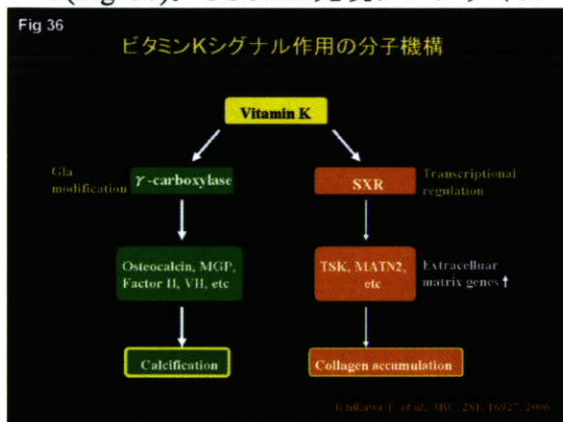


的因子の検索と機能解析

1. ビタミンKシグナルと骨代謝作用(BGP, GGCXコンディショナルトランスジェニックマウスの解析)

ビタミンKシグナルの骨代謝作用は、ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ(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(Fig 36)。GGCXの発現プロファイル

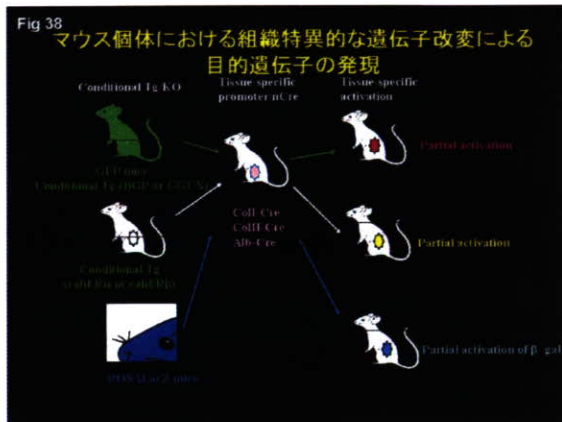
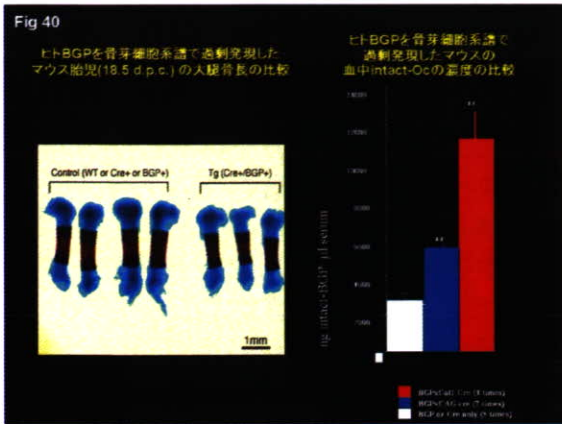
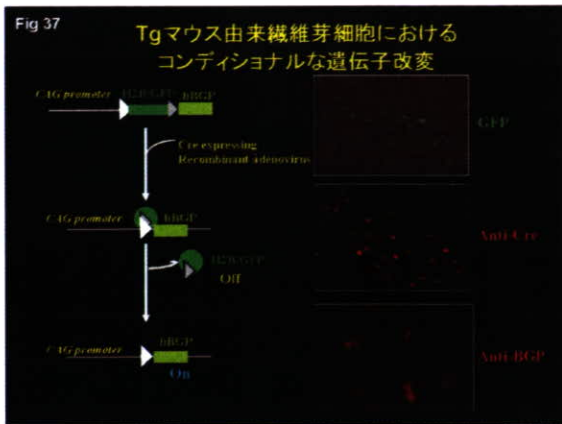


を行うと生体では特に肝臓で高い発現を示しており、ビタミンKを補因子としBGP(Bone Gla Protein: Osteocalcin)やMGP等の Ca^{2+} 結合を制御する修飾酵素として知られている。今までの報告ではGGCXのアミノ酸変異を伴う遺伝子変異は、四肢の形成異常、骨密度と相関があることが報告されている。最近の報告では、高齢者においてGGCXのSNP解析を行った結果、酵素活性と骨代謝との相関があることが示唆され、注目される因子である。本研究では、本来内在性のGGCXの発現が高い肝臓において、アルブミンプロモーター支配下にCre組換え酵素を発現するTgマウスを交配することにより、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討した結果、対照区と有意な差は得られなかったが、さらに詳細な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。ヒトGGCX cTgマウスの骨形成のパラメータを検討した結果、骨形成速度および石灰化速度が有意に減少していることが分かり、一方、骨吸収パラメータに関しては骨吸速度の減少、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。

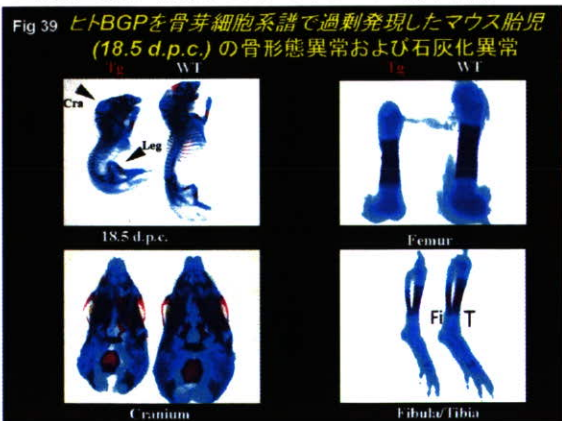
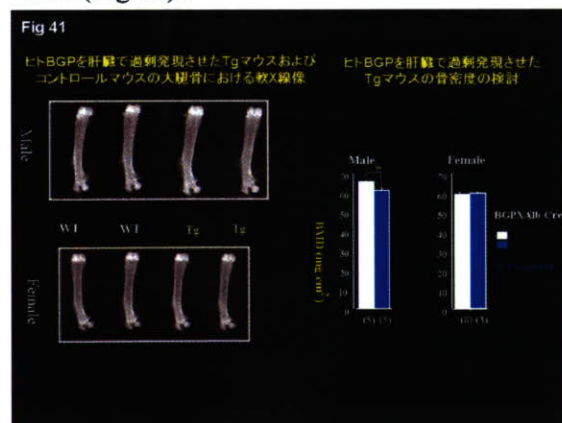
ビタミンKに関連する骨疾患遺伝子の候補として、GGCXのグラ化の標的蛋白であるBGPに関して、cTgマウスの作製を行った結果、数ラインのcTgマウスが得られた。BGPは、血中における代表的な骨代謝マーカーとして知られており、実際に血中の骨形成の指標とされている。BGP遺伝子のKOマウスの表現型では、石灰化異常を伴う顕著な骨量増加が報告されている。最近の3次元の立体構造解析により、骨組織でBGPは、GGCXによりグラ化修飾を受けて、ハイドロキシアパタイトとカルシウムと強固に結合するモデルが報告されている。

BGPの骨代謝における役割を検討するために、ヒトBGP cDNAを単離し、Cre/loxP系を利用して、コンディショナルにgain of functionできる遺伝子改変マウスを作製した。Cre処理前では、GFPをレポーター遺伝子として発現しており、Cre処理後ではGFPが除去されBGPが強制発現される系である(Fig 37、次頁)。骨芽細胞系譜で発現のあるコラーゲンタイプI プロモーター支配下にCreを発現し、BGPを強制発現する系を活用しこれらの遺伝子改変動物を利用して、生体におけるBGPの骨代謝への作用について解析を行った(Fig 38、次頁)。BGPを過剰発現した結果、マウス胎



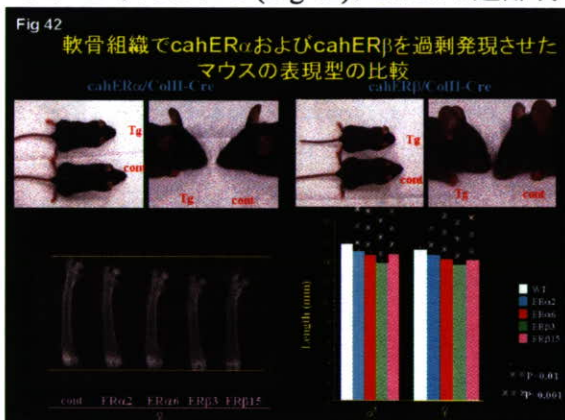
ける作用を検討することは困難と考えられた。それ故、これらの問題点を改善するために、BGPが血中分泌型蛋白であることに着目し、肝臓特異的に遺伝子を発現可能なアルブミンプロモーター支配下にCreを発現するTgマウスと交配することにより、成熟マウス個体を得ることが可能であった。これらのマウスを利用して、血中ヒトBGP量と骨代謝作用の解析を行った結果、骨密度に有意差が認められた(Fig 41)。

生後期から骨組織において石灰化異常が観察された、特に大腿骨、頸骨、および腓骨の長さが対照区と比較すると短く、さらに頭蓋骨の低形成が見られた(Fig 39)。上記交配により得られたBGPを過剰発現するマウスは、ほとんどが出生後1日目-2日目で致死となることを明らかにした。これら出生後1日目-2日目のマウス胎児から血清を集め、血清中のヒトBGP量を測定した結果、これらのマウスで有意に高いintract-BGP値を示した(Fig 40)。しかし、生後直後に致死となるため、骨代謝にお



2. エストロゲン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・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。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、軟骨におけるエストロゲ

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、同様な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 42)。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 43)。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、対照区の膝関節腔域では脂肪層と細胞外マトリックス

で満たされた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 シグナルを過剰発現した区では、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。ER α およびER β それぞれ違う軟骨・膝関節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関し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) 骨軟骨における NR1I サブファミリーの発現と骨粗鬆症

Vitamin D receptor(VDR: NR1I1)、steroid and xenobiotic receptor(SXR、NR1I2)、constitutive androstane receptor(CAR: NR1I3) の3種類は、核内受容体の中でもNR1I サブファミリーを構成する。VDRはビタミンDシグナルを媒介し骨代謝に大きく関与するばかりでなく、そのヒト遺伝子多型が骨密度と関連することが以前より報告されてきた。同じファミリーに属するSXRやCARに関しては肝臓に高発現し薬物代謝や脂質ならびに胆汁酸代謝における報告がなされている。しかしながらSXRやCARによる骨代謝における役割に関しては、未だ十分な理解がなされていない。最近、SXRは骨芽細胞においてビタミンKに対する受容体として機能し、ビタミンKによる骨芽細胞の分化マーカーの転写制御に関わることを報告した。従って、SXRにおいてはVDR同様にその遺伝子多型がヒト骨密度に影

響をもたらす可能性がある。CAR に関しては骨組織における発現の検討および骨代謝との関連の報告はなされていない。本検討において、我々は骨芽細胞での SXR ならびに CAR 遺伝子がラット骨芽細胞、ヒト骨芽細胞ならびにヒト軟骨細胞において発現することが RT-PCR の検討により明らかにされた。さらにヒト SXR 遺伝子ならびに CAR 遺伝子における SNPs が骨量と相関することも同時に見出した。

従って、SXR ならびに CAR 遺伝子は骨量を予測する遺伝子マーカー群として有用である可能性が示唆された。その一方で、SXR や CAR を介したシグナルが骨芽細胞をはじめとした骨代謝においてどのように機能しているかは未だ不明の部分が多くさらなる検討が期待される。

2) Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症

Wnt- β -catenin シグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LDL receptor-related protein 5(LRP5)遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は今までに、LRP5 の SNP と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は腰椎骨密度と有意に相関することを発見した。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)が腰椎骨密度と有意に相関することも見出した。Wnt- β -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-LRP シグナル伝達因子である Wnt10B における SNP が骨量と有意に相

関することを明らかにした。Wnt10B は哺乳動物に多数存在する Wnt シグナルのリガンドとして機能する因子の一つである。近年 Wnt10B 遺伝子のトランスジェニックマウスにおいて骨量増加を示し、ノックアウトマウスでは骨量減少を示すことが報告されている。このマウスのデータと今回の我々の遺伝子多型での解析から、多数存在する Wnt-LRP シグナル制御因子の中で Wnt10B-LRP5 経路が骨形成においては他の Wnt シグナルでは代償できない重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

前述したように我々は LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示してきた。その一方、中国や韓国では LRP5 のエクソン 2 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)が大腿骨頸部における骨密度との相関が報告されている。我々は今回この SNP に関して、本研究において検討したところ腰椎骨密度との有意な相関は見出されなかった。その一方で、本研究においてこの Q89R の SNP に関して OA におけるパラメータ(骨棘形成、椎間板狭小、終板硬化)との相関を検討したところ、骨棘形成との間に有意な相関を見出した。以上より本研究において LRP5 の遺伝子多型が骨量ばかりでなく骨棘形成に関与することを発見した。したがって LRP5 は骨芽細胞の増殖や分化制御ばかりでなく、軟骨の変成にも関与することが示唆された。さらに我々は Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである WISP1 と OA におけるパラメータとの相関を検討したところ、終板硬化との間に有意な相関を見出した。

以上より、Wnt-LRP5 シグナル伝達因子は脊椎変形を規定する遺伝子であることが示唆された。LRP5 ならびにその下流シグナルである WISP1 が脊柱変形に果たす役割を探求することで、新たな OA における遺伝子マーカーや治療薬の応用や開発が期待される。

3) 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 SNP は寿命や脳血管性認知症の発症との相関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 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。

前述したように我々は 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(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の中で終板硬化と有意な相関があることを報告した。さらに、我々は IGF1R が OA におけるパラメータ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の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。

4) 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

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出願中であり、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。こちらも特許出願中で、その活用が待望される。

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

本研究では、骨芽細胞系におけるビタミン K 作用とステロイド作用について、核内受容体およびその他の経路による遺伝子発現調節機構について検討を行い、骨粗鬆症ならびに OA 疾患の病因に関連する遺伝子の機能解析を行った。

本研究において、ビタミン K₂ が骨芽細胞系で核内受容体 SXR を介して、細胞外マトリクス蛋白質をコードする TSK と

MATN2 の発現誘導を行い、特に TSK の発現上昇はコラーゲン蓄積の増加に結びつく作用が明らかになった。TSK は small leucine-rich repeat プロテオグリカン (SLRP)ファミリーに属する構造を有しており、このファミリーの骨代謝における役割として、パイグリカンやデコリンが骨形成において重要な役割を果たしていることが遺伝子欠損マウスにより明らかになっている。またパイグリカンとデコリンは matrilin ファミリーと共に、コラーゲン細線維と結合体を形成することが報告されており、SLRR と matrilin の相互作用が考えられる。CD14 は単球系で発現するリポポリサッカライド結合蛋白であり、分泌型は B リンパ球系の増殖・分化を促す作用がある。B リンパ球系は破骨細胞分化に重要な RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)を発現し、さらに自らが破骨前駆細胞となることが報告されている。骨芽細胞系における CD14 の作用については不明な点が多いが、マウス初代培養骨芽細胞の分化系においては発現上昇が認められることから、骨形成と骨吸収の両者において、coupling factor として働く可能性が示唆される。

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

細胞においてはどのような核内受容体・転写因子もしくは共役因子との協調作用が必要なのかについても興味深い。また、近年、SXR は炎症により活性化される NF- κ B の経路と転写制御のレベルで拮抗することが明らかになった。この拮抗作用が骨、特に破骨細胞においても存在するのであれば、SXR が活性化することにより、OA や骨折などで起こる炎症作用を押さえる効果も考えられる。

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

本研究ではビタミン K₂のうち、MK-4のみで発現誘導される遺伝子群があり、GGCX および SXR の経路によらず、主として PKA の活性化に伴うメカニズムで発現調節されることが示された。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に属する 40-kDa のプロペプチドで、アミノ基側が切断されることにより、活性型ペプチドとして分泌される。TGF- β スーパーファミリーに属する骨形成蛋白 BMP などと同様に、GDF15 蛋白を皮下移植することにより、軟骨や内軟骨骨形成が起こることや、前立腺癌において造骨性骨転移の病巣にのみ発現上昇が認められること等から、MK-4 が GDF15 を介して骨代謝調節に関与する可能性が示唆される。STC2 はスタニオカルシンと呼ばれる分泌糖蛋白ホルモンの 1 つであり、同じファミリーの STC1 については、骨芽細胞分化において発現誘導され、過剰発現すれば骨形成の発育が促進し、ノックダウンすれば骨形成の発育が遅延することなどが報告されている。今回、MK-4 により PKA 活性化に至るメカニズムについては明らかではないが、最近、マウスの骨芽細胞における Gs 蛋白質の恒常的活性化が、著明な骨容積の増加につながることを報告されており、MK-4 が

PKA 上流の Gs 蛋白質やアデニル酸シクラーゼを直接活性化するかは、今後の検討課題と考えられる。

7) 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、アンドロゲン受容体結合部位のゲノム情報を基に、グルココルチコイド受容体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の報告、および研究者ら独自のデータがあり、今後、グルココルチコイド受容体結合部位のゲノム情報と合わせることにより、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。

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 -

本研究では破骨細胞特異的性ホルモン受容体遺伝子欠損マウスを作出することで、生体レベルにおける破骨細胞内性ホルモン受容体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。

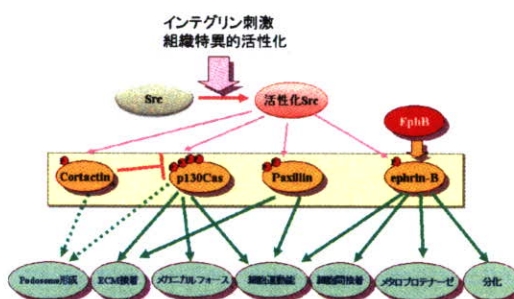
現在まで破骨細胞での明確な性ホルモン受容体の発現報告がないにも関わらず、実際に *OcARKO* マウスおよび *OcERKO* マウスを作製したところ、どちらのマウスともに骨量の減少が観察された。今回得られた結果から、性ホルモンは骨組織を構成する細胞群のひとつである破骨細胞に直接的に作用することで骨吸収を抑制していることが明らかとなった。

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

これまでの研究で *Src* ファミリーキナーゼの活性化に際して、骨細胞系に発現する基質蛋白質群がチロシンリン酸化依存的にそれぞれ特有の生物学的機能を発揮して骨・軟骨系の代謝をコントロールしていることが明らかになった(Fig 46)。

Fig 46

破骨細胞機能のエフェクターとしてのSrc基質群の役割



これらの細胞系の機能的バランスが崩れた状態である骨粗鬆症や OA の治療においては、このような幅広い機能を持つ *Src* ファミリーキナーゼの活性全体を調節するアプローチよりも、個々の基質分子の選択的シグナルを調節するようなアプローチの方がより可能性が高いと考えられる。

c-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、*Src* の活性化と破骨細胞の機能が密接に関係しているものと予測されて重点的に

研究が進められてきたが、多くの状況証拠や関連分子の発見にも関わらずその分子メカニズムについては現在に至るまで完全に解明されてはいない。

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 Paxillin は、破骨細胞においてもその機能に関連することが示唆されており、我々の開発してきた Src-Paxillin のシグナルのブロックが破骨細胞にどのような特異的作用を呈するか今後きちんと詰めていく必要があるが、骨粗鬆症治療の有望なターゲットになっていくことは間違いないと考えている。また Src によるコルタクチンのリン酸化シグナルは、多くの場合細胞機能を促進する方向に働く基質群のシグナルの中で例外的に破骨細胞機能を抑制的に制御している可能性がある。一方 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など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。

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

ビタミン K シグナルと BGP (Bone Gla protein: Osteocalcin) の骨代謝作用は、ビタミン K を介する γ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) のタンパク質修飾の標的因子と考えられ、骨組織で高発現させた場合、胎生致死となり、BGP 自体が骨基質に作用するばかりでなく、骨組織での石灰化制御因子である可能性も考えられる。最近の報告では、BGP は、ホルモン様に作用して内分泌代謝にも作用することが示唆されており、ビタミン K シグナルによる GGCX の標的因子が、タンパク質修飾の有無により新たな生体作用をもたらすことが考えられ、他の GGCX 標的

因子の骨代謝作用の解明および新規標的因子の同定は、今後の研究展開に重要と考えられる。ビタミン K を介する GGCX の肝臓における酵素活性の変化と骨代謝への関与の可能性については、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しないが、より詳細な骨形態計測解析した結果、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。つまり肝臓の GGCX 活性の上昇により、標的 Gla 化蛋白質の Glu/Gla の修飾を変化させ、特に骨吸収に強く作用する因子の存在の可能性が示唆された。このことは、血中の分泌蛋白質もしくは肝臓で合成される蛋白質で Gla 化修飾の制御を受ける蛋白質が存在し、骨吸収作用を抑制する可能性が考えられる。また、肝臓機能と骨代謝がビタミン K シグナルを介してお互いにリンクしている可能性が考えられ、慢性的な肝疾患における骨代謝異常との関係についても興味深い。ビタミン K シグナルを介する作用としては、骨粗鬆症の治療における骨量・骨密度だけでなく、骨質等も併せたパラメータの重要性、骨質を改善させるような新たな創薬ターゲットとしての可能性が考えられる。

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

LRP5、WISP1、WNT10B、CAR、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キャンにて極めて低い P 値を有する複数の SNP を同定し、診断学的価値が期待され、特許を出願中である。また、一連の解析から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、新しいシグナル経路を発見した。特にビタミンKの核内受容体 SXR 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新しいメカニズムを示し疾患モデル動物への応用が期待された。堺は、細胞内シグナル伝達の研究により、新規リン酸化シグナルと蛋白分解酵素の分泌との新しい交絡現象を見出し、さらにはメカニカルストレスを検知する画期的な分子メカニズムを明らかにした。津久井は、発生工学、疾患モデル動物を活用して、骨粗鬆症治療薬であるビタミンK、エストロゲン関連のコンディショナル遺伝子改変動物を疾患モデル動物として開

発し、骨と軟骨における病態を明らかにした。以上の研究で同定した新規標的因子、シグナル経路、作用メカニズムは新しい骨粗鬆症ならびに変形性関節症の予防、診断、治療法の開発に役立てられる。このように DNA、RNA、蛋白レベルでの多面的かつゲノム医学を取り入れた新しい方法で骨粗鬆症における疾患遺伝子を探索し、その機能の解明を動物モデルとヒトにおいて生物個体レベルで行うことにより、基礎ならびに臨床医学的な研究を推進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Urano, T., Shiraki, M., Fujita, M., Hosoi, T., Orimo, H., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxigenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 23, 226-230, 2005.
2. Ogushi, T., Takahashi, S., Takeuchi, T., Urano, T., Horie-Inoue, K., Kumagai, J., Kitamura, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M., Inoue, S.: Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res* 65, 3700-3706, 2005.
3. Suzuki, T., Urano, T., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Moriya, T., Ishida, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Sasano, H., Inoue, S.: Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 6148-6154, 2005.
4. Sudo, Y., Ezura, Y., Kajita, M., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Ito, H., Emi, M.: Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the pro-opiomelanocortin gene

- (POMC) with low bone mineral density in adult women. *J Hum Genet* 50, 235-240, 2005.
5. Sakuma, M., Akahira, J.I., Suzuki, T., Inoue, S., Ito, K., Moriya, T., Sasano, H., Okamura, K., Yaegashi, N.: Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 99, 664-670, 2005.
 6. Acconcia, F., Totta, P., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Trentalancia, A., Muramatsu, M., Mario, M.: Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: Role of ER α and ER β activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* 203, 193-201, 2005.
 7. Asaoka, K., Ikeda, K., Hishinuma, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: A retrovirus restriction factor TRIM5 α is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1950-1956, 2005.
 8. Ito, K., Suzuki, T., Akahira, J., Sakuma, M., Saitou, S., Okamoto, S., Niikura, H., Okamura, K., Yaegashi, N., Sasano, H., Inoue, S.: 14-3-3 σ in endometrial cancer - A possible prognostic marker in early stage cancer -. *Clin Cancer Res* 11, 7384-7391, 2005.
 9. Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. (2005) Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function. (Edited by Iuchi S, Kuldell N), Landes Bioscience, Georgetown, (pp 106-113)
 10. Aoki T, Imamura H, Makuuchi M, Inoue S: Immunohistochemical detection of EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma. 2005, Handbook of Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas Volume 3. Molecular genetics, liver carcinoma, and pancreatic carcinoma (Edited by M.A. Hayat) Elsevier Academic Press, New Jersey, (pp261-268)
 11. Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y., Sakai, R.: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24, 4754-4764, 2005.
 12. Horie-Inoue, K., Takayama, K., Bono, H., Ouchi, Y., Okazaki, Y., Inoue, S.: Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 99-106, 2006.
 13. Urata, Y., Ihara, Y., Murata, H., Goto, S., Koji, T., Yodoi, J., Inoue, S., Kondo, T.: 17-beta-Estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cell. *J Biol Chem* 281, 13092-13102, 2006.
 14. Shukuwa, K., Izumi, S.I., Hishikawa, Y., Ejima, K., Inoue, S., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitaoka, T., Koji, T.: Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochem Cell Biol* 126, 111-123, 2006.
 15. Nakasato, N., Ikeda, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res*

- Commun* 351, 540-546, 2006.
16. Takeuchi, T., Inoue, S., Yokosawa, H.: Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 473-477, 2006.
 17. Ichikawa, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B., Inoue, S.: Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934, 2006.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley, B.W., Kato, S.: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 8126-8131, 2005.
37. Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J* 24, 3881-3894, 2005.
38. Ogawa, S., Oishi, H., Mezaki, Y., Kouzu-Fujita, M., Matsuyama, R., Nakagomi, M., Mori, E., Murayama, E., Nagasawa, H., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor α associates with Hsc70. *Genes Cells* 10, 1095-1102, 2005.
39. Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato, S.: Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 138, 105-110, 2005.
40. Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E.,

- Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J Pharm Experim Therapeutics* 315, 545-552, 2005.
41. Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 933-938, 2005.
 42. Kambayashi, H., Odake, Y., Takada, K., Funasaka, Y., Ichihashi, M., Kato, S.: N-retinoyl-D-glucosamine, a new retinoic acid agonist, mediates topical retinoid efficacy with no irritation on photoaged skin. *Br J Dermatol* 153, 30-36, 2005.
 43. Kato, S., Sato, T., Watanabe, T., Takemasa, S., Masuhiro, Y., Ohtake, F., Matsumoto, T.: Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 56 (Supple. 7), 4-9, 2005.
 44. Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 2236-2239, 2005.
 45. Takada, I., Suzawa, M., Kato, S.: Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Pharmacol Sci* 97, 184-189, 2005.
 46. Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Chapter 17, Promoter targeting of vitamin D receptor through a chromatin remodeling complex. In *Vitamin D*, 2nd Edition, ed. by Feldman D, Pike JW, Glorieux, FH, Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp.305-312, 2005.
 47. Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T.: $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 429-440, 2005.
 48. Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C.A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St-Arnoud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low-P_i diet of type II NaP_i cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α OHase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C429-C434, 2005.
 49. Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br J Dermatol* 152, 231-241, 2005.
 50. Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., Kato, S., Taketani, Y.: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator or oestrogen receptor α . *Br J Cancer* 92, 2286-2291, 2005.
 51. Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., Nawata, H.: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* 54, 1000-1008, 2005.

52. Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata, E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima, N.: Circulating FGF-23 is regulated by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus *in vivo*. *J Biol Chem* 280, 2543-2549, 2005.
53. Ikeda, Y., Aihara, K., Sato, T., Akaike, M., Yoshizumi, M., Suzaki, Y., Izawa, Y., Fujimura, M., Hashizume, S., Kato, M., Yagi, S., Tamaki, T., Kawano, H., Matsumoto, T., Azuma, H., Kato, S., Matsumoto, T.: Androgen receptor gene knockout male mice exhibit impaired cardiac growth and exacerbation of angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *J Biol Chem* 280, 29661-29666, 2005.
54. Bando, T., Sekine, K., Kobayashi, S., Watabe, M.A., Rump, A., Tanaka, M., Suda, Y., Kato, S., Morikawa, Y., Manabe, T., Miyajima, A.: Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol Cell Biol* 25, 4166-4175, 2005.
55. Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., Okano, T.: 22-Oxa- 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 1044-1054, 2005.
56. Kallay, E., Bises, G., Bajna, E., Bieglmayer, C., Gerdenitsch, W., Steffan, I., Kato, S., Armbrecht, H.J., Cross, H.S.: Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases-a possible approach for tumor prevention. *Carcinogenesis* 26, 1581-1589, 2005.
57. Yamamoto, K., Uchida, E., Urushino, N., Sakaki, T., Kagawa, N., Sawada, N., Kamakura, M., Kato, S., Inouye, K., Yamada, S.: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D₃ whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I. *J Biol Chem* 280, 30511-30516, 2005.
58. Inoue, Y., Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Kusano, K., Kawakami, E., Furutani, J., Ito, M., Kuwahata, M., Saito, H., Fukushima, N., Kato, S., Kanayama, H., Miyamoto, K.: Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J* 390, 325-331, 2005.
59. Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J Biol Chem* 281, 20-26, 2006.
60. Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12, 133-137, 2006.
61. Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 224-229, 2006.
62. Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrinol J* 53,

- 157-172, 2006.
63. Lee, H.S., Sasagawa, S., Kato, S., Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A.: Yeast two-hybrid detection systems that are highly sensitive to a certain kind of endocrine disruptors. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 521-524, 2006.
 64. Urushino, N., Yamamoto, K., Kagawa, N., Ikushiro, S., Kamakura, M., Yamada, S., Kato, S., Inouye, K., Sakaki, T.: Interaction between mitochondrial CYP27B1 and adrenodoxin: Role of Arginine 458 of Mouse CYP27B1. *Biochemistry* 45, 4405-4412, 2006.
 65. Yamaoka, K., Kim, M.-S., Takada, I., Takeyama, K., Kamimura, T., Kato, S.: Culture serum-induced conversion from agonist to antagonist of a Vitamin D analog, TEI-9647. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100, 177-183, 2006.
 66. Yamada, T., Kawano, H., Koshizuka, Y., Fukuda, T., Yoshimura, K., Kamekura, S., Saito, T., Ikeda, T., Kawasaki, Y., Azuma, Y., Ikegawa, S., Hoshi, K., Chung, U., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med* 12, 665-670, 2006.
 67. Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 11736-11741, 2006.
 68. Tateishi, Y., Sonoo, R., Sekiya, Y., Sunahara, N., Kawano, M., Wayama, M., Hirota, R., Kawabe, Y., Murayama, A., Kato, S., Kimura, K., Yanagisawa, J.: Turning off estrogen receptor β -mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol* 26, 7966-7976, 2006.
 69. Katsu, Y., Kohno, S., Oka, T., Mitsui, N., Tooi, O., Santo, N., Urushitani, H., Fukumoto, Y., Kuwabara, K., Ashikaga, K., Minami, S., Kato, S., Ohta, Y., Guilette, L.J. Jr, Iguchi, T.: Molecular cloning of estrogen receptor α (ER α ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol Cell Endocrinol* 257-258, 84-94, 2006.
 70. Ma, Y., Khalifa, B., Yee, Y.K., Lu, J., Memezawa, A., Savkur, R.S., Yamamoto, Y., Chintalacheruvu, S.R., Yamaoka, K., Stayrook, K.R., Bramlett, K.S., Zeng, Q.Q., Chandrasekhar, S., Yu, X.P., Linebarger, J.H., Iturria, S.J., Burris, T.P., Kato, S., Chin, W.W., Nagpal, S.: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest* 116, 892-904, 2006.
 71. Moore, D.D., Kato, S., Xie, W., Mangelsdorf, D.J., Schmidt, D.R., Xiao, R., Kliewer, S.A.: International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnene X receptor, farnesoid X receptor α , farnesoid X receptor β , liver X receptor α , liver X receptor β , and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev* 58, 742-759, 2006.
 72. 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.
 73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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, 2007.
77. Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566, 2007.
78. Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., Kato, S.: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. *Nat Cell Biol* 9, 604-611, 2007.
79. Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H., Kato, S.: A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. *EMBO J* 26, 764-774, 2007.
80. Miyamoto, J., Matsumoto, T., Shiina, H., Inoue, K., Takada, I., Ito, S., Itoh, J., Minematsu, T., Sato, T., Yanase, T., Nawata, H., Osamura, R.Y., Kato, S.: Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. *Mol Cell Biol* 27, 4807-4814, 2007.
81. Kim, M.-S., Fujiki, R., Kitagawa, H., Kato, S.: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 168-173, 2007.
82. Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S.: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 21, 334-342, 2007.
83. Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch Biochem Biophys* 460, 166-171, 2007.
84. Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S., Kouzmenko, A.P.: Id2 Gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid

- signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* 26, 5038-5045, 2007.
85. Kimura, S., Matsumoto, T., Matsuyama, R., Shiina, H., Sato, T., Takeyama, K., Kato, S.: Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol Metab* 18, 183-189, 2007.
 86. Kato, S., Fujiki, R., Kim, M.-S., Kitagawa, H.: Ligand-induced transrepressive function of VDR requires a chromatin remodeling complex, WINAC. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 372-380, 2007.
 87. Matsumoto, T., Kawano, H., Shiina, H., Sato, T., Kato, S.: Androgen receptor functions in male and female reproduction. *Reproductive Med Biol* 6, 11-17, 2007.
 88. Fuse, H., Korenaga, S., Sakari, M., Hiyama, T., Ito, T., Kimura, K., Kato, S.: Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression. *Prostate* 67, 630-637, 2007.
 89. Sato, S., Kojima, M., Hanada, R., Kimura, A.I., Abe, T., Matsumoto, T., Iwasaki, M., Inose, H., Ida, T., Mieda, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., Kato, S., Kangawa, K., Shinomiya, K., Takeda, S.: Central control of bone remodelling by Neuromedin U: a mediator of the leptin-dependent regulation of bone formation. *Nat Med* 13, 1234-1240, 2007.
 90. Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J Clin Invest* 117, 1514-1526, 2007.
 91. Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T., Itoh, H.: Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J Biol Chem* 282, 1998-2010, 2007.
 92. Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R. and Nawata, H.: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. *J Biol Chem* 282, 7329-7338, 2007.
 93. Mukai, H., Tsurugizawa, T., Murakami, G., Kominami, S., Ishii, H., Ogiue-Ikeda, M., Takata, N., Tanabe, N., Furukawa, A., Hojo, Y., Ooishi, Y., Morrison J. H., Janssen, W.G., Rose, J.A., Chambon, P., Kato, S., Izumi, S., Yamazaki, T., Kimoto, T., Kawato, S.: Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100, 950-967, 2007.
 94. Kittaka, A., Saito, N., Honzawa, S., Takenouchi, K., Ishizuka, S., Chen, T. C., Peleg, S., Kato, S., Arai, M.A.: Creative synthesis of novel vitamin D analogs for health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 269-276, 2007.
 95. Hirata, T., Fujioka, M., Takahashi, K. A., Asano, T., Ishida, M., Akioka, K., Okamoto, M., Yoshimura, N., Satomi,

- Y., Nishino, H., Hirota, Y., Nakajima, S., Kato, S., Kubo, T.: Low molecular weight phenotype of Apo(a) is a risk factor of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplant. *J Rheumatol* 34, 516-522, 2007.
96. Arai, M.A., Takeyama, K., Ito, S., Kato, S., Chen, T.C., Kittaka, A.: High-throughput system for analyzing ligand-induced cofactor recruitment by vitamin D receptor. *Bioconjug Chem* 18, 614-620, 2007.
97. Hirata, T., Fujioka, M., Takahashi, K.A., Arai, Y., Asano, T., Ishida, M., Kuribayashi, M., Akioka, K., Okamoto, M., Yoshimura, N., Satomi, Y., Nishino, H., Fukushima, W., Hirota, Y., Nakajima, S., Kato, S., Kubo, T.: ApoB C7623T polymorphism predicts risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation. *J Orthop Sci* 12, 199-206, 2007.
98. Indra, A.K., Castaneda, E., Antal, M.C., Jiang, M., Messaddeq, N., Meng, X., Loehr, C.V., Gariglio, P., Kato, S., Wahli, W., Desvergne, B., Metzger, D., Chambon, P.: Malignant transformation of DMBA/TPA-induced papillomas and nevi in the skin of mice selectively lacking retinoid-X-receptor α in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127, 1250-1260, 2007.
99. Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.J., Okamoto, K., Nishizawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627, 2008.
100. Miyake, I., Hakomori, Y., Misu, Y., Nakadate, H., Matsuura, N., Sakamoto, M., Sakai, R.: Domain-specific function of ShcC docking protein in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 3206-3215, 2005.
101. Azuma, K., Tanaka, M., Uekita, T., Inoue, S., Yokota, J., Ouchi, Y., Sakai, R.: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24, 4754-4764, 2005.
102. Miyamoto, Y., Chen, L., Sato, M., Sokabe, M., Nabeshima, T., Pawson, T., Sakai, R., Mori, N.: Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J Neurosci* 25, 1826-1835, 2005.
103. Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A., Sakai, R.: Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol* 167, 213-222, 2005.
104. Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Kawazu, M., Yamagata, T., Sakai, R., Mitani, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Chiba, S., Hirai, H.: Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol* 175, 3492-3501, 2005.
105. Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R.: Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *EMBO J* 24, 3700-3711, 2005.
106. Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R.: EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of claudin-4 and mediates

- paracellular permeability. *J Biol Chem* 280, 42375-42382, 2005.
107. 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.
 108. Sawada, Y., Tamada, M., Dubrin-Thaler, B., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., Sheetz, M.P.: Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026, 2006.
 109. Tanaka, M., Kamata, R., Takigahira, M., Yanagihara, K., Sakai, R.: Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *Am J Pathol* 171, 68-78, 2007.
 110. Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Sakai, R.: Carboxyl terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J Cell Sci* 120, 2179-2189, 2007.
 111. Uekita, T., Jia, L., Narisawa-Saito, M., Yokota, J., Kiyono, T., Sakai, R.: CUB domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Mol Cell Biol* 27, 7649-7660, 2007.
 112. Tazaki, T., Miyazaki, K., Hiyama, E., Nakamoto, T., Sakai, R., Yamasaki, N., Honda, Z., Noda, M., Miyasaka, N., Sueda, T., Honda, H.: Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes Cells* 13, 145-157, 2008.
 113. Jia, L., Uekita, T., Sakai, R.: Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of Cas. *Mol Cancer Res*, in press.
 114. Imazawa, Y., Hisatake, K., Mitsuzawa, H., Matsumoto, M., Tsukui, T., Nakagawa, K., Nakadai, T., Shimada, M., Ishihama, A., Nogi, Y.: The fission yeast protein Ker1p is an ortholog of RNA polymerase I subunit A14 in *Saccharomyces cerevisiae* and is required for stable association of Rm3p and RPA21 in RNA polymerase I. *J Biol Chem* 280, 11467-11474, 2005.
 115. Tsukui, T., Imazawa, Y., Inoue, S.: Role of estrogen signaling in male bone. *Clin Calcium* 3, 468-472, 2006.
 116. Tsukui, T., Imazawa, Y., Inoue, S.: Molecular mechanism of vitamin K and its regulators in bone metabolism. *Clin Calcium* 17, 1685-1691, 2007.
 117. Ito, M., Muraki, M., Takahashi, Y., Imai, M., Tsukui, T., Yamakawa, N., Nakagawa, K., Ohgi, S., Horikawa, T., Iwasaki, W., Iida, A., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Miyado, K., Kono, T., Hosoi, Y., Saito, H.: Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertil Steril*, in press.
2. 学会発表
【国際学会】
1. Horie-Inoue, K., Takayama, K., Inoue, S.: Identification of novel hormone-responsive genes through the combination of bioinformatics and functional analysis in cells derived from different tissues. (2005.9.18-22) Tissue-selective Nuclear Receptors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Breckenridge, CO, USA.
 2. Urano, T., Shiraki, M., Narusawa, K.,

- Usui, T., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spine osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. (2005.9.23-27) American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA.
3. Asaoka, K., Ikeda, K., Inoue, S., Takeda, S.: Interferon-induced expression of TRIM5alpha, a retrovirus restriction factor. (2005.10.1) The XIXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology, Seoul, Korea.
 4. Inoue, S.: [Luncheon Seminar] Novel mechanism of vitamin K action via transcriptional regulation. (2005.11.7-11) International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, Awaji, Japan.
 5. Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide COX7RP is transcriptionally regulated by estrogen-related receptor α and estrogen receptors through an identical estrogen response element. (2005.12.15) Mitochondria and Life 2005, Tokyo, Japan.
 6. Inoue, S.: [Symposium] TRIM/RBCC family proteins in cancer and antiviral defense. (2006.6.23-24) Fourth RCGM Symposium of Academic Frontier International Conference of Hormone and Genome. Kawagoe, Saitama, Japan.
 7. Fujita, M., Takenouchi, T., Nakai, M., Urano, T., Inoue, S., Hashimoto, M.: Alpha-synuclein stimulates cellular differentiation in osteoblastic cells. (2006.6.18-23) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan.
 8. Ezura, Y., Nakajima, T., Inoue, S., Hosoi, T., Suzuki, T., Shiraki, M., Emi, M., Noda, M.: A genetic screening of osteoporosis susceptibility genes via 1315 common missense single nucleotide polymorphisms: a leader sequence variant (16-S) of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) had reproducibly associated with low bone mineral density among adult women. (2006.9.15-29) American Society of Bone and Mineral Research 28th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
 9. Inoue, S.: [Invited Talk] Post-translational modification of 14-3-3 σ by E3 ligase Efp. (2006.8.27-9.1) 2006 GRC on Biology of 14-3-3 Protein, Gordon Research Conference, Oxford, UK.
 10. Horie-Inoue, K., Ichikawa, T., Inoue, S.: [President's Poster] Vitamin K2 activates the transcription of bone-related genes in osteoblastic cells by steroid and xenobiotic receptor and a novel pathway independent of gamma-carboxylation. (2006.10.21-26) 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis, Port Douglas, Australia.
 11. Horie-Inoue, K., Takayama, K., Inoue, S.: Common and differential responses to steroid hormones via their receptor-binding sites in human genome identified by chromatin immunoprecipitation-based tiling array. (2007.3.22-27) Keystone Symposia, Steamboat Springs, Colorado, USA.
 12. Horie-Inoue, K., Ichikawa, T., Inoue, S.: Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. (2007.4.28-5.2) 9th European Congress