

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成20(2008)年4月

目 次

I.	総合研究報告	
	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 - 17
	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 - 27
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

総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテラーメード研究)
総合研究報告書

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厚生労働行政の上でも急務となっている。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ず、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、LRP、WISP1、WNT10B、CAR、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値の極めて低い複数の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、TSK、CD14、MTN2、GDF15、SC2、PGCなどの分子標的ならびに標的細胞を見出した。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・軟骨への新規作用メカニズムを解明した。一方で、新しい細胞内情報伝達経路ならびに新規メカニカルストレスセンサーを発見している。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、テラーメード医療への展開が期待された。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) 骨軟骨における NR1I サブファミリーの発現と骨粗鬆症 (分担：井上)

ラット頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞から mRNA を採取し、これら細胞の各分化段階でのラット Vitamin D Receptor (VDR)、Steroid X Receptor (SXR)、Constitutive Androstane Receptor (CAR)、アルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子発現を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

ヒト大腿骨由来骨芽細胞は、10%FBS、50 µg/ml アスコルビン酸および 5 mM β-グリセロリン酸添加 α-MEM にて培養した。ヒト膝関節由来軟骨細胞は Clonetics 社の軟骨細胞基本培地ならびに分化誘導培地を用いて培養を行った。メEDIUM 交換を 0、2、5、7 日目に行い、培養 2 日、5 日、10 日後に RNA を回収し、それぞれの時点でのヒト SXR、CAR、Col2a1、ALP

遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

インフォームドコンセントを得られた日本人非血縁閉経後女性 354 人を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法によりヒト SXR ならびに CAR における遺伝子型を決定した。特に骨代謝マーカー、骨密度(全身ならびに腰椎)に関して測定し、以上より得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト Wnt10B 遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、BMD との相関を検討した。

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト LRP5 ならびに Wnt-LRP5 シグナル伝達応答遺伝子である WISP1 における SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性関節症(OA)の指標(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関しても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

3) IGF1R 受容体と変形性関節症

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、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関しても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

4) 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

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。この集団から無作為に第 1 集団 251 名を群分けした。その第 1 集団から抽出した 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。

5) 骨芽細胞系における SXR を介するビタミン K 標的遺伝子の解析 (分担：井上)

骨芽細胞系における SXR を介するビタミン K の標的遺伝子を解析するため、Flag タグ標識の SXR (Flag-SXR)および VP16 活性化ドメインのカルボキシル末端を結合した Flag タグ標識の SXR (Flag-VP16C-SXR) の発現プラスミドを作製し、ヒト骨芽細胞系細胞株 MG63 細胞における 2 種類の安定発現細胞を数ラインずつ作製した。VP16C-SXR 安定発現細胞 (MG63/ Flag-VP16C-SXR) を、ビタミン K₂ (メナキノロン-4 : MK-4)と代表的 SXR 作動薬であるリファンピシン (RIF) で刺激し、Affymetrix 社の U133A GeneChIP アレイを用いてマイクロアレイ解析を行った。MK-4 と RIF で共通に発現上昇した遺伝子を SXR 標的遺伝子として同定した。2 倍以上の発現上昇した遺伝

子として14個が得られ、このうち、骨形成との関連を考え、Tsukushi (TSK)、Matrilin-2 (MATN2)、CD14 抗原(CD14)の3遺伝子についてさらに解析を行った。MG63/Flag-SXR 細胞および、親株 MG63 細胞を用いて、siRNA により SXR をノックダウンした条件における SXR 標的遺伝子の発現誘導を解析した。コンフルエントになったMG63 細胞をMK-4 を添加した分化培地で培養し、Sirius-Red 染色により細胞表層に蓄積するコラーゲン量を解析した。MG63 細胞を用いて TSK 安定発現細胞株を作製し、コラーゲン蓄積量を解析した。また、siRNA により TSK をノックダウンし、MK-4 によるコラーゲン蓄積における TSK の関与を検討した。TSK、MATN2、CD14 のプロモータ領域において、SXR 結合性を ChIP アッセイにて検討した。

6) 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 標的遺伝子の解析 (分担: 井上)

MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞と、コントロールベクターのみを安定発現させたMG63 細胞を MK-4 で刺激し、2細胞系で共通して発現が誘導され、かつ SXR 応答遺伝子には含まれない遺伝子をマイクロアレイ解析により探索することにより、SXR 以外の新規経路によるビタミン K 標的遺伝子の同定を行った。MK-4 により発現上昇が認められた遺伝子について、親株MG63細胞とMG63/Flag-VP16C-SXR 細胞を用いて、リファンピシンと MK-4 で刺激した時の mRNA の発現変化を定量的 RT-PCR により比較し、SXR の関与を検討した。また、ビタミン K およびその関連構造の種類による作用を検討するため、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 より側鎖の長いビタミン K₂ である 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。

7) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

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、ChIP アッセイにより得られた 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。

8) 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)

破骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスとして、Cathepsin K-Cre ノック

インマウス(Ctsk-Cre)系統の樹立を行った。次に、flox マウスと交配することにより、破骨細胞特異的 ARKO(OcARKO)マウスおよび破骨細胞特異的 ERKO(OcERKO)マウスを作出した。その後、これらマウスを用いて、DEXA 法による骨密度測定、 μ CT による骨構造解析、さらに骨形態計測法による骨組織の動態について解析を行った。

9) 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。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、等の情報が必要不可欠であることがある。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。

1. 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

破骨細胞の接着能と運動能はその機能のために必須なものであると考えられている。我々は蛋白質試料採取のための量的制限の少ない骨肉腫細胞株をモデルに使って、この接着能や運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の単離を進めてきた。骨肉腫細胞の運動能や接着能を制御している鍵となる分子を、それぞれの細胞群の蛋白質、特にチロシンリン酸化蛋白質の解析により明らかにすることを目的に研究を進めてきた。この過程で Src ファミリーキナーゼと幾つかの基質の蛋白質群が重要であることが明らかになってきた。ウェスタンブロット、キナーゼアッセイ、細胞免疫染色等の手法を用いてこれらの分子や Src ファミリーの接着・運動能への関わりを明らかにする。

2. コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

Podosome の重要な構成成分で Src ファミリーの基質であるコルタクチンは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。

3. メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わり方の解析

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 はこれまでの研究から、骨粗鬆症や OA 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、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、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。

4. 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。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分かった。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。

10) 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)

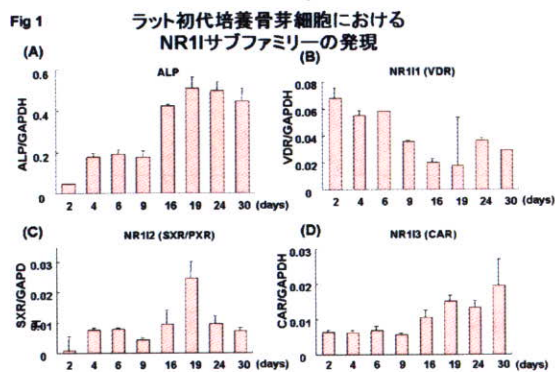
骨粗鬆症疾患・OAの関連因子として考えられる2つのエストロゲンシグナルおよびビタミンKシグナルを介する骨・軟骨作用に焦点を絞り研究を行った。エストロゲン等の遺伝子情報制御因子について遺伝子改変動物を作製し、その動物個体における骨・軟骨作用について解析を行った。分担者は、エストロゲンシグナル関連因子としてのエストロゲンレセプター(ER α およびER β)を介する生体での軟骨作用について解析した。また、ビタミンK関連因子としてのGGCX、およびGGCXの代表的な標的蛋白質として知られるBGP(Bone Gla Protein: Osteocalcin)の骨作用について検討した。新規遺伝子情報制御因子・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4つの段階に分けて研究を遂行した。

1. ビタミンK依存性GGCXおよびそのグラ化標的タンパクとしてのBGPのビタミンK関連遺伝子のTgマウスの作製およびその解析
2. リガンド非依存性な活性型caER α 、およびcaER β Tgマウスの作製およびその解析
3. 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
4. 1、2および3で準備・作製した遺伝子改変マウスを活用して、骨、軟骨、および肝臓組織特異的にそれぞれ生体内でgain of functionする系を確立し、エストロゲンシグナル・ビタミンKシグナルによる生体内での骨・軟骨代謝作用について検討する。

C. 結果

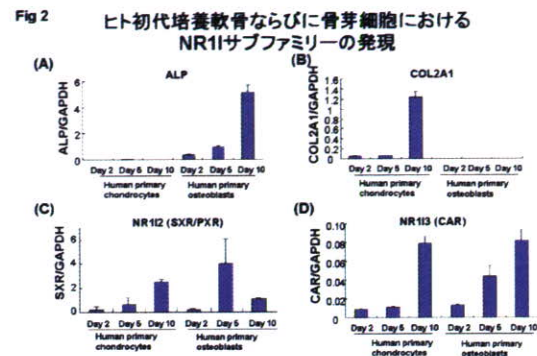
1) 骨軟骨における NR1I サブファミリーの発現と骨粗鬆症

定量的 RT-PCR 法により骨芽細胞の分化マーカーの一つである ALP の発現はラット初代培養骨芽細胞の培養期間に伴い上昇することが確認された(Fig 1A)。ラット初代培養骨芽細胞において SXR ならびに CAR の mRNA レベルでの発現が VDR と同様に確認された(Fig 1B、C、D)。



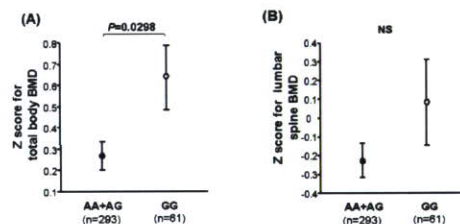
定量的 RT-PCR 法により骨芽細胞の分化マーカーの一つである ALP の発現はヒト初代培養骨芽細胞の培養期間に伴い上昇し、軟骨細胞の分化マーカーの一つである COL2A1 の発現はヒト初代培養軟骨

細胞の培養期間に伴い上昇することが確認された(Fig 2A、B)。ヒト初代培養骨芽



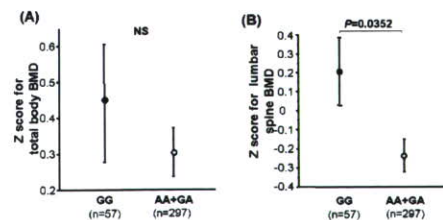
細胞ならびに軟骨細胞において SXR ならびに CAR の mRNA レベルでの発現がラット骨芽細胞同様に確認された(Fig 2C、D)。ヒト SXR 遺伝子のイントロン 1 に存在する一塩基置換遺伝子多型性(SNP)では、全身骨骨密度と有意に関連した(Fig 3)。ヒト CAR 遺伝子の 5'上流域に存在する

Fig 3 SXR遺伝子多型と骨量との相関(IVS1-579)



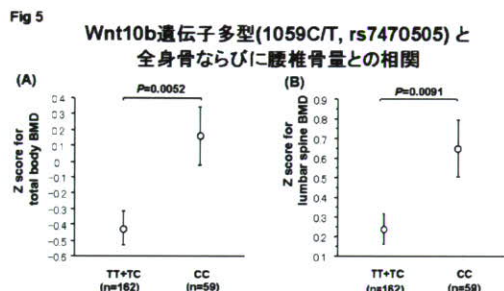
SNP では、腰椎骨密度において有意差を呈していた(Fig 4)。

Fig 4 CAR遺伝子多型と骨量との相関(5'上流域-3723G/A)



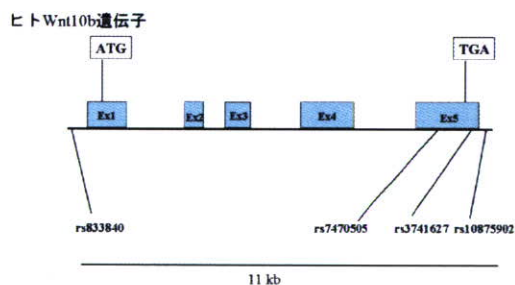
2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10b のエクソン 5 に存在するアミノ酸置換を伴わない SNP(rs1059C/T, His353His, rs7470505)においては全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた (Fig 5A, B)。また、Wnt10b の 5' 上流域に



存在する SNP(rs833840)、3'非翻訳領域における SNP(rs3741627)、さらには 3'下流領域における SNP(rs10875902)も同時に決定し (Fig 6)、これら遺伝子多型間の連鎖不

Fig 6 本研究にて遺伝子型を決定した Wnt10b 遺伝子における SNP の位置



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

次に LRP5 遺伝子のアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)ならびに WISP1 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する SNP と変形性脊椎

Table 1

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

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

症の各パラメータ(骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化)を検討した。その結果、LRP5 遺伝子の SNP は骨棘形成 (Fig 7) と WISP1 遺伝子上の SNP は終板硬化と有意に相関した (Fig 8)。

Fig 7 LRP5 遺伝子多型と変形性腰椎症における各パラメータとの相関(Q89R)

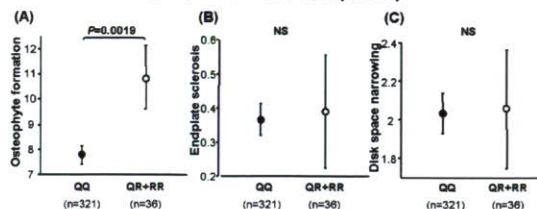
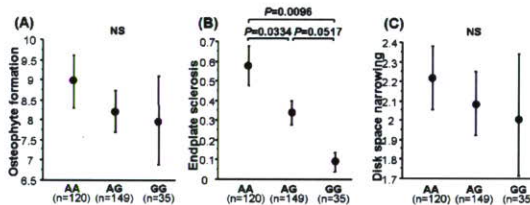


Fig 8

WISP1 遺伝子多型と変形性腰椎症における各パラメータとの相関 (3'非翻訳領域)



3) 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(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 に示したようにバッ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 の各パラメータの中で椎間板狭小化と有意に相関した (Fig 9, Table 2, $P=0.0051$)。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 2, $P=0.015$)。

Fig 9

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

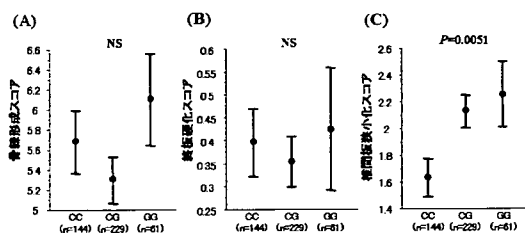


Table 2 IGF1R遺伝子のイントロン1に存在する遺伝子多型 (IVS1+14488C>G, rs11247361)の遺伝子型と臨床データとの相関解析

Items	Genotype (mean ± SD)			P value (ANOVA)	P value (Kruskal-Wallis)
	CC	CG	GG		
対象人数	144	229	81		
年齢 (years)	65.0 ± 9.2	68.3 ± 8.5	67.1 ± 10.6	NS	NS
身長 (cm)	150.8 ± 6.1	150.1 ± 6.3	150.3 ± 6.1	NS	NS
体重 (kg)	50.6 ± 7.4	49.5 ± 8.1	50.6 ± 8.7	NS	NS
BMI	22.3 ± 2.8	21.8 ± 3.0	22.6 ± 3.2	NS	NS
椎間板狭小化スコア	0.40 ± 0.88	0.35 ± 0.83	0.43 ± 1.04	NS	NS
脊椎変形スコア	5.69 ± 3.88	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

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 3)。

Table 3 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, CG, GG=1)			5.7	0.110
年齢		43.1	40.4	0.291
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 4, P=0.0042, オッズ比=1.84)。IGF1R 遺伝子の本 SNP におい

Table 4 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=82)	1.38	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

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 4, 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。

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

本解析により日本人閉経後女性 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。

5) 骨芽細胞系における SXR 応答遺伝子の解析

転写活性能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

マイクロアレイ解析を行った結果、溶媒コントロールに対してステロイド X 受容体 (SXR) リガンドにより 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子が 14 個同定され、この中から、TSK、MATN2、CD14 についてさらに解析を行った (Table 5)。これら遺伝

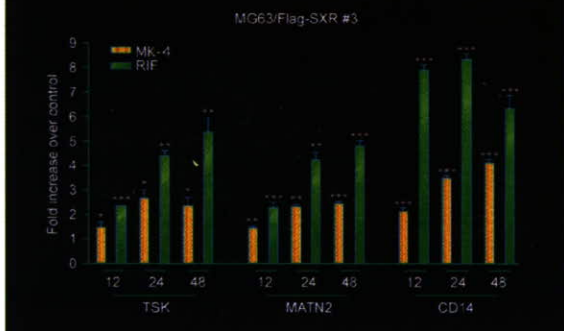
Table 5

Probe set ID	Ensemble gene ID	Gene symbol	Description	Fold increase over control
209994_s_at	ENSG00000086563	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	6.06 4.26
209993_at	ENSG00000086563	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	4.29 4.00
209297_s_at	ENSG00000144861	AGTR1	Angiotensin II receptor, type 1	2.83 2.46
212936_at	ENSG00000142158	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	2.94 2.14
201743_at	ENSG00000170458	CD14	CD14 antigen	2.48 4.92
209771_s_at	ENSG00000185276	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	2.48 2.30
211839_s_at	ENSG00000194371	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	2.48 2.30
212937_s_at	ENSG00000142158	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	2.48 2.14
219379_s_at	ENSG00000185276	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	2.48 2.30
202350_s_at	ENSG00000132561	MATN2	Matrin 2	2.30 6.86
203632_s_at	ENSG00000187191	GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	2.30 5.28
211953_s_at	ENSG00000151822	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	2.30 3.73
211945_at	ENSG00000182704	TSK	Likely ortholog of chicken tsukushi	2.30 2.64
218854_at	ENSG00000118117	SART7	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 2	2.30 5.28
210022_at	ENSG00000141448	GATAB	GATA binding protein 6	2.14 2.14
218594_s_at	ENSG00000187134	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	2.14 3.73
204151_s_at	ENSG00000187134	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	2.00 3.48
212289_at	ENSG00000213655	BERPINE1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade B (ovalbumin), member 1	2.00 2.83

209994 (10 μM) およびシクロファンテン (RIF, 10 μM) (48 h 培養) により、高発現遺伝子 SXR 受容体 MG63 細胞 (MG63/Flag-SXR) において発現誘導した遺伝子群 (溶媒コントロール処理) により、Allylmetresil U133A GeneChip アレイにより解析した。

子は、定量的 RT-PCR による解析の結果、リガンド刺激後 12 時間から発現上昇が確認され、MG63/Flag-SXR 細胞においてもリガンド添加により mRNA の発現量の増加が認められた (Fig 11)。siRNA に

Fig 11
マイクロアレイにより同定された SXR 標的遺伝子の
骨芽細胞系におけるリガンド依存性発現誘導



より SXR mRNA 発現をノックダウンした結果、SXR 蛋白質の発現量が減少し、SXR の代表的標的遺伝子である CYP3A4 (シトクロム P450 3A4) の MK-4 による発現誘導が抑制された (Fig 12)。この条件で SXR 標的遺伝子の発現誘導を解析した結果、SXR のノックダウンにより、MG63/Flag-SXR 細胞およびその親株である MG63 の両者において、遺伝子のリガンド依存的な発現誘導は減少した (Fig 12 および 13)。

MG63 細胞は MK-4 添加により、コラーゲンの蓄積を示す Sirius Red の強い染

Fig 12
SXR 特異的 siRNA による SXR 標的遺伝子の発現低下

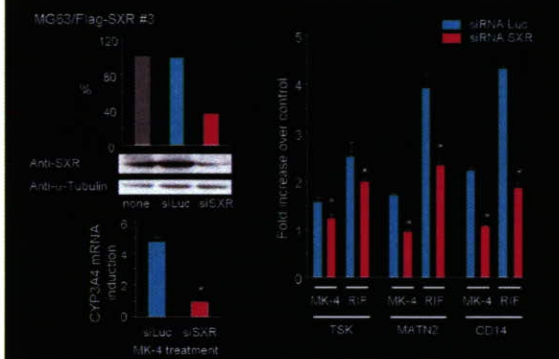
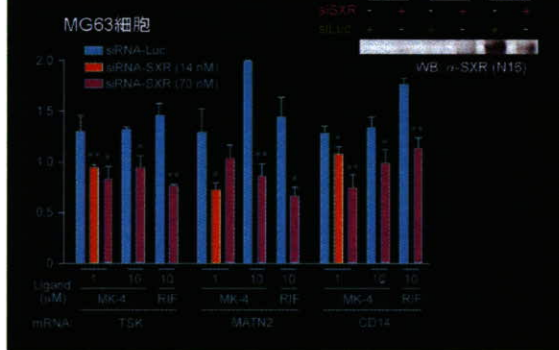
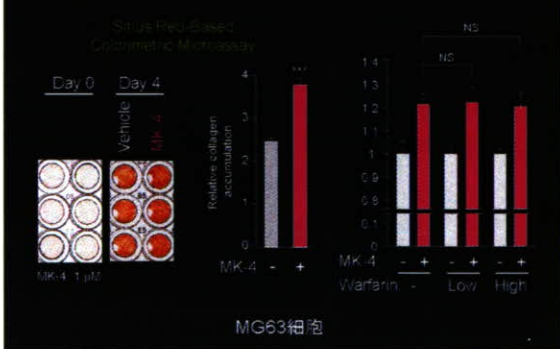


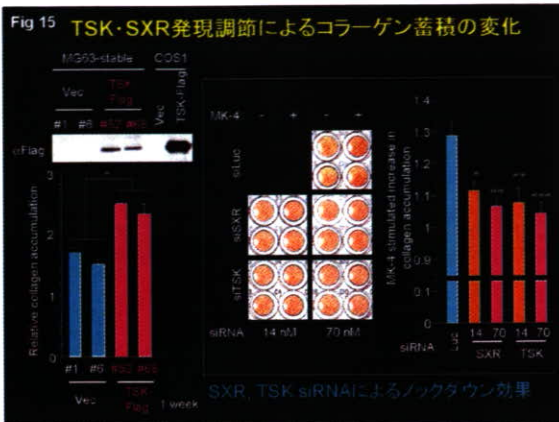
Fig 13
内因性 SXR のノックダウンと
SXR 標的遺伝子の発現低下



色が認められる。この反応はビタミン K 代謝サイクル阻害薬であるワーファリンによっては抑制されないことから、GGCX 非依存性の経路を介することが示唆された (Fig 14)。また、TSK 安定発現 MG63 細胞株を作製し、これを 1 週間培養してコラーゲンの蓄積量を解析した結果、TSK 安定発現細胞ではコントロールのベクター発現細胞に比してコラーゲンの蓄積量が増加していた (Fig 15、次頁)。MK-4 によるコラーゲンの蓄積促進作用

Fig 14
ビタミン K₂ によるコラーゲンの蓄積促進作用は
ワーファリンによって阻害されない





は、SXRとTSKのmRNA発現をsiRNAによりノックダウンすると減少することが示された (Fig 15)。

TSK、MATN2、CD14の近位プロモータ領域(転写開始点より10 kb以内)において、リガンド依存性のSXR結合性をChIPアッセイにて検討したところ、TSKの上流400 bp以内の近傍にMK-4およびリファンピシンによるSXR結合性上昇が認められる領域と、CD14の上流~6 kbにリファンピシンによる軽度SXR結合性上昇が認められる領域が検出された。TSK上流およびCD14上流とも、SXR応答配列の可能性が高い配列を含んでいる。MATN2については、リガンド依存性のSXR結合性上昇する領域を検出できていないが、ゲノム配列の*in silico*解析によりSXR応答配列の可能性が高い配列も見ついている。

6) 骨芽細胞系におけるビタミンK(MK-4)応答遺伝子の解析

ここでは、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、高転写活性でリガンド応答性のある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MK-4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。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るもののうち、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

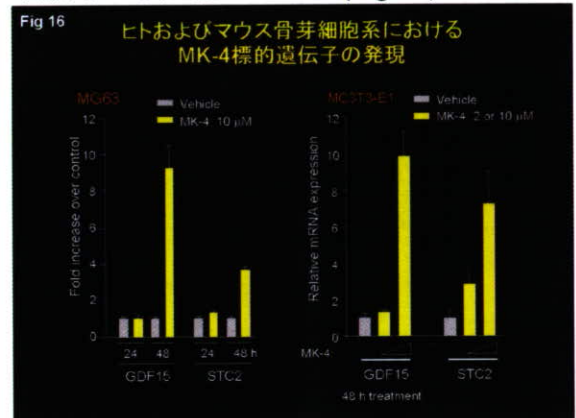
外して、それ以外の14遺伝子をビタミンK応答遺伝子として同定した(Table 6)。こ

Table 6

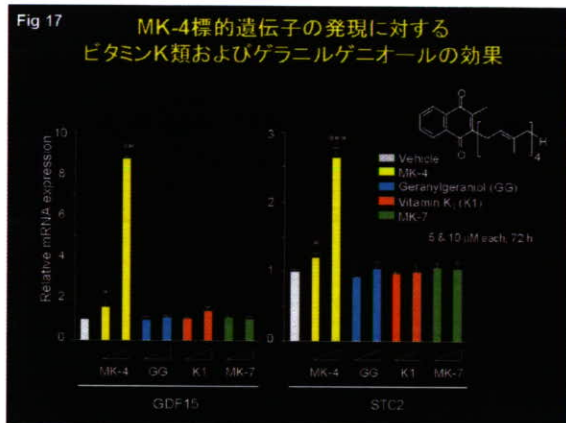
Probe set ID	Ensemble gene ID	Gene symbol	Description	Fold Change	
				Vector	Flag-VP16C-SXR
221577_x_at	ENSG00000130513	GDF15	Growth differentiation factor 15	8.00	5.66
218145_at	ENSG00000101256	TRB3	Tribbles homolog 3 (Drosophila)	6.50	4.29
207145_at	ENSG00000138379	GDF8	Growth differentiation factor 8	4.29	2.00
219270_at	ENSG00000128965	MGC4504	hypothetical protein MGC4504	3.03	3.48
202847_at	ENSG00000100889	PICK2	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2 (mitochondrial)	2.46	2.00
205047_s_at	ENSG00000107869	ASNS	Asparagine synthetase	2.46	3.25
203695_s_at	ENSG00000100222	HMOX1	Hemo oxygenase (hemoxygen) 1	2.30	2.46
208629_s_at	ENSG00000123610	TNFAIP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	2.30	2.00
203438_at	ENSG00000113739	STC2	Stanniocalcin 2	2.14	2.00
203477_at		COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1	2.14	2.14
208625_s_at	ENSG00000123610	TNFAIP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	2.14	2.46
209921_at	ENSG00000151012	SLC7A11	Solute carrier family 7, member 11	2.14	2.64
202887_s_at	ENSG00000168209	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	2.00	2.64
204472_s_at	ENSG00000138695	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	2.00	2.30
220892_s_at	ENSG00000135099	PSAT1	Phosphoserine aminotransferase 1	2.00	2.00

MK-4 (10 μM, 48 時間) により、ベクター発現MG63細胞 (MG63vector) および高転写活性でSXRを発現するMG63細胞 (MG63/Flag-VP16C-SXR) において発現誘導された遺伝子群。溶媒コントロールと比較して、MG63/Flag-VP16C-SXR における発現量がMG63vectorに比して1.5倍以上を除外した。Affymetrix社U133A GeneChipアレイにより解析した。

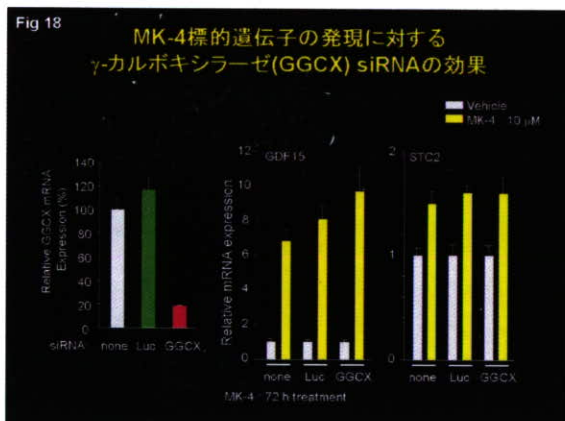
のうち、骨代謝への関与が予想される growth differentiation factor 15 (GDF15)と stanniocalcin 2 (STC2)について解析を行い、どちらの遺伝子もMG63細胞においてMK-4刺激後48時間におけるmRNAの発現誘導が強く認められた(Fig 16)。マウス



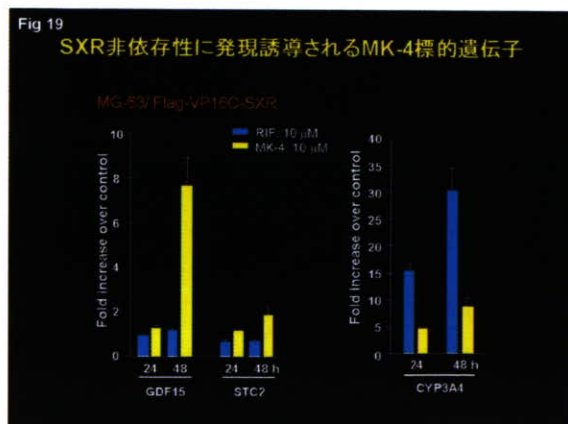
骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1においては、MK-4 2 μMに比較して、MK-4 10 μMにおいて、GDF15およびSTC2 mRNAの著明な発現誘導を認めた(Fig 16)。興味深いことに、MG63細胞におけるGDF15およびSTC2 mRNAの発現誘導は、MK-4の側鎖構造であるゲラニルゲラニオールだけでは起こらず、他のビタミンK構造であるビタミンK₁とビタミンK₂のうちで側鎖のイソプレニル鎖の長さが異なるMK-7でも起こらなかった(Fig 17, 次頁)。MK-4によるGDF15とSTC2 mRNAの発現誘導において、γ-グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)の関与を検討するため、MG63細胞にGGCX siRNAを作用させたところ、GGCX mRNA発現はノックダウ



する条件において、GDF15 と STC2 mRNA の発現に対する影響は認められず、GGCX 非依存性の MK-4 作用が示された (Fig 18)。また、SXR を介する発現誘導で

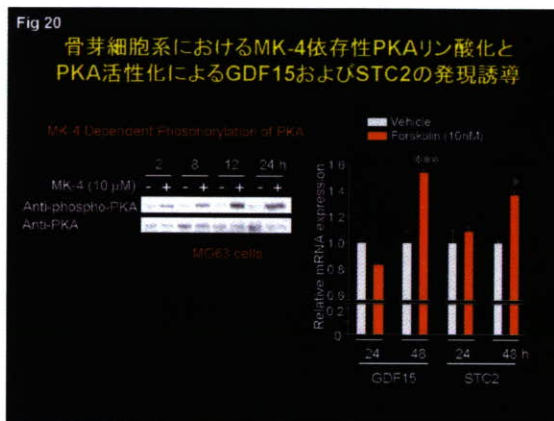


ない点についても、SXR の代表的リガンドであるリファンピシンにより SXR 応答遺伝子 CYP3A4 の mRNA 発現は誘導される条件にて、両者の mRNA 発現上昇は起こらないことを確認した (Fig 19)。以上から、ビタミン K (MK-4)には SXR および GGCX 非依存性の新しい作用があること

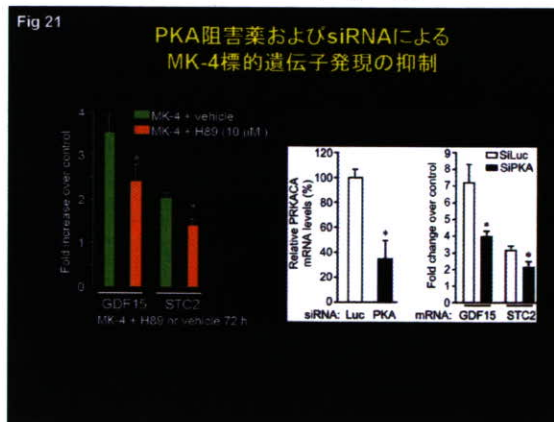


が示唆された。

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β2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 μM)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プロットにより示された (Fig 20)。



フォルスコリン (FSK)によりアデニル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 20)。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 21)。



7) 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 7) について、リガンド

Table 7

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	近位 遺伝子	転写開始 点からの 距離 (bp)	近位遺伝子に 対する 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	26,807,586	SCAP2	-129,874	5' upstream
4	ENm013	7	89,501,530	89,501,614	STEAP2	15,922	intron 3
5	ENm013	7	89,980,335	89,980,389	PFTK1	-3,010	5' upstream
6	ENm001	7	115,551,316	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	41,840,443	41,840,980	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 36)に基づく

依存性の 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、全ての細胞株において、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、2 箇所 (Table 10) における ARBS_2 と ARBS_6) が同定された。

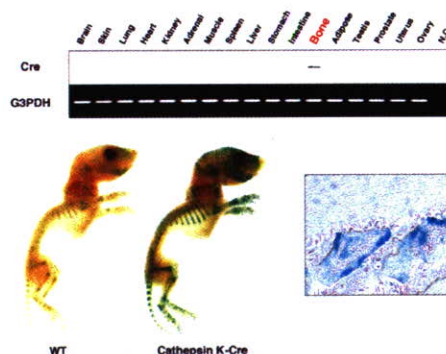
ARBS_2 は PGC (pepsinogen C) の近位プロモータに位置し、ヒト乳癌細胞 T47D において、各種ステロイドホルモン (アンドロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン) による PGC の発現調節が報告されている。本手法により、骨芽細胞系において、少なくともグルココルチコイドにより発現調節を受ける遺伝子の同定が可能であることが示された。本手法を進展させ、ChIP-on-chip 法から得られる全ゲノム中の AR 結合部位データと、骨芽細胞系においてグルココルチコイドの発現調

節を受ける遺伝子のデータを合わせることで、多数の新規ステロイド応答遺伝子が同定されることが期待される。

8) 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 -

一般的なトランスジェニックマウスの問題点である組織特異性の低さや、成長・継代に伴う発現量低下などの解決を期待し、破骨細胞特異的発現遺伝子である Cathepsin K 遺伝子座に直接 Cre 遺伝子を挿入した Cre ノックインマウスの作出を行った。得られたマウスの各組織での Cre 遺伝子発現を RT-PCR Southern 法にて調べたところ、骨組織特異的な発現を確認した。また、CAG-CAT-Z テスターマウスと交配を行うことで生体での Cre 依存性遺伝子欠損について検討した結果、胎生期・成体で破骨細胞特異的な LacZ 遺伝子の発現が確認された (Fig 22)。以上の結

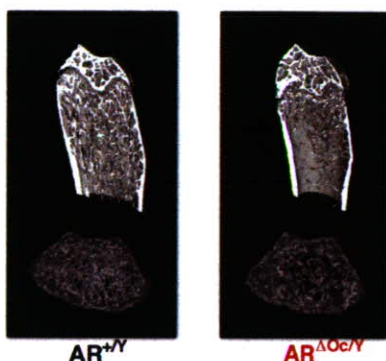
Fig 22



果から破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作製に成功したと判断した。

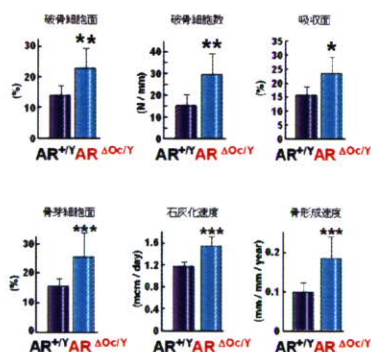
樹立した Ctsk-Cre マウスと AR flox マウスの交配により OcARKO オスマウスを得た。12 週齢雄マウス大腿骨の X 線撮影および 3 次元マイクロ CT による解析を行ったところ、OcARKO マウスでは大腿骨遠位の大幅な海綿骨減少が観察された (Fig 23、次頁)。KO 群で観察された海綿骨減少について詳細に検討するため、骨形態計測による解析を行った結果、骨組織中の破骨細胞数が大幅に増加し、骨吸

Fig 23



収面の増加が観察された。更に代表的な骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度が対象群に対して有意に上昇していたことから、破骨細胞機能亢進による骨吸収速度の増加が起きていると考えられた。興味深いことに骨芽細胞数も増加しており、骨形成速度・石灰化速度が上昇傾向にあった(Fig 24)。以上の結

Fig 24

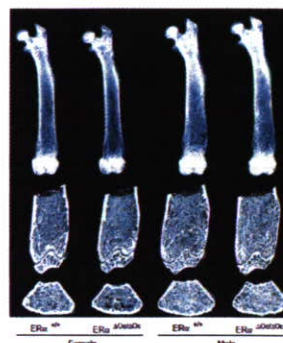


果より、OcARKO マウスでは破骨細胞機能が亢進することで骨代謝回転が高回転となり、その結果として海綿骨量の減少が起きていることが明らかとなった。

一方、樹立した Ctsk-Cre マウスと ER flox マウスの交配により OcERKO マウスを得た。OcERKO マウスでは全身性 ERKO マウスで観察される血中テストステロン値上昇等の内分泌系異常を示さないことから、間接的な骨組織への作用を排除した系統であると考えられた。12 週齢マウスの骨密度を測定した結果、OcERKO メスマウスで顕著な骨密度の低下が見られた(Fig 25)。さらに骨形態計測

Fig 25

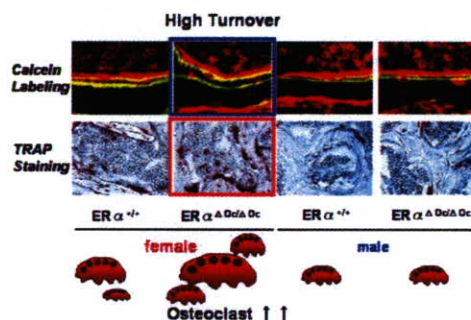
Female OcERαKO mice develop osteopenia



の結果、破骨細胞機能の亢進に伴う高回転型の骨代謝が行われていることが明らかとなった(Fig 26)。また、このマウスで

Fig 26

Female OcERαKO mice develop osteopenia



はエストロゲン過剰投与による海綿骨量の増加が著しく阻害されていることが分かった。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 マウスでは骨量の有意な変化を認めなかった(Fig 27, 28, 29)。

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

Fig 27

E2 Replacement Effect Doesn't Occur in Female OcERαKO

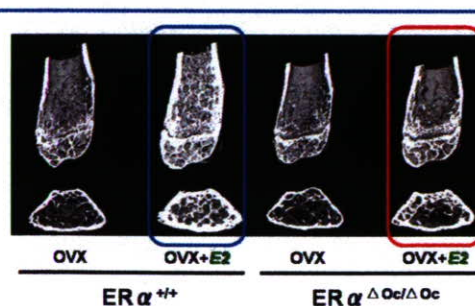


Fig 28

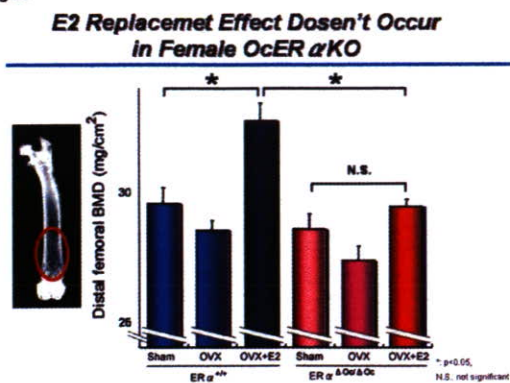
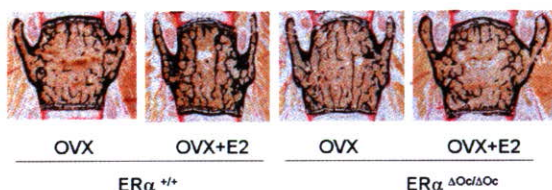


Fig 29



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 30)。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 31)。以上の結果より、破骨細胞内において ER は FasL

Fig 30

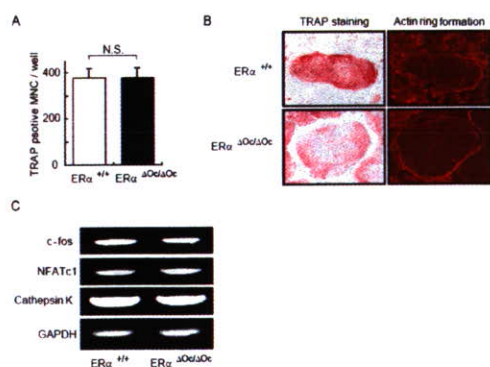
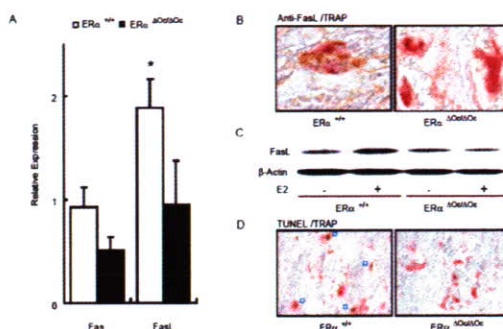


Fig 31



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。

9) 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. 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

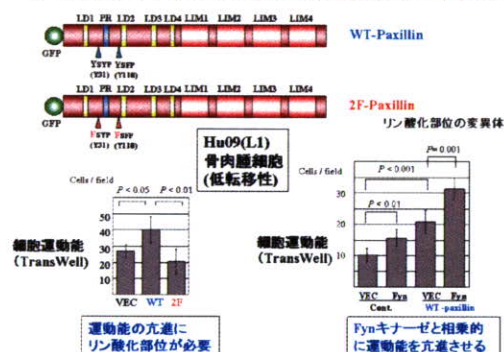
骨肉腫細胞株 Hu-O9 の転移能の異なる亜株群を用いてチロシンリン酸化の相違の検索を進めてきた。転移性の高い群では、どれも低い群よりも Src ファミリーのキナーゼ活性が亢進していたが、それに対応して強くリン酸化している分子として同定された最初の分子は Paxillin であった。Paxillin の細胞内局在は高転移群でも低転移群でも接着班にみられ、発現量、リン酸化量は高転移群で顕著に増加しているもののどちらの群でもインテグリンを介した細胞-基質間の接着に関わっていることが確認された。高転移群の骨肉腫細胞で Src ファミリーのキナーゼ活性を特異的阻害剤 PP2 を用いて阻害すると、Paxillin のリン酸化が著明に低下したことから、Src ファミリーの活性上昇が Paxillin のリン酸化をもたらしていることが示唆された。PP2 は同時に高転移群の細胞で亢進していた運動能が低転移群の細胞群と同程度以下に低下した。

Paxillin のリン酸化量の変化がこの細胞の接着能・運動能に影響を与えていることを確認するために、まず低転移群の

細胞に Paxillin を過剰発現すると、細胞の運動能が亢進した。このような運動能の亢進は paxillin の主要なチロシンリン酸化部位 Y31 と Y118 のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体では見られなかった。また paxillin の発現だけでなく Fyn と共発現させることにより相乗的に細胞運動能を亢進させることが示された(Fig 32)。

Fig 32

Paxillin のチロシンリン酸化の運動能における役割



以上のことから、活性化した Fyn キナーゼが、同時に過剰発現した paxillin のチロシンリン酸化に働き、結果として骨肉腫細胞の運動能・転移能に関与することが明らかになった。

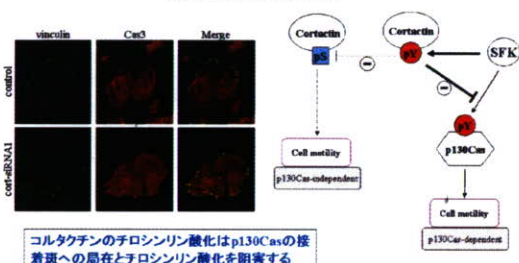
2. コルタクチンのチロシンリン酸化の役割

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 Cas のチロシンリン酸化が強く誘導されていた。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在ると考えられるが、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 33)。

Fig 33

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



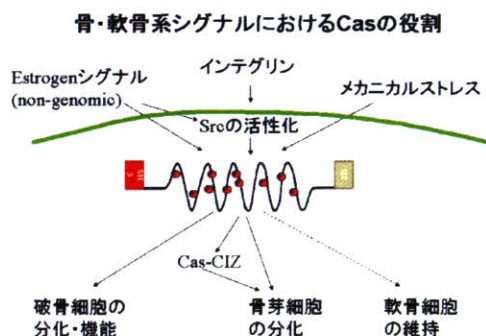
3. メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わりへの解析

Src キナーゼが活性化した癌細胞等では 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限局してみられる。一方、このような細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することが分かった。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、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分かった。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。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下流シグナルの活性化が抑え

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。

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、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 (Fig 34)。

Fig 34



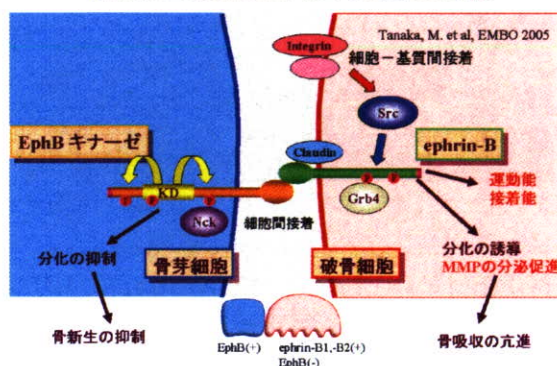
また広島大学原爆放射線医科学研究所の本田浩章先生と共同研究で Cas の SH3 ドメインを欠損するコンディショナルマウスの解析も進めており、メカニカルストレスの伝達異常をもたらす骨軟骨系の異常や、疾患感受性などの解析に興味を持たれる。

4. 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-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、破骨細胞に発現する ephrin-B1 も、骨芽細胞と接触する等の刺激でマトリックスメタロプロテアーゼの分泌を介してその機能に関与することが示唆された (Fig 35)。

Fig 35 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能



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、メタロプロテイナーゼの分泌、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。

10) 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