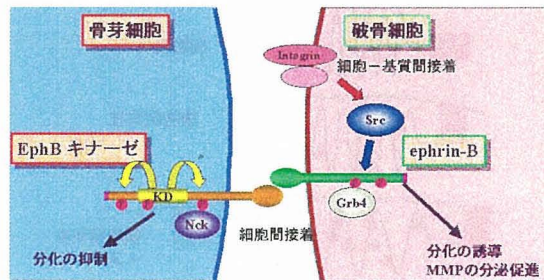


実際に胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると細胞運動能や浸潤能が顕著に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加することが確認された。胃癌細胞の腹腔内注射による腸間膜に対する播種の程度や、同所性に胃の粘膜下に移植した際の、漿膜側への浸潤の速度などが、ephrin-B1 の発現で著明に亢進することが明らかになった。ephrin-B1 による癌の浸潤能の獲得は、メタロプロテナーゼの分泌、細胞運動能の亢進、細胞間接着の抑制など複数の因子によるものと考えられ、同じようなメカニズムによる機能制御が同様に ephrin-B1 を発現する破骨細胞にもあるのではないかと考え研究を進めている(図 13)。

2. メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わりの解析

Src キナーゼが活性化した癌細胞などでは Cas 蛋白質の広範な恒常的なリン酸

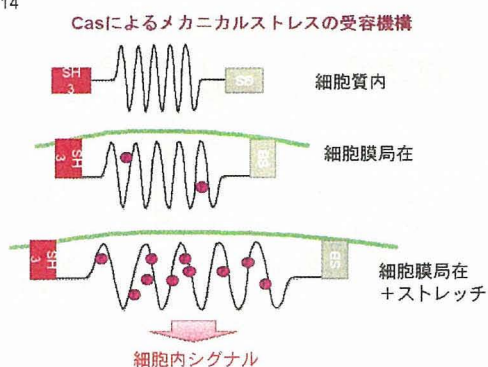
図13 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能



化が観察されるが、正常細胞における Cas 蛋白質のチロシンリン酸化は、接着斑などにごく限られた部位に限局してみられる。一方、このような細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することがわかった。Cas には基質領域と呼ばれる 15 個のリン酸化を受けるチロシンが集積する領域があるが、ここの部分に対して樹立した Cas1 抗体はネイティブな状態では、細胞をストレッチした場合に Cas 蛋白質との反応性が著しく上昇したため、外力により細胞が伸長した際に、実際に Cas 蛋白質の構造が変化して、基質領域の内側が露出した形になることが想像された。実際、蛍光分子断片によって Cas 蛋白質の N 末と C 末をラベルすることにより相互の距離を推定すると、Cas が外力により伸長しうる構造であることが示された。またストレッチによる刺激で活性化される Rap1 蛋白質などの活性は Cas 蛋白質の発現を RNAi の手法により抑えることでストレッチによる活性化が抑えられるので、Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止め、Src キナーゼによるリン酸化の受けやすさが変化することにより、下流にメカニカルストレスのシグナルを伝える分子であることが明らかになった(図 14)。

現在、Cas のリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析し

図14



ている。これまでの解析で、ここの領域 (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。Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を用いて Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすることにより、細胞におけるメカニカルストレス受容の変化を観察して Cas の下流シグナルの生物学的意義をさらに解析したい。

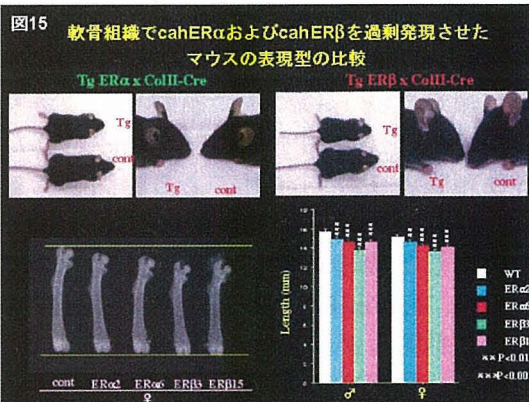
また広島大学原爆放射線医科学研究所の本田浩章先生と共同研究で Cas の SH3 ドメインを欠損するコンディショナルマウスの解析も進めており、メカニカルストレスの伝達異常をもたらす骨軟骨系の異常や、疾患感受性などの解析に興味を持たれる。

(9) 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. 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型コラーゲンの遺伝子変異および蛋白質変性を伴うことが原因で起こることが知られている。第1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。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II型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、II型コラーゲン(CoII)-Cre マウスとcTg マウスの交配を行った。ER α およびER β シグナルを過剰発現したマウスでは、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(図15)。また、3週齢幼若マウ



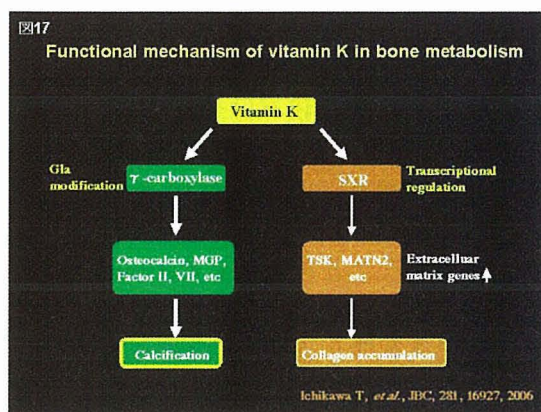
スにおいて骨組織での表現型の解析を行った結果、頭蓋形成異常、頸椎不全、体長の短縮、骨長への作用の可能性が示唆された(図16)。さらに、時系列的に成熟マウス(15週齢メス)における膝関節領域の解析を行った結果、対照区では、一般的には脂肪層と細胞外マトリックスで満たされた領域により膝関節でのスムーズな歩行運動が可能と考えられるが、ER β シグナルを過剰発現したマウスの十時鞅



帯では、脂肪層の顕著な減少が観察された。 $ER\alpha$ シグナルを過剰に発現した区においては、II型コラーゲンの減少および関節軟骨の脱落を呈した表現型が得られた。一方、 $ER\beta$ シグナルを過剰に発現した区では、関節軟骨の減少はなく、関節軟骨の脱落が観察できる表現型を示すマウスが得られた。 $ER\alpha$ および $ER\beta$ それぞれ違う軟骨作用を持つ可能性が示唆され、典型的な変形性関節症様の表現型を示し、エストロゲンシグナルによる軟骨作用と変形性関節症との関与が示唆された。

2. ヒトGGCX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

GGCX は生体では特に肝臓で高い発現を示しており、オステオカルシンやMGP等の Ca^{2+} 結合を制御する修飾酵素として知られている。最近の報告ではGGCXのアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は、四肢の形成異常、骨密度と相関があることが報告され、GGCXの酵素活性と骨代謝との相関が注目される因子である。ビタミンKの骨代謝作用は、GGCXによるGla化修飾を介する作用、およびSXR等を介するマトリックスなどの転写制御による作用などが報告されている(図17)。本研究では、本来内在性のGGCXの発現が高い肝臓において、アルブミンプロモーター支配下にCre組換え酵素を発現するTgマウスを交配することにより、コンディショナルにヒトGGCXをマウスの肝臓で過剰発現した際の、骨代謝の解析を行っ



た。ヒトGGCXを肝臓で過剰発現したマウスでは、PIXImus(マウス専用X線骨密度測定装置、UGOBASILE社)により大腿骨部の骨密度および骨塩含量を検討した結果、対照区と有意な差は得られなかったが、骨代謝作用をさらに詳細に検討するために骨形態計測による解析を行った結果、骨量および骨梁数などの増加が認められた。骨形成のパラメータを検討した結果、骨形成速度および石灰化速度が有意に減少していることがわかり、一方、骨吸収パラメータに関しては骨吸収速度の減少、および骨吸収を盛んに行う多核破骨細胞数の顕著な減少が観察された。本研究により、ヒトGGCXを肝臓で過剰発現したマウスの骨代謝作用を解析した結果、低回転型の骨代謝状態であることが示唆され、骨形成より骨吸収が優位に減少することで未成熟な骨量および骨梁数の増加したことが示唆され、ビタミンKを介する肝臓のGGCXの活性の変化により、骨代謝に作用することが示唆された。

D. 考察

(1) 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*, 2007)。Wnt- β -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-LRP シグナル伝達因子である Wnt10b 遺伝子のエクソン5における SNP が骨量と有意に相関することを明らかにした(Usui et al., *Geriatric Gerontol Int*, 2007)。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。また、本 SNP を含む Wnt10b 遺伝子における 5' 上流域、翻訳領域、3' 非翻訳領域ならびに 3' 下流域までの 4 種類の SNP 間での連鎖不平衡を検討したところ、これらはすべて連鎖不平衡にあることを見出した。したがって、Wnt10b 遺伝子全体はハプロタイプブロックを形成している可能性があり、このハプロタイプブロックが Wnt10b 遺伝子の発現や機能を調節し、骨代謝に影響を与えている可能性がある。

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、我々は LRP5 のエクソン 2 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)が変形性脊椎症におけるパラメーター(骨棘形成、椎間板狭小化、終板硬化)の中で骨棘形成と有意な相関があることを報告した(Urano et al., *Spine*, 2007)。したがって Wnt-LRP シグナル伝達因子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。そこで、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ー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。今後、LRP5 ならびにそのリガンドである Wnt10b さらには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、新たな骨粗鬆症や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。

(2) IGF-I 経路と変形性関節症

IGF-I シグナルは軟骨代謝において重要な役割を果たしていることが示されてきた。血清 IGF-I は年齢と共に減少することが示されており、この年齢に伴う IGF-I の減少が関節において軟骨細胞由来の関節内に存在する細胞外マトリックスの分泌低下をもたらすことが関節炎の発症に関与することが示唆されている。また、IGF-I 遺伝子のプロモーターに存在する遺伝子多型が変形性関節症の発症と相関することが近年明らかにされており、IGF-I シグナルと変形性関節症との関連は注目されている。本研究では IGF-I シグナルにおいて受容体として働く 1 型 IGF-I 受容体(IGF1R)遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP が変形性脊椎症のパラメーターのなかで椎間板狭小化と相関

することを見出した。したがって、IGF-I 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。今後、IGF-I からその受容体を介した下流シグナルが脊椎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。

(3) ゲノムワイドスクランによる骨粗鬆症ならびに変形性関節症関連遺伝子の探索

本解析により有意差が見出された SNP に関して、対象者数を約 700 名まで増やし相関解析を行い、複数の骨量規定遺伝子の候補遺伝子を選定した。今後、骨粗鬆症や変形性脊椎症における Wnt-LRP5 シグナル、変形性脊椎症における IGF-I シグナル、に加えて TGF β からその受容体を介した下流シグナル伝達因子における遺伝子多型と骨粗鬆症との関連を探求することで、新たな骨粗鬆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。今後、骨量以外にも変形性脊椎症の各パラメーターを規定する候補遺伝子を選定し、新たな脊椎変形に関与する遺伝子の探求も行う予定である。

(4-6) 骨芽細胞系における新しいビタミン K 作用とステロイド作用の検討

本研究は骨芽細胞系におけるビタミン K 作用とステロイド作用について、核内受容体を中心とした遺伝子発現調節機構について検討を行い、骨粗鬆症ならびに変形性関節症疾患の病因に関連する遺伝子の作用について明らかにし、診断・治療への応用を目指すものである。

本研究において、ビタミン K₂ が骨芽細胞系で核内受容体 SXR を介して、細胞外マトリクス蛋白質をコードする TSK と MATN2 の発現誘導を行い、特に TSK の発現上昇はコラーゲン蓄積の増加に結びつく作用が明らかになった。TSK は small leucine-rich repeat プロテオグリカン (SLRP) ファミリーに属する構造を有して

おり、このファミリーの骨代謝における役割として、パイグリカンやデコリンが骨形成において重要な役割を果たしていることが遺伝子欠損マウスにより明らかになっている。またパイグリカンとデコリンは *matrilin* ファミリーと共に、コラーゲン細線維と結合体を形成することが報告されており、SLRR と *matrilin* の相互作用が考えられる。CD14 は単球系で発現するリポポリサッカライド結合蛋白であり、分泌型は B リンパ球系の増殖・分化を促す作用がある。B リンパ球系は破骨細胞分化に重要な RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)を発現し、さらに自らが破骨前駆細胞となることが報告されている。骨芽細胞系における CD14 の作用については不明な点が多いが、マウス初代培養骨芽細胞の分化系においては発現上昇が認められることから、骨形成と骨吸収の両者において、coupling factor として働く可能性が示唆される。

SXR が、骨芽細胞系への分化作用・コラーゲン蓄積作用などの生理的作用を実際に生体内の骨組織において発揮しているかについては、さらに検討が必要である。ステロイドホルモン受容体やビタミン D 受容体などの他の核内受容体と比べて、SXR はリガンド特異性が低いように考えられるが、リガンドにより発現調節される標的遺伝子の種類が異なり、またその際の転写調節に機能する共役因子が異なるという報告もあり、SXR をとりまく分子の種類により、個々の遺伝子に対する異なった転写制御メカニズムを形成している可能性も示唆される。肝細胞において、SXR が CYP3A4 遺伝子の転写を活性化する際には転写因子 HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)の活性化も重要であるが、骨芽細胞においてはどのような核内受容体・転写因子もしくは共役因子との協調作用が必要なのかについても興味深い。また、最近、SXR は炎症により活性化される NF- κ B の経路

と転写制御のレベルで拮抗することが明らかになった。この拮抗作用が骨、特に破骨細胞においても存在するのであれば、SXR が活性化することにより、変形性関節症や骨折などで起こる炎症作用を押さえる効果も考えられる。

また、本研究ではビタミンK₂のうち、MK-4のみで発現誘導される遺伝子群があり、直接にはGGCXおよびSXRの経路によらないメカニズムで発現調節される可能性が示唆された。この反応はヒト骨芽細胞系、マウス骨芽細胞系ともに認められており、生体内の骨代謝においても生理的役割を果たしている可能性が考えられる。GDF15はTGF-βスーパーファミリーに属する40-kDaのプロペプチドで、アミノ基側が切断されることにより、活性型ペプチドとして分泌される。TGF-βスーパーファミリーに属する骨形成蛋白BMPなどと同様に、GDF15蛋白を皮下移植することにより、軟骨や内軟骨骨形成が起こることや、前立腺癌において造骨性骨転移の病巣にのみ発現上昇が認められることなどから、MK-4がGDF15を介して骨代謝調節に関与する可能性が示唆される。STC2はスタニオカルシンと呼ばれる分泌糖蛋白ホルモンの1つであり、同じファミリーのSTC1については、骨芽細胞分化において発現誘導され、過剰発現すれば骨形成の発育が促進し、ノックダウンすれば骨形成の発育が遅延することなどが報告されている。GDF15およびSTC2の発現誘導のメカニズムについては、SXRを介する転写調節機構とは異なり、発現誘導までに比較的時間を要することなどから、骨芽細胞系の転写調節作用で重要であるPKA/CREBシグナル伝達系などが間に機能していることも考えられ、今後の検討を要する。

骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析については、グルココルチコイド受容体とDNA結合性・転写調節機能に相同性があるアンドロゲン受容体で

のChIP-on-chip法解析データを元に進めていく予定である。既にいくつかの遺伝子について、近傍にアンドロゲンおよびグルココルチコイド受容体結合部位を有し、グルココルチコイド応答性を示すものを同定しており、これらがステロイドの濃度依存性にどのような骨代謝作用を示すかを検討していきたい。

(7) 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—破骨細胞における性ホルモン受容体の高次機能—

本研究では破骨細胞特異的ERKOマウスを作成することで、生体レベルにおける破骨細胞内ER高次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あり、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。昨年度報告したCtsk-Creノックインマウスを用いることで成熟破骨細胞特異的な遺伝子欠損が可能となった。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ER発現報告がないにも関わらず、実際に破骨細胞特異的ERKOマウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。今回得られた結果から、性ホルモンであるエストロゲンは骨組織を構成する細胞群のひとつである破骨細胞に直接的に作用することで骨吸収を抑制していることが明らかとなった。

今後、閉経後骨粗鬆症に対する新たなかつ選択的な治療法の開発も視野に入れ、成熟破骨細胞におけるERの直接的な作用メカニズムを詳細に検索していく必要がある。

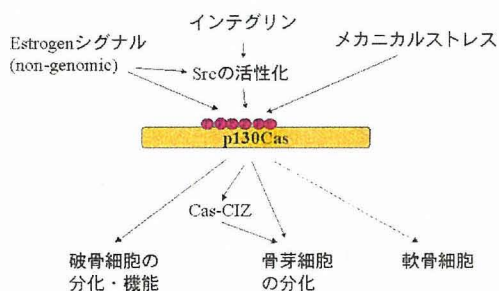
(8) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容

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

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、骨・軟骨系細胞の生理機能と病態に Src キナーゼとその基質が様々な形で関与していることが示されてきたが、今回の研究は ephrin-B1 を介したメタロプロテアーゼの分泌誘導、そして Cas を介したメカニカルストレスの伝達という全く新しい形での関与を提唱する画期的なものである。メカニカルストレスは、骨芽細胞による骨新生を促進することが経験的に知られているが、その機序についてはわかっていなかった。メカニカルストレスを構造変化として検知するセンサー分子であることが示された Cas 蛋白質であるが、下流シグナルとしては直接の結合分子 CIZ が核に移行して骨芽細胞の分化に関わることノックアウトマウスを用いた系で最近示されており、Cas-CIZ の系が骨新生を制御しているのかもしれない。Cas はインテグリン刺激、ステロイド刺激、メカニカルストレス刺激の共通のセンサーとして骨・軟骨系のキーとなる制御分子として骨粗鬆症や変形関節症の発症に深く関わると考えている(図 18)。

図 18

骨・軟骨系シグナルにおけるCasの役割



骨芽細胞に発現する EphB と破骨細胞に発現する ephrin-B の相互の活性化で両方の細胞の分化の方向性を決めるというモデルが 2006 年の Cell 誌にも紹介されたことで、骨分化におけるこれらの分子

の重要性が一躍注目されるに至ったが、そもそも EphB と ephrin-B は、神経系や消化管のシステムで、異種の細胞間の反発や棲み分けに関わる分子であることが示されており、骨細胞においても骨芽細胞と破骨細胞が混ざり合わないような役目もしている可能性がある。刺激された ephrin-B1 がメタロプロテアーゼ分泌に関わることを今回示したが、メタロプロテアーゼ阻害剤は、骨粗鬆症や変形性関節症に対しても一定の効果があるという報告もあり、ephrin-B1 のシグナルを抑制することがこれらの疾患発症にどれだけ影響があるかは関心のあるところである。

破骨細胞においては Src キナーゼの他の基質群 c-Cbl、cortactin、paxillin などや、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 等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。今後、さらに多くの基質群のシグナルを解明していくことにより、どのような組み合わせで抑えることが最も効果的に破骨細胞機能を抑制できるかなど、治療に向けての更に詳しい情報が得られるであろう。

(9) 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

エストロゲンシグナルと変形性関節症との関係については、リンガンド非依存性の変異エストロゲンレセプター $caER\alpha$ および $caER\beta$ を軟骨組織において過剰発現した場合、胎生期から未成熟期において軟骨の成長や骨長への作用が示唆された。また、成熟期でも 15 週齢と若い週齢においても、 $ER\alpha$ および $ER\beta$ シグナルを過剰発現したマウスでは、膝関節において典型的な変形性関節症様の表現型を示す個体を得られた。しかし、 $ER\alpha$ および