

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., Okano, T.: 22-Oxa- $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 1044-1054, 2005.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci US A* 103, 11736-11741, 2006.
33. 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.
34. 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.
35. 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, nonsteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest* 116, 892-904, 2006.
36. 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, pregnane 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.
37. 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.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.

48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.

59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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 alpha in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127, 1250-1260, 2007.
64. 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.: Catheptin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627, 2008.
2. 学会発表
【国際学会】
1. Kato, S.: Co-regulator complexes for VDR. XXXV International Congress of Physiological Sciences, San Diego, USA (2005.3.31-4.5)
 2. Kato, S.: The function of steroid receptors in bone. The 2nd Advanced Bone and Joint Symposium, Tokyo, Japan (2005.6.13-14)
 3. Takada, I., Suzawa, M., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Mezaki, Y., Igarashi, M., Kato, S.: Differentiation switch of mesenchymal stem cells through suppression of PPAR γ function by NLK, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
 4. Nakamura, T., Watanabe, T., Nakamichi, Y., Azuma, Y., Yoshimura, K., Matsumoto, T., Fukuda, T., Ochiai, E., Metzger, D., Chambon, P., Sato, T., Kato, S.: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts, American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA (2005.9.23-27)
 5. Kato, S.: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
 6. Fujiki, R., Kim, M.S., Sasaki, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -

- induced transrepression on 1α -hydroxylase gene promoter is mediated by chromatin remodeling through WINAC, EMBO Conference, Gardone Riviera, Italy (2005.9.29-10.1)
7. Kato, S.: The role of Williams Syndrome Transcription Factor (WSTF) in gene regulation and chromatin remodeling through vitamin D receptor, Workshop "Epigenetic Mechanisms in Development and Disease", Baeza, Spain (2005.11.13-16)
 8. Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Maki, A., Zhao, Y., Yamagata, K., Furutani, T., Kouzmenko, A., Tanabe, M., Takeyama, K., Kato, S.: E2F transcriptional activation as a potential mechanism of neurodegeneration of polyglutamine expansion androgen receptor mutants. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 9. Yoshimura, K., Kitagawa, H., Fujiki, R., Matsumoto, T., Kato, S.: Analysis of a novel VDR interacting chromatin remodeling complex 'WINAC' *in vivo*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 10. Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kouzmenko, A., Kato, S.: *Drosophila* genetic system as a powerful tool for identification of novel co-regulators of human nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 11. Baba, A., Ohtake, F., Kato, S.: Modulation of estrogen signaling by dioxin receptor and associated complexes. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 12. Yokoyama, A., Takezawa, S., Okada, M., Fujiki, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Identification and functional analysis of cell-cycle specific co-repressor complex, Dev-CoR complex. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 13. Zhao, Y., Takeyama, K., Ito, S., Suzuki, E., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Tanabe, M., Kato, S.: Isolation of androgen receptor co-regulators regulating the alteration of chromatin structure using modified position effect variegation system in *Drosophila*. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 14. Kato, S.: Bone remodeling and the roles of nuclear receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptors), Banff, Canada (2006.3.18-23)
 15. Kato, S.: Ligand-induced transrepression mechanism by nuclear receptor through chromatin remodeling/modification complexes. 13th Workshop on Vitamin D, Victoria, Canada (2006.4.7-12)
 16. Kato, S.: Function of co-regulator complexes for nuclear receptors. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
 17. Ito, S., Takeyama, K., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Kouzmenko, A., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Shirode, Y., Tabata, T., Kato, S.: Identification of a novel co-regulator of nuclear receptors by *Drosophila* genetic system. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
 18. Sawatsubashi, S., Takeyama, K., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Yamagata, K., Shirode, Y., Tabata, T., Kato, S.: Functional analysis of ecdysone

- receptor-mediated transcription through alteration of chromatin structure. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
19. Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Ohya, H., Kato, S.: Functional analysis of a novel ATP dependent chromatin remodeling complex 'WINAC'. Keystone Symposia (Regulation of Eukaryotic Transcription), New Mexico, USA (2006.4.21-26)
 20. Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signaling by activated dioxin receptor. Gordon Research Conference "Environmental Endocrine Disruptors". Pisa, Italy (2006.6.4-9)
 21. Kato, S.: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by VDR on the human CYP27B1 gene promoter mediates the DNA methylation. Adrenal 2006/ Molecular Steroidogenesis 5, Boston, USA (2006.6.20-23)
 22. Kato, S.: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts. 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Athens, Greece (2006.9.13-17)
 23. Kim, M.-S., Murayama, A., Fujiki, R., Takeyama, K., Kato, S.: $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation mediates the transrepression by VDR. ASBMR 28th Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
 24. Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.: Vitamin K stimulates osteoblastogenesis through PXR/SXR-mediated Msx2 induction. ASBMR 28th Annual Meeting, Philadelphia, USA (2006.9.15-19)
 25. Kato, S.: Bone remodelling and the roles of nuclear receptor. 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis and 16th Annual Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Port Douglas, Australia (2006.10.22-26)
 26. Kato, S.: Nuclear steroid receptors and bone remodeling. Annual Autumn Symposium of Korean Society of Endocrinology, Busan, Korea (2006.11.3-4)
 27. Kato, S.: Bone remodeling and the roles of nuclear receptor. International Conference on Progress in Bone and Mineral Research (AuSBMR) 2006, Vienna, Austria (2006.11.16-18)
 28. Kato, S.: Transcriptional pathways in the treatment of bone disease. Salk/Nature/Ipsen Foundation Symposium on Biological Complexity: Diseases of Transcription, La Jolla, USA (2007.1.11-14)
 29. Kato, S.: Functional regulation of nuclear steroid hormone receptors through protein degradation. The 4th International Nuclear Receptor Meeting in Japan, Osaka, Japan (2007.2.1-2)
 30. Kato, S.: Transcriptional regulation of steroid action. 2nd Conference on Skeletal Biology and Medicine, New York, USA (2007.4.25-28)
 31. Takada, I., Mihara, M., Kato, S.: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical WNT signaling suppresses PPAR- γ function. EMBO Conference 2007, Gardon Riviera, Italy (2007.5.2-5)
 32. Ohtake, F., Takada, I., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Dioxin (Ah) receptor assembles a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase complex. EMBO Conference 2007, Gardon Riviera, Italy (2007.5.2-5)
 33. Kato, S.: Interactions between dioxin (AhR) and estrogen receptors. Bregenz Summer School on Endocrinology,

- Bregenz, Austria (2007.7.22-26)
34. Kato, S.: Functional regulation of nuclear steroid hormone receptors through protein degradation. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Tokyo, Japan (2007. 8.21-25)
 35. Kato, S.: Consequences of a selective VDR knock out in the osteoblast. ASBMR 29th Annual Meeting, Hawaii, USA (2007.9.16-19)
 36. Kim, M.-S., Takada, I., Takeyama, K., Kato, S.: Derepression of CYP27B1 gene expression mediates DNA-demethylation. ASBMR 29th Annual Meeting, Hawaii, USA (2007.9.16-19)
- 【国内学会】
1. 沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、山形薫、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明: クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 2. 目崎喜弘、神津円、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: 選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) 結合エストロゲン受容体転写制御機構の解析 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 3. 大矢博之、藤木亮次、吉村公宏、目崎喜弘、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明: クロマチンリモデリング複合体 WINAC におけるシグナル依存的調節機構の解析 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 4. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 5. 大竹史明、馬場敦史、藤井義明、加藤茂明: ユビキチン化を介したダイオキシン受容体のエストロゲン・シグナル制御 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 6. 藤木亮次、金美善、佐々木康匡、吉村公宏、北川浩史、加藤茂明: 新規クロマチンリモデリング複合体 WINAC を介した、リガンド依存性ビタミンDレセプター転写抑制機構の解明 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 7. 岡田麻衣子、竹沢慎一郎、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: ER α の細胞周期依存的な ER α の機能解析 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 8. 盛真友、松本高広、秋本千央、加藤茂明: ヒト Y 染色体精子形成不全領域遺伝子 RBMY の分子機能解析 (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 9. 吉村公宏、北川浩史、竹沢慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田亨、山本陽子、渡辺智之、中村貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明: WSTF (Williams syndrome transcription factor) は移動後の神経堤細胞と心臓の発生に必須である (2005.12.6-8) 第28回日本分子生物学会年会 (福岡)
 10. 山形薫、福田亨、藤山沙理、越田伊織、武山健一、松本高広、北川浩史、加藤茂明: DEAD Box RNA helicase p72/p68 による miRNA processing の機能解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本農芸化学会 (京都)
 11. 吉村公宏、北川浩史、竹沢慎一郎、高田伊知郎、古谷善幸、八木寿人、福田亨、山本陽子、渡辺智之、中村貴、椎名博子、宮本純子、田中佐依子、松本高広、松岡瑠美子、加藤茂明: 新規ビタミンDレセプター (VDR) 相互作用因子複合体 WINAC の生体内高次機能の解析 (2006.3.25-28) 2006 年度日本

- 農芸化学会 (京都)
12. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: ビタミンKはエストロゲンと協調的に骨芽細胞形成を促進する (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 13. 馬場敦史、大竹史明、三木ひろみ、北川浩史、高田伊知郎、加藤茂明: 肝臓特異的 FXR 転写共役因子複合体精製の新たな試み (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 14. 岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎善弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: 細胞周期依存的な ER α の機能解析 (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 15. 伊藤紗弥、武山健一、沢津橋俊、鈴木絵里子、Yue Zhao、山形薫、田辺真彦、Alexander Kouzmenko、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明: 分子遺伝学的アプローチによるヒト核内レセプター新規転写共役因子 BAHD1 の機能解析 (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 16. 沢津橋俊、武山健一、伊藤紗弥、鈴木絵里子、田辺真彦、趙越、山形薫、城出裕子、多羽田哲也、加藤茂明: クロマチン構造を介したエクダイソンレセプター転写制御機構の解明に関する研究 (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 17. 高田伊知郎、須澤美幸、松本邦弘、加藤茂明: ヒストン修飾を介した Wnt シグナルと核内レセプター PPAR γ のクロストーク分子機構の解析 (2006.3.25-28) 2006年度日本農芸化学会 (京都)
 18. 五十嵐庸、過足芳子、三原正朋、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明: 骨芽細胞分化関連因子 Msx2 はビタミンKの標的遺伝子である (2006.7.6-8) 第24回日本骨代謝学会学術集会 (東京)
 19. 北川浩史、藤木亮次、吉村公宏、大矢博之、加藤茂明: ビタミンD受容体転写制御におけるクロマチンリモデリング因子群の役割 (2006.5.19-21) 第79回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
 20. 村上友浩、高田伊知郎、北川浩史、山岡一良、加藤茂明: 筋芽細胞を用いた PPAR δ 転写共役因子の精製と同定 (2007.3.24-27) 2007年度日本農芸化学会 (東京)
 21. 武山健一、伊藤紗弥、沢津橋俊、Alexander Kouzmenko、鈴木絵里子、山形薫、趙越、田辺真彦、木村周平、上田崇、村田拓也、藤山沙理、加藤茂明: Notch シグナル伝達依存的な新規転写抑制因子の同定と機能解析 (2007.3.24-27) 2007年度日本農芸化学会 (東京)
 22. 高田伊知郎、三原政朋、加藤茂明: Wnt シグナル依存的な PPAR γ 活性制御機構の解析 (2007.3.24-27) 2007年度日本農芸化学会 (東京)
 23. 鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、田辺真彦、木村周平、趙越、山形薫、上田崇、村田拓也、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明: 未知クロマチンバウンダリー制御因子の新たな探索法確立の試み (2007.3.24-27) 2007年度日本農芸化学会 (東京)
 24. 秋本千央、井上和樹、松本高広、盛真友、北川浩史、加藤茂明: Y染色体遺伝子 TSPYと男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析 (2007.3.24-27) 2007年度日本農芸化学会 (東京)
 25. 武政 (高橋) さゆり、渡辺資之、松本高広、北村唯一、加藤茂明: 前立腺におけるアンドロゲンレセプターの高次機能解析 (2007.4.14-17) 第95回日本泌尿器科学学会総会 (神戸)
 26. 加藤茂明: 核内受容体を介する細胞内情報伝達機構に関する研究 (2007.6.14-16) 第27回日本内分泌学会 (東京)
 27. 加藤茂明: 性ホルモン受容体群の骨組

- 織での高次機能 (2007.7.19-21) 第 25 回日本骨代謝学会 (大阪)
28. 高田伊知郎、三原正朋、松本邦弘、加藤茂明:間葉系幹細胞における PPAR γ と Non-canonical Wnt シグナルのクロストーク分子機構の解析 (2007.7.19-21) 第25回日本骨代謝学会 (大阪)
 29. 今井祐記、中村貴、竹田秀、福田亨、山本陽子、高岡邦夫、松本高広、加藤茂明:エストロゲンの骨量維持機構は Fas Lignd シグナルを介した破骨細胞寿命の調節である (2007.7.19-21) 第 25 回日本骨代謝学会 (大阪)
 30. 藤木亮次、赤石葉月、北川浩史、加藤茂明:レチノイン酸誘導性血球分化を制御する核内受容体転写共役因子群の探索 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 31. 金美善、高田伊知郎、武山健一、加藤茂明:ビタミンD一位水酸化酵素遺伝子の活性型ビタミンD依存的な転写抑制解除にはDNA脱メチル化機構が関与する (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 32. 山形薫、鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、藤山沙理、田辺真彦、上田崇、村田拓哉、趙越、松川紘之、加藤茂明:エストロゲン応答 miRNA 発現のプロファイリング (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 33. 岡田麻衣子、竹澤慎一郎、目崎喜弘、高田伊知郎、北川浩史、加藤茂明:細胞周期依存的な ER α の機能解析 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 34. 横山敦、竹澤慎一郎、北川浩史、加藤茂明:オーファン核内受容体 TLX の、転写共役因子複合体の同定による転写抑制機構の解明 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 35. 馬場敦史、大竹史明、高田伊知郎、加藤茂明:グルカゴン/PKA シグナル依存的な FXR 新規転写共役因子複合体の解析 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 36. 伊藤紗弥、沢津橋俊、鈴木絵里子、趙越、山形薫、田辺真彦、木村周平、上田崇、藤山沙理、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明:染色体構造変換を介した新規転写共役抑制因子の探索と機能解析 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 37. Yue Zhao, Ken-ichi Takeyama, Shun Sawatsubashi, Saya Ito, Eriko Suzuki, Kaoru Yamagata, Yuko Shirode, Masahiko Tanabe, Shuhei Kimura, Sari Fujiyama, Takashi Ueda, Takuya Murata, Hiroyuki Matsukawa, Alexander P. Kouzmenko, Shigeaki Kato: Identification of MDC1 that enhances androgen receptor transactivation (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 38. 山岡育子、北川浩史、秋本千央、加瀬郁子、目崎善弘、清水崇史、加藤茂明:酸化還元刺激によるグルココルチコイドレセプター転写制御メカニズムの解析 (2007.12.11-15) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
 39. 藤山沙理、沢津橋俊、鈴木絵里子、伊藤紗弥、田辺真彦、趙越、木村周平、上田崇、山形薫、村田拓哉、松川紘之、武山健一、加藤茂明:遺伝学的アプローチとプロテオミクスを連携した新規活性化クロマチン構造調節因

- 子の網羅的探索と機能解析 (2007.12.11-15) 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
40. 三木ひろみ、大竹史明、高田伊知郎、藤井義明、加藤茂明：ダイオキシン受容体による脂肪細胞分化抑制作用機構の解明 (2007.12.11-15) 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
41. 秋本千央、上田崇、山岡育子、井上和樹、松本高広、盛真友、北川浩史、加藤茂明：Y 染色体遺伝子 TSPY と男性ホルモン受容体の機能的相互作用の解析 (2007.12.11-15) 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
42. 松山玲子、高田伊知郎、北川浩史、矢野哲、加藤茂明：ERR α 新規転写共役因子の同定と解析 (2007.12.11-15) 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜)
43. 鈴木絵里子、沢津橋俊、伊藤紗弥、趙越、山形薫、田辺真彦、木村周平、藤山沙理、上田崇、村田拓哉、松川紘之、Alexander Kouzmenko、武山健一、加藤茂明：未知クロマチンバウンダリー制御因子の新たな探索法確立の試み (2007.12.11-15) 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜)

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)
分担研究報告書 (総合)

細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の
骨粗鬆症ならびに変形性関節症における機能解析

分担研究者 堺 隆一
国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部部長

【研究要旨】

骨粗鬆症や変形性関節症の原因となる骨細胞系・軟骨細胞系の細胞の増殖・機能異常の本態を理解し、その異常に関わる細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることは、その予防・診断・治療などの面でも極めて重要である。特にチロシンキナーゼである Src ファミリーの分子とその基質群は、破骨細胞・骨芽細胞においてはその分化と機能維持のために、軟骨細胞においてはインテグリンを介して細胞外基質の情報を受け取り、増殖を維持するために必要であると考えられる。本研究では Src ファミリーの活性変化や組織による基質特異性を解析することにより、骨細胞・軟骨細胞系における Src ファミリーの役割を詳細に解析し、骨粗鬆症・変形性関節症の病因の理解を目指すとともに、Src のシグナル経路を標的とした治療への発展につながる基盤を作成する。これまでに我々は欠損変異体や RNAi などの手法を用いて paxillin, ephrin-B, p130Cas(Cas), Cortactin などの新しい機能を見いだすことに成功した。これらの機能は骨・軟骨系の分化や機能維持に密接に関係していると考えられ、さらには骨粗鬆症や変形性関節症などの疾患に対する選択的な治療薬開発につながると思われる。

A. 研究目的

骨質における骨新生と骨破壊のバランスが崩れた状態である骨粗鬆症や、関節軟骨の量的・質的異常をその一因とする変形性関節症(OA)は、加齢、外的ストレス、ホルモンバランスなど幾つかの要因で増殖や機能調節の適切なコントロールが崩れた状態であり、他の内臓疾患と全く同様にその増殖や機能を司る蛋白質群の解析が重要であることは明かである。

本研究の目的は、このような骨や軟骨を形成する細胞の機能がどのような機構により制御されているかを、細胞内シグナル伝達の解析により明らかにすること、

そしてそのメカニズムに基づいて有効な骨粗鬆症・変形性関節症の治療モデルを提唱することである。骨・軟骨細胞において、細胞外から働きかける種々の刺激が、実際に細胞膜・細胞質のどのようなシグナル伝達分子を介して、どのように細胞の機能・増殖・生存を制御するのかを明らかにして、骨粗鬆症・OA の病態と、正常な代謝のバランスを取り戻すためには骨・軟骨細胞にどのようなシグナル分子を標的とした治療を行うと有効であるかを、細胞モデルを用いて解明することを目指している。

骨・軟骨系細胞でのシグナル伝達には

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

まず 1 つは、細胞と細胞外基質と間での接着刺激の情報を受け取るインテグリンシグナルの媒介分子としての役割である。骨粗鬆症の病態に関与する破骨細胞はその骨吸収作用を発揮するために骨基質と接着したり移動したりすることが必要で、そのため細胞表面のインテグリン $\alpha V\beta 3$ を中心とするインテグリンが接着刺激を受け取る。このような接着能・運動能を維持し、機能を発揮するにはインテグリンシグナルを細胞内に伝える Src キナーゼが必要である。また変形性関節症で病的減少が見られる軟骨細胞の増殖には回りのコラーゲンによるインテグリン $\alpha 1/\alpha 2\beta 1$ 複合体刺激が必要で、細胞内シグナル伝達はやはり Src キナーゼからその基質であるパキシリン、PYK、コルタクチンなどのリン酸化を介する経路を用いると考えられる。特に破骨細胞においては骨融解の場を作る sealing zone の形成に先立って、podosome という小さな構造体が形成されることが重要とされる。この podosome は約 $1\mu\text{m}$ の点状の接着構造で、破骨細胞だけでなくマクロファージ 樹状細胞、活性型 Src などで Transform した細胞、などに観察される。培養した破骨細胞においても podosome が集合して環状の構造体を形成し、更に大きくなってアクチンが濃縮することにより Sealing Zone のような構造を取ることが観察される。この podosome の形成には Src キナーゼの活性化が深くかかわることが知られており、その基質の中でも特

にコルタクチンがこの構造に局在することが報告されているが、Src によるコルタクチンのリン酸化はむしろ podosome の形成に抑制的に働くという研究もあり、その作用機序に興味を持たれる。

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

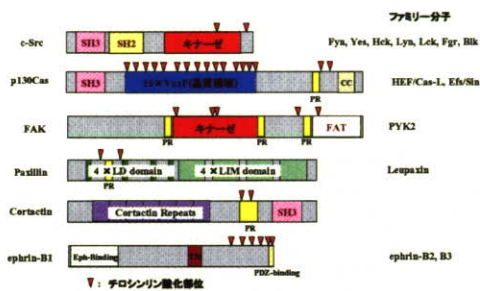
さらには、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の分泌もそのメカニズムの詳細は明らかになっていないが Src キナーゼ経路との深い関わりが指摘されている。MMP の分泌は骨粗鬆症における破骨細胞による骨吸収にも深く関わっているが、同時に OA における軟骨組織の破壊においてもその寄与が示唆されているものである。

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

このように多彩な機能が骨・軟骨系の

維持にも重要であると考えられる Src ファミリーキナーゼは、チロシンキナーゼの酵素としてその生理機能を発揮すると考えられるが、数多くの分子が潜在的に Src ファミリーの基質となりうる。骨・軟骨系において発現する Src ファミリーキナーゼが、臓器特異的に、そして機能特異的に多くの基質のチロシンリン酸化に関わっていると考えられるが、どの基質がどのような骨・軟骨の機能を制御しているのかは未だに明らかにされていない場合が多い(図 1)。

図 1 骨細胞系における Src ファミリーの基質分子群



Src ファミリーの各組織における機能を正確に理解するには、その場でリン酸化を受ける基質の同定と、基質が下流に伝えるシグナルを明らかにすることが極めて重要である。最終的には骨・軟骨細胞系における Src ファミリーの活性化、各々の基質分子のリン酸化のメカニズムと、その媒介する細胞内シグナルの情報に基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいはシグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

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

B. 研究方法

これまで何年間も続けてきたリン酸化蛋白質の総合的解析の過程で、疾患に関わる数多くの Src キナーゼの基質分子の

発現変化やチロシンリン酸化の変化を見出し、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、など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。ウエスタンブロット、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、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、などを見だし報告してきた。最近になって 2 細胞間の EphB と ephrin-B の相互作用で起こる生理作用についてさらに解析を進めたところ、ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことが分かった。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る。

C. 研究結果

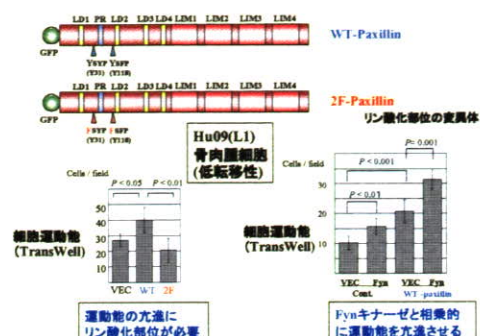
(1) 骨肉腫細胞をモデルに用いた細胞の接着能、運動能に関わるチロシンリン酸化蛋白質の解析

骨肉腫細胞株 Hu-09 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斑にみられ、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(図2)。

以上のことから、活性化した Fyn キナ

図2 Paxillinのチロシンリン酸化の運動能における役割

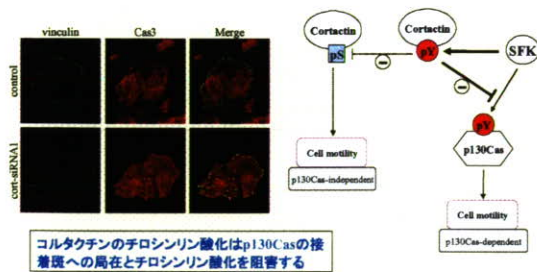


ーゼが、同時に過剰発現した paxillin のチロシンリン酸化に働き、結果として骨肉腫細胞の運動能・転移能に関わることが明らかになった。

(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(図3)。

図3 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



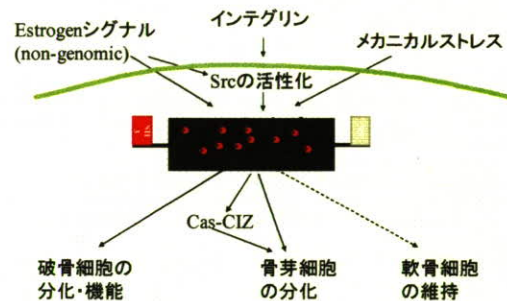
(3) メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わり の解析

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局限してみられる。一方、このような細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することが分かった。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(図 4)。

図4 骨・軟骨系シグナルにおけるCasの役割



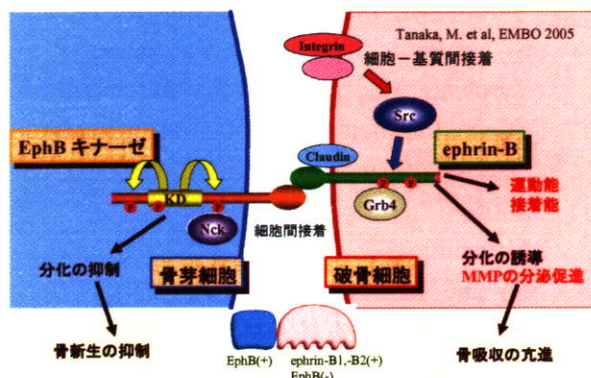
また広島大学原爆放射線医科学研究所の本田浩章先生と共同研究で Cas の SH3 ドメインを欠損するコンディショナルマウスの解析も進めており、メカニカルストレスの伝達異常のもたらす骨軟骨系の異常や、疾患感受性などの解析に興味を持たれる。

(4) ephrin-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-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わることが示唆された(図 5)。

図5 ephrin-Bの破骨細胞における活性化と機能



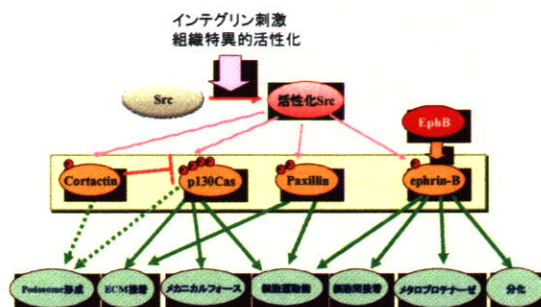
実際に胃癌の細胞株を使って ephrin-B1 を RNAi で抑制すると、細胞運動能や浸潤能が顕著に低下し、逆に過剰発現により細胞運動能が増加することが確認された。実際に胃癌細胞の腹腔内注射による腸間膜に対する播種の程度や、同所性に胃の粘膜下に移植した際の漿膜側への浸潤の速度などが、ephrin-B1 の発現で著明に亢進することが明らかになった。ephrin-B1 による癌の浸潤能の獲得は、メタロプロテナーゼの分泌、細胞運動能の亢進、細胞間接着の抑制など複数の因子によるものと考えられ、同じようなメカニズムによる機能制御が同様に ephrin-B1 を発現する破骨細胞にもあるのではないかと考え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

D. 考察

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(図 6)。

これらの細胞系の機能的バランスが崩

図6 破骨細胞機能のエフェクターとしてのSrc基質群の役割



れた状態である骨粗鬆症や変形性関節症の治療においては、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。

E. 結論

老化などの長期にわたる過程で起こる骨粗鬆症や変形性関節症などの代謝性変化は、特定の遺伝子の変異や発現のON/OFFのようなはっきりとしたスイッチがあると考えよりも、いくつかの蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で「疾患遺伝子」を研究する際に、疾患の引き金となる遺伝子変化を追い求めるだけでなく、疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考え。Src キナーゼに関わる細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることが可能になると考える。今後最も重要な点は、骨・軟骨代謝・機能を特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

現在、癌などの分野で進められているSrc のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた研究と比較しても、細胞内のシグナル媒介・調節分子によるチロシンキナーゼシグナルの制御が実現すればその特異性においてはるかに優れているため、副作用の少ない薬剤の開発につながる可能性が高いと期待している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R.: Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contract formation. *EMBO J* 24, 3700-3711, 2005.

7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 堺隆一: 「癌の浸潤・転移をコントロールする Src キナーゼ基質群の役割」 実験医学 24(18) p2947-2952, 2006 年.
 11. Tanaka, M., Kamata, R., Takigahira, M., Yanagihara, K., Sakai, R.: Phosphorylation of ephrin-B1 regulates dissemination of gastric scirrhus carcinoma. *Am J Pathol* 171, 68-78, 2007.
 12. 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.
 13. 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 Cel Biol* 27, 7649-7660, 2007.
 14. 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.
 15. 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.
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Sakai, R., Miyake, I.: Analysis of domain functions of ShcC protein in neuroblastoma. 12th conference of Advances in Neuroblastoma Research, Los Angeles, USA (2006.5.17-20)
 2. Sakai, R., Uekita, T.: Identification of Src kinase substrates regulating anchorage independency of lung cancer cells. International Meeting on Targeting the Kinome, Basel, Switzerland (2006.12.4-6)
 3. Uekita, T., Lin, J., Sakai, R.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma. 7th AACR/JCA Joint International Conference, Hawaii, USA (2007.1.21-27)
 4. Sakai, R., Uekita, T.: CDCP1 regulates anoikis resistance in human lung adenocarcinoma Mechanisms & Models of Cancer Meeting, San Diego, USA (2007.8.8-12)
 5. Sakai, R., Uekita, T.: CDCP1 regulates metastatic potential of human cancers through anoikis resistance. The 12th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Sapporo, Japan (2007.12.21-22)
- 【国内学会】
1. 堺隆一、上北尚正、田中正光、浅輪珠恵: Cas ドッキング蛋白質の C 末端領域による腫瘍特性の制御 (2005.9.14-16) 第 64 回日本癌学会学術