

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
ヒトゲノムテーラーメイド研究

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成20（2008）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 - 9
	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 - 18
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
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究)
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 IGF1R をはじめとする複数の遺伝子に同定し、さらにゲノムワイドスクリーンで P 値の極めて低い SNP を明らかにし、特許出願中である。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、GDF15、SC2、PGC などの分子標的ならびに標的細胞を見出し、新しいリン酸化シグナルについて解析を進めた。特にビタミン K の核内ステロイド X 受容体(SXR)あるいは PKA を介する二つの新しい作用メカニズムの解明は国内外の注目を浴びた。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、エストロゲンの骨・軟骨への新しい作用メカニズムを解明した。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、診断・治療への応用、知的財産権の確保、テーラーメイド医療への展開が期待される。このように本研究は、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したものである。

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

核内情報研究分野・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、それに基づく腰背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) IGF1R 受容体と変形性関節症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により IGF-I シグナル伝達調節因子であるヒト IGF1 受容体(IGF1R)遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性関節症(OA)のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を評価した。骨密度ならびに各種臨床データについても同時に測定し、得られたデータに関して統計学的な解析を行った。

2) 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 (分担：井上)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とす

る。750名の血液よりDNAを抽出した。この集団を無作為に第1集団251名を群分けした。第1集団の251名から抽出したDNAを用いて、AFFYMETRIX社のGeneChip Mapping 100K Setに含まれる、57,244SNPについて同社GeneChip Mapping Assay法を用いて決定した。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OAの指標(椎間板狭小、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した。Hardy-Weinberg平衡、Minor allele frequency(≥ 0.2)、Fisherの検定などの総合データより統計的に有意となる遺伝子多型を順位付けした。以上1次スクリーニングによって着目された候補遺伝子については別集団を対象とした再解析を行い再現性が得られたSNPを同定した。

3) 骨芽細胞系におけるGGCXおよびSXR以外の新規経路によるビタミンK応答遺伝子の解析(分担:井上)

SXRを介するビタミンK標的遺伝子の解析では、転写活性が高くリガンド応答性が認められるSXRを安定発現させたMG63細胞(MG63/Flag-VP16C-SXR)を用いてマイクロアレイ解析を行った。今回の解析では、SXRの作用によらずにビタミンKにより発現誘導される遺伝子を同定するため、MG63/Flag-VP16C-SXR細胞とコントロールベクター発現MG63細胞をそれぞれのビタミンK₂1つMK-4(メナキノン-4, 10 μ M 48 h)と溶媒コントロールで刺激し、マイクロアレイ解析を行った。MK-4により発現上昇が認められた遺伝子について、MG63親株とMG63/Flag-VP16C-SXR細胞を用いて、SXRの代表的リガンドであるリファンピシン(RIF)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の関与の有無を検討した。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 -グルタミルカルボキシラーゼ(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。さらに、GGCXおよびステロイドX受容体(SXR)以外の経路によると考えられるMK-4応答遺伝子の発現調節に関して、骨芽細胞系では重要な経路であるプロテインキナーゼA(PKA)の関与の可能性について検討を行った。MK-4によるPKAリン酸化の有無を蛋白レベルで検討し、PKA作用または発現抑制を起こした際のMK-4応答遺伝子の発現変化を定量的RT-PCRにより検討した。

4) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析(分担: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、不死化ヒト胎児骨芽細胞株hFOB 1.19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、hFOB 1.19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 にて定量的に検討した。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、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。

5) 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)

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。そこで昨年度、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、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(OcERKO)マウスを作出し、その骨組織変異を解析したところ、メス OcERKO マウスにおいて顕著な骨密度の低下が見られた。そこで本年度は、成熟破骨細胞における ER の直接的な作用メカニズムを明らかにすることを目的としたため、OcERKO マウスの 12 週齢メスマウスを用いて、骨形態計測法による骨組織のさらなる解析、および破骨細胞内における ER の標的遺伝子の探索等を行った。

6) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割 (分担：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について解析を進めた。

1. コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

種々の細胞において RNAi によってコルタクチンの発現を抑制して生物学的機能を解析する実験を行っていたが、スキルス胃がんの細胞においてコルタクチンの発現抑制が細胞運動能に大きな影響を与えることが分かった。ただ、面白いことにコルタクチンのチロシンリン酸化の状態によって発現抑制の効果が大きく異なることに気づいた。このようなチロシンリン酸化の有無によるコルタクチンの働きの変化は podosome におけるコルタクチンの役割の解析でも報告されていることで、そのメカニズムに興味を持って解析を進めた。

具体的にはチロシンリン酸化したコルタクチンを抑制したときに細胞内のチロシンリン酸化蛋白質の変化を解析し、複合体形成や局在解析などによりチロシンリン酸化したコルタクチンの働きについて Cas との関わりで新たな知見を得ることができた。

2. メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わり

その 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/Cas の過剰発現が、タモキシフェン耐性獲得につながる、等のこれまでの研究から、骨粗鬆症や変形性関節症等の骨・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。

3. 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

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。最近、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、等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た。

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

骨粗鬆症疾患・OA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、本年度は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・軟骨作用について焦点を絞り解析を行った。

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。そのため、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、軟骨組織特異的に特定因子を過剰発現させることで、生体内の作用機序を解析した。

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. エストロゲンシグナル欠乏マウス

1, 2 および 3 で作製した遺伝子改変マウスを準備することにより、軟骨組織特異的に gain of function する系およびエストロゲンシグナル欠乏マウスのモデル系を確立し、エストロゲンシグナルによる生体での軟骨代謝作用について検討した。

C. 結果

1) 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 (IVS1+14488C>G, rs11247361)と変形性関節症(OA)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。434 名の閉経後女性を対象としてジェノタイプングを行なったところ、この SNP は CC 型が 144 名、GC 型が 229 名、GG 型が 61 名であった。Table 1 に示したようにパッ

Table 1

IGF1R 遺伝子のイントロン1に存在する遺伝子多型 (IVS1+14488C>G, rs11247361)の 遺伝子型と臨床データとの相関解析

Items	Genotype (mean ± SD)			P value (ANOVA)	P value (Kruskal-Wallis)
	CC	GC	GG		
対象人数	144	229	61		
年齢 (years)	65.0 ± 9.2	66.3 ± 8.5	67.1 ± 10.6	NS	NS
身長 (cm)	150.8 ± 8.1	150.1 ± 8.3	150.3 ± 8.1	NS	NS
体重 (kg)	50.8 ± 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
終板硬化スコア	0.40 ± 0.68	0.35 ± 0.83	0.43 ± 1.04	NS	NS
骨棘形成スコア	5.69 ± 3.68	5.31 ± 3.44	6.10 ± 3.58	NS	NS
椎間板狭小化スコア	1.63 ± 1.70	2.13 ± 1.82	2.26 ± 1.89	0.015	0.0051

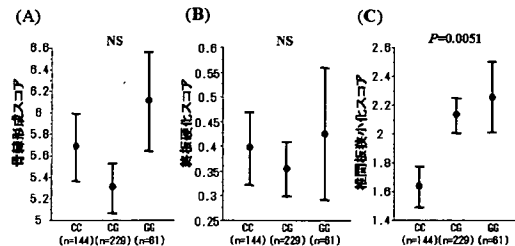
BMI: body mass index, NS: not significant

クグラウンドデータ(年齢、身長、体重、BMI)と各群間において有意差はなかった。Kruskal-Wallis 解析の結果、この SNP は OA の各パラメーターの中で椎間板狭小化と有意に相関した(Fig 1, Table 1, P=0.0051)。ANOVA 解析においても同様に椎間板狭小化と有意に相関した(Table 1, P=0.015)。

脊椎変形は年齢、身長、体重の影響を受けることが知られているため、次に

Fig 1

IGF1R 遺伝子のイントロン1に存在する遺伝子多型 (IVS1+14488C>G, rs11247361)の遺伝子型と 脊椎変形パラメーターとの相関解析



我々はこれら因子に IGF1R の遺伝子型を加えて、椎間板狭小化に与える影響に関してステップワイズリグレッション解析による検討を行った。その結果、これらの因子の中で年齢と IGF1R 遺伝子型が有意に椎間板狭小化スコアと相関した(Table 2)。

Table 2

椎間板狭小化を規定する4つの要因 (年齢、体重、身長、IGF1R SNP)を用いた ステップワイズリグレッション解析の結果

Factors	F value			s.r.c. Step2 (R ² =0.103)
	Step 0	Step 1	Step 2	
Intercept	523	11.7	13.2	-2.323
IGF1R SNP genotypes (CC=0, GC, GG=1)			5.7	0.110
年齢		43.1	40.4	0.281
体重		not selected		
身長		not selected		

s.r.c.: standard regression coefficient

さらに、我々は年齢補正を行なった後に、IGF1R 遺伝子 SNP(IVS1+14488C>G, rs11247361)の遺伝子型と椎間板狭小化スコアとの相関を解析した。本解析においては対象者を G アレルを有する群(GG or GC 群)と G アレルを有さない群(CC 群)とに分けた。本解析において G アレルを有する群(GG or GC)では椎間板狭小化を 2 椎体間もしくはそれ以上有する人数が有意に多かった(Table 3, P=0.0042, オッズ比=1.84)。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 群間での比較を行なった。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 群の頻度が有意に低かった。椎間板狭小化を 3 個以上の脊椎

Table 3

年齢補正を行なった椎間板狭小化と IGF1R SNPとの相関解析(GG and GC (n=290) vs. CC (n=144))

Severity of disc narrowing	OR	95%CI	P-value
One or more disc narrowing (n=342) versus no disc narrowing (n=92)	1.36	0.83-2.23	0.21
Two or more disc narrowing (n=223) versus less (≤ 1) disc narrowing (n=211)	1.84	1.21-2.79	0.0042
Three or more disc narrowing (n=140) versus less (≤ 2) disc narrowing (n=294)	2.04	1.27-3.29	0.0033

OR: オッズ比, 95%CI: 95% 信頼区間

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(Table 3, P=0.0033, オッズ比=0.49)。以上より IGF1R 遺伝子上の SNP が脊椎における椎間板狭小化と相関することが示された。

2) 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

本解析により日本人閉経後女性 251 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。Hardy-Weinberg 平衡、Minor allele frequency(≥ 0.2)、Fisher の検定などの総合データより統計的に有意となる遺伝子多型を順位付けした。本解析により選定された SNP について第 2 集団による 2 次スクリーニングを行った。第 2 集団を対象とした相関解析を行った結果、第 2 集団においても再現性が確認された。

3) 骨芽細胞系における GGCX および SXR 以外の新規経路によるビタミン 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(MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞とベクター発現 MG63 細胞における発現量が 1.5 倍以上の遺伝子は SXR 依存性遺伝子として除外)、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。

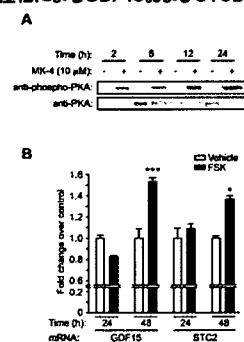
前年度の報告のように、GDF15 も STC2 も、MK-4 刺激後 48 時間における mRNA

発現上昇が著明であり、MG63 細胞の他、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 においても認められた。他のビタミン K(ビタミン K₁ と側鎖が長いビタミン K₂ である MK-7)と MK-4 の側鎖構造であるゲラニルゲラニオールでは、GDF15 と STC2 の発現誘導は起こらず、MK-4 特異的であった。GGCX siRNA を作用しても MK-4 による遺伝子発現誘導は変わらず、SXR の代表的リガンドである RIF では GDF15 と STC2 の発現誘導は起こらないことから、この現象が GGCX と SXR には依存しない経路により起こることが示された。

MK-4 による新しいビタミン K 作用の 1 つの可能性として、骨芽細胞系の転写調節機構として重要なプロテインキナーゼ A(PKA)のリン酸化に注目した。骨芽細胞系においては、副甲状腺ホルモンや $\beta 2$ アドレナリン受容体などを介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMP 産生が上昇し、PKA リン酸化が起こることが知られている。MG63 細胞において、MK-4(10 μ M)の 2-24 時間刺激により、PKA のリン酸化が経時的に誘導されることが Western ブロットにより示された(Fig 2)。フォルスコリン(FSK)によりアデニル

Fig 2

骨芽細胞系におけるビタミンK2(MK-4)依存性PKAリン酸化と PKA活性化によるGDF15およびSTC2の発現誘導

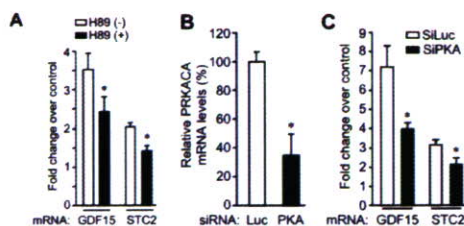


酸シクラーゼを直接活性化することによっても、GDF15 と STC2 mRNA の発現上昇は有意に起こることが示された(Fig 2)。また、MK-4 による GDF15 と STC2 mRNA の発現誘導は、PKA 阻害薬の H89 と PKA 特異的 siRNA によっても有意に抑制され、

PKA の関与が示された(Fig 3)。

Fig 3

PKA阻害薬H89およびPKA特異的siRNAによるMK-4標的遺伝子発現の抑制



4) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

ヒト前立腺癌細胞における AR 結合部位の解析結果から、骨芽細胞系において GR 結合部位としても機能するゲノム領域を探索する目的で、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、ChIP-on-chip 法によりしきい値 $P < 1e-5$ として同定された AR 結合部位 10 箇所(Table 4)について、リガンド依

Table 4

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	近隣遺伝子	転写開始点からの距離 (bp)*	近隣遺伝子における ARBS の位置
1	ENr131	2	234,433,433	234,433,823	UGT1A1	-17,390	5' upstream
2	ENr334	6	41,823,411	41,823,433	PGC	-323	5' upstream
3	ENm010	7	26,807,344	26,807,566	SCAP2	-129,874	5' upstream
4	ENm013	7	89,501,530	89,501,814	STEAP2	15,922	intron 3
5	ENm013	7	89,980,335	89,980,369	PFTK1	-3,010	5' upstream
6	ENm001	7	115,551,318	115,551,473	TES	106,864	3' downstream
7	ENm001	7	116,022,567	116,022,922	MET	116,336	intron 17
8	ENr233	15	41,640,443	41,640,980	KIAA0377	23,671	intron 27
9	ENr233	15	41,739,974	41,740,495	CATSPER2	-11,904	5' upstream
10	ENr213	18	23,990,311	23,990,793	CDH2	20,637	intron 1

*各ARBSにおける最も近隣のRefSeqクロンの転写開始点からの距離 (UCSCゲノムブラウザ NCBI build 35に基づく)

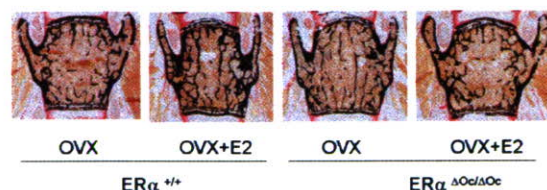
存性の GR 結合能について検討を行った。細胞系としては、ヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2、不死化ヒト胎児骨芽細胞株 hFOB 1.19 および GR 安定発現 293 細胞(293GR)を用いた。このうち、dexamethasone(10 nM)1 時間刺激により 1.5 倍以上の GR 結合性濃縮を認める領域として、SaOS2 と 293GR 細胞共通では少なくとも 6 箇所、hFOB1.19 と 293GR 細胞共通では少なく

とも 3 箇所が検出された。3 つの細胞に共通なリガンド依存性 GR 結合性の高い領域の 1 つとして ARBS_2 があり、この部位は PGC(pepsinogen C)の近位プロモーターに位置していた。ヒト乳癌細胞 T47D において、各種ステロイドホルモン(アンドロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン)による PGC の発現調節が報告されている。本手法により、骨芽細胞系において、グルココルチコイドおよびその他のステロイドホルモンにより発現調節を受ける遺伝子の同定が可能であることが示された。

5) 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 マウスの卵巣摘出後にエストロゲンを投与したところ、対照群においては骨密度の回復を認めたものの、OcERKO マウスにおいては骨量の有意な変化を認めなかった(Fig 4)。

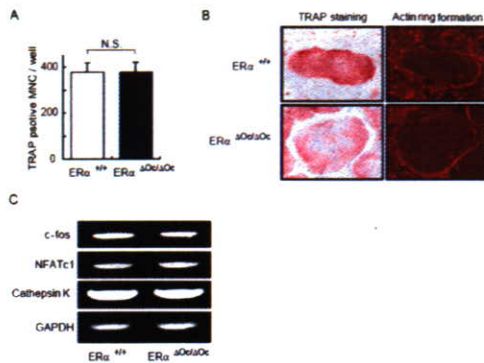
Fig 4



そこで、破骨細胞初代培養系を用い、その破骨細胞分化への影響を検討したところ、OcERKO マウス由来の破骨細胞初代培養系においては、対象群と比較して分化に有意な差は認められなかった。また、c-fos や NFATc1 などの破骨細胞に関連する転写因子の発現にも差が認められなかった(Fig 5、次頁)。このことは、ER が破骨細胞分化には関与しないことを示している。

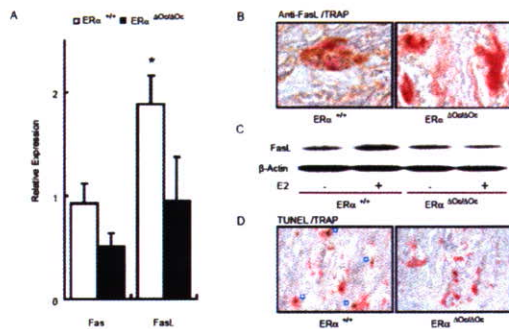
そこで、破骨細胞内での ER のターゲッ

Fig 5



トを探索したところ、アポトーシス関連因子である FasL の発現が低下していることが明らかとなった(Fig 6)。

Fig 6



以上より、破骨細胞内において ER は FasL の発現を制御しアポトーシスに導くことにより、骨吸収を抑制していることが明らかとなった。

6) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

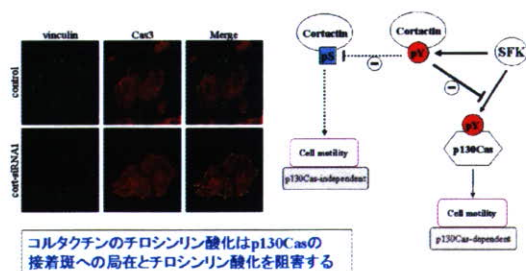
1. コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

コルタクチンは、胃がん細胞に普遍的に発現しているが、そのチロシンリン酸化レベルには大きな違いが認められた。チロシンリン酸化レベルが低い一群のスキルス胃がん細胞ではコルタクチンの抑制は細胞運動能の低下をもたらした。これに対しチロシンリン酸化レベルが高い細胞群では RNAi によるコルタクチンの発現抑制がさらに細胞運動能の亢進を引き起こした。この際に細胞内のチロシン

リン酸化蛋白質の変化を観察すると、コルタクチンの発現低下に伴って 130kD の蛋白質のチロシンリン酸化が顕著に誘導されることに気づいた。分子量とバンドの形状からこの蛋白質が Cas ではないかと推測し、特異的抗体を用いて解析したところ、実際に Cas のチロシンリン酸化が強く誘導されていた。コルタクチンのチロシンリン酸化の少ない MCF-7 細胞に Fyn キナーゼを入れてコルタクチンのチロシンリン酸化を誘導した際も、コルタクチンの RNAi により Cas に同様の変化が認められた。共焦点レーザー顕微鏡による観察ではチロシンリン酸化したコルタクチンがピンキュリンと共局在して接着斑にいと考えられるが、この状態で Cas の接着斑への局在とそこにおけるチロシンリン酸化が抑えられており、コルタクチンの発現抑制とともに一部の Cas 蛋白質が接着斑に移動しチロシンリン酸化されることが観察された。Cas が細胞運動に重要な蛋白質であることは、我々を含め多くのグループが既に報告しており、コルタクチンの機能の少なくとも一部は Cas と競合して、それを接着斑から排斥することによるのではないかと考えられた (Fig 7)。

Fig 7

コルタクチンのチロシンリン酸化による細胞運動能の阻害



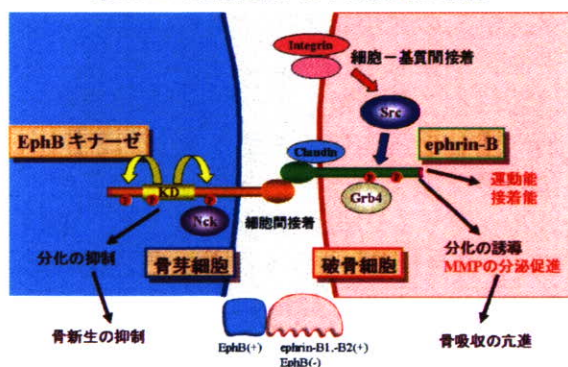
コルタクチンのチロシンリン酸化はp130Casの接着斑への局在とチロシンリン酸化を阻害する

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

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。線維芽細胞などで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ると、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することが観察されるが、昨年までの解析で Cas が実際に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得る分子であることが明らかになった(Fig 8)。

Fig 8 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能

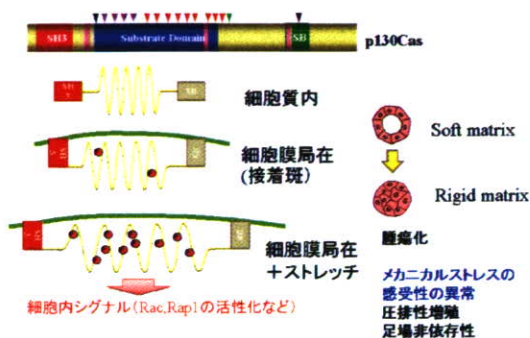


いくつかの癌細胞においてもストレッチによる Cas 蛋白質のチロシンリン酸化の変化を解析しているが、細胞を Confluent の状態で細胞間接着が強い状態でのストレッチにより Cas のチロシンリン酸化が誘導されることが実際に観察された。このような癌細胞において Cas のリン酸化依存的シグナルを抑える変異体 Cas-CT の影響を解析している。これまでの解析でこの領域(Cas-CT)を欠損した変異体は Src との結合能を失うばかりでなく、チロシンリン酸化のレベルも顕著に低下することが分かっている。Cas-CT をアデノウイルスを用いて大量に発現する系を用いて Cas から伝わるシグナルを選択的にブロックすることにより、造腫

瘍能や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ている(Fig 9)。

Fig 9

Srcの主要基質Casによるメカニカルストレスの受容機構

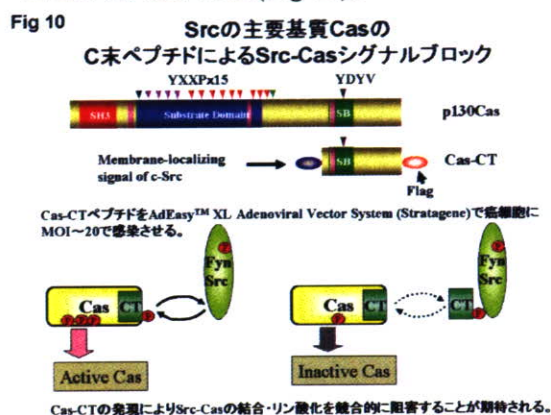


3. ephrin-B 1 のマトリックスメタロプロテアーゼ分泌における新規の役割

これまで 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、その一つとして細胞-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分かった。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わることが示唆された(Fig 10)。

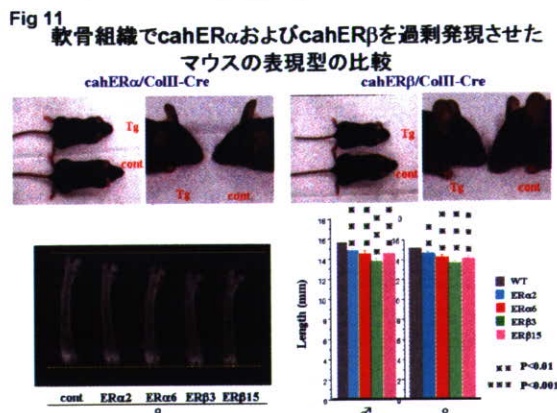


実際に胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると細胞運動能や浸潤能が顕著に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加することが確認された。実際に胃癌細胞の腹腔内注射による腸間膜に対する播種の程度や、同所性に胃の粘膜下に移植した際の、漿膜側への浸潤の速度などが、ephrin-B1 の発現で著明に亢進することが明らかになった。ephrin-B1 による癌の浸潤能の獲得は、メタロプロテナーゼの分泌、細胞運動能の亢進、細胞間接着の抑制等複数の因子によるものと考えられ、同じようなメカニズムによる機能制御が同様に ephrin-B1 を発現する破骨細胞にもあるのではないかと考え研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

7) 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

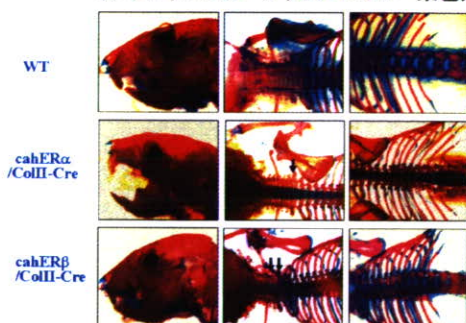
エストロゲンシグナルに関する、生体内の骨・軟骨代謝における作用については、選択的にER α またはER β シグナルを

gain of functionすることが可能な、cTgマウスの作製を行い、軟骨組織で ER α または ER β を過剰発現可能な系を確立した。OA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OA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OA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(ColII)-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(Fig 11)。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(Fig 12、次頁)。さらに、時系列

Fig 12
3週齢♂ ER α , β トランスジェニックマウスの骨格標本
(アリザリンレッド・アリシアンブルー染色)



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字靭帯では、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。

エストロゲンシグナル欠乏と軟骨代謝作用についても検討を加えている。エストロゲンシグナルと軟骨代謝の関連が示唆される所見を得つつあり、今後の解析が注目される。予備的な結果として、エストロゲンシグナルの欠乏により正常な軟骨代謝作用が維持できないことが観察された。

D. 考察

1) IGF-I 経路と変形性関節症との関連

IGF-I 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、IGF-I シグナルの受容体として機能する IGF1R の遺伝子変異

は胎内ならびに生後の発達障害を引き起こすことが報告されている。また IGF1R 遺伝子上の一塩基置換遺伝子多型性 (SNP) は寿命や脳血管性認知症の発症との関連も報告されており個体の老化との関連でも注目されている。IGF-I シグナルは関節軟骨細胞の増殖、分化、アポトーシスといった細胞機能に大きな影響を与えることが細胞ならびに *in vivo* モデルで示されており、関節代謝ならびに関節疾患との関連が注目されてきた。今回、我々は IGF1R の SNP が変形性関節症(OA)と有意に相関することを見出した。欧米のグループからは IGF1R のリガンドである IGF-I 遺伝子のプロモーター領域における SNP が OA と有意に相関することが報告されている。IGF-I/IGF1R シグナル伝達因子は多数同定されており IGF-I や IGF1R のみならず、他の因子に関しても脊椎変形を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。

今までに我々は Wnt- β カテニンシグナル伝達因子である LRP5 のエクソン2に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)が OA におけるパラメーター(骨棘形成、椎間板狭小、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。さらに Wnt-LRP シグナル伝達因子の一つである WISP-1 は OA におけるパラメーターの中で終板硬化と有意な相関があることを報告した。今回、我々は IGF1R が OA におけるパラメーターの中で椎間板狭小化と有意な相関があることを報告した。以上より OA の各パラメーターは異なった遺伝子により制御されている可能性が示された。

現在、我々は 55-83 歳の閉経後女性 251 名の DNA を用いて、ヒト遺伝子上の 5 万 SNP について同社 GeneChip Mapping Assay 法を用いて決定している。これら SNP と OA の指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)との相関解析を行い、脊椎変形を制御する候補遺伝子を現在探索してい

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、再解析を行うことで脊椎変形規定遺伝子の候補遺伝子を選定を行う予定としている。今後、本解析により OA における Wnt-LRP5 シグナル、OA における IGF-I シグナルに加えて、新たな高齢者の脊椎変形を規定す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) 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

1 次スクリーニングにより有意差が見出された SNP に関して、2 次スクリーニングを行った。合計対象者数を 750 名の相関解析の結果、複数の骨量規定遺伝子の候補遺伝子を選定した。これらの結果に基づき特許申請中であり、その公開までは詳述できないが、これらの因子が骨粗鬆症の新しい診断・治療法に活用されることが期待される。今後、同様の解析により骨量以外にも OA の各パラメータ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を現在施行中である。また、一連の解析の結果、肥満に関する遺伝子マーカーも複数発見した。こちらも特許申請中で、その活用が待望される。

3) 骨芽細胞系における GGCX および SXR 以外の新規経路によるビタミン K 応答遺伝子の解析

本研究では、ビタミン K₂ の SXR を介する遺伝子発現調節により、コラーゲン蓄積に至る作用の他、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 の経路を介さずに発現調節され、ここに PKA 活性化の関与が示された。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の 1 つであり、GDF15 と軟骨形

成・内軟骨骨形成との関連、前立腺癌の造骨性骨転移巣における発現上昇などが報告されていることから、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。分泌型糖蛋白スタニオカルシンの 1 つである STC2 については、骨形成との関連性については明らかではないが、同じファミリーの STC1 については、骨芽細胞分化・骨形成における作用が報告されている。本研究においては、MK-4 が GDF15 と STC2 の mRNA 発現誘導したメカニズムとして、PKA 活性化の関与が考えられた。骨芽細胞系における副甲状腺ホルモンや β 2 アドレナリン受容体などの Gs 蛋白質/アデニル酸シクラーゼ経路の活性化をもたらす G 蛋白質共役受容体 (GPCR) の骨形成作用についてはよく知られていることから、MK-4 が PKA 活性化を起こした経路として、さらに PKA 経路の上流因子にも作用しているかについてはさらに検討を要する。

4) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

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、他組織由来の細胞における AR 結合部位のゲノム情報を活用して、GR 結合部位の機能解析が可能である系が示された。ヒトおよびマウスの骨芽細胞・軟骨芽細胞系におけるグルココルチコイド応答性遺伝子のマイクロアレイ発現解析については、いくつかの研究グループから報告されるとともに、研究者らも独自に解析を進めており、GR 結合部位のゲノム情報と合わせることで、さらに新規ステロイド応答遺伝子の同定が可能になるものと考えられる。また、抗炎作用、細胞増殖、骨芽細胞系分化作用、あるいはアポトーシス作用に対して、ステロイドの濃度変化が異なる作用をもたらすかについても、研究を要すると思われる。

5) 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 マウスを作出する事で、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、培養破骨細胞を用いた検証には限界が有り、それら因子が破骨細胞で特異的に機能しているか証明する手段が存在しなかった。そこで我々が作出した 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 OcERKO 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。

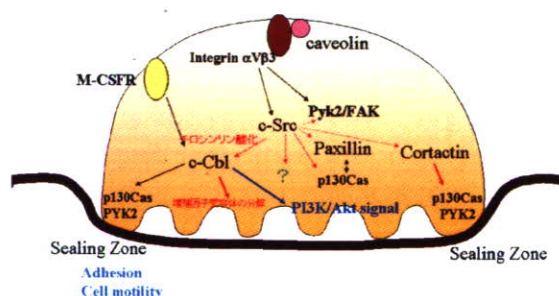
6) 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

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

れば各種の病態を引き起こしうる。その中でも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。Src キナーゼの基質 c-Cbl や Cas もう一つのチロシンキナーゼ Pyk2 が c-Src の下流分子として機能すること、主として Sealing Zone で $\alpha V\beta 3$ インテグリンを介した細胞接着シグナルが Src、Pyk2、Cas、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等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おり、我々のデータもこれらの分子の重要性を指示している。これまでに分かっている Src を介した破骨細胞のシグナル伝達を Fig 13 にまとめる。

Fig 13

破骨細胞におけるSrcを介したシグナル伝達



本研究で骨肉腫細胞の解析をきっかけに焦点を当てることとなった接着班に関連する分子 Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質として破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されており、シグナルの調節機構などは細胞がん化等との関わりで研究が進んでいるので、破骨細胞におけるコンディショナルノックアウトの解析が待たれる。

Podsome の構成成分としてのコルタクチンの機能は 1) チロシンリン酸化がその機能に対し抑制的に働くことが示唆される。2) Cas という Src キナーゼの他の基質を抑制的に制御することにより機能する。以上の 2 つの点で特徴的である。コルタクチンは極めて多機能な蛋白質であるため分子標的には向かない可能性があるが、骨・軟骨系の代謝制御を理解する上でこれからさらに重要性が増す可能性がある。

7) 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 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 $caER\alpha$ 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 OA 様の表現型を示す個体が得られた。しかし $ER\alpha$ および $ER\beta$ 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 OA 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。一方、エストロゲンシグナルの欠乏と OA の関係に関しても病的な変化が観察された。遺伝子発現変化の検討から

エストロゲンシグナルが直接的もしくは間接的に軟骨作用をもつことが示唆された。将来的な研究展開としては、エストロゲンシグナルの軟骨作用および OA 発症の分子レベルでの作用メカニズムの解明が重要と考えられる。

E. 結論

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ランにて極めて低い P 値を有する SNP を同定し、診断学的価値が期待され、特許申請中である。一連の解析の結果、肥満の遺伝子マーカーを複数発見し、こちらの知的財産確保も進めている。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、リン酸化経路、新しいシグナル経路を発見した。特にビタミン K の新しい作用メカニズムの解明は注目を集めた。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国内外の脚光を浴びた。堺は、細胞内シグナル伝達の研究により、新たなリン酸化シグナルを見出し、さらに、新規接着シグナル、メカニカルストレスシグナルを解明した。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

遺伝子を探査し、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. Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., Jung, J.U.: TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916-921, 2007.
2. Ichikawa, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B., Inoue, S.: Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39, 239-247, 2007.
3. 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.
4. 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* 25, 253-258, 2007.
5. Fujita, M., Sugama, S., Nakai, M., Takenouchi, T., Wei, J., Urano, T., Inoue, S., Hashimoto, M.: α -synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: Relevance to downregulation of proteasome activity. *J Biol Chem* 282, 5736-5748, 2007.
6. 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.
7. 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* 7, 48-53, 2007.
8. 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.
9. 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* 26, 4453-4463, 2007.
10. 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 α (ERR α) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer* 120, 2325-2330, 2007.
11. Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Yagi, K., Okazaki, Y., Inoue, S.: Estrogen-related receptor α modulates

- the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 813-818, 2007.
12. Kumagai, J., Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Blumberg, B., Inoue, S.: Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate* 67, 1029-1037, 2007.
 13. Ikeda, M., Inoue, S., Muramatsu, M., Minatogawa, Y.: Characterization and identification of a steroid receptor-binding protein, SRB-RGS. *Biol Pharm Bull* 30, 1056-1064, 2007.
 14. 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* 98, 644-651, 2007.
 15. Mori, K., Horie-Inoue, K., Kohda, M., Kawasaki, I., Gehlbach, P.L., Awata, T., Yoneya, S., Okazaki, Y., Inoue, S.: Association of the *HTRAI* gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet* 52, 636, 2007.
 16. 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* 7, 104-109, 2007.
 17. Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Steroid and xenobiotic receptor mediates a novel vitamin K2 signaling pathway in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab* 26, 9-12, 2008.
 18. 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 insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine*, in press.
 19. Kitagawa, H., Yamaoka, I., Akimoto, C., Kase, I., Mezaki, Y., Shimizu, T., Kato, S.: A reduction state potentiates the glucocorticoid response through receptor protein stabilization. *Genes Cells* 12, 1281-1287, 2007.
 20. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Igarashi, M., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Kato, S.: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR- γ transactivation. *Nat Cell Biol* 9, 1273-1285, 2007.
 21. Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.: Vitamin K induces osteoblast differentiation through PXR-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Mol Cell Biol* 27, 7947-7954, 2007.
 22. Kitagawa, H., Ray, W. J., Glantschnig, H., Nantermet, P.V., Yu, Y., Leu, C.T., Harada, S.I., Kato, S., Freedman, L.P.: A regulatory circuit mediating convergence between *nurr1* transcriptional regulation and Wnt Signaling. *Mol Cell Biol* 27, 7486-7496, 2007.
 23. Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T.J., Chambon, P., Kato, S.: Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130, 811-823,