

200807025A

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

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに関連
疾患遺伝子・分子標的解明に基づく診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成21(2009)年 4月

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

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに関連疾患の疾患遺伝子・
分子標的解明に基づく診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成21（2009）年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに関連疾患の疾患遺伝子・分子標的解明に基づく診断・治療法の開発	
	井上 聡	I - 1
II.	分担研究報告書	
	1. 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症ならびに関連疾患における機能解析	
	加藤 茂明	II - 1
	2. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割	
	堺 隆一	II - 9
	3. 骨粗鬆症ならびに関連疾患の標的 SNP の同定と臨床応用に関する研究	
	細井 孝之	II - 18
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	III - 1
	(別冊)	
IV.	刊行物の別刷	IV - 1

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究)
総括研究報告書

ゲノム医学を用いた骨粗鬆症ならびに関連疾患の
疾患遺伝子・分子標的解明に基づく診断・治療法の開発

主任研究者 井上 聡
東京大学大学院医学系研究科 抗加齢医学講座特任教授

【研究要旨】

超高齢社会を迎えるにあたり、1,100万人にも及ぶ罹患者をもつ骨粗鬆症、700万人以上といわれる変形性関節症をはじめとする加齢性疾患が急増しており、その対策が急務である。骨粗鬆症は加齢に伴い骨量の減少、骨格系の変形・変性が病的に亢進し腰痛や骨折、運動障害、寝たきりを引き起こす症候群で、特に高齢者の生活の質を低下させる。21世紀におけるゲノム医学の発展により、新しい手法での疾患遺伝子の探索・機能解明と、その診断・治療への応用が可能となった。しかし、骨粗鬆症の診断・治療は未だ理想的なものではなく、変形性関節症に関しては診断法・治療法とも模索段階である。したがって、これらの疾患遺伝子とその分子機能の解明が待ち望まれている。骨疾患治療薬であるエストロゲンとビタミンDは核内受容体を介して作用し、その他遺伝情報制御分子が骨粗鬆症・関連疾患の疾患遺伝子として関与することから、本研究は、それらの遺伝情報制御分子の系統的探索と機能解析を行い、ヒト全ゲノム情報、疾患モデル動物からの疾患感受性遺伝子探索のアプローチと組み合わせ、疾患遺伝子、分子標的を解明し、新しい診断・治療・予防法へ役立てることを目的とする。

これまでの研究により、骨量に相関する遺伝子をゲノムワイド5万SNPの解析の結果複数同定し、その大規模集団での確認を併せて進め、有力な候補疾患遺伝子を得、本年度は海外特許取得のためにPCT出願を行った。さらに骨代謝と密接に関連したエストロゲン、ビタミンK、ビタミンD、アンドロゲンにおいて新規シグナル経路、分子標的を見出し、新しい骨粗鬆症・関連疾患モデル動物を作製解析した。さらに、25万SNPに基づくヒト全ゲノムワイドでの遺伝解析を重点的に進め、疾患感受性に寄与している遺伝子群を明らかにした。このように本研究は、倫理面、知財確保に配慮しつつ、分子生物学、蛋白生化学、遺伝子改変動物、SNPを用いたヒト遺伝学を駆使して骨粗鬆症・関連疾患の病態を解明し、診断・治療・予防への応用から、国民の健康増進を目指したものであり、テーラーメイド医療により社会、我が国の医療、厚生労働行政に寄与することが期待される。

分担研究者氏名：所属機関名・所属機関
における職名

加藤 茂明：

東京大学分子細胞生物学研究所

核内情報研究分野・教授

堺 隆一：

国立がんセンター研究所

細胞増殖因子研究部・部長

細井 孝之：

国立長寿医療センター

先端医療部・部長

A. 目的

骨運動器の加齢性疾患として、急増する骨粗鬆症、また変形性関節症などの関連疾患は、罹患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる骨折や運動障害、寝たきりの原因となる。これら疾患の診断、治療法は未だ十分なものではなく、病態の解明と診断、治療法の確立が強く求められている。その治療薬は主に細胞内の受容体・情報制御伝達系・酵素系を介して働くことから、遺伝情報制御分子の骨粗鬆症・関連疾患における役割が注目される。ヒトゲノムの遺伝情報に基づき、本研究では骨代謝、骨加齢における遺伝情報制御分子の作用機序を解明し、全ゲノムレベルでの遺伝子多型解析を行い、効率的で偏りのない疾患遺伝子・分子標的の探索とその臨床応用を目指す。本研究の目的は、1) ゲノム医学と独自の手法を活用し、骨加齢性疾患・関連疾患における遺伝情報制御分子と関連因子群を系統的に探索同定しその機能を分子レベルで解明し、2) ヒト全ゲノム遺伝解析と遺伝子改変動物を用いて、個体レベルで疾患感受性遺伝子を網羅的に明らかにし、3) これらの骨粗鬆症・関連疾患の診断、治療の分子標的としての意義を検証し、遺伝子診断、創薬によりテーラーメイド医療としての新しい臨床応用を図ることにある。

B. 方法

1. TGFβ シグナル伝達因子と骨粗鬆症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TGFβ シグナル伝達調節因子であるヒト Smad6 遺伝子における遺伝子多型に関して、TaqMan PCR 法を用いて genotype の分類を行い、骨密度ならびに各種臨床データに関しても同時に測定し、得られたデータに関して統計学的な解析を行った。Smad6 遺伝子上にある 4SNP に関して連鎖不平衡解析を行った。

TGFβ シグナルのリガンドである TGFβ1 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う SNP(Pro10Leu)の遺伝子型を、同様の方法にて決定し、各種臨床データに関して相関解析を行った。さらに、TGFβ1 遺伝子 Pro10LeuSNP と Smad6 遺伝子上の SNP との相互作用による骨量との相関についても検討を行った。

2. Wnt-β カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として、Wnt-β カテニンシグナル伝達因子であるヒト LRP5 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う遺伝子多型(A1330V)に関して、TaqMan PCR 法を用いて genotype の分類を行い、SNP を決定した。各種臨床データに関して相関解析を行った。

293T 細胞に pcDNA3-LRP5 野生型(LRP5-A1330)、もしくは pcDNA3-LRP5 遺伝子変異型(LRP5-V1330)、さらには pcDNA3-Wnt3A、以上の発現ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。同時に Wnt-β カテニンシグナルの下流シグナルである TCF-Lef 活性を測定する Luciferase ベクターである Topflash ベクターをトランスフェクションすることで LRP5 遺伝子多型が Wnt-β カテニンシグナルに与える影響を *in vitro* で検討した。

3. ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症

関連遺伝子の探索 (分担: 井上)

55-83歳の閉経後女性750名を対象とし、その750名の血液よりDNAを抽出する。この集団を無作為に第1集団251名と第2集団499名とに群分けした。第1集団の251名から抽出したDNAを用いて、AFFYMETRIX社のGeneChip Mapping 100K Setに含まれる、約5万SNPについて同社GeneChip Mapping Assay法を用いてgenotypingを決定する。腰椎ならびに全身骨骨量との相関解析を行い、骨量を制御する候補遺伝子を選択する。Hardy-Weinberg平衡、Minor allele frequency(≥ 0.2)、Fisherの検定などの総合データより統計的に有意となる遺伝子多型を順位付けした。以上1次スクリーニングによって着目された候補遺伝子については、別集団499名を対象とした再解析を行い、再現性が得られたSNPを同定した。さらに、AFFYMETRIX社の250K arrayに含まれる、約25万SNPについても同様の手法によりgenotypingを決定し、新規骨量規定SNPの探索を行った。

4. 骨芽細胞系におけるGR応答遺伝子の解析 (分担: 井上)

骨芽細胞系細胞としてヒトの骨肉腫由来細胞株であるSaOS2を用いた。SaOS2細胞をPhenol red freeのDMEMに活性炭処理した血清を5%加え、Dexamethasone 10^{-8} Mにて6時間刺激を行った。Dexamethasone刺激およびコントロール(エタノール)刺激をした細胞よりRNAを抽出し、それぞれCy3, Cy5でラベルしたcDNAを合成し、Agilent社の44Kマイクロアレイにて遺伝子発現変化の解析を行った。

誘導された遺伝子に対しては、個別にprimerを作成し、定量的Reverse transcriptase-PCR法にて誘導の確認を行った。

誘導が確認された遺伝子のうち、骨芽細胞系において新規に同定されたTRIM63に関しては、C末にFLAG tag、

HA tagをtandemに付加した蛋白を作成し、SaOS2に恒常的に高発現する細胞をそれぞれ樹立した。これらの細胞を大量培養し、プロテオソーム阻害薬であるMG132にて処理した後、細胞溶解液をFLAG抗体、HA抗体による免疫沈降法にて2段階精製を行い、SDS-PAGEを行った後、PVDFメンブレンに転写、金コロイド染色を行った。共沈した蛋白をメンブレンより切り出し、TOF-MSにて結合蛋白の同定を試みた。

TRIM63誘導の生物学的意義を解析するため、MTTアッセイにより増殖速度の解析を行い、定量的Reverse transcriptase-PCR法にて、分化マーカー(アルカリフォスファターゼ・オステオカルシン)の発現解析を行った。分化の解析は、分化刺激を与えた条件下(BMP9刺激)にて行った。

5. PXRノックアウトマウスの骨格系表現系の解析 (分担: 井上)

カルフォルニア大学アーバイン校のBruce Blumberg教授との共同でPXR遺伝子欠損マウスを用いて、骨・関節における表現系の解析を行った。研究には、13ヶ月齢のPXR遺伝子欠損マウス(メスn=4、オスn=4)、および1ヶ月間同様の環境で生育させた野生型の129Strain(メスn=5、オスn=4)を用いた。これらのマウスに骨摘出の5日前にテトラサイクリン、2日前にカルセインを腹腔内注射し、ラベリングを行った。摘出した大腿骨において、骨密度計測、皮質骨の骨形態計測を行い、脛骨にて海綿骨の骨形態計測を行った。膝関節に関しても、関節軟骨幅、関節面のずれの計測を行った。

6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞 (分担: 井上)

ステロイド受容体のうち、グルココルチコイド受容体(GR)、ミネラルコルチコイド受容体(MR)、アンドロゲン受容体(AR)、プロゲステロン受容体(PR)の4つは、共通したゲノム上のステロイドホル

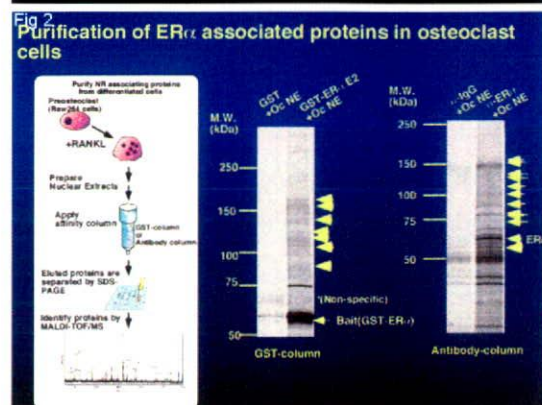
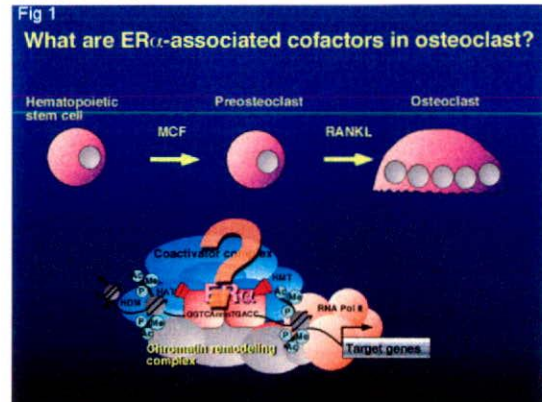
モン応答配列(SHRE)を認識し、ホモ二量体として SHRE に結合して、下流の応答遺伝子の転写制御を行っている。我々はこれまで、クロマチン免疫沈降法(ChIP)とDNAアレイを合わせたChIP-on-chip法を用いて、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における AR 結合部位の解析を行い、アンドロゲン受容体標的因子の同定に成功している(Takayama et al., *Oncogene*, 2007; Takayama et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; Takayama et al., *Cancer Res*, 2009)。本研究では、各ステロイド受容体を安定発現させたヒト胎児腎臓上皮 293 細胞をモデル細胞として作製し、ChIP-on-chip 法にて同定した AR 結合部位のゲノム領域について、クロマチン免疫沈降法による受容体の結合性を解析し、近傍遺伝子について、ステロイドによる遺伝子発現への影響を検討した。

GR、MR、AR を発現させた 293GR、293MR、293AR 細胞において、ホルモン枯渇 3 日後、溶媒 (0.1%エタノール) または各受容体に対する特異的ステロイド (293GR には dexamethasone (Dex, 10 nM)、293MR には aldosterone (Aldo, 100 nM)、293AR には R1881 (10 nM))にて 1 時間刺激し、各受容体に対する特異的抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いて ChIP を行い、ChIP を行っていない Input DNA をコントロールにして、ホルモン刺激による受容体結合の濃縮倍率をリアルタイム PCR にて定量的に検討した。受容体結合部位の最も近傍の遺伝子発現におけるステロイド応答性について、経時的に各細胞より RNA を調整して、定量的 RT-PCR にて遺伝子発現量を検討した。

7. 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症ならびに関連疾患における機能解析 (分担: 加藤)

In vitro で破骨細胞に分化しうる細胞 Raw 264.7 細胞を RANKL 刺激することで破骨細胞に分化させ、内在する ER α に結合する因子群を ER α 抗体カラムで精製、

同定した(Fig 1, 2)。その後、破骨細胞内での ER α に対する転写活性への影響などを検討した。



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

これまで続けてきたリン酸化蛋白質の総合的解析の過程で、疾患に関わる数多くの Src キナーゼの基質分子の発現変化やチロシンリン酸化の変化を見出し、その機能解析を行ってきたが、疾患治療のための分子標的を見つけるという最終的な目的に沿って、その中から骨軟骨系において極めて重要な役割を果たす可能性のある幾つかの蛋白質とその機能に焦点を絞るような形で最近の研究を進めてきている。

(1) Src の新規基質の機能解析

スキルス胃がんの腹膜浸潤部位で、強くチロシンリン酸化されている蛋白質として機能不詳の c9orf10 蛋白質を同定した。c9orf10 は、酸化ストレスによりチロシンリン酸化を受け Src と PI3 キナーゼの活性

化を誘導することで、腫瘍細胞の酸化ストレス抵抗性に関わることが明らかになった。このことから、我々はこの分子に Ossa (Oxidative Stress-associated Src Activator) と名付けた。酸化ストレスに対する細胞の抵抗性は、骨細胞を含む多くの正常細胞系においてもその機能バランスを保つために重要であり、この分子の発現分布、癌以外の種々の疾患の病態とのかかわりを調べるとともに、RNAi や発現ベクターを用いて、機能発揮のメカニズム、その他の生理機能の探索など解析を進める。

また我々は近年、腫瘍の転移・浸潤に関わる腫瘍特性である足場非依存性を制御するチロシンリン酸化蛋白質 CDCP1 を肺癌細胞株から精製により同定した。CDCP1 は、Src ファミリーキナーゼの基質分子である機能不詳の膜蛋白質であり、足場非依存性の強い肺癌で発現とチロシンリン酸化レベルが高い。RNAi および変異体を用いた実験で、CDCP1 がチロシンリン酸化した状態でアポトーシス関連分子 PKC δ を介して肺癌細胞の足場喪失時のアポトーシスを抑制していることが明らかになった。更に CDCP1 の発現抑制が幾つかの系で腫瘍の遠隔転移を抑えることを示した。この機能に加え CDCP1 は細胞の運動能を制御し、未知のマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を介して細胞の浸潤能と深く関わることが分かりつつある。この機能は Src の破骨細胞における役割を考える上でも重要であると考えられ、さらに解析を進める。

(2) Podosome 関連蛋白質の解析

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事が必要で、そのため細胞表面のインテグリン $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ 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 $\alpha\text{1}/\alpha\text{2}\beta\text{1}$ 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 μm 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、等に観察される。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関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。

コルタクチンは Podosome の重要な構成成分で Src ファミリーの基質である。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 1) インテグリンシグナルにおける Src の主要な基質として破骨細胞の分化・機能維持に重要である、2) エストロゲン受容体と直接結合してその nongenomic 作用に関わる分子である可能性がある、3) 乳癌における BCAR1/p130Cas の過剰発現がタモキシフェン耐性獲得につながる、等のこれまでの研究から、骨粗鬆症や変形性関節症等の骨・軟骨疾患においても、その成因に関与するのではないかと以前から考えていた。そのため、単純に RNAi を用いた発現抑制を用いて Cas のシグナルが腫瘍の特性にどのような影響を与えているかを解析するとともに、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博士との共同研究で、細胞に物理的な外力すなわちメカニカルストレスをかけたときに、細胞内の Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が大きく変化する現象について解析を進めてきた。そのようなメカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、澤田博士の開発した細胞外基質の伸長による解析法と、我々の樹立した Cas の各ドメインに対する抗体やリン酸化特異的抗体、RNAi の手法を用いて解析を進めた。

9. 骨粗鬆症ならびに関連疾患の標的 SNP の同定と臨床応用に関する研究 (分担: 細井)

東京都内在住の健常な若年男性ボランティアを対象とした。骨代謝疾患をもつ者、骨代謝に影響を及ぼす薬剤を服用し

ている者は除外された。60 名の対象者が得られ、平均年齢は 22.6 ± 1.6 歳であった。

採血前の 3 日間について食事内容が記録された。栄養の専門家によって記録内容が確認され、ソフトウェアである Eiyokun (Kenpaku-sha, Japan) によって摂取栄養素量を計算した。その結果から、ビタミン K1 やビタミン K2 の摂取量を推定した。

空腹時に得られた血液を用いて、血清中のビタミン K1 や K2 が測定された。これらの測定は LC-APCI-MS/MS を用いて、神戸薬科大学の岡野教授らによって行われた。骨代謝関連のビタミン K 依存性蛋白質であるオステオカルシン(OC)と非グラ化オステオカルシン(ucOC)の血清濃度は免疫学的手法によって測定された。

全血から DNA が抽出され、 γ グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)遺伝子多型性(R325Q, 974G>A)について遺伝子型が決定された。多型性部位を含む DNA を PCR で増幅し、シーケンサー(Gene Rapid, Amersham)で塩基配列を決定することによって遺伝子型を得た。遺伝子型の分布については Hardy-Weinber 平衡について検討した。

ビタミン K 摂取状況と血清 ucOC/OC 比との関連を統計学的に解析し(Spearman rank test)、遺伝子型の影響を検討した。

【倫理的配慮】本研究は日本女子大学の倫理委員会で検討され、承認されたものである。被験者からは研究内容が説明され、書面による承諾を得た。

C. 結果

1. TGF β シグナル伝達因子と骨粗鬆症

TGF β シグナル伝達因子である Smad6 のイントロン 3 に存在する SNP(rs755451)においては、全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた(Fig 3A, B, Table 1, 全身骨骨密度: $P=0.0004$, 腰椎骨密度: $P=0.0052$, 次頁)。また、イントロン 3 に存在する rs755451 以外にも Smad6 遺

Fig 3

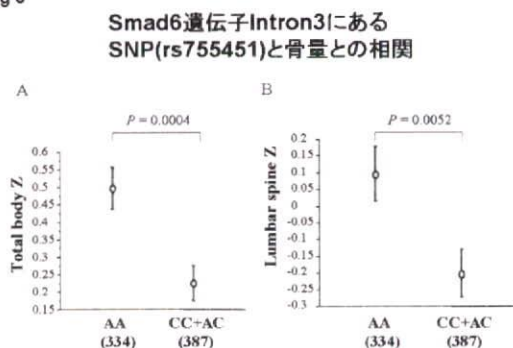


Table 1

**Smad6遺伝子Intron3にあるSNP(rs755451)と
臨床データとの相関解析(IVS3+26115A>C, rs755451)**

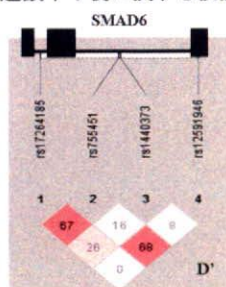
Items	Genotype (mean ± SD)		P value
	AA	CC + AC	
Number of subjects	334	387	
Age (years)	65.9 ± 7.3	66.0 ± 7.4	NS
Height (cm)	151.0 ± 5.6	150.4 ± 6.0	NS
Body weight (kg)	51.5 ± 7.8	50.6 ± 7.5	NS
Total body BMD (Z score)	0.50 ± 1.07	0.23 ± 0.98	0.0004
Lumbar spine BMD (Z score)	0.10 ± 1.48	-0.20 ± 1.38	0.0050
I-OC (ng/mL)	8.2 ± 4.5	8.3 ± 4.2	NS
DPD (pmol/μmol/Cr)	7.4 ± 4.2	7.6 ± 2.7	NS
Intact PTH (pg/mL)	37.3 ± 18.9	36.4 ± 14.9	NS
Calcitonin (pg/mL)	23.4 ± 10.1	23.5 ± 11.0	NS
BMI	22.5 ± 3.0	22.4 ± 3.1	NS

BMD, bone mineral density; I-OC, intact-osteocalcin; DPD, deoxypyridinoline; PTH, parathyroid hormone; BMI, body mass index; NS, not significant. Statistical analysis was performed according to the method described in the text.

伝子イントロン 1 に存在する SNP (rs17264185)、イントロン 3 における SNP (rs1440373)、さらにはエクソン 4 における SNP (rs12591946)も同時に決定し、これら遺伝子多型間の連鎖不平衡に関して検討を行った。その結果、これら遺伝子多型は連鎖不平衡にはないことが示された (Fig 4)。

Fig 4

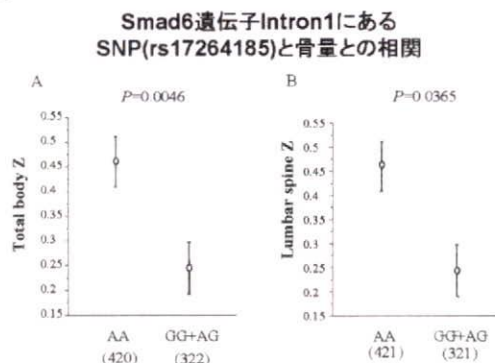
**Smad6 遺伝子上のSNPにおける
連鎖不平衡に関する検討**



また、これら SNP の中では Smad6 遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP (rs17264185)も全身骨ならびに腰椎骨密

度に関して有意差を呈していた (Fig 5A, B, Table 1, 全身骨骨密度: $P=0.0046$, 腰椎骨密度: $P=0.036$)。

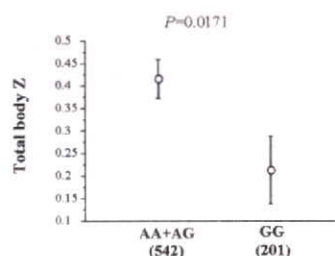
Fig 5



TGFβ シグナル伝達因子と骨量の相関解析においては、過去に、日本人を対象として、そのリガンドである TGFβ1 遺伝子上に存在するアミノ酸変異を伴う遺伝子多型 (Pro10Leu, rs1800470) と骨量との相関に関して報告がある。そこで、今回、我々は本集団において TGFβ1 Pro10Leu と骨量との相関を検討した。その結果、Pro10Leu 多型は全身骨骨密度と有意に相関した (Fig 6, $P=0.0171$)。さらに、Smad6

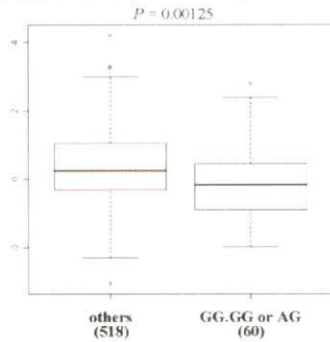
Fig 6

TGFβ1遺伝子多型(Pro10Leu)と骨量との相関



遺伝子上の SNP の中で、TGFβ1 遺伝子 Pro10Leu 多型と骨量との相関を示す P 値をさらに低下させる SNP を探索した結果、TGFβ1 遺伝子において 10Leu 変異となるホモ体である GG 型で、かつ Smad6 遺伝子のイントロン 1 において GG もしくは AG 型となる集団とその他の集団においては全身骨骨量の相関を示す P 値が 0.00125 とさらに低下した (Fig 7,

Fig 7 Smad6遺伝子Intron1にあるSNP(rs17264185)と TGFβ遺伝子多型(Pro10Leu)との交互作用

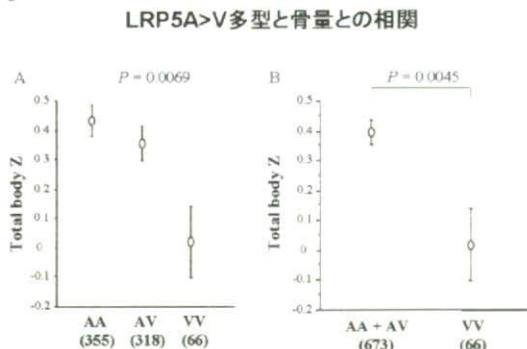


$P=0.00125$)。このことから、Smad6 のイントロン 1 での SNP と TGFβ1 遺伝子 Pro10Leu とは、相互作用を有して骨量を規定することを新たに見出した。

2. Wnt-β カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症

我々をはじめとする複数のグループが Wnt-β カテニンシグナルの制御因子である LRP5 に存在する SNP が骨量と相関することを明らかにし、近年注目されている。今回、我々は今までに報告した集団と別の集団 739 名を対象にした解析により、LRP5 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)と全身骨骨量との相関解析を行った。その結果、AA 型 355 名、AV 型 318 名、VV 型 66 名の 3 群に genotyping された。これら 3 群と全身骨骨量との相関解析を Kruskal-Wallis 解析により行ったところ、有意な相関を認めた(Fig 8A, $P=0.0069$)。さらに AA 型+AV 型と VV 型とを un-paired t test により比較検討したところでも有意な相関を認めた(Fig 8B,

Fig 8

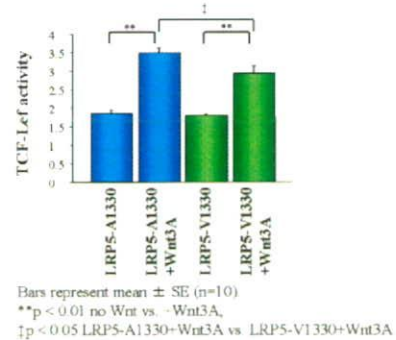


$P=0.0045$)。以上より、今回の日本人集団においても本 SNP と骨量とは再現性をもって有意に相関した。

次に、A1330V 変異が Wnt-β カテニンシグナルに与える影響を *in vitro* で検討した。293T 細胞に pcDNA3-LRP5 野生型 (LRP5-A1330)、もしくは pcDNA3-LRP5 遺伝子変異型 (LRP5-V1330)、さらには pcDNA3-Wnt3A、以上の発現ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。同時に Wnt-β カテニンシグナルの下流シグナルである TCF-Lef 活性を測定する Luciferase ベクターである Topflash ベクターをトランスフェクションすることで、LRP5 遺伝子多型が Wnt-β カテニンシグナルに与える影響を検討した。その結果、LRP5-A1330 は Wnt3A により活性化されるが、LRP5-V1330 では Wnt3A による活性化が減弱することを見出した(Fig 9)。

Fig 9

LRP5A>V多型がWntシグナルに与える影響



3. ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症関連遺伝子の探索

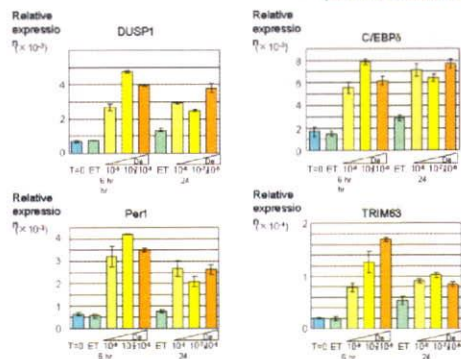
今回、今までの報告にあった SNP と骨量との相関が再現性を持って認められた 55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、この集団を無作為に第 1 集団 251 名と第 2 集団 499 名とに群分けした。第 1 集団 251 名の遺伝子上にランダムに存在する約 5 万 SNP における genotype を決定した。Hardy-Weinberg 平衡、Minor allele frequency (≥ 0.2)、Fisher の検定などの総合データより、統計的に有意となる遺伝子

多型を順位付けした。本解析により選定された十数個のSNPsに関して第2集団による2次スクリーニングを行った。第2集団499名を対象とした相関解析を行った結果、第2集団においても複数の骨量規定遺伝子において再現性が確認された。本解析における骨量規定候補遺伝子には機能不明の遺伝子上に存在するSNPが複数存在した。我々はさらに高密度SNPアレイを用いて5万SNPに加えて、25万SNPのgenotypingに関して約250名に対して行った。本解析からも同様に第2集団における2次スクリーニングを行い、骨量を規定する新規SNPを複数同定している。

4. 骨芽細胞系におけるGR応答遺伝子の解析

マイクロアレイにおいて、SaOS2細胞のDexamethasone刺激により発現が誘導されていた遺伝子のうち、DUSP1、C/EBP δ 、Per1、TRIM63に関して、定量的Reverse transcriptase-PCR法により2倍から8倍の発現上昇を確認した(Fig 10)。このうち、

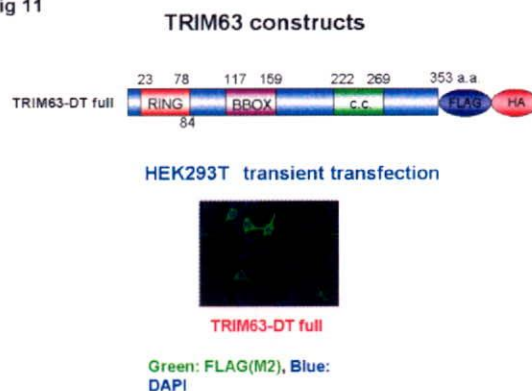
Fig 10 Confirmation by quantitative real-time PCR method (Internal Control: 18S rRNA)



TRIM63は、MuRF1 (Muscle Specific Ring Finger Protein)とも呼ばれ、従来骨格筋における発現しか知られていなかった。TRIM63は筋組織においては、E3 ubiquitin ligaseとしての機能が知られ、心筋においてはtroponin I、骨格筋においてはミオシン重鎖の分解に関わることが報告されている。この骨芽細胞においても、何らかの蛋白分解に関わっていると考えた。FLAG tag、HA tagをtandemに付加した

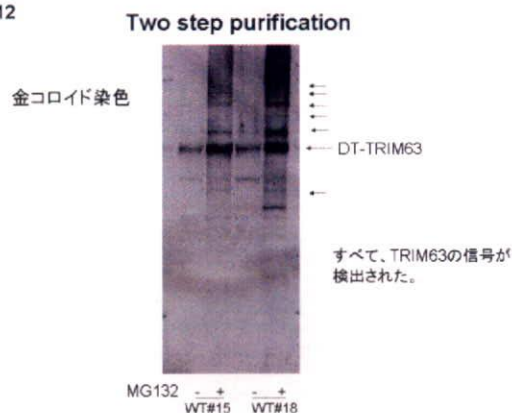
TRIM63を恒常的に高発現したSaOS2を樹立し(Fig 11)、FLAG抗体およびHA抗体

Fig 11



体による二段階の免疫沈降法を用いた精製にて基質蛋白の同定を試みたが、TRIM63自身の修飾蛋白のみしか検出することができなかった(Fig 12)。

Fig 12



TRIM63の高発現株の独立した2クローンを用いて増殖能・分化能を評価したところ、TRIM63はSaOS2の増殖は抑制したが(Fig 13)、SaOS2の分化は促進する傾向を認めた(Fig 14、次頁)。

Fig 13

Growth assay of TRIM63 overexpressing cells

SaOS2 cells stably express wild type TRIM63 or vector clones were plated 1×10^3 /well and cultured for 48 hours. Cell number was analyzed by MTT assay.

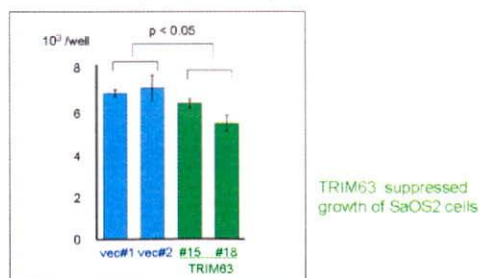
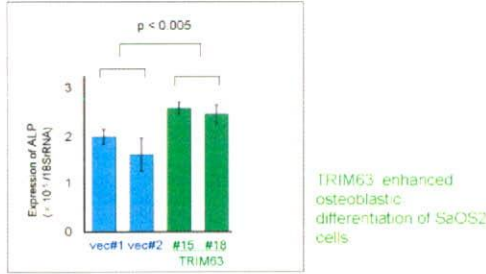


Fig 14

ALP expression of TRIM63 overexpressing cells

SaOS2 cells stably express wild type TRIM63 were treated with BMP9 for 4 days and mRNA of ALP was evaluated by quantitative RT-PCR method.

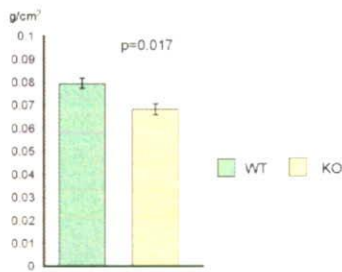


5. PXR ノックアウトマウスの骨格系表現系の解析

大腿骨の骨密度測定の結果、PXR 遺伝子欠損(PXRKO)マウスは 0.068 g/cm²、wild type (WT)は 0.079 g/cm² であり、PXRKO マウスにおいてWTに比べ有意な骨密度の低下(p=0.017)を認めた(Fig 15)。

Fig 15

Bone mineral density of femoral bones



骨形態計測においては、皮質骨においては、PXRKO マウスの皮質骨幅の減少を認め(p<0.005)、骨内膜側の BFR/BS がPXRKO マウスにおいて亢進するとともに(p<0.05)、ES/BS も増加し(p<0.05)、代謝回転の亢進を認めた。海綿骨におけるBV/TV も、PXRKO マウスにおいて著明な減少を認め、PXRKO マウスにおける骨代謝回転の亢進を認めた。

6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞

ヒト前立腺癌細胞における AR 結合部位の解析結果から、ステロイド受容体結合部位としても機能するゲノム領域を探索する目的で、ENCODE 領域(米国にお

けるヒトゲノムの機能解析計画において、パイロット研究の領域として選択されたゲノムの約 1%にあたる 30 Mb の領域)における、ChIP-on-chip 法により同定された AR 結合部位 10 箇所(しきい値 P < 1e-5、Table 2)について、リガンド依存性のステ

Table 2

ゲノムENCODE領域におけるChIP-on-chip法により同定されたアンドロゲン受容体結合部位 (ARBS) (P < 1e-5)

ARBS 番号	ENCODE 領域番号	染色体番号	開始部位	終了部位	近隣遺伝子	転写開始点からの距離 (bp)	近隣遺伝子における ARBS の位置
1	ENr131	2	234,433,433	234,433,623	UGT1A1	-17,390	5' upstream
2	ENr334	6	41,823,411	41,823,433	PGC	-323	5' upstream
3	ENm010	7	26,807,344	26,807,566	SCAP2	-129,874	5' upstream
4	ENm013	7	89,501,530	89,501,614	STEAP2	15,922	intron 3
5	ENm013	7	89,980,335	89,980,369	PFTK1	-3,010	5' upstream
6	ENm001	7	115,551,316	115,551,473	TES	106,884	3' downstream
7	ENm001	7	116,022,567	116,022,922	MET	116,338	intron 17
8	ENr233	15	41,840,443	41,840,980	KIAA0377	23,671	intron 27
9	ENr233	15	41,739,974	41,740,495	CATSPER2	-11,904	5' upstream
10	ENr213	18	23,990,311	23,990,793	CDH2	20,637	intron 1

*各ARBSにおける最も近隣のRefSeqプロンの転写開始点からの距離 (UCSCゲノムブラウザ NCBI build 36)に基づく。

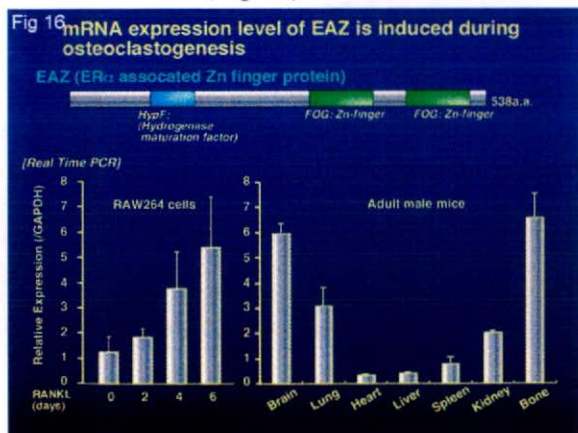
ロイド受容体結合能について検討を行った。各細胞に対するリガンド 1 時間刺激により、2 倍以上の受容体結合性濃縮を認める領域として、GR では 4 箇所、MR では 6 箇所、AR では 4 箇所検出された。3 つの受容体に共通なリガンド依存性受容体結合性の高い領域の 1 つとして ARBS_2 と ARBS_10 があり、この部位は PGC (pepsinogen C)の近位プロモーターと CDH2(cadherin 2)のイントロン 1 に位置していた。PGC については、ヒト乳癌細胞 T47D における各種ステロイド刺激(アンドロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン)による遺伝子発現調節が報告されており(Balbin et al., *J Biol Chem*, 1996)、本手法により、各種ステロイドにより発現調節を受ける遺伝子の同定が可能であることが示された。PGC 遺伝子については、特に 293GR に対する GC 刺激により、発現上昇することが RT-PCR により示された。CDH2 のイントロン 1 はゲノム配列解析により、SHRE がクラスターを形成しているが、リガンド刺激による CDH2 遺伝子発現は大きく変化しないことから、このゲノム領域は、各種ステロイドにより発現制御を受けていることが考えられ

た。また、ARBS_5はGRとARの2つの受容体において、受容体結合性が2倍以上に濃縮されており、これはPFTK1遺伝子の転写開始3 kb上流に位置していた。ステロイド刺激によるPFTK1遺伝子の発現変化は2倍以下であった。ARBS_1については、MRで2倍以上、GRとARでは2倍に到達しないものの2倍近くの受容体結合性の濃縮が認められ、近傍遺伝子のUGT1A1の発現については、GRとMRで、2倍以上の発現上昇が認められた。

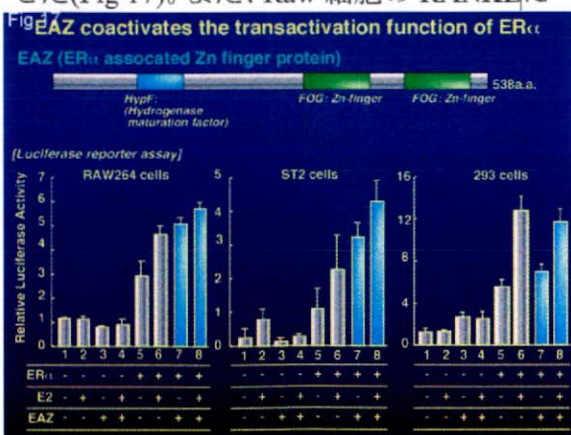
7. 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症ならびに関連疾患における機能解析

結合因子のなかのひとつ EAZ (ER α associated Zn finger protein)の解析を行った。

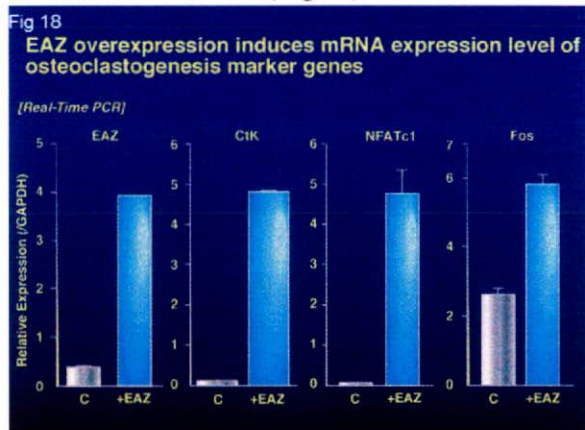
EAZはRANKL刺激依存性に発現が上昇し、また骨組織での発現が特異的な高い因子である(Fig 16)。また、いくつかの



細胞内で確かに ER α の転写活性を上昇させた(Fig 17)。また、Raw細胞のRANKLに



による破骨細胞分化系において破骨細胞分化マーカーを上昇させる因子であることが明らかになった(Fig 18)。



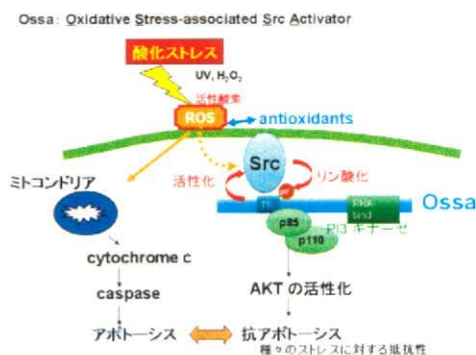
8. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

(1) Srcの新規基質の機能解析

スキルス胃がん 44As3細胞をマウス腹腔内に注射すると腸管膜転移を起こすが、この腸管膜転移部位で通常培養時に比べ強くチロシンリン酸化された蛋白質として新規蛋白質Ossaが質量分析により同定された。ヒトの組織染色では、Ossaは粘膜下に浸潤したスキルス胃がん組織で周囲の正常粘膜に比べ強い発現があることが確認された。Ossaは正常組織でも消化管系を中心に広い発現が認められることから、その生理作用について幅広い解析を行った。その結果、Ossaは紫外線や過酸化水素などの酸化ストレス刺激により細胞内でSrcファミリーキナーゼによってチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的にPI3キナーゼと会合しPI3キナーゼ-AKTシグナルを活性化することが分かった。またOssaはC末側にRNA結合ドメインを持ち、この領域を介してIGF-IIなどの発現を調節していることが明らかになった。この結果として、Ossaを高発現する細胞は酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得していると考えられ、スキルス胃がん細胞のOssaの発現をRNAiにより抑制するとそのマウ

モデルでの腸間膜浸潤が抑えられた。Ossa による酸化ストレスに対する抵抗性は、骨細胞を含めた多くの細胞が、*in vivo* での働きに関与すると考えられ、さらにノックアウトマウスを含めた機能解析に進めていく予定である。酸化ストレス刺激における Ossa の役割を Fig 19 にまとめる。

Fig 19
Ossaは酸化ストレスによるアポトーシスを抑制する



固形腫瘍の足場非依存性増殖に関わる分子として 2007 年に肺がん細胞から同定した CDCP1 は、Src ファミリーによりリン酸化して下流のエフェクター分子 PKC δ を膜にリクルートすることで、固形腫瘍の足場非依存性増殖や運動能・浸潤能を制御することが分かった。浸潤能に関しては CDCP1 及び PKC δ が、後述するコルタクチンと複合体をつくること、さらに CDCP1 は未同定のメタロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。ヒトスキルス胃がん 44As3 細胞において、CDCP1 を RNAi によって抑制すると、マウス腹腔内に注射した際に生ずる腸間膜転移が強く抑制されるが、造腫瘍能等に対する影響は見られない。CDCP1 は膜透過ドメインを持つ膜蛋白質であり、その多量体化が活性に関わると考えられているため、CDCP1 の細胞外ドメインに結合して多量体化を抑える抗体およびペプチドを現在スクリーニング中である。このような、細胞外から CDCP1 シグナルの抑制出来る分子を移植腫瘍等に局注することで腫瘍の転移浸潤に対する効果が得られれば、更に臨床応用に近づくものと考えられる。膜型のリガンドである Ephrin-B1 もスキルス胃がん

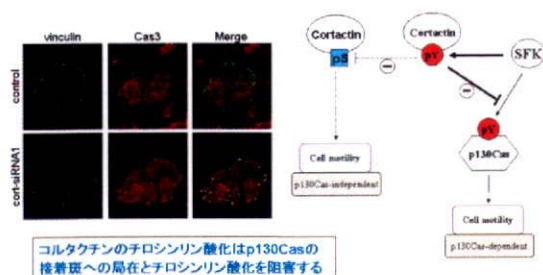
や膵がん等の腫瘍において、腫瘍間質-相互作用に関わってメタロプロテアーゼ分泌誘導等の機序で腫瘍の浸潤を抑えることを示してきた。こちらのシステムもこれまでに、C 末を欠損する変異体の過剰発現で Ephrin-B1 を介したシグナルを抑えると、マウスモデルにおける腫瘍の浸潤能を著明に抑制することを見出した。Ephrin-B1 も CDCP1 同様に細胞膜外の結合による多量体化が活性化に関わることが分かっている。そこで臨床における実用化を睨んで、細胞外ドメインに対して、多量体化をブロックすることで活性を抑制するタイプの抗体を作成することを試みている。

(2) Podosome 関連蛋白質の解析

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、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(Fig 20、次頁)。

Fig 20

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

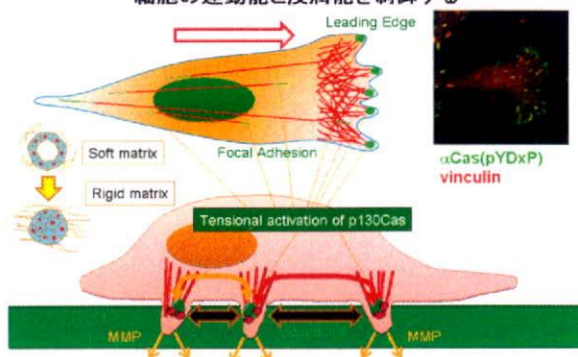


(3) メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わり の解析

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限局してみられる。一方、このような細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進することが分かった。Cas には基質領域と呼ばれる 15 個のリン酸化を受けるチロシンが集積する領域があるが、ここの部分に対して樹立した Cas1 抗体はネイティブな状態では、細胞をストレッチした場合に Cas 蛋白質との反応性が著しく上昇したため、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想像された。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。またストレッチによる刺激で活性化される Rap1 蛋白質などの活性は、Cas 蛋白質の発現を RNAi の手法により抑えることでストレッチによる活性化が抑えられるので、Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止め、Src キナーゼによるリン酸化の受けやすさが変化することにより、下流にメカニカルストレスのシグナルを伝えうる分子である

ことが明らかになった。腫瘍の転移浸潤において Cas は前述の invadopodia や focal adhesion 等につながるアクチン束の端に位置して、このような構造体にかかる応力を感じて、転移浸潤に関わるモデルが示され、実際 Cas によるメタロプロテアーゼ分泌シグナルなどがその足場となる細胞外基質の硬度依存性に伝えられることが他施設によって示された(Fig 21)。

Fig 21 p130Casは細胞にかかる応力を感じて細胞の運動能と浸潤能を制御する

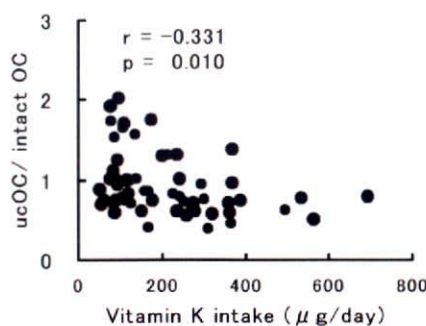


骨など硬度の高い組織において podosome などに局在する Cas が未融解部位を認識して破骨細胞の融解シグナルを送る分子センサーとしての Cas の役割について更に解析を進めている。

9. 骨粗鬆症ならびに関連疾患の標的 SNP の同定と臨床応用に関する研究

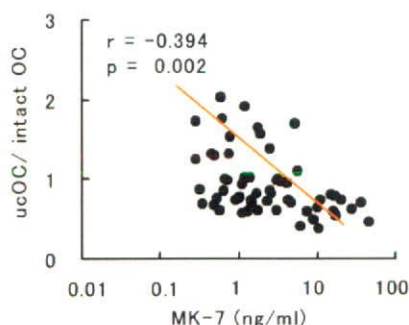
総ビタミン K 摂取量と非グラ化オステオカルシン/オステオカルシン比 (ucOC/OC 比) は統計学的に有意な負の相関を示した(Fig 22)。この相関は総ビタミ

Fig 22 ビタミンK摂取量とucOC/intact OC



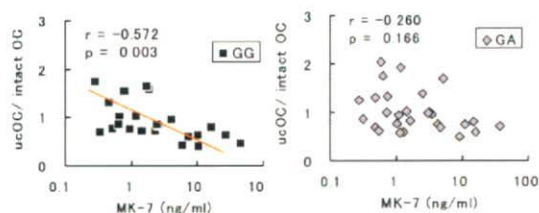
ンK量をビタミンK2 (MK7)摂取に置き換えても認められた(Fig 23、次頁)。また、

Fig 23 血清MK-7濃度とucOC/intact OCとの関連



集団を GGCX の遺伝子型によって層別化し、それぞれにおいて MK7 摂取量と ucOC/OC 比との関連を検討したところ、GG 型の集団では統計学的に有意な相関が認められたが、GA 型の集団では有意な相関は認められなかった(Fig 24)。

Fig 24 血清MK-7濃度とucOC/intact OCとの関連 :GGCX 8762G>Aの影響



Goseki and Hosoi et al.
J Vitaminol Nutr Sci 2007

D. 考察

1. TGFβ シグナル伝達因子と骨粗鬆症

今回、我々は TGFβ シグナル伝達因子である Smad6 のイントロン3ならびにイントロン1に存在する SNP は、骨量と有意に相関することを世界に先駆けて見出した(Urano et al., *J Bone Miner Metab*, in press)。一方、TGFβ シグナル伝達因子と骨量の相関解析においては過去に、日本人を対象として、そのリガンドである TGFβ1 遺伝子上に存在する Pro10Leu 多型と骨量との相関に関して報告がある(Yamada et al., *JAMA* 2001)。今回、我々は本集団において TGFβ1 Pro10Leu と骨量も有意に相関することを見出した。本 SNP

と骨量との相関解析において再現性が認められたことにより、TGFβ1 遺伝子多型は日本人において骨量を予測する遺伝子マーカーとしての有用性がある可能性が示唆された。Smad6 のイントロン1での SNP と TGFβ1 遺伝子 Pro10Leu とは相互作用を有して骨量を規定することも新たに見出した。このことは、TGFβ1 と Smad6 遺伝子が同じシグナル伝達経路の上で相互作用をすることで骨量を規定している可能性を示唆させる。

2. Wnt-β カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症

Wnt-β カテニン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(Urano et al., *J Bone Miner Metab*, 2004)。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(Ezura et al., *Bone*, 2007)。この LRP5 遺伝子における A1330V 多型は近年、欧米でゲノムワイドスクリーニングを行った結果でも同定されており、骨量を規定する再現性の高い SNP として注目されている(Richards et al., *Lancet*, 2008)。今回、我々は新たな日本人集団において A1330V SNP が骨量と有意に相関することを明らかにした。さらに、今回この遺伝子変異により Wnt-β カテニンシグナルが減弱することを *in vitro* で見出した。LRP5 ノックアウトマウスは骨量の減少

が示されている。またヒトにおいて LRP5 の機能低下変異は骨量低下を、機能亢進変異は高骨量となることが報告されている。今回の *in vitro* のデータと今までの報告を併せ考えると、A1330V 変異により Wnt- β カテニンシグナルの低下が直接、低骨密度を誘導している可能性が示唆された。

3. ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症関連遺伝子の探索

SNP アレイを用い、約 5 万 SNP の genotyping を行い、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 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。今回の 750 名の集団は前述したように、過去に報告のあった LRP5 や TGF β 1 遺伝子における SNP と有意に相関を示した。このことは、本集団が骨量を規定する遺伝的素因に影響を受けている集団であることが示唆される。本解析により選定された SNP の中には、膜型受容体である G 蛋白質共役型受容体をはじめとした、今までに骨代謝に関与することが示されていない遺伝子上の SNP が複数含まれていた。また、アミノ酸変異を有する SNP も複数同定された。本遺伝子の骨代謝における役割を探り、このアミノ酸変異をはじめとした機能変化を同定することで、新たな骨代謝制御機構が示される可能性がある。また、今回の探索で SNP と骨量との相関が同定された G 蛋白質共役型受容体に関しては、現在ノックアウトマウスの飼育を開始しており、骨における表現型の解析や受容体に対するリガンドの探索を現在行っており、新しい骨代謝メカニズムの解明や創薬への応用が期待される。さらに、50K アレイの解析法を 250K アレイに応用し、骨量規定遺伝子を新たに複数同定しており、本遺伝子群の機能検索が望まれる。

4. 骨芽細胞系における GR 応答遺伝子の

解析

本研究によって SaOS2 においていくつかの遺伝子が同定された。このうち DUSP1 は、マクロファージにおいてグルココルチコイドによって誘導されることは既に報告があり、MAPK シグナルの抑制作用が知られている。骨芽細胞における DUSP1 の誘導は、骨芽細胞の生存や増殖を抑制することが推測され、骨芽細胞の機能低下をもたらすと考えられる。また、C/EBP δ は脂肪細胞の分化促進因子であり、骨芽細胞と脂肪細胞が同じ幹細胞から分化することを考慮すると、分化レベルにて骨芽細胞に対し、抑制的に働いていることが推測される。Per1 は時計遺伝子として知られるが、血液単核球におけるグルココルチコイドによる誘導も知られていた。また、骨芽細胞の増殖抑制作用も報告されており、グルココルチコイドによる骨芽細胞機能抑制のメカニズムの一つであることが推測される。

TRIM63 に関しては、骨芽細胞の増殖は抑制するが、分化に関しては促進効果があり、骨芽細胞機能に対して二面的な作用を持っていると考えられた。TRIM63 は、E3 ubiquitin ligase であり、骨芽細胞においても何らかの蛋白を基質としておりと考えられるが、その同定にはさらなる研究が必要である。

5. PXR ノックアウトマウスの骨格系表現型の解析

PXR 遺伝子欠損マウスは、骨粗鬆症様の表現型を呈した。このことより、PXR/SXR シグナルは、骨に保護的に働くことが示唆された。骨に関しては、PXR 遺伝子欠損マウスは、骨形成パラメータ、骨吸収パラメータ双方の高値を呈し、高代謝回転を示した。PXR/SXR は、骨芽細胞における発現が知られているが、肝臓や腎臓においても発現し、ビタミン D 代謝酵素の発現制御作用も報告されている。また、炎症性の転写因子である NF- κ B を抑制する作用もあり、炎症を抑制するこ

とによる骨代謝への影響も推測される。PXR/SXRの骨芽細胞への直接作用やビタミンD代謝や炎症反応抑制を介する間接作用は、PXR/SXRのリガンドであるビタミンKの作用メカニズムの一部を担っていると考えられる。

6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞

本研究では、ステロイド受容体結合部位の包括的解析であるChIP-on-chip法によるゲノム情報を活用して、各ステロイド受容体結合部位の機能解析が可能である実験系が示された。骨芽細胞・軟骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子のマイクロアレイ発現解析については、GCについていくつかの研究グループから報告されているが、各種ステロイドによる応答遺伝子については明らかになっていない。本研究における、ステロイド受容体結合部位のゲノム情報とステロイド応答性遺伝子発現データを組み合わせることにより、さらに新規のステロイド受容体標的遺伝子の同定が可能になるものと考えられる。本研究で作製したステロイド受容体発現細胞は、複雑に絡み合うステロイド受容体のシグナルネットワークを検討する上で有用なツールであり、ここで得られる情報に基づき、さらに骨芽細胞系における各種ステロイド受容体の機能解析が進むことが期待される。細胞増殖作用、骨芽細胞系分化作用、アポトーシス作用、抗炎症作用に対して、各種ステロイド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。

7. 核内受容体、核内受容体共役因子の骨粗鬆症ならびに関連疾患における機能解析

破骨細胞の分化を促進させる因子であるEAZがER α の転写活性を上昇させる転写共役因子複合体の中に存在する可能性が明らかになった。昨年までの研究から成熟破骨細胞内でのER α の機能が明らかとなったが、その全段階での作用には不

明な点が多く、今回の研究がその解明の端緒になる可能性があると考えられる。

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

元来、Srcキナーゼはレトロウイルスの中で恒常的に活性化した形になることで腫瘍性異常増殖の原因分子として同定されたもので、正常のSrc蛋白質は細胞の秩序の取れた増殖や運動を維持する働きがあると考えている。正常細胞では、細胞内の限られた場所で、限られた時間の間活性化する事で細胞を正しくコントロールするので、必要がない状態では非活性型として存在している。活性が強く遷延する場合には腫瘍のような異常増殖につながるし、一方活性或いは蛋白質それ自体が無くなった場合にも、その臓器に他のSrcファミリーの相補的作用がなければ各種の病態を引き起こしうる。その中でもノックアウトマウスの解析から破骨細胞ではSrcファミリーのうちc-Srcが機能維持に中心的な役割を果たしていることが明らかになっている。ただSrcファミリーに属するFynやYesなども広範な組織において発現を認めるため、骨芽細胞・軟骨細胞等他の細胞系において役割を果たしている可能性があるが、現時点ではSrcファミリーの使い分けについては明らかになっていない部分が多い。Srcファミリーキナーゼはチロシンキナーゼの酵素としてその生理機能を発揮すると考えられるが、数多くの分子が潜在的にSrcファミリーの基質となりうる。骨・軟骨系において発現するSrcファミリーキナーゼが、臓器特異的に、そして機能特異的に多くの基質のチロシンリン酸化に関わっていると考えられるが、どの基質がどのような骨・軟骨の機能を制御しているのかは未だに明らかにされていない場合が多い。

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斑に関