

が見られ、発生過程で神経堤由来の細胞の運動能や運動方向を制御していると考えられる。今までの研究は Eph-ephrin の受容体ーリガンド相互作用によって細胞間接着で接触した細胞同志に双方向性のシグナルを送り repulsion や adhesion の指令を出すことがこの系の主要な役割として解析が進められてきたが、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、などを見いだし報告してきた。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。

C. 研究結果

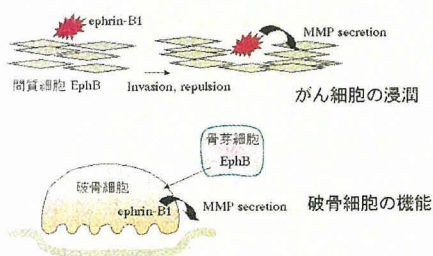
(1) ephrin-B1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

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 ephrin-B1 と結合能を持ち、細胞間接着に伴い claudin が膜表面に集積することで ephrin-B1 がリン酸化するという新しいメカニズムを見いだした。このような受容体を介さない ephrin-B1 の活性化は、他の機序によっても起こると考えられ、その1つとして細胞ー基質間接着でイン

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 ephrinB-1 がリン酸化するメカニズムがあると考えている。

ephrin-B1 を高発現する膵癌細胞で、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つたことから、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わることを示唆された(図2)。

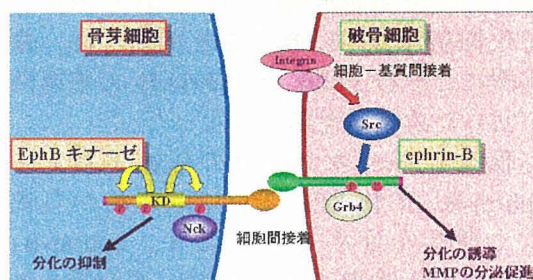
図2 ephrin-B1を介したシグナルによるMMP分泌の制御



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事が確認された。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3)。

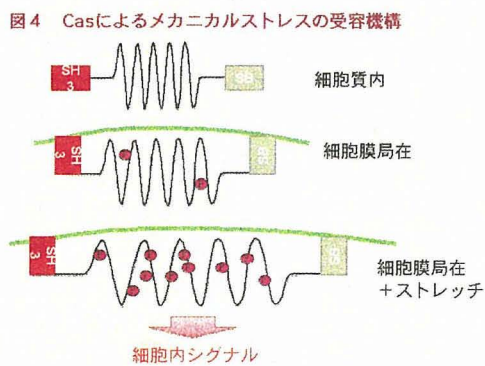
図3 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能



(2) メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わりへの解析

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局限してみられる。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 Rap 1 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 4)。



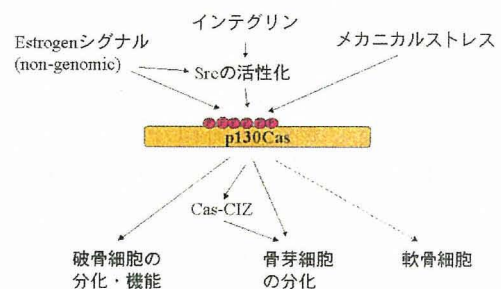
現在、Cas のリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析している。これまでの解析でこの領域 (Cas-CT) を欠損した変異体は Src との結合能を失うばかりでなく、チロシンリン酸化のレベルも顕著に低下することがわかっている。Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を用いて Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすることにより、細胞におけるメカニカルストレス受容の変化を観察して Cas の下流シグナルの生物学的意義をさらに解析したい。

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。

D. 考察

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 5)。

図 5 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 α V β 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。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もっと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。

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固形腫瘍や線維芽細胞のモデル系を使った機能解析が中心であ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。

E. 結論

多くの環境的要因や加齢による変化が引き金となる骨粗鬆症や変形性関節症などのような代謝性疾患は、特定の遺伝子の変異や発現の ON/OFF のようなはつき

りとしたスイッチがあると考えるよりも、複数の蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で「疾患遺伝子」を研究する際に、疾患の引き金となる遺伝子変化を追い求めるだけでなく、疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。数多くの細胞外の刺激を細胞機能に反映するためのセンサーである細胞内リン酸化蛋白質群は、多くの環境要因のエフェクターとして働く可能性が強く考えられ、さらにはリン酸化蛋白質群の解析は、通常のマイクロアレイ法や2次元スポット解析だけでは手の届かない未開拓の分野である。治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考ええる。Src キナーゼに関わる細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることが可能になると考える。今後最も重要な点は、骨・軟骨代謝・機能を特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

F. 発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.

3. 堺隆一: 「癌の浸潤・転移をコントロールする Src キナーゼ基質群の役割」実験医学 24(18) p2947-2952, 2006 年

2. 学会発表

【国際】

1. Sakai R, Miyake I: Analysis of domain functions of ShcC protein in neuroblastoma. 12th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Los Angeles, USA, 2006 (2006.5.17-20)
2. 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】

1. 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)
2. 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)

3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)

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

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

分担研究者 津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 講師

【研究要旨】

多因子性疾患である骨粗鬆症・変形性関節症疾患遺伝子について、その疾患因子候補としてのエストロゲン、ビタミン K 関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを作製した。これらのトランスジェニックマウスをコンディショナルに骨組織もしくは肝臓で過剰発現させる系を確立し、遺伝子情報制御因子の生体での機能解析を行った。エストロゲンと変形性関節症（OA: Osteoarthritis）との関係は、古くから閉経後の女性で OA の有病率が増加することから、エストロゲンと OA との関与の可能性が考えられてきたが、未だ不明な点が多い。エストロゲンシグナルを非リガンド依存的に活性化できるエストロゲンの変異レセプター（caER α および caER β ）を軟骨組織で過剰発現することにより、エストロゲンシグナルの軟骨組織・膝関節における作用の関与を示唆した。またビタミン K の関連因子として知られるヒト GGCX (γ -カルボキシラーゼ)を肝臓で過剰発現させた結果、低回転型の骨代謝で骨形成より骨吸収優位の状態であり、未成熟な骨量増加、多核破骨細胞の減少および骨吸収の抑制が観察された。

A. 研究目的

最近の報告では、エストロゲンとその代謝物の血中濃度とOAとの関与が示唆されている。また骨粗鬆症の治療薬としてその有効性または可能性が高いことが報告されている物質について、カルシトニン、ビタミンD、ビタミンK、PTH、エストロゲン、ビスホネートが治療薬として考えられており、また実際に臨床におけるデータよりその有効性が示されているが、その作用機序・骨代謝以外のリスク等については、未だ不明な点が多く生体内での機能解析が必須と考えられる。これらの生体内での作用メカニズムを分子レベルで解明し、骨粗鬆症疾患遺伝子の検索、シグナル伝達、および相互作用に関する研究を行うことで、新規の治療

法および創薬の可能性を示すことが、今後の重要な研究課題と考えられる。とりわけ将来的な治療法として極めて重要なコンセプトとして、生体内で副作用が少なく骨形成作用を持つ新規因子の同定が急務と考えられる。加えて、骨粗鬆症疾患とならんで変形性関節症は、“痛み”を伴う骨疾患で、健康長寿を脅かす大きなリスクファクターと考えられる。

本研究課題における分担項目として、エストロゲンおよびビタミンK関連遺伝子について、遺伝子改変マウスを解析することにより、動物個体を利用することでしか得られない、重力化での骨代謝における生体機能、薬剤の効果・影響について個体丸ごとを活用した系で検討できる点が遺伝子改変マウスを使用する利点

と考えられる。その際、実際に骨代謝で重要と考えられる候補因子群について、マウスで遺伝子改変を行った場合、これらの個体においては、種々の理由(例えば、軟骨形成異常、肺呼吸不全、授乳不可能等)から胎生期で致死となる可能性が高く、遺伝子改変マウスをライン化して、再現性および信頼できるデータとして吟味することが困難であった。それら問題点を改善するため、本研究課題では、コンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスシステムを開発し、個体での網羅的な解析を行う。

最終目的は、本研究課題により明らかにされると期待できる候補因子群を同定し、これらの因子群の生体内における骨作用を解明し、これらの因子の相互作用やシグナル伝達に関する研究を通して、違う作用点を持つと考えられる新規因子について分子レベルで骨粗鬆症・変形性関節症を体系的に解明することである。さらに、本研究課題で作製される遺伝子改変モデル動物を利用して、これらの因子の骨代謝における生体作用、病態のメカニズム、治療法への応用性を検討し、治療法への新たなコンセプトの提案および新薬の開発に貢献することを目指した。

B. 研究方法

分担者の研究分担項目のうち、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。特に分担者は、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 γ -カルボキシラーゼ(GGCX)の骨作用について検討を行う。分担研究者は新規遺伝子情報制御因子・標的因子候補としてエストロゲンシグナ

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。

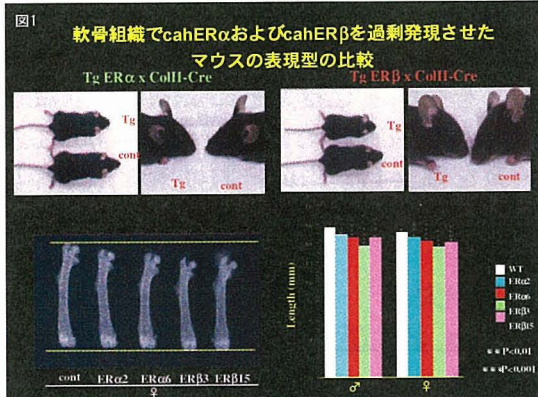
1. 活性型 caER α 、および caER β Tgマウスの作製およびその解析
2. 骨組織または肝臓特異的に遺伝子改変するための組換え酵素 Cre を発現するマウスの準備および実験系の確立
3. ビタミンK依存性 γ -カルボキシラーゼのcTgマウスの作製およびその解析
4. 1,2および3で作製した遺伝子改変マウスを交配させることにより、骨組織または肝臓特異的にgain of functionする系を確立し、生体における骨代謝作用について検討する。

C. 研究結果

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タンパク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いだした。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(CollII)-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1)。また、3週齢幼



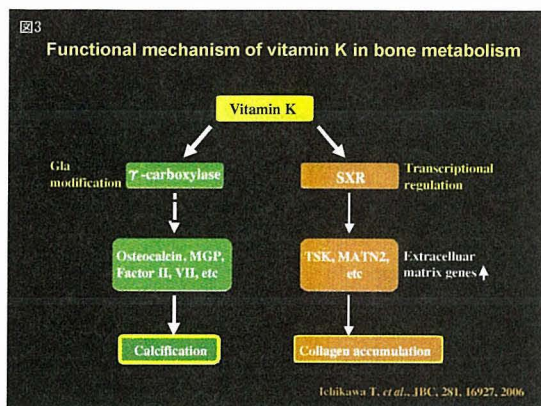
若マウスにおいて骨組織での表現型の解析を行った結果、頭蓋形成異常、頸椎不全、体長の短縮、骨長への作用の可能性が示唆された(図2)。さらに、時系列的に成熟マウス(15週齢♀)における膝関節領域の解析を行った結果、対照区では、一般的には脂肪層と細胞外マトリックスで満たされた領域により膝関節でのスムーズな歩行運動が可能と考えられるが、ER β シグナルを過剰発現したマウスの十



時靭帯では、脂肪層の顕著な減少が観察された。ER α 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 β 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 α およびER β 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OA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OA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、ビタミンK依存性 γ -カルボキシラーゼで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Ca²⁺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3)。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により大腿骨部の骨密度および骨塩含量を検査した結果、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査した結果、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

エストロゲンシグナルとOA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caERαおよびcaERβ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、ERαおよびERβ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OA様の表現型を示す個体が得られ

た。しかしERαおよびERβ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OA発症の関与については、関節腔や関節軟骨等、ERαおよびERβ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ERαおよびERβシグナルを区別して、エストロゲンの軟骨作用およびOA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化タンパク質の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、血中の分泌タンパク質もしくは肝臓で合成されるタンパク質でGla化修飾の制御を受けるタンパク質が存在し、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

エストロゲンシグナルとOAとの関係については、軟骨組織でエストロゲンシグナルを過剰発現した場合、マウス個体においてOA様の表現型を示すことが観察され、軟骨組織におけるエストロゲンシグナルの破綻が細胞の分化・増殖、も

しくはコラーゲン、細胞外マトリックス、および脂肪等の分解・合成関連因子と作用する可能性が示唆され、エストロゲンシグナルがOAの発症に関与することが示唆された。

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作用に関しては、マウス肝臓でヒトGGCXを過剰発現することで、骨代謝は低回転型を示し骨形成より骨吸収が優位な状態となり、未成熟な骨量の増加が表現型として観察され、また肝臓機能を介して骨吸収を抑制する作用をもつGla化標的タンパク質が存在する可能性が示唆された。

F. 発表

1. 発表論文

1. Tsukui T, Imazawa Y, Inoue S: Role of estrogen signaling in male bone. *Clin Calcium* 3, 468-472, 2006.

2. 学会発表

【国内】

1. 津久井通、今澤由紀子、井上聡：ビタミンK依存性 γ -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)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, <u>Inoue S</u>	Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells.	<i>J Biol Chem</i>	281	Cover and 16927-16934	2006
9	Horie-Inoue K, Takayama K, Bono H, Ouchi Y, Okazaki Y, <u>Inoue S</u>	Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	339	99-106	2006
17	Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, <u>Inoue S</u> , Kondo T	17-beta-Estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cell.	<i>J Biol Chem</i>	281	13092-13102	2006
28	Shukuwa K, Izumi SI, Hishikawa Y, Ejima K, <u>Inoue S</u> , 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.	<i>Histochem Cell Biol</i>	126	111-123	2006
41	Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, <u>Inoue S</u>	A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	351	540-546	2006
48	Takeuchi T, <u>Inoue S</u> , Yokosawa H	Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	348	473-477	2006
53	Horie-Inoue K, <u>Inoue S</u>	Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancer.	<i>Semin in Cancer Biol</i>	16	235-239	2006
58	Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	<i>Spine</i>	32	25-29	2007

63	Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, <u>Inoue S</u> , 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
69	Fujita M, Sugama S, Nakai M, Takenouchi T, Wei J, Urano T, <u>Inoue S</u> , Hashimoto M	Alpha -synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: Relevance to downregulation of proteasome activity.	J Biol Chem	282	5736-5748	2007
82	Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, <u>Inoue S</u> , 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
91	Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, <u>Inoue S</u>	Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis.	Oncogene	in press		
102	Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, <u>Inoue S</u> , Sasano H	Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor.	Cancer Sci	in press		
110	Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women.	J Bone Miner Metab	in press		
122	Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, <u>Inoue S</u>	Increased expression of Estrogen-Related Receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer.	Int J Cancer	in press		
128	Usui T, Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density.	Geriatric Gerontol Int	in press		
134	Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	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		

145	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, <u>Kato S</u> , Kawaguchi H	Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification.	<i>Nature Medicine</i>	12	665-670	2006
151	Li M, Hener P, Zhang Z, <u>Kato S</u> , Metzger D, Chambon P	Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	103	11736-11741	2006
157	Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, <u>Kato S</u> , Kimura K, Yanagisawa J	Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis.	<i>Mol Cell Biol</i>	26	7966-7976	2006
168	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, <u>Kato S</u> , Chin WW, Nagpal S	Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators.	<i>J Clin Invest</i>	116	892-904	2006
181	Kim M-S, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamamoto K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K, <u>Kato S</u>	1alpha, 25(OH)2D3 -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter.	<i>Mol Endocrinol</i>	21	334-342	2007
190	Memezawa A, Takad I, Takeyama K, Igarashi M, Ito S, Aiba S, <u>Kato S</u> , Kouzmenko AP	Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes.	<i>Oncogene</i>	in press		
198	Yamaoka K, Shindo M, Iwasaki K, Yamaoka I, Yamamoto Y, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR.	<i>Arch Biochem Biophys</i>	in press		
204	Huang J, <u>Sakai R</u> , Furuichi T	The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons.	<i>Mol Biol Cell</i>	17	3187-3196	2006

214	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.	<i>Cell</i>	127	1015-1026	2006
226	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.	<i>Nature</i>	446	562-566	2007
231	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.	<i>Nature</i>	in press		

刊行物の別刷

the journal of biological chemistry

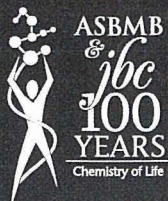
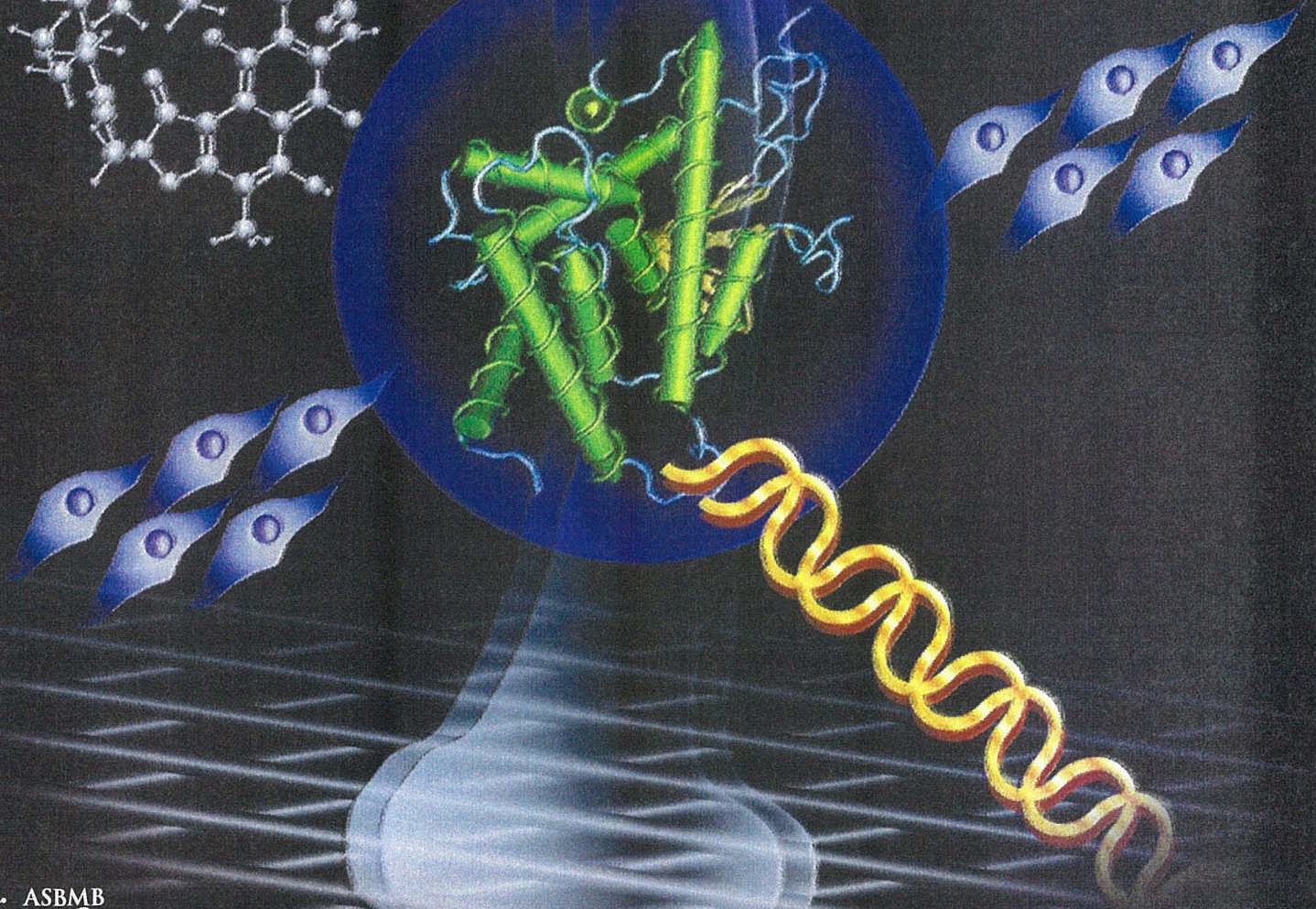
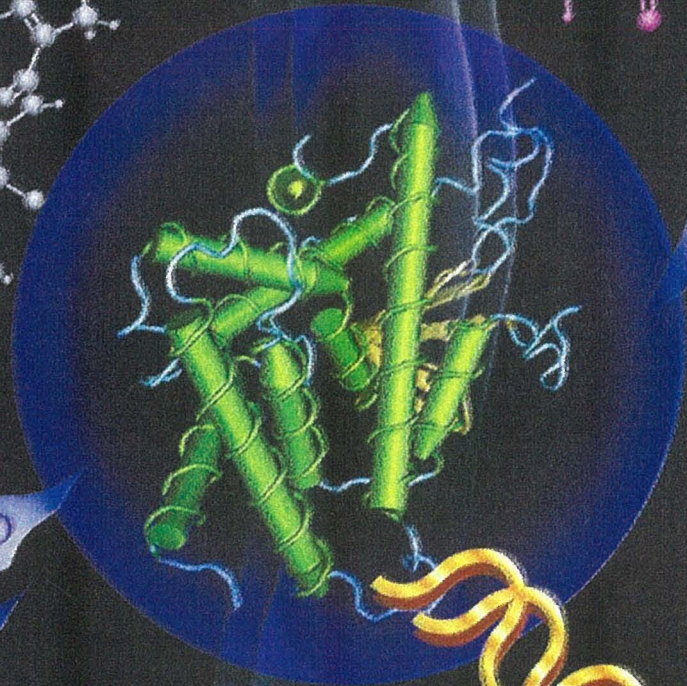
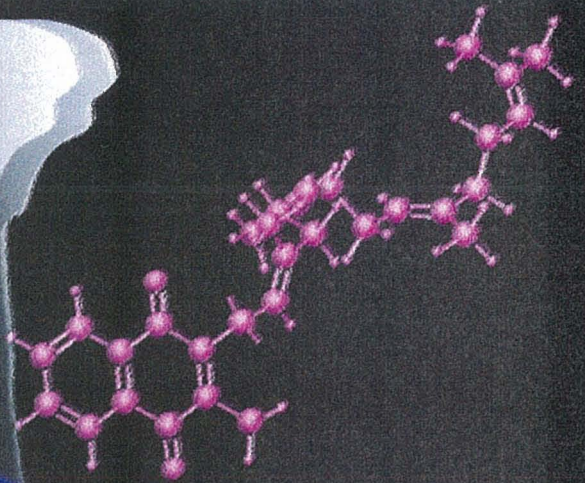
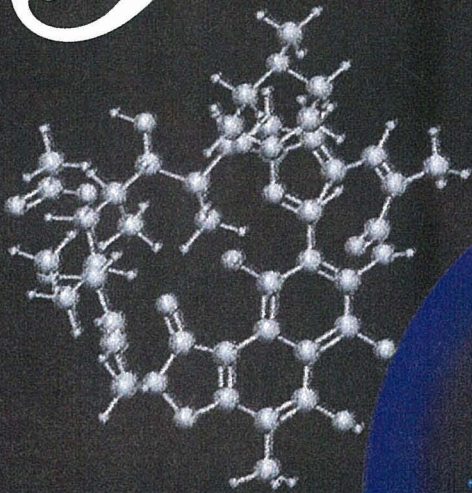
jbc

ASBMB

JUNE 23, 2006

VOLUME 281

NUMBER 25



AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Steroid and Xenobiotic Receptor SXR Mediates Vitamin K₂-activated Transcription of Extracellular Matrix-related Genes and Collagen Accumulation in Osteoblastic Cells*[†]

Received for publication, January 30, 2006, and in revised form, March 28, 2006 Published, JBC Papers in Press, April 10, 2006, DOI 10.1074/jbc.M600896200

Tomoe Ichikawa[‡], Kuniko Horie-Inoue[‡], Kazuhiro Ikeda[‡], Bruce Blumberg[§], and Satoshi Inoue^{‡¶1}

From the [‡]Division of Gene Regulation and Signal Transduction, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, Saitama 350-1241, Japan, the [§]Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, California 92697-2300, and the [¶]Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan

Vitamin K₂ is a critical nutrient required for blood coagulation. It also plays a key role in bone homeostasis and is a clinically effective therapeutic agent for osteoporosis. We previously demonstrated that vitamin K₂ is a transcriptional regulator of bone marker genes in osteoblastic cells and that it may potentiate bone formation by activating the steroid and xenobiotic receptor, SXR. To explore the SXR-mediated vitamin K₂ signaling network in bone homeostasis, we identified genes up-regulated by both vitamin K₂ and the prototypical SXR ligand, rifampicin, in osteoblastic cells using oligonucleotide microarray analysis and quantitative reverse transcription-PCR. Fourteen genes were up-regulated by both ligands. Among these, *tsukushi*, *matrilin-2*, and *CD14* antigen were shown to be primary SXR target genes. Moreover, collagen accumulation in osteoblastic MG63 cells was enhanced by vitamin K₂ treatment. Gain- and loss-of-function analyses showed that the small leucine-rich proteoglycan, *tsukushi*, contributes to vitamin K₂-mediated enhancement of collagen accumulation. Our results suggest a new function for vitamin K₂ in bone formation as a transcriptional regulator of extracellular matrix-related genes, that are involved in the collagen assembly.

Vitamin K is an important cofactor in blood coagulation and also known as a potent stimulator of the bone building process. Vitamin K is a family of structurally similar, fat-soluble, 2-methyl-1,4-naphthoquinones, including phyloquinone (K₁), menaquinones (K₂), and menadiolone (K₃). Vitamin K₁ and vitamin K₂ are natural vitamin Ks. The former is found in plants, whereas the latter is mainly derived from animal sources and produced by intestinal bacteria. *In vitro* studies showed that vitamin K₂ is far more active than K₁ in both promoting bone formation and reducing bone loss (1–5). Human studies have demonstrated that vitamin K₂ is an effective treatment for osteoporosis and preventing fractures (6, 7). Menaquinone-4 (MK-4)², the most common form of

vitamin K₂ containing four isoprene units, is frequently prescribed for osteoporosis in Japan.

One of the major known functions of vitamin K is the posttranslational modification of vitamin K-dependent proteins containing γ -carboxyglutamic acid (Gla) residues, most of which are related to coagulation (as reviewed in Ref. 8). In vitamin K-dependent carboxylation reactions, the reduced form of vitamin K de-protonates glutamate via the γ -glutamyl carboxylase and the reduced vitamin K is converted to vitamin K epoxide. Two such vitamin K-dependent proteins were identified in bone: osteocalcin and matrix Gla protein (MGP). Osteocalcin is a bone protein only synthesized in osteoblasts and odontoblasts. It serves as a good biochemical marker of the metabolic turnover of bone because the osteocalcin lacking Gla residues cannot bind to hydroxyapatite, one of the major components of bone matrix (9). Levels of undercarboxylated osteocalcin increase during aging and significantly correlates with fracture risk (10). Therefore, vitamin K-modified osteocalcin plays an important role in bone homeostasis. In contrast to osteocalcin, MGP is predominantly expressed in chondrocytes and vascular smooth muscle cells. *Mgp*-deficient mice exhibited inappropriate calcification of various cartilages as well as arterial walls, indicating that MGP is a modulator of extracellular matrix mineralization (11, 12). Despite structural similarities between osteocalcin and MGP, these two Gla proteins exhibit different functions. These findings suggest that vitamin K plays a significant role in bone homeostasis, although the precise mechanisms through which bone Gla proteins regulate homeostasis are complex.

During the 60-year history of vitamin K research, most of the attention has been paid to the actions of vitamin K on γ -carboxylation. We recently identified a novel mechanism of vitamin K functions via transcriptional regulation in osteoblastic cells (13). Both vitamin K₂ and the known SXR ligands rifampicin (RIF) and hyperforin up-regulated expression of the prototypical SXR target gene *CYP3A4* and bone markers such as alkaline phosphatase (*ALP*) and *MGP* (13). Our findings suggested an important role for vitamin K₂-dependent transcriptional regulation in bone homeostasis. Until now, the contribution of distinct vitamin K₂ and SXR target genes to these mechanisms remained to be studied.

In the present study, we searched for SXR target genes induced by vitamin K₂ and RIF in osteoblastic MG63 cells using microarray analysis. Several genes were identified that are up-regulated by both agonists. We focused here on the osteoblastogenic functions of extracellular matrix-related genes as SXR targets in response to vitamin K₂ treatment. Furthermore, we showed that the novel SXR target, *tsukushi* (*TSK*), plays a role in collagen accumulation in MG63 cells. Our findings indicate that vitamin K₂ activates SXR to regulate the transcription of extracellular matrix-related genes that may contribute to collagen assembly.

* This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare and from the Japan Society for the Promotion of Science and by a grant of the Genome Network Project from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and for Development of New Technology from The Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan. This work was also supported by National Institutes of Health Grant GM-060572 (to B. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] This article was selected as a Paper of the Week.

¹ To whom correspondence should be addressed: Division of Gene Regulation and Signal Transduction, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical School, 1397-1 Yamane, Hidaka-shi, Saitama 350-1241, Japan. Tel.: 81-42-985-7206; Fax: 81-42-985-7209; E-mail: s_inoue@saitama-med.ac.jp.

² The abbreviations used are: MK-4, menaquinone-4; Gla, γ -carboxyglutamic acid; MGP, matrix Gla protein; RIF, rifampicin; FBS, fetal bovine serum; CYP, cytochrome P-450; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; siRNA, small interfering RNA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—MG63 human osteosarcoma cells, 293T, and COS1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplement with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml penicillin, and 50 μg/ml streptomycin. Prior to vitamin K₂ treatment, cells were cultured in phenol red-free media containing 10% dextran-charcoal-stripped FBS.

Cloning and Construction of cDNAs—Human SXR (pCDG-SXR), human SXR containing the VP16 activation domain upstream to SXR (VP16-SXR), and tk-(3A4)₃-Luc containing three-copy SXR response elements from human cytochrome P-450 (CYP) 3A4 promoter were described previously (14–16). N-terminally FLAG-tagged pcDNA3 (Invitrogen) plasmids containing SXR (pcDNA3-FLAG-SXR) and VP16C-SXR (pcDNA3-FLAG-VP16C-SXR) were generated by PCR using pCDG-SXR and VP16-SXR as templates, respectively, and inserted in-frame to FLAG-tagged pcDNA3 at EcoRI and XhoI sites. VP16C-SXR contained 20 amino acids from the C terminus of VP16 activation domain upstream of SXR. The tsukushi (*TSK*) cDNA was isolated from first-strand cDNA derived from MG63 cells using primers 5'-CACGAATTCGCCACCATGCCGTGGCCCTGCTG-3' and 5'-CGACTCGAGCAAGATGGTGGGGCCCTGGC-3', inserted in-frame to C-terminally FLAG-tagged pcDNA3 at EcoRI and XhoI sites (pcDNA3-TSK-FLAG). DNA sequences of plasmids were determined by ABI PRISM 377 Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Luciferase Assay—Luciferase assay was performed using MG63 cells (2 × 10⁴ cells/well on 24-well plates) transfected with 115 ng of tk-(3A4)₃-Luc, 130 ng of pRL-CMV (Promega), and 5 ng of FLAG-pcDNA3 or FLAG-tagged SXR plasmids using the FuGENE 6 reagent (Roche Diagnostics). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 20 μM RIF (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan), 20 μM MK-4 (gifted by Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan), or vehicle (0.2% ethanol) for 30 h in fresh media, and luciferase activities were determined by a MicroLumatPlus microplate luminometer (Berthold Technologies) using the dual-luciferase assay system (Promega). Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase, which was used as a transfection control. The experiments were repeated three times with similar results.

Generation of Stable Cell Lines—MG63 cells were transfected with pcDNA3-FLAG-SXR, pcDNA3-FLAG-VP16C-SXR, pcDNA3-TSK-FLAG, or empty FLAG-tagged pcDNA3 using the FuGENE 6 reagent and selected in 0.5 mg/ml G418. Expression levels of FLAG-SXR, FLAG-VP16C-SXR, and TSK-FLAG proteins were verified by Western blot analysis.

Western Blot Analysis and Immunoprecipitation—Whole cell lysates were prepared using PLC lysis buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml aprotinin, and 10 μg/ml leupeptin). Protein concentrations were analyzed using the BCA protein assay kit (Pierce). Proteins were resolved by SDS-PAGE and electroblotted onto Immobilon-P transfer membrane (Millipore). Membranes were incubated with primary antibodies for 90 min followed by incubation with secondary antibodies for 30 min. After extensive washing, the antibody-antigen complexes were detected using the Western blotting Chemiluminescence Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology). Antibodies used included anti-PXR (pregnane X receptor)/SXR (N-16 and H-160, Santa Cruz Biotechnology), anti-α-tubulin monoclonal antibody (Zymed Laboratories), anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma), and anti-Myc polyclonal antibody (Cell Signaling Technology). For SXR detection in parental MG63 cells, 500 μg of proteins from cell lysates were incubated with anti-SXR antibody (H-160) or normal rabbit IgG (Sigma) at 4 °C overnight. The mixture of cell extracts and antibody was

incubated with Protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences) at 4 °C for 2 h, washed four times using PLC lysis buffer. The immunoprecipitated proteins were boiled 5 min in Laemmli sample buffer and separated by SDS-PAGE.

Preparation of cRNA—Total RNA was extracted from MG63 cells stably expressing FLAG-VP16C-SXR treated with vehicle (0.1% ethanol), MK-4 (10 μM), or RIF (10 μM) for 48 h. The methods for preparation of cRNA and subsequent steps leading to hybridization and scanning of the U133A GeneChip Arrays were provided by the manufacturer (Affymetrix). Briefly, poly(A)⁺ RNA was isolated from 200 μg total RNA of each sample with the OligotexTM-dT30 Super mRNA purification kit (Takara Bio, Kyoto, Japan) and converted into double-stranded cDNA using the cDNA synthesis kit (SuperScript Choice, Invitrogen) with a special oligo(dT)₂₄ primer containing a T7 RNA polymerase promoter site added 3' of the poly(T) tract (Amersham Biosciences). After second-strand synthesis, labeled cRNA was generated from the cDNA sample by an *in vitro* transcription reaction using the bioarray high yield RNA transcript labeling kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) supplemented with biotin-CTP and biotin-UTP (Enzo Life Sciences). The labeled cRNA was purified using RNeasy spin columns (Qiagen). Twenty μg of each cRNA sample was fragmented by mild alkaline treatment, at 94 °C for 35 min in fragmentation buffer (200 mM Tris acetate, pH 8.1, 500 mM potassium acetate, 150 mM magnesium acetate) and then used to prepare 400 μl of master hybridization mix (0.1 mg/ml herring sperm DNA (Promega), 0.5 mg/ml of acetylated bovine serum albumin in hybridization buffer containing 100 mM MES, 1 M [Na⁺], 20 mM EDTA, 0.01% Tween 20).

Oligonucleotide Array Hybridization and Scanning—Before hybridization, the cRNA samples were heated to 99 °C for 5 min, equilibrated to 45 °C for 5 min, and clarified by centrifugation (15,000 rpm) at room temperature for 5 min. Aliquots of each sample (10 μg of cRNA in 200 μl of the master mix) were hybridized to U133A GeneChip arrays at 45 °C for 16 h in a rotisserie oven set at 60 rpm. After this, the arrays were washed with non-stringent wash buffer (6 × saline/sodium phosphate/EDTA, 0.01% Tween 20) and stringent wash buffer (100 mM MES/0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween 20), stained with streptavidin-phycoerythrin (Molecular Probes), washed again, and read using a microarray scanner G2500A (Affymetrix) with the 570-nm long-pass filter. Data analysis was performed by using Affymetrix Microarray Suite software. For comparing arrays, normalization was performed using data from all probe sets.

Reverse Transcription-PCR Analysis—MG63 cells were treated with 10 μM RIF, 10 μM MK-4, or vehicle for indicated times. Total RNA was isolated using the ISOGEN reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan). First strand cDNA was generated from RNase-free DNase I-treated total RNA by using the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)₂₀ primer. For PCR amplification, the primer sequences were: human *TSK*, 5'-CTGAGCGACGTGAACCTTAGC-3' and 5'-CCT-GACTGTGCGTCGTGAAG-3'; human *MATN2*, 5'-ACAGATCCT-TTGCTGTCAAGTGT-3' and 5'-GGTCCCCCAGAGCACAAGA-3'; human *CD14*, 5'-GACTGATGGCGGCTCTCTGT-3' and 5'-TGTG-GGCGTCTCCATTCC-3'; human *CYP3A4*, 5'-TTCAGCCCATCTC-TTTCATATTT-3' and 5'-CAGTTGGGTGTTGAGGATGGA-3'; human *GAPDH*, 5'-GCCTGCCTGACCAAATGC-3' and 5'-GTGGT-CGTTGAGGGCAATG-3'. mRNAs were quantified by real-time PCR using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) and the ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems) based on SYBR Green I fluorescence. The evaluation of relative differences of PCR product amounts among the treatment groups was carried out by the comparative cycle threshold (C_T) method, using GAPDH as an external control (17).

The experiments were independently repeated at least three times, each performed in triplicate. For cycloheximide treatment, cells were preincubated with the compound (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2 h prior to the stimulation by SXR ligands.

RNA Interference—Small interfering RNA (siRNA) duplexes to target human *SXR* and *TSK* were synthesized by Qiagen (Qiagen, Tokyo, Japan). The siRNA target sequences were: *SXR*, 5'-GGCCACTGGC-TATCACTTC-3' (18) and *TSK*, 5'-CCTGCTCACCAGCATCTCA-3'. The siRNA specific to the luciferase gene (Luciferase GL2 Duplex, Dharmacon, Lafayette, CO) and nonspecific control VII (Dharmacon) was used as control. Cells were transfected with siRNA (70 nM) using GeneSilencer reagent (Genlantis, San Diego, CA) for 48 h, and further maintained in the culture medium containing 10% dextran-charcoal-stripped FBS with or without ligand stimulation for indicated times.

Collagen Accumulation Assay by Sirius Red Staining—Cells were cultured until confluence (day 0), and the medium was replaced by the osteoblast differentiation medium (α -minimal essential medium containing 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, and 5 mM β -glycerophosphate) with or without MK-4 (1 μM). Cells were fixed with Bouin's fluid (8.3% formaldehyde and 4.8% acetic acid in saturated aqueous picric acid) for 1 h at room temperature, rinsed with water, and stained with 1 mg/ml of sirius red dye (Direct Red 80) (Sigma) in saturated aqueous picric acid for 1 h. Cells were treated with 0.01 N HCl, and then the stain was extracted by 0.1 N NaOH. The absorbance of the dye solution was measured at 550 nm (19). In experiments with warfarin [3-(α -acetylbenzyl)-4-hydroxycoumarin, Sigma] treatment, cells at confluence were pretreated with vehicle or warfarin at 5 μM or 25 μM for 1 day, then treated with vehicle or vitamin K₂ (1 μM) for another 3 days in the presence of warfarin (final concentration; 2.5 μM or 12.5 μM). In siRNA treatment experiments, cells were treated with the siRNA twice, 2 days before day 0 and on day 0.

Statistical Analysis—Differences between two groups were analyzed using two-sample, two-tailed Student's *t* test. A *p* value less than 0.05 was considered to be significant. All data are presented in the text and figures as the mean \pm S.D.

RESULTS

Construction of SXR Expression Vectors and Generation of Osteoblastic Cells Stably Expressing SXR—Our previous studies showed the direct effect of vitamin K₂ on bone marker expression in osteoblastic cells. Although SXR is endogenously expressed in osteoblastic cells, it has been shown that the expression level is lower than that in cells derived from the intestine. Therefore, to identify vitamin K₂ and SXR target genes in osteoblastic cells, we generated MG63 cells stably expressing SXR. These cells respond more robustly to SXR ligands than do wild type MG63 cells. We constructed two FLAG-tagged expression vectors containing full-length SXR (FLAG-SXR) and SXR fused to the C-terminal portion of the VP16 activation domain (FLAG-VP16C-SXR). Both vitamin K₂ and RIF increased the transcriptional activity of the trimerized SXR response elements derived from the *CYP3A4* promoter in MG63 cells transiently transfected with FLAG-SXR or FLAG-VP16C-SXR (Fig. 1A). We also constructed an expression vector fusing SXR to the full-length VP16 activation domain. This construct was constitutively active in the absence of ligand stimulation (data not shown). In contrast, FLAG-VP16C-SXR retained the ligand-dependent activation while it had substantial higher basal transcription level than FLAG-SXR.

For further quantitative analysis of SXR actions in osteoblastic cells, we generated the stable cell lines expressing SXR constructs in MG63 cells. For either FLAG-SXR or FLAG-VP16C-SXR, we obtained two MG63 clones each with different expression levels (Fig. 1B).

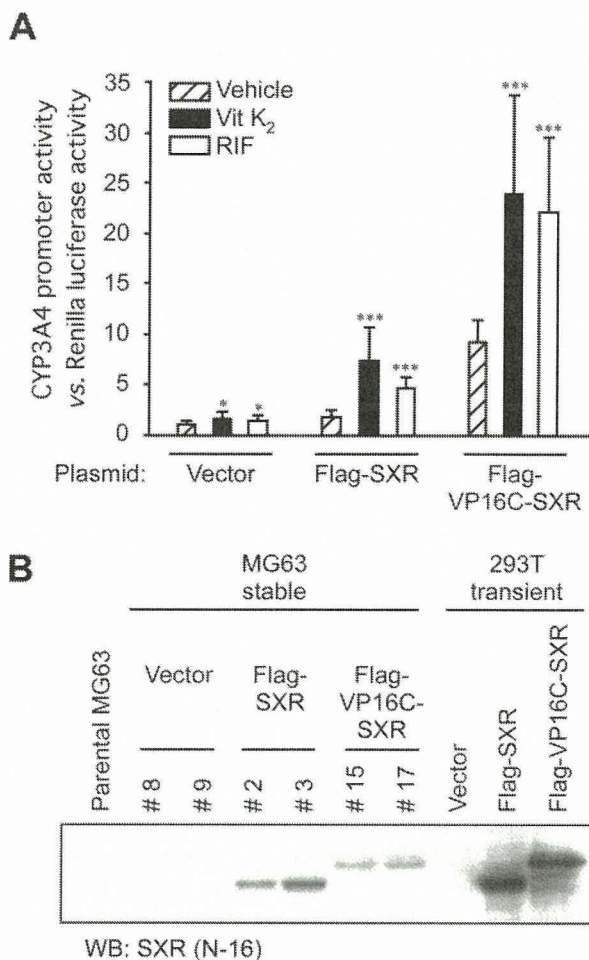


FIGURE 1. Construction of SXR expression vectors and generation of osteoblastic cells stably expressing SXR. A, activation of *CYP3A4* promoter activity by vitamin K₂ (Vit K₂) or RIF treatment. MG63 cells were cotransfected with tk-(*CYP3A4*)₃-Luc, pRL-CMV, and SXR expression vectors (FLAG-SXR and FLAG-VP16C-SXR) or empty vector. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with RIF (20 μM), vitamin K₂ (20 μM), or vehicle (0.2% ethanol) for 30 h in fresh media. Firefly luciferase reporter activity was determined and normalized to the *Renilla* luciferase transfection control. Data are expressed as fold induction of luciferase activity by ligands versus vehicle in vector-transfected cells. *, *p* < 0.05; ***, *p* < 0.001 (by Student's *t* test). B, generation of MG63 cells stably expressing SXR constructs. SXR protein expression in MG63/FLAG-SXR clones #2 and #3 and MG63/FLAG-VP16C-SXR clones #15 and #17 was confirmed by Western blotting (WB) using anti-SXR antibody.

Identification of Genes Up-regulated by SXR Ligand in Osteoblastic Cells by GeneChip Analysis—To identify dual up-regulated genes by vitamin K₂ and RIF treatment in osteoblastic cells, we prepared biotin-labeled cRNA samples from MG63 cells expressing FLAG-VP16C-SXR treated with vitamin K₂, RIF, or vehicle. The Affymetrix U133A GeneChip array represents more than 18,000 human transcripts from ~14,000 genes. Analysis of the MG63 samples was performed by hybridizing aliquots of cRNA to the GeneChip arrays. Seventy-seven transcripts were induced 2-fold or greater by vitamin K₂, whereas 100 transcripts were induced by RIF. Eighteen transcripts were up-regulated by both SXR ligands. Therefore, we infer that these are potential SXR target genes.

Table 1 shows the list of 18 transcripts from 14 distinct genes up-regulated by vitamin K₂ and RIF. It is notable that a prototypical SXR-responsive gene ATP-binding cassette subfamily B or multidrug resistance 1 (*MDR1*) (20) was most significantly up-regulated by either vitamin K₂ or RIF. Among these SXR target molecules, we were particularly interested in three genes due to their putative bone-related functions. There were a small leucine-rich proteoglycan named tsukushi