

ER $\beta$ シグナルの軟骨作用に違いがあることが観察され、エストロゲンと変形性関節症発症の関与については、関節腔や関節軟骨等、ER $\alpha$ およびER $\beta$ シグナルそれぞれで別の作用があると考えられ、多段階的に関与することが考えられる。今後ともER $\alpha$ およびER $\beta$ シグナルを区別して、エストロゲンの軟骨作用および変形性関節症発症にどのような情報制御因子が関与するか、コラーゲン、細胞外マトリックス、および脂肪等の分解・合成関連因子との関係について焦点を絞り検討を進めていきたい。

ビタミン K 依存性 GGCX の肝臓における酵素活性の変化と骨代謝との関係については、肝臓でヒト GGCX を過剰発現させたマウスでは、骨密度・骨塩含量ともに変化が見られないが、より詳細な骨代謝作用を解析した結果、低回転型の骨代謝状態であり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・骨梁数の増加したことが示唆された。ビタミン K を介する肝臓の GGCX 活性の上昇により、標的 Gla 化蛋白質の Glu/Gla の修飾を変化させ、特に骨吸収に強く作用する因子の存在の可能性が示唆された。このことは、血中の分泌蛋白質もしくは肝臓で合成される蛋白質で Gla 化修飾の制御を受ける蛋白質が存在し、骨吸収作用を抑制する可能性が考えられる。また、肝臓機能と骨代謝がビタミン K シグナルを介してお互いにリンクしている可能性が考えられ、慢性的な肝疾患における骨代謝異常との関係についても興味深い。

#### E. 結論

LRP5、WISP1、WNT10B、IGF1R 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、さらにゲノムワイドスクリーンにて今までに類を見ないほど極めて低い P 値を有する数個の SNP を同定し、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。特にビタミン K の核内受容体 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。加藤は、破骨細胞特異的なノックアウト動物を開発して、エストロゲン受容体の骨代謝における極めて新しいメカニズムを示した。堺は、細胞内シグナル伝達の研究により、新規リン酸化シグナルと蛋白分解酵素の分泌との新しい交絡現象を見出し、さらにはメカニカルストレスを検知する画期的な分子メカニズムを明らかにした。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コンディショナル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. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S: Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934, 2006.

2. 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.
3. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T: 17-beta-Estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2 cell. *J Biol Chem* 281, 13092-13102, 2006.
4. Shukuwa K, Izumi SI, Hishikawa Y, Ejima K, Inoue S, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitaoka T, Koji T: Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochem Cell Biol* 126, 111-123, 2006.
5. Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 540-546, 2006.
6. Takeuchi T, Inoue S, Yokosawa H: Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 473-477, 2006.
7. Horie-Inoue K, Inoue S: Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancer. *Semin in Cancer Biol* 16, 235-239, 2006.
8. 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* 32, 25-29, 2007.
9. Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, Inoue S, Orimo H, Ouchi Y, Hosoi T: A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Glu) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone* 40, 451-456, 2007.
10. Fujita M, Sugama S, Nakai M, Takenouchi T, Wei J, Urano T, Inoue S, Hashimoto M: Alpha -synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: Relevance to downregulation of proteasome activity. *J Biol Chem* 282, 5736-5748, 2007.
11. 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* 40, 997-1005, 2007.
12. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S: Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* (in press)
13. Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, Inoue S,

- Sasano H: Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci* (in press)
14. Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab* (in press)
  15. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S: Increased expression of Estrogen-Related Receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer* (in press)
  16. Usui T, Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* (in press)
  17. 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)
  18. 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.
  19. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci US A* 103, 11736-11741, 2006.
  20. Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J: Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol* 26, 7966-7976, 2006.
  21. Ma Y, Khalifa B, Yee YK, Lu J, Memezawa A, Savkur RS, Yamamoto Y, Chintalacheruvu SR, Yamaoka K, Stayrook KR, Bramlett KS, Zeng QQ, Chandrasekhar S, Yu XP, Linebarger JH, Iturria SJ, Burris TP, Kato S, Chin WW, Nagpal S: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest* 116, 892-904, 2006.
  22. Kim M-S, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamamoto K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K, Kato S: 1alpha, 25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 21, 334-342, 2007.
  23. Memezawa A, Takad I, Takeyama K, Igarashi M, Ito S, Aiba S, Kato S, Kouzmenko AP: Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* (in press)
  24. Yamaoka K, Shindo M, Iwasaki K, Yamaoka I, Yamamoto Y, Kitagawa H, Kato S: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch Biochem Biophys* (in press)

25. Takezawa S, Yokoyama A, Okada M, Fujiki R, Iriyama A, Yanagi Y, Ito H, Takada I, Kishimoto M, Miyajima A, Takeyama K, Umesono K, Kitagawa H, Kato S: A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor (PNR). *EMBO J* 26, 764-774, 2007.
  26. Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, Nakamura T, Akimoto C, Yamamoto Y, Katagiri T, Foulds C, Takezawa S, Kitagawa H, Takeyama K, O'Malley BW, Kato S: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. *Nat Cell Biol* (in press)
  27. Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566, 2007.
  28. Huang J, Sakai R, Furuichi T: The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons. *Mol Biol Cell* 17, 3187-3196, 2006.
  29. Sawada Y, Tamada M, Dubrin-Thaler B, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, Sheetz MP: Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026, 2006.
  30. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU: TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* (in press)
2. 学会発表  
【国際学会】
  1. Fujita M, Takenouchi T, Nakai M, Urano T, Inoue S, Hashimoto M: Alpha-synuclein stimulates cellular differentiation in osteoblastic cells. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan (2006.6.18-23)
  2. Inoue S: [Invited Talk] Post-translational modification of 14-3-3sigma by E3 ligase Efp. 2006 GRC on Biology of 14-3-3 Protein, Gordon Research Conference, Oxford, UK (2006.8.27-9.1)
  3. Ezura Y, Nakajima T, Inoue S, Hosoi T, Suzuki T, Shiraki M, Emi M, Noda M: A genetic screening of osteoporosis susceptibility genes via 1315 common missense single nucleotide polymorphisms: a leader sequence variant (16-S) of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) had reproducibly associated with low bone mineral density among adult women. American Society of Bone and Mineral Research 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2006.9.15-29)
  4. Horie-Inoue K, Ichikawa T, Inoue S: [President's Poster] Vitamin K2 activates the transcription of bone-related genes in osteoblastic cells by steroid and xenobiotic receptor and a novel pathway independent of gamma-carboxylation. 3<sup>rd</sup> IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis, Port Douglas, Australia (2006.10.21-26)
  5. Horie-Inoue K, Takayama K, Inoue S: Common and differential responses to steroid hormones via their receptor-binding sites in human genome

- identified by chromatin immunoprecipitation-based tiling array. Keystone Symposia, Steamboat Springs, Colorado, USA (2007.3-22-27)
6. Suzuki E, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Maki A, Zhao Y, Yamagata K, Furutani T, Kouzmenko A, Tanabe M, Takeyama K, Kato S: E2F transcriptional activation as a potential mechanism of neurodegeneration of polyglutamine expansion androgen receptor mutants. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  7. Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Matsumoto T, Kato S: Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' *in vivo*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  8. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Kouzmenko A, Kato S: *Drosophila* genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  9. Baba A, Ohtake F, Kato S: Modulation of estrogen signaling by dioxin receptor and associated complexes. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  10. Yokoyama A, Takezawa S, Okada M, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S: Identification and functional analysis of cell-cycle specific co-repressor complex, Dev-CoR complex. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  11. Zhao Y, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Sawatsubashi S, Shirode Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Tanabe M, Kato S: Isolation of androgen receptor co-regulators regulating the alteration of chromatin structure using modified position effect variegation system in *Drosophila*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  12. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
  13. Kato S: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes. 13<sup>th</sup> Workshop on Vitamin D, Victoria, Canada (2006.4.7-12)
  14. Kato S: Function of co-regulator complexes for nuclear receptors. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
  15. Ito S, Takeyama K, Sawatsubashi S, Suzuki E, Kouzmenko A, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Shirode Y, Tabata T, Kato S: Identification of a novel co-regulator of nuclear receptors by *Drosophila* genetic system. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
  16. Sawatsubashi S, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Yamagata K, Shirode Y, Tabata T, Kato S: Functional analysis of ecdysone receptor-mediated transcription through alteration of chromatin structure. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
  17. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Ohya H, Kato S: Functional analysis of

- a novel ATP dependent chromatin remodeling complex "WINAC". Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
18. Kato S: Modulation of estrogen receptor signaling by activated dioxin receptor. Gordon Research Conference "Environmental Endocrine Disruptors". Pisa, Italy (2006.6.4-9)
  19. Kato S:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by VDR on the human CYP27B1 gene promoter mediates the DNA methylation. Adrenal 2006/ Molecular Steroidogenesis 5, Boston, USA (2006.6.20-23)
  20. Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts. 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Athens, Greece (2006.9.13-17)
  21. Kim M-S, Murayama A, Fujiki R, Takeyama K, Kato S:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR. ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
  22. Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, Takada I, Kitagawa H, Kato S: Vitamin K stimulates osteoblastogenesis through PXR/SXR-mediated Msx2 induction. ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
  23. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006, Vienna, Austria (2006.11.16-18)
  24. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Port Douglas, Australia (2006.10.22-26)
  25. Kato S: Nuclear steroid receptors and bone remodeling. Annual Autumn Symposium of Korean Society of Endocrinology, Busan, Korea (2006.11.3-4)
  26. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research (AuSBMR) 2006, Vienna, Austria (2006.11.16-18)
  27. Kato S: Transcriptional pathways in the treatment of bone disease. Salk/Nature/Ipsen Foundation Symposium on Biological Complexity: Diseases of Transcription, La Jolla, USA (2007.1.11-14)
  28. Sakai R, Miyake I: Analysis of domain functions of ShcC protein in neuroblastoma. 12<sup>th</sup> conference of Advances in Neuroblastoma Research, Los Angeles, USA (2006.5.17-20)
  29. Sakai R, Uekita T: Identification of Src kinase substrates regulating anchorage independency of lung cancer cells. International Meeting on Targeting the Kinome, Basel, Switzerland (2006.12.4-6)
- 【国内学会】
1. 浦野友彦、井上聡：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 Efp (2006.3.3-4) 第5回ステロイドホルモンを考える会 (東京)
  2. 浅岡健太郎、池田和博、井上聡、竹田省：レトロウイルス抑制因子 TRIM5alpha の染色体上の位置と発現制御 (2006.4.22-25) 第58回日本産科婦人科学会総合学術講演会 (横浜)
  3. 井上聡：[研究奨励賞受賞講演]エス

- トロゲン標的遺伝子の同定とその機能の解明 (2006.5.19) 第 79 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
4. 堀江公仁子、高山賢一、坊農秀雅、大内尉義、岡崎康司、井上聡：ヒトゲノム応答配列に基づいた新規ステロイドホルモン応答遺伝子の同定 (2006.5.19) 第 79 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
  5. 浦野友彦、白木正孝、細井孝之、中村利孝、大内尉義、井上聡：Wnt/beta-catenin シグナル伝達因子における遺伝子多型が変形性脊椎症に与える影響 (2006.6.7-9) 第 48 回日本老年医学会学術集会 (金沢)
  6. 塩之入温、井上聡、大内尉義：高齢骨粗鬆症女性患者における転倒者と非転倒者の重心動揺計による評価 (2006.6.7-9) 第 48 回日本老年医学会学術集会 (金沢)
  7. 東浩太郎、井上聡：肝細胞癌におけるステロイド X 受容体の機能解析 (2006.6.10) 第 5 回関東ホルモンと癌研究会 (東京)
  8. 井上聡：[シンポジウム] 骨のアンチエイジング-骨粗鬆症の診断、治療とその予防 (2006.6.16-18) 第 1 回アンチエイジング国際シンポジウム&エキスポ東京 (東京)
  9. 浦野友彦、井上聡：癌における 14-3-3  $\sigma$  のメチル化ならびに蛋白修飾による機能制御 (2006.6.17) 14-3-3 シンポジウム (京都)
  10. 東浩太郎、浦野友彦、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるグルココルチコイド標的遺伝子の網羅的解析 (2006.7.1) 第 6 回東京骨関節フォーラム (東京)
  11. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞における新規ビタミン K 標的分子の探索とその発現制御機構の解析 (2006.7.6-8) 第 24 回日本骨代謝学会 (東京)
  12. 江面陽一、中島敏明、鈴木隆雄、細井孝之、井上聡、白木正孝、江見充、野田政樹：原発性骨粗鬆症発症に関わる遺伝的素因の網羅的解析における再現性の検討：ゴナドトロピン遊離ホルモン遺伝子のシグナルペプチド多型 (2006.7.6-8) 第 24 回日本骨代謝学会 (東京)
  13. 井上聡：[学術賞受賞講演] 骨代謝疾患の治療薬作用機構ならびに疾患遺伝子の探索 (2006.7.6-8) 第 24 回日本骨代謝学会 (東京)
  14. 井上聡：[シンポジウム] 核内受容体と代謝・血管機能調節 エストロゲンならびにエストロゲン関連受容体 (ER/ERR) とエネルギー代謝 (2006.7.13-14) 第 38 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (東京)
  15. 井上聡：[シンポジウム] エストロゲン標的因子群の同定とそれらの癌ならびに脳神経系における役割 (Identification of estrogen receptor target genes and role of their gene products in cancer and nervous system) (2006.7.19-21) 第 29 回日本神経科学大会 (京都)
  16. 浦野友彦、井上聡：14-3-3 蛋白とユビキチンリガーゼ Efp による細胞周期制御機構 (2006.10.6) 第 29 回神経研シンポジウム (東京)
  17. 浦野友彦、白井貴彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：脂肪細胞分化に関わる遺伝子多型と骨粗鬆症との関連解析 (2006.10.12-14) 第 8 回日本骨粗鬆症学会 (東京)
  18. 東浩太郎、浦野友彦、藤田雅代、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるグルココルチコイド標的遺伝子の網羅的解析 (2006.10.12-14) 第 8 回日本骨粗鬆症学会 (東京)
  19. 堀江公仁子、市川智恵、井上聡：[日本骨代謝学会・日本骨粗鬆症学会ジョイントシンポジウム] 骨芽細胞に

- におけるビタミン K 作用の新展開—新規標的分子の探索とその発現制御機構の解析 (2006.10.12-14) 第 8 回日本骨粗鬆症学会 (東京)
20. 伊地知暢広、池田和博、八木研、岡崎康司、井上聡：脂肪細胞分化・形成におけるエストロゲン受容体の発現調節 (2006.10.27-28) 日本肥満学会 (神戸)
  21. 池田和博、中里権恵、竹田省、井上聡：ウイルス感染防御に関わる TRIM ファミリー遺伝子のインターフェロンを介する発現制御 (2006.11.19-21) 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (名古屋)
  22. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：E3 リガーゼ Efp による蛋白修飾と細胞周期制御機構ならびに癌組織におけるその発現検討 (2006.11.25) 東京大学生命科学研究ネットワーク・シンポジウム (東京)
  23. 井上聡：核内受容体の標的因子ネットワークの解明とその応用 (2006.12.21) 第 3 回先端医療開発研究クラスター 第 2 回疾患生命工学センター 第 2 回 22 世紀医療センター 第 4 回医工連携研究会 合同シンポジウム (東京)
  24. 池田和博、中里権恵、堀江公仁子、井上聡：TRIM ファミリーに属する Efp 遺伝子のインターフェロンによる転写調節 (2007.1.25-27) 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ (転写研究会共催) (新潟)
  25. 井上聡：骨とアンチエイジング (2007.2.4) 日本抗加齢医学会専門医・指導医認定委員会講習会 (東京)
  26. 井上聡：生体においてステロイドホルモンが担うゲノムネットワークの解明 (2007.2.16) 第 3 回ゲノムネットワークプロジェクト公開シンポジウム 医学・生物学へ展開するゲノムネットワーク (東京)
  27. 井上聡：[ミニレクチャー] 核内受容体 SXR を介するビタミン K の新しいシグナル伝達 (2007.2.17) 第 10 回 Vitamin K & Aging 研究会 (東京)
  28. 井上聡：[シンポジウム]ゲノム医学とアンチエイジング( 2007.2.24) 第 3 回東京抗加齢医学研究会 (東京)
  29. 井上聡：核内受容体の標的因子ネットワークの解明とその臨床への応用 (2007.3.2) 東京大学臨床展開研究シンポジウム (東京)
  30. 井上聡：ゲノム結合部位同定によるアンドロゲン受容体標的遺伝子の系統的探索 (2007.3.9-10) 第 7 回ステロイドホルモンを考える会 (東京)
  31. 井上聡：ビタミン K の核内受容体を介する新しい作用機構 (2007.3.16) 第 315 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (東京)
  32. 山形薫、福田亨、藤山沙理、越田伊織、武山健一、松本高広、北川浩史、加藤茂明：DEAD Box RNA helicase p72/p68 による miRNA processing の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  33. 吉村公宏、北川浩史、竹澤慎一郎、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：新規ビタミン D レセプター (VDR) 相互作用因子複合体 WINAC の生体内高次機能の解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  34. 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 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  35. 馬場敦史、大竹史明、三木ひろみ、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明：



- 肝臓特異的 FXR 転写共役因子複合体精製の新たな試み (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
36. 岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：細胞周期依存的な ER  $\alpha$  の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  37. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、鈴木絵里子、Yue Zhao、山形薫、田辺真彦、Alexander Kouzmenko、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明：分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター新規転写共役因子 BAHD1 の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  38. 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 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  39. 高田伊知郎、須澤美幸、松本邦弘、加藤茂明：ヒストン修飾を介した Wnt シグナルと核内レセプター PPAR  $\gamma$  のクロストーク分子機構の解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  40. 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：骨芽細胞分化関連因子 Msx2 はビタミン K の標的遺伝子である (2006.7.6-8) 第 24 回日本骨代謝学会学術集会 (東京)
  41. 北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、大矢博之、加藤茂明：ビタミン D 受容体転写制御におけるクロマチンリモデリング因子群の役割 (2006.5.19-21) 第 79 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
  42. 堺隆一：シグナルドッキング分子と癌 (2006.2.23) 第 15 回広島大学・広島がんセミナー学術講演会 (広島)
  43. 黄錦鴻、堺隆一、古市貞一：小脳顆粒細胞軸索の伸長におけるチロシンリン酸化ドッキング蛋白質 Cas の役割の解析 (2006.7.19-21) 第 29 回日本神経科学大会 (京都)
  44. 堺隆一：神経細胞の分化増殖異常と癌 (2006.7.19-21) 第 29 回日本神経科学大会 (京都)
  45. 三宅泉、上北尚正、堺隆一：神経芽腫細胞株における ShcC シグナルの分化・増殖に対する影響 (2006.9.28-30) 第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜)
  46. 上北尚正、堺隆一：がん細胞の足場非依存性増殖における CDCP1 による新規シグナル伝達機構の解析 (2006.9.28-30) 第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜)
  47. 賈琳、上北尚正、柳原五吉、堺隆一：Cortactin のリン酸化によるがん細胞の運動制御機構の解析 (2006.9.28-30) 第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜)
  48. 田中正光、堺隆一：Eph-ephrin を介した腫瘍制御機構 (2006.9.28-30) 第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜)
  49. 津久井通、今澤由紀子、井上聡：ビタミン K 依存性  $\gamma$ -カルボキシラーゼトランスジェニックマウスにおける骨作用の解析 (2006.10.1) 第 2 回 Bone Forum in Hanno (埼玉)

分担研究報告書

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）  
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】

性ホルモン（アンドロゲン・エストロゲン）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。内分泌機構を介して間接的な骨組織に対する作用なのか、あるいは骨組織を構成している細胞群に直接的に作用するのかは未だ明らかでなく、後者の場合、骨細胞・破骨細胞・骨芽細胞のいずれ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り、培養細胞を用いた研究が中心となっているが生体内高次機能の探索には十分とはいえない。そこで、破骨細胞特異的なエストロゲンレセプター（ER）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ERを直接的に介したエストロゲンによる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ハイ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破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を活発に繰り返している（骨リモデリング）。この過程は、骨吸収と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おり、閉経後骨粗

鬆症における骨折予防を目的として、ホルモン補充療法（HRT:Hormone Replacement Therapy）が導入されたがホルモン作用の副作用が認められたため、副作用改善を目的として、比較的骨量回復のみを認める合成リガンドとしてSERM(Selective Estrogen Receptor Modulator)が導入されてはいるもののその詳細な作用メカニズムは不明である。

エスト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エストロゲン受容体（ER）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。ところが、全身的ER遺伝子欠損マウスでは、アンドロゲンをはじめとした全身の内分泌バランスによるホメオスタシスの維持のため、骨量に著明な変化は認めな

い。そこで本研究では骨組織特異的にER遺伝子を破壊することによりERの骨組織における高次機能解明を目的に、昨年度報告したCre/loxPシステムを利用した破骨細胞特異的Cre発現マウスを用いることにより、破骨細胞特異的ER遺伝子欠損マウスを作成し、その骨組織変異を解析した。

## B. 研究方法

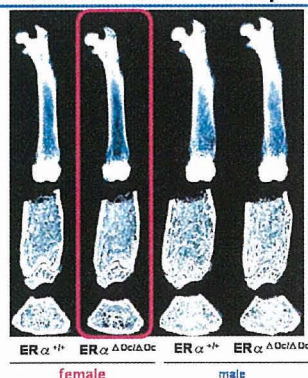
昨年度報告した破骨細胞特異的Creリコンビナーゼ発現マウスであるCathepsin K-Creノックインマウス (Ctsk-Cre) と floxed ERマウスと交配する事で、破骨細胞特異的ERKOマウス (OcERKO) を得た。12週齢の雌マウスを用いて、DEXA法による骨密度測定、 $\mu$ CTによる骨構造解析、さらに骨形態計測法による骨組織の動態について解析を行った。

## C. 研究結果

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事から、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1)。

図1

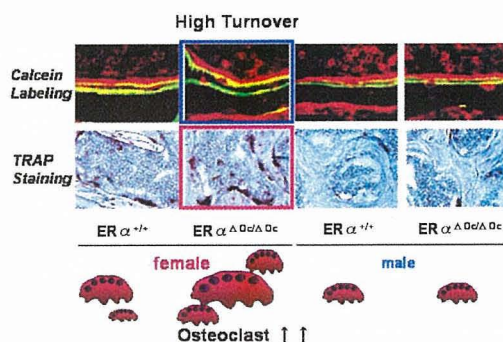
**Female OcER  $\alpha$ KO mice develop osteopenia**



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事が明らかとなった(図2)。

図2

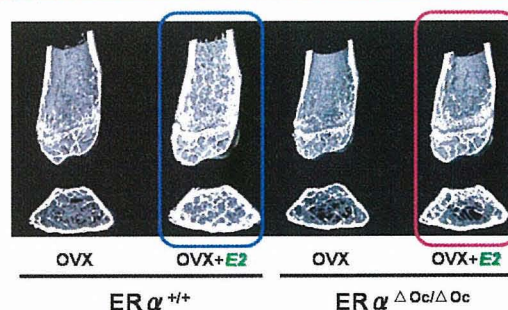
**Female OcER  $\alpha$ KO mice develop osteopenia**



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事が分かった。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3, 4)。

図3

**E2 Replacement Effect Doesn't Occur in Female OcER  $\alpha$ KO**



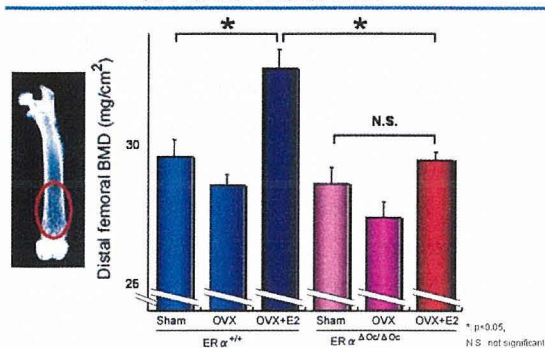
## D. 考察

本研究では破骨細胞特異的ERKOマウスを作成する事で、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

図 4

**E2 Replacement Effect Doesn't Occur in Female OcER  $\alpha$ KO**



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。

E. 結論

本研究は破骨細胞特異的 ERKO マウスの作出および解析により、破骨細胞内 ER 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. 研究発表

1. 論文発表

- Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566, 2007.
- Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, Nakamura T, Akimoto C, Yamamoto Y, Katagiri T, Foulds C, Takezawa S, Kitagawa H, Takeyama K, O'Malley BW, Kato S: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. *Nat Cell Biol* (in press)
- Takezawa S, Yokoyama A, Okada M, Fujiki R, Iriyama A, Yanagi Y, Ito H, Takada I, Kishimoto M, Miyajima A, Takeyama K, Umesono K, Kitagawa H, Kato S: A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor (PNR). *EMBO J* 26, 764-774, 2007.
- Yamaoka K, Shindo M, Iwasaki K, Yamaoka I, Yamamoto Y, Kitagawa H, Kato S: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch Biochem Biophys* (in press)
- Memezawa A, Takada I, Takeyama K, Igarashi M, Ito S, Aiba S, Kato S, Kouzmenko AP: Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* (in press)
- Kim M-S, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamamoto K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K, Kato S:

- 1alpha, 25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 21, 334-342, 2007.
7. 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, 2006.
  8. 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.
  9. Yamaoka K, Kim M-S, Takada I, Takeyama K, Kamimura T, Kato S: Culture serum-induced conversion from agonist to antagonist of a Vitamin D analog, TEI-9647. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100, 177-183, 2006.
  10. Kishimoto M, Fujiki R, Takezawa S, Sasaki Y, Nakamura T, Yamaoka K, Kitagawa H, Kato S: Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrinol J* 53, 157-172, 2006.
  11. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S, Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung U, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nature Medicine* 12, 665-670, 2006.
  12. 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.
  13. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 11736-11741, 2006.
  14. Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J: Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol* 26, 7966-7976, 2006.
  15. Katsu Y, Kohno S, Oka T, Mitsui N, Tooi O, Santo N, Urushitani H, Fukumoto Y, Kuwabara K, Ashikaga K, Minami S, Kato S, Ohta Y, Guille L Jr, Iguchi T: Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol Cell Endocrinol* 257-258, 84-94, 2006.
  16. Ma Y, Khalifa B, Yee YK, Lu J, Memezawa A, Savkur RS, Yamamoto Y, Chintalacheruvu SR, Yamaoka K, Stayrook KR, Bramlett KS, Zeng QQ, Chandrasekhar S, Yu XP, Linebarger JH, Iturria SJ, Burris TP, Kato S, Chin WW, Nagpal S: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest* 116,

892-904, 2006.

17. Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. *J Biol Chem* (in press)
18. Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A, Saito I, Kitagawa H, Kato S, Saruta T, Itoh H: Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J Biol Chem* 282, 1998-2010, 2007.

## 2. 学会発表

### 【国際】

1. Suzuki E, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Maki A, Zhao Y, Yamagata K, Furutani T, Kouzmenko A, Tanabe M, Takeyama K, Kato S: E2F transcriptional activation as a potential mechanism of neurodegeneration of polyglutamine expansion androgen receptor mutants. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
2. Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Matsumoto T, Kato S: Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' *in vivo*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
3. Takeyama K, Ito S, Sawatsubashi S, Shirode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Kouzmenko A, Kato S: *Drosophila* genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
4. Baba A, Ohtake F, Kato S: Modulation of estrogen signaling by dioxin receptor and associated complexes. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
5. Yokoyama A, Takezawa S, Okada M, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S: Identification and functional analysis of cell-cycle specific co-repressor complex, Dev-CoR complex. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
6. Zhao Y, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Sawatsubashi S, Shirode Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Tanabe M, Kato S: Isolation of androgen receptor co-regulators regulating the alteration of chromatin structure using modified position effect variegation system in *Drosophila*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
7. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
8. Kato S: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes. 13<sup>th</sup> Workshop on Vitamin D, Victoria, Canada (2006.4.7-12)
9. Kato S: Function of co-regulator complexes for nuclear receptors. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
10. Ito S, Takeyama K, Sawatsubashi S, Suzuki E, Kouzmenko A, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Shirode Y, Tabata T, Kato S: Identification of a novel co-regulator of nuclear receptors by *Drosophila* genetic system.

- Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
11. Sawatsubashi S, Takeyama K, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Yamagata K, Shirode Y, Tabata T, Kato S: Functional analysis of ecdysone receptor-mediated transcription through alteration of chromatin structure. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
  12. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Ohya H, Kato S: Functional analysis of a novel ATP dependent chromatin remodeling complex 'WINAC'. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
  13. Kato S: Modulation of estrogen receptor signaling by activated dioxin receptor. Gordon Research Conference "Environmental Endocrine Disruptors". Pisa, Italy (2006.6.4-9)
  14. Kato S:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by VDR on the human CYP27B1 gene promoter mediates the DNA methylation. Adrenal 2006/ Molecular Steroidogenesis 5, Boston, USA (2006.6.20-23)
  15. Kato S: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts. 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Athens, Greece (2006.9.13-17)
  16. Kim M-S, Murayama A, Fujiki R, Takeyama K, Kato S:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR. ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
  17. Igarashi M, Yogiashi Y, Mihara M, Takada I, Kitagawa H, Kato S: Vitamin K stimulates osteoblastogenesis through PXR/SXR-mediated Msx2 induction. ASBMR 28<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
  18. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research 2006
  19. Kato S: Bone remodelling and the roles of nuclear receptor. 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Port Douglas, Australia (2006.10.22-26)
  20. Kato S: Nuclear steroid receptors and bone remodeling. Annual Autumn Symposium of Korean Society of Endocrinology, Busan, Korea (2006.11.3-4)
  21. Kato S: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research (AuSBMR) 2006, Vienna, Austria (2006.11.16-18)
  22. Kato S: Transcriptional pathways in the treatment of bone disease. Salk/Nature/Ipsen Foundation Symposium on Biological Complexity: Diseases of Transcription, La Jolla, USA (2007.1.11-14)
- 【国内】
1. 山形薫、福田亨、藤山沙理、越田伊織、武山健一、松本高広、北川浩史、加藤茂明: DEAD Box RNA helicase p72/p68 による miRNA processing の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
  2. 吉村公宏、北川浩史、竹澤慎一郎、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：新規ビタミン D レセプター (VDR)相互作用因子複合体 WINAC の生体内高次機能の解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
3. 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 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
4. 馬場敦史、大竹史明、三木ひろみ、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明：肝臓特異的 FXR 転写共役因子複合体精製の新たな試み (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
5. 岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明：細胞周期依存的な ER  $\alpha$  の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
6. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、鈴木絵里子、Yue Zhao、山形薫、田辺真彦、Alexander Kouzmenko、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明：分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター新規転写共役因子 BAHD1 の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
7. 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ソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
8. 高田伊知郎、須澤美幸、松本邦弘、加藤茂明：ヒストン修飾を介した Wnt シグナルと核内レセプター PPAR  $\gamma$  のクロストーク分子機構の解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
9. 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：骨芽細胞分化関連因子 Msx2 はビタミンKの標的遺伝子である (2006.7.6-8) 第 24 回日本骨代謝学会学術集会 (東京)
10. 北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、大矢博之、加藤茂明：ビタミン D 受容体転写制御におけるクロマチンリモデリング因子群の役割 (2006.5.19-21) 第 79 回日本内分泌学会学術総会 (神戸)

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長

【研究要旨】

骨粗鬆症や変形性関節症の原因となる骨細胞系・軟骨細胞系の細胞の増殖・機能異常の本態を理解し、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、その予防・診断・治療などの面でも極めて重要である。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・骨芽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・変形性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。これまでに我々は欠損変異体や RNAi などの手法を用いて Paxillin、ephrin-B、Cas などの新しい機能を見いだすことに成功した。これらの機能は骨・軟骨系の分化や機能維持に密接に関係していると考えられ、さらには骨粗鬆症や変形性関節症などの疾患に対する選択的な治療薬開発につながると考えられる。

A. 研究目的

他の組織と同様に骨や軟骨の維持や修復にも多くの細胞内蛋白質群を介したシグナル伝達系が関与している。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、間接軟骨の量的・質的異常をその一因とする変形性関節症は、加齢、外的ストレス、ホルモンバランスなど幾つかの要因で増殖や機能調節の適切なコントロールが崩れた状態であり、他の内臓疾患と全く同様にその増殖や機能を司る蛋白質群の解析が重要であることは明らかである。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種々の刺激が、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、骨粗鬆症・変形性関節症の病態と、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解明することを目指している。

骨・軟骨系細胞でのシグナル伝達には多くの分子群の関わりが指摘されているが、本研究で特に焦点を絞って解析するのは、非受容体型チロシンキナーゼに分類される Src ファミリーのチロシンキナーゼとそれによってチロシンリン酸化を受ける基質蛋白質群を介したシグナル伝達系である。Src ファミリーキナーゼは非常に多彩ないくつもの生理機能を持ちその多くは骨軟骨組織においても極めて重要である。

まずは細胞と細胞外基質と間での接着刺激の情報を受け取るインテグリンシグナルの媒介分子としての役割である。骨粗鬆症の病態に関与する破骨細胞はその骨吸収作用を発揮するために骨基質と接着したり移動したりする事が必要で、そのため細胞表面のインテグリン $\alpha V\beta 3$ を中心とするインテグリンが接着刺激を受け取る。このような接着能・運動能を維持し、機能を発揮するにはインテグリンシグナルを細胞内に伝える Src キナーゼが必要である。また変形性関節症で病的減少が見られる軟骨細胞の増殖には回りのコラーゲンによるインテグリン $\alpha 1/\alpha 2\beta 1$ 複合体刺激が必要で、細胞内シグナル伝達はやはり Src キナーゼからその基質であるパキシリン、PYK、コルタクチンなどのリン酸化を介する経路を用いると考えられる。

また同様に細胞-細胞間の接着においても Src キナーゼはそれを直接感知するカドヘリン分子群や Eph-ephrin 分子群の直下において、接着の情報を細胞内に伝える役割を果たしている。骨芽細胞表面に発現する EphB 蛋白質と破骨細胞表面に発現する ephrin-B 蛋白質は、両方の細胞が接触したときに双方向に活性化のシグナルを送りそれぞれの細胞のコントロールを行うことが最近明らかになって注目を集めている。この破骨細胞における ephrin-B 活性化のプロセスにおいても、Src キナーゼによるリン酸化が重要な役

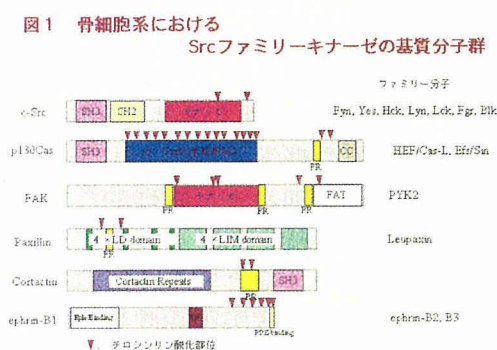
割をしていることがわかっている。

さらにはそのメカニズムの詳細は明らかになっていないが、マトリックスメタロプロテナーゼの分泌も Src キナーゼ経路との深い関わりが指摘されている。マトリックスメタロプロテナーゼの分泌は骨粗鬆症における破骨細胞による骨吸収にも深く関わっているが、同時に変形性関節症における軟骨組織の破壊においてもその寄与が示唆されているものである。

骨・軟骨の生理学的役割の中で最も大きいのが体躯に加わった物理的な外力から重要な他の組織を保護し、更にその力を吸収するということである。このようなメカニカルな刺激が実際骨粗鬆症や変形性関節症の成因と深く関わることは以前から知られているが、最近の知見としては、幾つかの Src キナーゼの基質分子が細胞に外力が加わった時にチロシンリン酸化され、そのようなメカニカルストレスのシグナルを細胞内に伝えることが明らかになった。これらのメカニカルストレスのシグナルを解明することは、これらの疾患の研究において重要な課題である。

このように多彩な機能が骨・軟骨系の維持にも重要であると考えられる Src ファミリーキナーゼであるが、ノックアウトマウスの解析から破骨細胞では Src ファミリーのうち c-Src が機能維持に中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。ただ Src ファミリーに属する Fyn や Yes なども広範な組織において発現を認めるため、骨芽細胞・軟骨細胞など他の細胞系において役割を果たしている可能性があるが、現時点では Src ファミリーの使い分けについては明らかになっていない部分が多い。Src ファミリーキナーゼはチロシンキナーゼの酵素としてその生理機能を発揮すると考えられるが、数多くの分子が潜在的に Src ファミリーの基質となりうる。骨・軟骨系において発現する Src ファミリーキナーゼ

が、臓器特異的に、そして機能特異的に多くの基質のチロシンリン酸化に関わっていると考えられるが、どの基質がどのような骨・軟骨の機能を制御しているのかは未だに明らかにされていない場合が多い(図1)。



Src ファミリーの各組織における機能を正確に理解するには、その場でリン酸化を受ける基質の同定と、基質が下流に伝えるシグナルを明らかにすることが極めて重要である。

その方向からのアプローチが遅れている背景には、このような基質蛋白質の機能解析に現在主流となった DNA チップのような発現量解析では情報を得るのが難しい幾つかの情報、すなわち 1) 蛋白質のチロシンリン酸化の状態、2) 蛋白質の複合体形成とその結合相手、3) 蛋白質の細胞内局在、などの情報が必要不可欠である事がある。我々はこの目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を行ってきた。この手法と、プロテオーム解析や古典的な細胞生物学的解析をうまく組み合わせることで研究を押し進めることにより、各種刺激により骨・軟骨細胞に起こる細胞内変化に蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成-細胞内局在の4つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。また、蛋白質の解析にはサンプル量が増やせることが必要になってく

る場合が多いので、機能を解析する実験は骨肉腫細胞を初めとする固形腫瘍細胞を用いて、骨・軟骨系においても高発現している個々の Src の基質群の機能の詳細を明らかにして、骨・軟骨系のモデル系を構築することを行ってきた。

最終的には骨・軟骨細胞系における Src ファミリーの活性化、各々の基質分子のリン酸化のメカニズムと、その媒介する細胞内シグナルの情報に基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいはシグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

以上のような解析により病態と Src ファミリーのシグナルの関わりをできる限り正確に把握し、骨粗鬆症・変形性関節症の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

## B. 研究方法

これまで何年間も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だし、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