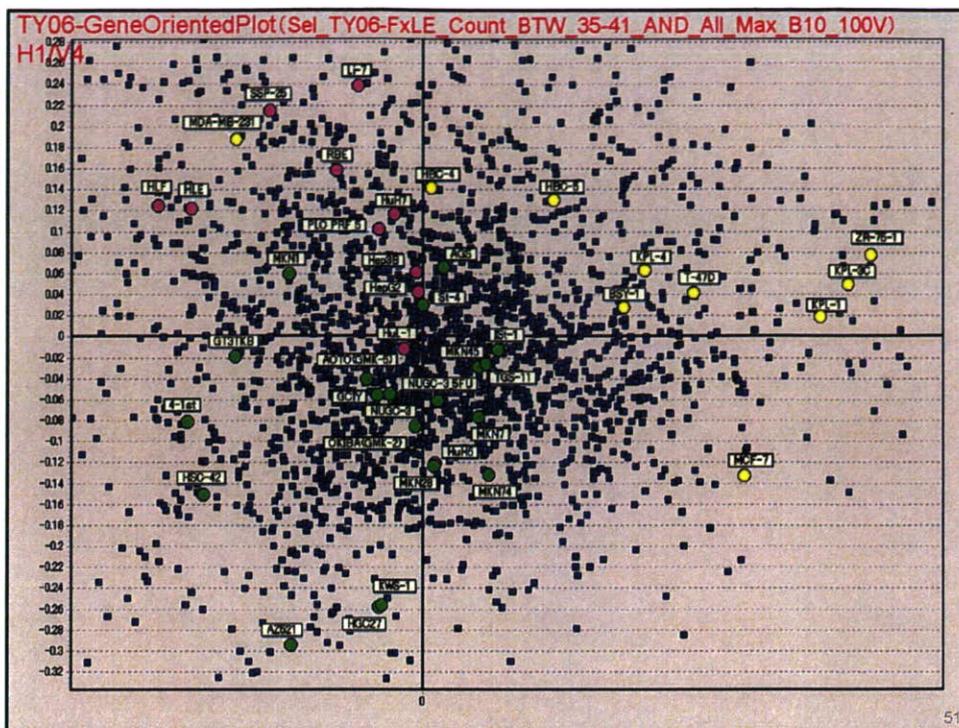


# Gene Oriented Plot

50



## 結論

- マイクロアレイのプローブ飽和現象を補正する方法の基本アルゴリズムを構築した。
- tmf, MADIC, RSortの組み合わせにより、全ての発現パターンを網羅的に評価できる解析環境が整った。
- GoViewer, GoPlotIによって、候補遺伝子リストの意味づけや、候補遺伝子リストの生成条件の妥当性を評価できるようになった。

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野 純、相崎 健一、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、中津 則之、児玉 幸夫、高木 篤也	トキシコゲノミクスの新展開 -Percellome プロジェクトによる TCDD- TCDF 比較-		細胞工学	株式会社 秀潤社	東京	2007	26  1391 - 1396

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 TJ, Chambon P, Kato S.	Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts.	Cell	130	811 - 823	2007
Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M.	A novel mechanism for polychlorinated biphenyl -induced decrease in serum thyroxine level in rats.	Drug Metab Dispos	35	1949 - 1955	2007
Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J	Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1.	Arch Pharm Res	30	444 - 452	2007
Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T.	Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines.	Mol Pharmacol	72	1171 - 1180	2007
Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A	Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction	J Exp Med	205	295 - 303	2008
Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S and Kanno J	Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube.	J Toxicol Sci	33	105 - 116	2008
David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R and Franz WM	MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling	Nat Cell Biol	10	338 - 345	2008
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T	Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+)	J Membr Biol	217	105 - 113	2007

	Hematopoietic Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle				
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T	Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemo- genesis	Exp Biol Med	232	700 - 712	2007
Hirabayashi Y, Inoue T.	Implications of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leuke mogenesis: Relevance to Gompertzian mortality as possible hemato- toxicological endpoint	Exp Hematol	35	125 - 133	2007
Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J.	Epigenetic silencing of prostagrandin E2 receptor (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas	Oncogene	26	7401 - 7413	2007
Horibe S, Takagi M, Unno J, Nagasawa M, Morio T, Arai A, Miura O, Ohta M, Kitagawa M, Mizutani S.	DNA damage checkpoints prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome.	Leukemia	10	2195 - 2198	2007
Keith T, Araki Y, Ohyagi M, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M.	Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia.	Br J Haematol	137	206 - 215	2007
Abe S, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Takizawa T, Kitagawa M	Rapid induction of IAP family proteins and Smac/DIABLO expression after proapoptotic stimulation with doxorubicin in RPMI 8226 multiple myeloma cells.	Exp Mol Pathol	83	405 - 412	2007
Iizuka A, Ikarashi Y, Yoshida M, Heike Y, Takeda K, Wakasugi H, Kitagawa M, Takaue Y	Interleukin (IL)-4 promotes T helper 2 biased-Natural Killer T (NKT) cell expansion, which is regulated by NKT cell-derived interferon- $\gamma$ and IL-4.	Immunol ogy	123	100 - 107	2007
Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, Takemura T, Suzuki K, Kitagawa M.	IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes.	Am J Hematol.	81(11)	824 - 831	2006
Kurata M, Hasegawa M, Nakagawa Y, Abe S, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M	Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP)	Exp Mol Pathol	81	249 - 254	2006

	during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes				
K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, M. Hirode, T. Shimizu, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, T. Urushidani	Gene Expression Profiling of Rat Liver Treated with Serum Triglyceride-Decreasing Compounds	J. Toxicol. Sci	32	387 - 399	2007
N. Kiyosawa, T. Uehara, W. Gao, K. Omura, M. Hirode, T. Shimizu, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani	Identification of Glutathione Depletion-Responsive Genes Using Phorone-Treated Rat Liver	J. Toxicol. Sci	32	469 - 486	2007
Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, Murayama H, Shibata Y, Minami S, Kamihira S, Kurosawa H, Ikeda T	The effect of the microstructure of b-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue	Biomaterials	28	2612 - 2621	2007
Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M	Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells	Biomaterials	28	3469 - 3477	2007
Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A	Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup	Mutat. Res.	627	31 - 35	2007
Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F	Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment.	Mutat. Res.	627	36 - 40	2007
Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M	Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells	Mutat. Res.	619	113 - 123	2007
Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H	Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line.	Exp Hematol	35	1190 - 1200	2007

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

---

トキシコゲノミクスの新展開  
Percellome プロジェクトによる2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋 聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也



秀潤社  
細胞工学  
CELL TECHNOLOGY  
Vol.26 No.12 2007

## 特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

トキシコゲノミクスの新展開  
Percellome プロジェクトによる2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋 聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Atsuya Takagi

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに90以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

**key words**

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

1 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 E-mail : kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之\*、児玉幸夫、高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部  
\*現(独)医薬基盤研究所 基盤的研究部

## はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質 (生活化学物質, 環境化学物質, 医薬品や食品を含む) が摂取された際の安全性を担保するため (毒性評価) に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして、酵素、膜、DNA など比較的全体的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的特異性の高いものや、エピジェネティックな遅発影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健常人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治療薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

## I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の互換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに90以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

## II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 mRNA (スパイク RNA) を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そして RNA 抽出・測定に移る。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する<sup>1)~3)</sup>。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精

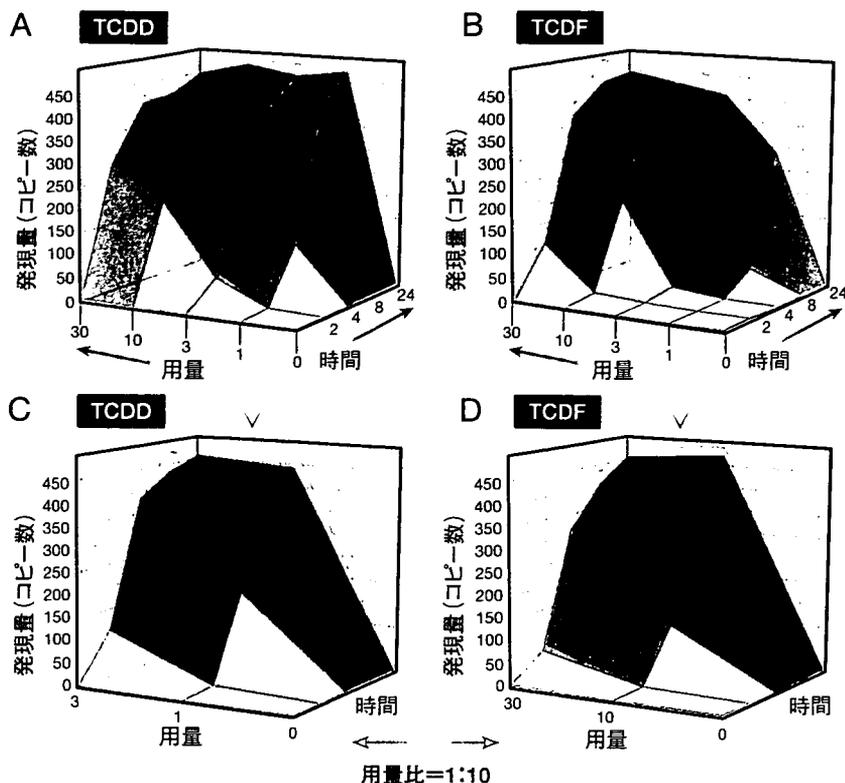


図1. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：TEF依存遺伝子の抽出法 (1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0 (溶媒対照), 1, 3, 10, および30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った (両動物実験は1カ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例としてcytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217\_a\_at) を示す。

A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface (反応曲面) 表示。  
B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。丁度、用量について10倍ずれた反応を示している。  
C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD: TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともにほぼ完全に一致している。このような遺伝子をTEF依存性とした。

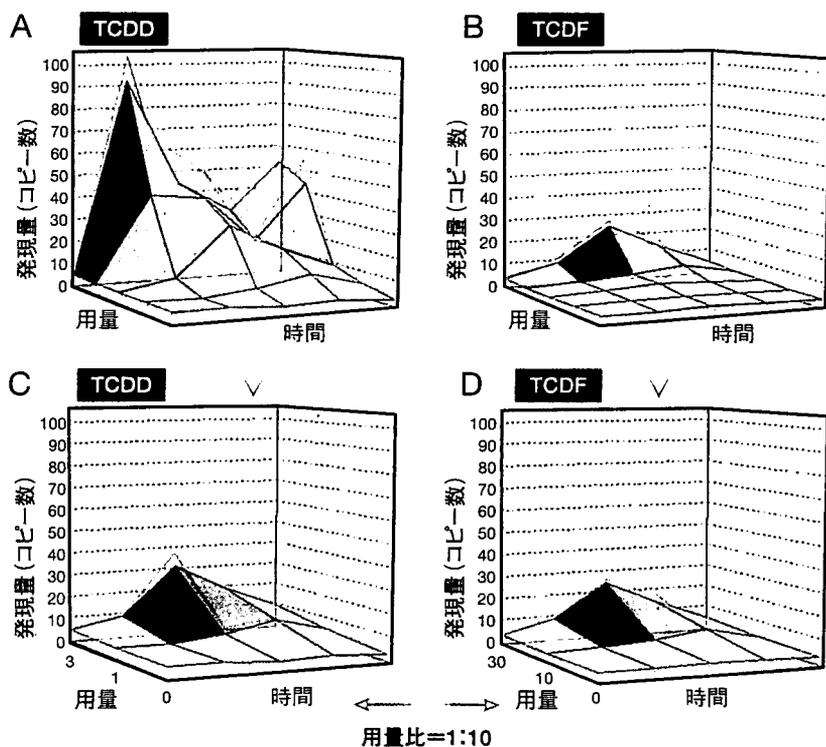


図2. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：TEF依存遺伝子の抽出法 (2)

TEFに従うもう1つの例としてTCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160\_at) を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが、CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり、Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。



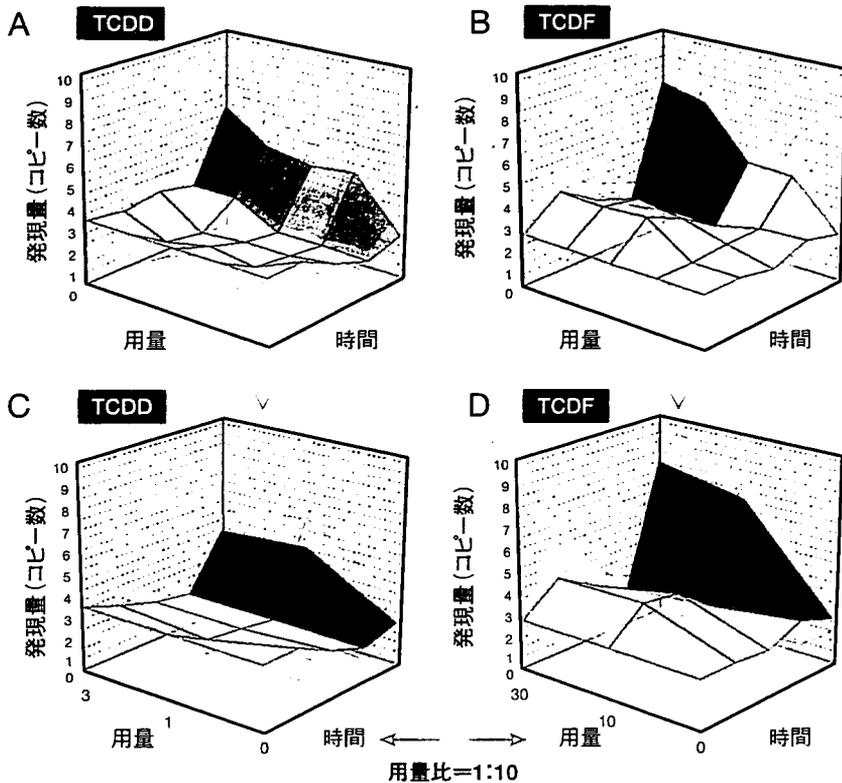


図4. TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として, Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944\_at) の Surface を示す. A, B, C, D は図1と同様の表示. 2時間目の応答の違いのほか, 24時間目の応答が TCDF > TCDD である.

factor) <sup>6)</sup> に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する.

ダイオキシン類, すなわちダイオキシン, ジベンゾフラン, およびコプラナーPCBは, そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり, 個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ, 例えば *in vitro* 実験系で Cyplal の発現を誘導する能力に違いがある. 他方, 環境中では, これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから, その生物影響の総体強度を推定するために, 個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている. その際の強度の単位に TEF が用いられる. TEF は最も活性が強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とし, 2,3,7,8-TCDF は 0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran は 0.05, などとして表す. なお, TEF の値は, ほぼ, AhR 結合能に比例していることが経験的に知られている.

ダイオキシン毒性は, 受容体原性毒性の典型であり, その説明には “AhR ノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応” であることが用いられる. すなわち, このノックアウトマウスでは, 体中に広がった TCDD はそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないことを示している. 野生型のマウスが TCDD で死ぬのは AhR が存在するからであり, 言い換えれば, AhR からの異常なシグナルによるという

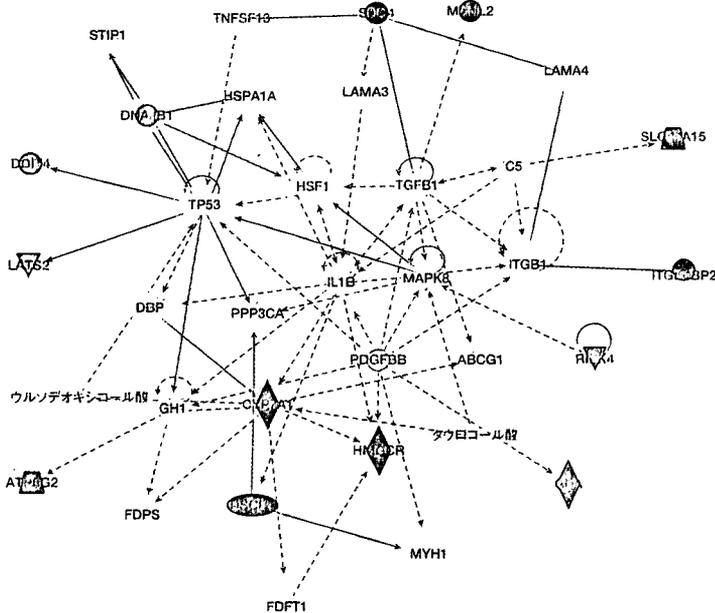


図5: TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法を利用し抽出された TEF 非依存遺伝子約 20 を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.) に投入し, 得られる Pathway の代表的なものを示す. AhR は含まれず, p53, TGF-β, MAPK8 などが見られる. 赤色; 計算に投入した TEF 非依存遺伝子のうち, この Pathway に含まれるもの. 灰色; Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの.

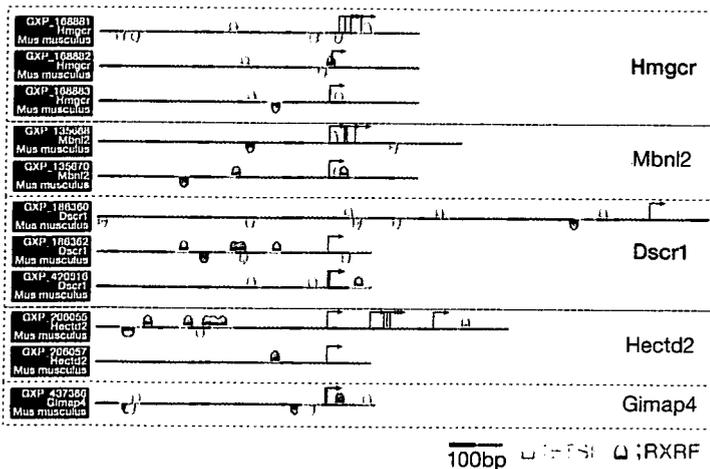


図6：TEF非依存遺伝子の*in silico*プロモーター解析

TEF非依存遺伝子約20のうち、TCDF優位の5遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbHの提供する*in silico*プロモーター解析の結果を示す。5つの遺伝子に共通して、ETSファミリーとRXRファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgcr；3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Mbnl2；muscleblind-like 2, Dscr1；Down syndrome critical region homolog 1 (human), Hectd2；HECT domain containing 2, Gimap4；GTPase, IMAP family member 4.

ことになる。この際の毒性も概してTEFに従うことが知られており、TCDDの1に対してTCDFの10が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子個有の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際にこの値が逆転する可能性があることを見いだしたことから、TCDF特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDDとTCDFについて、以下のような同一プロトコルを用いての実験を行った。12週齢雄C57BL/6マウスの1群3匹、20群を用意し、0, 1, 3, 10, および30  $\mu$ g/kgの用量で単回強制経口投与後、2, 4, 8, および24時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip, MOE430 2.0によりPercellome遺伝子発現データを得た。2時間目の反応を見やすくするために、仮想0時間に2時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸5点、時間軸5点から成る5×5の三次元Surfaceを作製した。さらに、TCDD = 1, TCDF = 0.1というTEF値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDDの0, 1, 3  $\mu$ g/kg群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30  $\mu$ g/kg群から成る3×5のSurfaceを用意した。そして、この3×5のSurface同士について、上述のtmfアルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与依存的変動として生物学的蓋然性があるかを3×5および5×5のSurfaceにより確認し、TEFに忠実に従うTEF依存遺伝子(図1, 2)を約140, 従わないTEF非依存遺伝子を約20得た。TEFに従うと判定

された遺伝子群を、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)により既知情報と照合するとAhRの下流の第1相代謝酵素やNrf2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要員であることが示され(図3)、上述したTEFについて現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5×5のSurface同士を比較し、TCDDとTCDFで反応のパターンが異なるもの、および類似していてもTEF値の10倍差を説明できないもの、すなわち、TCDFが同等あるいはより強い反応を示すものを抽出した(図4)。TEF非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想どおりAhRを含まないPathwayを描き出した(図5)。*In silico*プロモーター解析ソフトウェア(Genomatix Software GmbH)に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、すべてに共通するものとして多数のエレメント、例えば、E2F, EKL, ETS, HES, NR2, RXR, SP1, TBPなどのファミリーが見いだされたが、AhR結合配列は抽出されなかった。さらに、非依存遺伝子のうちTCDF優位の5遺伝子を絞り込みパスウェイ解析を行った結果、TNFを中心とし、ESR1やABCA1を含むネットワークが描かれ、*in silico*プロモーター解析では5遺伝子に共通するものとしてETSファミリーとRXRファミリーの結合部位が選択された(図6)。ETSはERK/MAPKシグナル系の下流に位置し、その1つであるETS2の強制発現系の実験などからp53系を介する胸腺系のアポトーシス、あるいはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、得られたリストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子(図5中の灰色)について、再度Surfaceを吟味すると選定基準ぎりぎりでは排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図5中のTgfb1 (transforming growth factor beta 1), Hspala (heat shock protein 1A), およびFdft1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

## おわりに

このTCDDとTCDFの実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析はまだ途上にあり、追加としてAhRノックアウトマウスを用いた投与実験やChIP(クロマチン免疫沈降)解析などによる確認作業が考えられる。ここでは、Percellome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPercellome法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学

物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能であることを示すことができたと考える。誌面の都合上、他に譲るが、ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが、癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて、成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と経胎盤的にマウス胎仔に及ぼす影響とをPercellome解析により対比すると、間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆される事例を見いだした。異なったプロトコールで異なった組織に対して行われた実験の間でも、このように共通のメカニズムを抽出しうる可能性を見ており、今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後、本法の利点を生かした解析をさらに進めるとともに、データ・

解析ツールの公開Webサイトの充実、および、実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させていきたい。

謝辞 本Percellome Projectの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。三次元Surface可視化およびそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共筆者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC実装などのIT開発はNTTコムウェア、日本NCR (日本テラデータ) との共同研究に負うところ大である。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

#### 文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) 菅野 純ら: 細胞工学 (2007) 26: 71-77
- 4) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194
- 5) 相崎健一ら: 細胞 (ニュー・サイエンス社), 印刷中
- 6) Van den Berg M, et al: Toxicol Sci (2006) 93: 223-241

# Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor $\alpha$ and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts

Takashi Nakamura,<sup>1,2,9</sup> Yuuki Imai,<sup>1,3,9</sup> Takahiro Matsumoto,<sup>1,2</sup> Shingo Sato,<sup>4</sup> Kazusane Takeuchi,<sup>1</sup> Katsuhide Igarashi,<sup>5</sup> Yoshifumi Harada,<sup>6</sup> Yoshiaki Azuma,<sup>6</sup> Andree Krust,<sup>7</sup> Yoko Yamamoto,<sup>1</sup> Hiroshi Nishina,<sup>4</sup> Shu Takeda,<sup>4</sup> Hiroshi Takayanagi,<sup>4</sup> Daniel Metzger,<sup>7</sup> Jun Kanno,<sup>5</sup> Kunio Takaoka,<sup>3</sup> T. John Martin,<sup>8</sup> Pierre Chambon,<sup>7</sup> and Shigeaki Kato<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

<sup>2</sup>Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Honcho 4-1-8, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

<sup>3</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Asahimachi 1-4-3, Abeno-ku, Osaka, 545-8585, Japan

<sup>4</sup>Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

<sup>5</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>6</sup>Teijin Institute for Biomedical Research, Asahigaoka 4-3-2, Hino, Tokyo 191-8512, Japan

<sup>7</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Physiological Genetics / Inserm, U-596 / CNRS, UMR7104 / Université Louis Pasteur, Illkirch, Strasbourg, F-67400 France

<sup>8</sup>St. Vincent's Institute of Medical Research, 9 Princes Street, Fitzroy VIC 3065, Australia

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence: uskato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2007.07.025

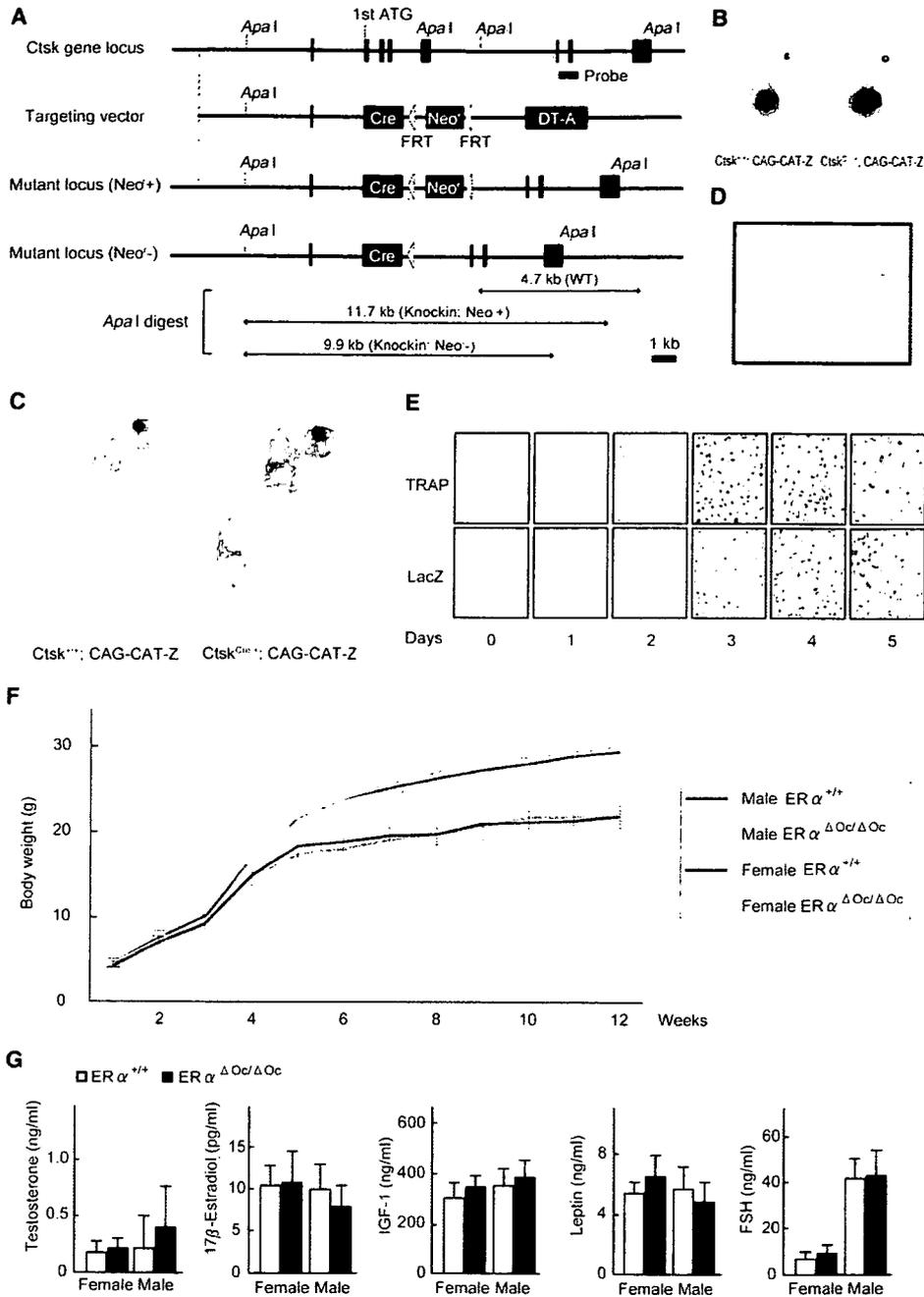
## SUMMARY

Estrogen prevents osteoporotic bone loss by attenuating bone resorption; however, the molecular basis for this is unknown. Here, we report a critical role for the osteoclastic estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in mediating estrogen-dependent bone maintenance in female mice. We selectively ablated ER $\alpha$  in differentiated osteoclasts (ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$ ) and found that ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$  females, but not males, exhibited trabecular bone loss, similar to the osteoporotic bone phenotype in postmenopausal women. Further, we show that estrogen induced apoptosis and upregulation of Fas ligand (FasL) expression in osteoclasts of the trabecular bones of WT but not ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$  mice. The expression of ER $\alpha$  was also required for the induction of apoptosis by tamoxifen and estrogen in cultured osteoclasts. Our results support a model in which estrogen regulates the life span of mature osteoclasts via the induction of the Fas/FasL system, thereby providing an explanation for the osteoprotective function of estrogen as well as SERMs.

## INTRODUCTION

Bone remodeling is a dynamic metabolic process. The destruction or "resorption" of pre-existing bone by mature osteoclasts is followed by the formation of new bone by osteoblasts. Osteoblasts are derived from pleiotropic mesenchymal stem cells in the bone marrow. Mature osteoclasts are multinuclear, macrophage-like cells, derived from hematopoietic stem cells also in the bone marrow. Bone resorption and deposition are tightly coupled, and their balance defines both bone mass as well as quality. The regulation of bone remodeling is complex. A number of systemic hormones and transcription factors directly regulate the proliferation and differentiation of osteoblasts and osteoclasts (Karsenty, 2006; Karsenty and Wagner, 2002; Rodan and Martin, 2000; Teitelbaum and Ross, 2003). Additionally, the indirect cellular communication among groups of bone cells is also physiologically critical for bone growth and remodeling (Martin and Sims, 2005; Mundy and Elefteriou, 2006). The molecular and genetic mechanisms governing bone cell fate have been intensively studied; however, how the life span of bone cells is determined on a molecular level remains elusive.

Estrogen is a key hormone in bone remodeling in several species. The osteoprotective action of estrogen is demonstrable in rodents and is clinically important in humans, particularly older women (Chien and Karsenty, 2005;



**Figure 1. Generation of Knockin Mice Selectively Expressing Cre in Mature Osteoclasts**

(A) Illustration of the targeting strategy for insertion of the *Cre* gene into the mouse *Cathepsin K* (*Ctsk*) gene. A targeting vector was generated to contain the *Cre* cDNA at the endogenous ATG start site, followed by a *FRT* (Fip-recombinase target)-flanked *Neo<sup>r</sup>* cassette. The *DT-A* (diphtheria toxin-A) gene was also inserted to avoid random integrations.

(B and C) *Ctsk-Cre* mice were then crossed with *CAG-CAT-Z* mice.  $\beta$ -galactosidase activity derived from the activated *LacZ* reporter gene was monitored to test if expressed *Cre* excised the *loxP* sites in mature osteoclasts. *LacZ* expression patterns reflected the localization patterns of mature osteoclasts in the developing bone at 16.5 days post coitum embryos and in the skeletal tissues of 7-day-old pups.

(D) The *LacZ* expression induced by *Cre*-mediated excision was also seen in osteoclasts attached to trabecular bone in the lumbar vertebrae of 12-week-old mice.

(E) *LacZ* expression was induced during osteoclastogenesis. Osteoclast-like cells that differentiated from bone-marrow macrophages following culture in the presence of M-CSF and RANKL were stained with TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase), a mature osteoclast marker.

Delmas, 2002; Raisz, 2005; Rodan and Martin, 2000). Estrogen deficiency in postmenopausal women frequently leads to osteoporosis, the most common skeletal disorder. Similarly, ovariectomy clearly produces an osteoporotic bone phenotype in mice. Osteoporotic bone loss is the result of high bone turnover in which bone resorption outpaces bone deposition (Rodan and Martin, 2000; Teitelbaum, 2007). This imbalance in bone turnover that is induced by estrogen deficiency in women and female rodents can be ameliorated with bio-available estrogens including selective estrogen receptor modulators (SERMs) (Riggs and Hartmann, 2003).

Estrogen and SERMs primarily act by regulating gene transcription via estrogen receptors (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) (Couse and Korach, 1999; Shang and Brown, 2002). ERs belong to the nuclear receptor gene superfamily and act as ligand-inducible transcriptional factors (Mangelsdorf et al., 1995). ER dimers directly or indirectly associate with specific DNA elements in the target gene promoter (Shang and Brown, 2002) and control transcription through reorganizing chromatin structure and histone modifications (Belandia and Parker, 2003). Genetic mouse models (KO mice) lacking ER $\alpha$  (ER $\alpha^{-/-}$ ) and ER $\beta$  (ER $\beta^{-/-}$ ) provide insights into ER function (Mueller and Korach, 2001; Windahl et al., 2002). In mice, though ER $\alpha$  appears to be the major receptor in most estrogen target tissues including bone (Sims et al., 2003), neither clear bone loss nor high bone turnover is detectable in ER $\alpha$  single or ER $\alpha$ /ER $\beta$  double-KO females (Syed and Khosla, 2005; Windahl et al., 2002). This unexpected maintenance of bone mass in female mutants is presumed to be due to unphysiologically elevated levels of other osteoprotective hormones, like androgens. Systemic defects in the hypothalamus caused by ER inactivation appear to impair the negative feedback system of hormone production (Syed and Khosla, 2005). This leads to an excess in estrogen precursors, notably androgens. In fact, the anabolic effects of androgens mediated by the androgen receptor (AR) are evident in female mice (Kawano et al., 2003; Sims et al., 2003). In males, estrogen is also osteoprotective, as is evident by the development of osteopenia in male patients genetically deficient in ER $\alpha$  (Smith et al., 1994) or aromatase activity (Simpson and Davis, 2001). Thus, irrespective of the accumulating clinical and basic research data on the osteoprotective actions of estrogen and SERMs, the molecular basis of this osteoprotection in females remains elusive.

To study the molecular interactions behind the antbone resorptive actions of estrogen in women and female animals, we genetically ablated ER $\alpha$  in mature osteoclasts (ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$ ). Selective ablation of ER $\alpha$  in differentiated osteoclasts (ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$ ) was accomplished by crossing a *Cathepsin K-Cre* knockin mouse with a floxed ER $\alpha$  mouse. This resulted in clear trabecular bone loss and

high bone turnover associated with increased osteoclast numbers in females but not in males. In the female mutants, further bone loss following ovariectomy was not significant and recovery by estrogen was ineffective in the trabecular areas of long bones and lumbar vertebral bodies. Upregulated expression of *Fas ligand (FasL)* gene, and increased apoptosis in differentiated osteoclasts by estrogen was found in the intact bone of wild-type females but undetectable in ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$  females. Induction of FasL and apoptosis by estrogen as well as a SERM also required ER $\alpha$  in cultured osteoclasts. Thus, we propose that the osteoprotective actions of estrogen and SERMs are mediated at least in part through osteoclastic ER $\alpha$  in trabecular bone, and the life span of mature osteoclasts is regulated through the activation of the FasL signaling.

## RESULTS

### Generation of Osteoclast-Specific ER $\alpha$ Gene Disruption by Knocked-In *Cre* in the *Cathepsin K* Gene

To specifically disrupt ER $\alpha$  gene in mature osteoclasts, we knocked in *Cre* into the gene locus of *Cathepsin K* (*Ctsk*<sup>Cre/+</sup>) (Figures 1A, S1A, and S1B), a gene known to be expressed in differentiated osteoclastic cells arising from hematopoietic stem cells. This gene is functionally indispensable for mature osteoclasts (Saftig et al., 1998). Only one copy appears enough to support normal bone formation and bone turnover, since heterozygous mutant mice of *Cathepsin K* (*Ctsk*<sup>+/-</sup>) have no obvious bone phenotype (Gowen et al., 1999; Li et al., 2006; Saftig et al., 1998). Clear, bone-specific expression of the *Cre* transcript in the adult *Ctsk*<sup>Cre/+</sup> mice was observed in the tested tissues (Figure S1C). To confirm *Cre* protein expression, the *Ctsk*<sup>Cre/+</sup> mice were crossed with tester mice (CAG-CAT-Z). These mice were genetically engineered to express  $\beta$ -galactosidase by excision of the transcribed stop sequence in front of the  $\beta$ -galactosidase gene (*LacZ*) in cells expressing *Cre* (Sakai and Miyazaki, 1997).  $\beta$ -galactosidase expression visualized by LacZ staining was observed in the bones of 16.5 dpc embryos and 7-day-old pups of *Ctsk*<sup>Cre/+</sup>; CAG-CAT-Z mice. Expression patterns were consistent with the appearance and skeletal localization of functionally mature osteoclasts (Figures 1B and 1C). Histochemical staining of LacZ in the lumbar vertebrae of 12-week-old mice was localized in multinuclear osteoclasts (Figure 1D) but not seen in osteoblasts and osteocytes (Figure S1D) and the hypothalamus (Figure S1E). Since *Cathepsin K* gene expression is evident in differentiated osteoclasts (Saftig et al., 1998), we used an in vitro culture cell system to test whether *Cre* expression was driven by the endogenous promoter that is induced at the time of osteoclast differentiation. Osteoclast-precursor cells derived from bone marrow

(F) The growth curve of ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$  mice was indistinguishable from that of the control mice. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

(G) Serum hormone levels were normal in 12-week-old ER $\alpha^{\Delta Oc/\Delta Oc}$  (filled column) versus ER $\alpha^{+/+}$  (open column) mice (n = 10–11 animals per genotype). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

were cytodifferentiated for 1 week in the presence of M-CSF (macrophage colony stimulating factor) and RANKL (receptor activator of NF $\kappa$ B ligand) (Koga et al., 2004). TRAP-positive osteoclasts emerged after 3 days of culture (Figure 1E). The number of TRAP-positive osteoclasts and the number of LacZ-expressing cells simultaneously increased. In the contrast, the LacZ expression was not detected in primary cultured osteoblasts derived from the calvaria (Figure S1F). In view of both our in vivo and in vitro observations, we conclude that the *Ctsk*<sup>Cre/+</sup> mouse line expresses Cre in differentiated osteoclasts. Moreover, estrogen response in bone mass control was not distinguishable in between *Ctsk*<sup>Cre/+</sup> and *Ctsk*<sup>+/+</sup> mice (Figure S2A).

We then crossed floxed *ER $\alpha$*  mice (Dupont et al., 2000) with *Ctsk*<sup>Cre/+</sup> mice to disrupt *ER $\alpha$*  in differentiated osteoclasts (*ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup>). Excision of the *ER $\alpha$*  gene (Figure S1G) was confirmed by Southern blotting of DNA from adult female and male (data not shown) bone as well as in cultured mature osteoclasts (Figure S1H). No overt differences were observed in the growth curve, reproduction, or tissues for up to 12 weeks of age (Figure 1F) between the *Ctsk*<sup>Cre/+</sup>; *ER $\alpha$* <sup>+/+</sup> (*ER $\alpha$* <sup>+/+</sup>) and the *Ctsk*<sup>Cre/+</sup>; *ER $\alpha$* <sup>flx/flx</sup> (*ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup>) mice, with the exception of the female bones. Serum levels of sex hormones and bone remodeling regulators such as IGF-I, leptin, and follicle-stimulating hormone (Sun et al., 2006; Takeda et al., 2002) appeared unchanged in both male and female *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> mice at 12 weeks (Figure 1G).

#### Osteopenia Occurred in Osteoclast-Specific *ER $\alpha$* KO Females But Not Males

The 12-week-old *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> females exhibited a clear reduction in bone mineral density (BMD) in the femurs (Figures 2A–2C) and tibiae (data not shown) when compared with *ER $\alpha$* <sup>+/+</sup> mice. Though cortical bone appeared unaffected, trabecular bone loss (Figure 2A) with significant reduction of trabecular bone volume (BV/TV) (Figure 2F) was clearly seen. This is similar to the osteoporotic abnormalities observed in women during natural menopause or following ovariectomy (Delmas, 2002; Tolar et al., 2004). However, unlike men deficient in aromatase or *ER $\alpha$*  activity (Simpson and Davis, 2001; Smith et al., 1994), *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> males unexpectedly exhibited no clear bone loss even in the trabecular areas (Figures 2A–2C). In *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> females, both the bone-formation rate, estimated by double-calcein labeling (Figure 2D), as well as the bone-resorption rate, estimated from TRAP-positive differentiated osteoclast numbers (Figure 2E), were increased, indicating high bone turnover. Histomorphometric analyses of *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> females supported the observation of accelerated bone resorption, as increased numbers of osteoclasts (Oc.S/BS and N.Oc/BS) were observed together with more eroded bone surface (ES/BS in Figure 2F). Bone formation was also enhanced as the rates of mineral apposition (MAR) and bone formation (BFR/BS) were both upregulated without an increase in osteoblast numbers (Ob.S/BS) (Figure 2F). Thus, considering all of these find-

ings, it is conceivable that the increased number of differentiated osteoclasts following *ER $\alpha$*  ablation accelerates bone resorption over formation, leading to bone loss in the trabecular areas.

#### No Further Bone Loss Results from Estrogen Deficiency in *ER $\alpha$* <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> Females

To verify whether osteoclastic *ER $\alpha$*  indeed mediates osteoprotective estrogen actions, estrogen action was investigated by ovariectomy (OVX) of 12-week-old female mice. As expected, OVX in *ER $\alpha$* <sup>+/+</sup> females resulted in significantly reduced BMD particularly in the trabecular bone (Figures 3A and 3B) but not in the cortical bone (Figure 3C). Consistent with previous reports, (Kimble et al., 1995; Teitelbaum and Ross, 2003), estrogen deficiency following OVX upregulated the serum levels of cytokines like TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  (Figure 3D). These cytokines enhance bone resorption through stimulation of osteoclastogenesis, leading to the loss of bone mass (Teitelbaum and Ross, 2003). OVX did not further reduce BMD or trabecular bone volume of the femurs of *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> females (Figure 3B) nor affect increased number of TRAP-positive osteoclasts (see lower panel in Figure 3A) despite upregulation of serum cytokines. This suggests that the expression of cytokines known to regulate bone resorption is not under the control of osteoclastic *ER $\alpha$* .

#### Estrogen Treatment Failed to Rescue the Osteoporotic Bone Phenotype of *ER $\alpha$* <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> Mice

Estrogen treatment by estrogen pellet implantation (OVX + E2) for 2 weeks after OVX in *ER $\alpha$* <sup>+/+</sup> mice elicited a dramatic increase in bone mass in both the trabecular and cortical areas of the femurs (data not shown) and lumbar vertebral bodies (Figure 4A). Estrogen action during E2 treatment in female mutants (*ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup>) was not as pronounced as in the *ER $\alpha$* <sup>+/+</sup> females (Figures 4A and 4B), and the increase in the trabecular portions of the distal femurs was slight (data not shown). Histomorphometric analysis of the lumbar vertebral bodies (Figure 4B) supported the idea that E2 treatment in the female mutants was not sufficient to suppress accelerated bone resorption. These in vivo findings in the *ER $\alpha$*  <sup>$\Delta$ Oc/ $\Delta$ Oc</sup> females suggest that in at least the trabecular areas of the long bones and lumbar vertebral bodies, the osteoprotective estrogen action is primarily mediated via osteoclastic *ER $\alpha$*  inhibiting bone resorption.

To further test this hypothesis, we investigated *ER $\alpha$*  protein expression in mature osteoclasts from trabecular bone. Few reports document osteoclastic expression of *ER $\alpha$*  protein and an estrogen response in both intact animals and in in vitro cultured osteoclasts (Bland, 2000). We therefore reasoned that ER expression ceases during differentiation into mature cells from primary cultures of osteoclast precursors, similar to that observed in other primary culture cell systems such as avian oviduct cells, in which *ER $\alpha$*  protein expression is drastically decreased during culture (Kato et al., 1989). Using highly sensitive immunohistochemistry, we investigated whether