

連する分子 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。

Podosome の構成成分としてのコルタクチンの機能は 1) チロシンリン酸化がその機能に対し抑制的に働くことが示唆される。2) Cas という Src キナーゼの他の基質を抑制的に制御することにより機能する。以上の 2 つの点で特徴的である。コルタクチンは極めて多機能な蛋白質であるため分子標的には向かない可能性があるが、骨・軟骨系の代謝制御を理解する上でこれからさらに重要性が増す可能性がある。

酸化ストレスと老化との深い関係は以前からよく知られているが、加齢が主たる要因となる骨粗鬆症においても酸化ストレスとの関係は重要だと考えられる。酸化ストレスによる T 細胞の活性化が骨髄で TNF の産生を促し、骨喪失を亢進させること、酸化ストレスが破骨細胞の分化に関わること等が言われているが、Ossa を介した酸化ストレス抵抗性のシグナルの ON/OFF も骨粗鬆症の発症に影響を与えている可能性がある。今後骨細胞系における Src 基質群の発現パターンの加齢による変化についてもさらに検討をしていく必要がある。

以上のような基質分子と Src の相互作用による骨細胞系のシグナル伝達制御の多様性を Fig 25 にまとめる。

#### 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

我々が検討した GGCX 遺伝子の SNP は catalytic center の近傍にあり、アミノ酸置換を伴う nonsynonymous SNP である (Fig 26)。この多型性は酵素活性の差異がもたらされることを報告している (Fig 27)。骨

Fig 25

#### Src 結合蛋白質群による Src の活性化と機能異常



Fig 26

#### Membrane topology of $\gamma$ -glutamylcarboxylase (GGCX) and the location of a functional SNP

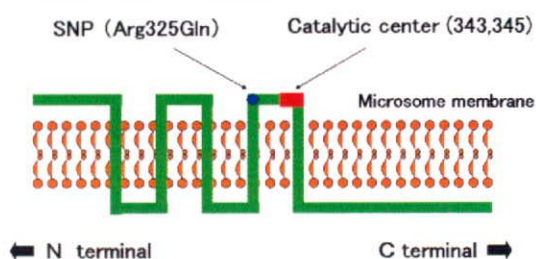
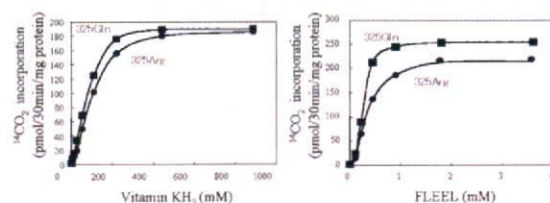


Fig 27

#### Influence of vitamin KH2 or FLEEL on the carboxylase activity of GGCX 325Gln or 325Arg.



- A. Carboxylation of 3.6mM FLEEL at vitamin KH2 concentrations between 0 and 888mM was measured by  $^{14}\text{CO}_2$  incorporation.  
B. Carboxylation of 222mM vitamin KH2 at FLEEL concentrations between 0 and 3.6mM was measured by  $^{14}\text{CO}_2$  incorporation.

Hosoi et al 2006

代謝に関連する主要なビタミン K 依存性蛋白質であるオステオカルシンのカルボキシル化はビタミン K の摂取状況と負の相関を示すことを確認し、このことは血清中のビタミン K2、とくに MK7 との有意な関連に反映されていた。さらにこの関連は上記で見出した GGCX 遺伝子の特定の genotype でのみに認められることが確認された。以上の結果から、GGCX 遺伝子の多型性が骨代謝からみたビタミン K 充足状態の機能的な個人差に関連して



いることが示唆され、ビタミン K に関する介入を栄養学的または薬理的に検討していく際に考慮すべき課題であろう。

骨粗鬆症は骨量の低下に加えて「骨の質」によってもたらされた骨脆弱性が亢進した疾患である。骨強度の規定因子として、骨量に加えて骨質の重要性が強調されてきたのはこの10年あまり前からである。骨粗鬆症の診療においても、骨量のみでは説明がつかないことがあり、「骨量以外」のことを骨質という概念にまとめているともいえる。いずれにしても骨粗鬆症の合併症である骨折の発症を予防することが、骨粗鬆症の予防と治療における最大の目標であり、その目安として骨量とそれ以外のファクターを考える必要がある。わが国における骨粗鬆症診療に関するガイドラインは1998年から整備されてきた。最近のガイドラインである「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2006版」では骨粗鬆症性骨折の危険因子をより広くとらえる観点から、診断基準とは別に骨折発生抑制を目的とする薬物療法開始の目安が検討された。その結果、原発性骨粗鬆症の診断基準にあてはまる場合のみならず、「骨量減少」のレベルでも、喫煙、過度のアルコール摂取、そして両親いずれかにおける大腿骨頸部骨折の既往といった、骨量や既存骨折とは独立した骨折の危険因子のうちいずれか一つをもっている場合は薬物療法の開始を検討するという提案がなされた。これらのうち、「両親いずれかの大腿骨頸部骨折の既往」が骨粗鬆症性骨折における遺伝的因子の関与が臨床的にも有意なものであることを示している。しかしながら、この遺伝的因子を説明する遺伝子(群)についてはまだ結論が得られていないことが事実である。Kanisによって率いられたWHOの国際共同研究グループは総数6万人にもおよぶ大規模な前向きコホートをを用いて、脆弱性骨折の絶対骨折リスクを算出するアルゴリズムを作成した。

「fracture risk assessment tool」に由来するFRAXと呼ばれるこのプログラムに掲載されている脆弱性骨折の発症に独立して寄与する10の因子について入力すると、前向きに10年間における大腿骨頸部ならびに4つの主要骨粗鬆症製骨折(脊椎、上腕骨、前腕骨、大腿骨頸部)の絶対骨折発生率(%)を得ることができる。これは個人ごとの骨折発生率を得るものであり、診断基準による疾患群と非疾患群へのグループわけとは異なる評価方法である。年齢や性によっても多少こととなるが、このプログラムにおいて、「両親の大腿骨頸部骨折」は骨折リスクを約2倍に増加させる。個人ごとの骨折リスクを把握した上で、骨粗鬆症の広い意味でのオーダーメイド医療が進展する可能性がある。遺伝子情報も用いた病態の個人差や薬物反応性の個人差が診療の場で活用されることも期待される。

## E. 結論

(1) 骨粗鬆症ならびに関連疾患の診断・治療の分子標的の同定機能解析とテーラード医療への応用

本年度は、GBS法とゲノム医学を活用したChIP-chip法(クロマチン免疫沈降法に基づくゲノムタイリングアレイ解析)、マイクロアレイ法等により、骨粗鬆症ならびに関連疾患に関わる遺伝情報制御分子、診断・治療の分子標的を網羅的に探索し、機能解析を行った。特に、エストロゲン、グルココルチコイドをはじめとする各種骨作用薬の新規標的因子を明らかにし、分子標的の探索を行い、IGF経路、WNT経路、TGF $\beta$ 経路に関わる因子やTRIM63、HIF2 $\alpha$ をはじめとする複数の候補遺伝子を得た。

さらに、ヒト遺伝解析について、これまでの5万SNPによる遺伝解析をさらに発展させ、現在集めている2,000人程の対象者の骨密度、骨関節変形指数、骨加齢疾患・関連疾患に関わる各種バイオマ

ーカーとの関連をゲノムワイド 25 万 SNP について 250 人規模の第 1 集団で検討を行い、第 2 集団での検証により、研究協力者である統計専門家と共に詳細な解析を進め数十の疾患感受性遺伝子に絞り込んだ。なお、知財の確保として、海外特許取得のため、東大 TLO を介して PCT 出願を行った。有望な候補に対して、細胞レベルと動物レベルで機能解析を行い、薬の標的としての可能性を示した。また、一般市民向けの骨粗鬆症の啓蒙書を出版した。

## (2) 核内受容体と共役因子の同定とその骨粗鬆症ならびに関連疾患との関連

本年度には骨代謝と関連疾患に関わる核内受容体と共役因子について、破骨細胞、軟骨細胞ならびに骨芽細胞特異的ノックアウトマウスのシステムを活用して生体機能解析を行った。特にエストロゲン、アンドロゲン、ビタミン D、ステロイド X 受容体による結果は骨の病態を引き起こすものであり、また関節症に関しても新しい疾患モデルを開発した。

## (3) 新しい細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素の同定、機能解析と骨粗鬆症ならびに関連疾患との関連

細胞内シグナル伝達系では、蛋白質レベルの修飾が大きな意義を持っている。特に、エストロゲンをはじめとする骨作用薬もしくはメカニカルストレスによるリン酸化、さらにはエピジェネティックな蛋白修飾に関わるシグナル伝達機構の解析を進め、新規リン酸化、アセチル化修飾メカニズムを明らかにした。

## F. 発表

### 1. 論文発表

- Urano, T., Narusawa, K., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine* 33, 1256-1261, 2008.
- Shiraki, M., Urano, T., Kuroda, T., Saito, M., Tanaka, S., Miyao-Koshizuka, M., Inoue, S.: The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab* 26, 595-602, 2008.
- Takayama, K., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Urano, T., Murakami, K., Hayashizaki, Y., Ouchi, Y., Inoue, S.: FOXp1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 388-393, 2008.
- Kubo, M., Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 71-77, 2009.
- Kumagai, J., Urano, T., Ogushi, T., Takahashi, S., Horie-Inoue, K., Fujimura, T., Azuma, K., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitamura, T., Inoue, S.: EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer. *Int J Cancer* 124, 799-805, 2009.
- Takayama, K., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Kaneshiro, K., Fujimura, T., Kumagai, J., Urano, T., Sakaki, Y., Shirahige, K., Sasano, H., Takahashi, S., Kitamura, T., Ouchi, Y., Aburatani, H., Inoue, S.: Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res* 69, 137-142, 2009.
- Takeo, C., Ikeda, K., Horie-Inoue, K.,



- Inoue, S.: Identification of *Igf2*, *Igfbp2* and *Enpp2* as Estrogen-Responsive Genes in Rat Hippocampus. *Endocrine J* 56, 113-120, 2009.
8. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Liu, X., Ogushi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitamura, T., Homma, Y., Inoue, S.: EBAG9 expression and its clinical significance in human testicular cancer. *Int J Urol* 16, 329-332, 2009.
  9. Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of estrogen receptor  $\alpha$  and histone deacetylase 6 causes rapid decetylation of tubulin in breast cancer cell. *Cancer Res* 69, 2935-2940, 2009.
  10. Furuya, T., Urano, T., Ikari, K., Kotake, S., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19, 140-146, 2009.
  11. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Kumagai, J., Murata, T., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Homma, Y., Inoue, S.: Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* (in press).
  12. Urano, W., Furuya, T., Inoue, E., Taniguchi, A., Urano, T., Kotake, S., Sekita, C., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: Associations between methotrexate treatment and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with incident fractures in Japanese female rheumatoid arthritis patients. *J Bone Miner Metab* (in press)
  13. Urano, T., Usui, T., Shiraki, M., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the constitutive androstane receptor (CAR) gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* (in press)
  14. Urano, T., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: Bone mass effects of a Smad6 gene polymorphism in Japanese postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* (in press)
  15. Tanabe, M., Kouzmenko, A., Ito, S., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Fujiyama, S., Yamagata, K., Zhao, Y., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.: Activation of facultatively silenced *Drosophila* loci associates with increased acetylation of histone H2AvD. *Genes Cells* 13, 1279-1288, 2008.
  16. Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H.G., Krasnov, A., Georgieva, S.G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L.: A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 29, 92-101, 2008.
  17. Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S. Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor- $\alpha$ . *EMBO Rep* 9, 563-568, 2008.
  18. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. *Mol Cell Biol* 28, 3995-4003, 2008.
  19. Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T.,

- Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Yaegashi, N., Kato, S.: *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 889-893, 2008.
20. Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 541-546, 2008.
21. Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kato, S.: Ligand-dependent interaction between estrogen receptor  $\alpha$  and adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 13 723-730, 2008.
22. Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T., Kato, S.: Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes Cells* 13, 623-633, 2008.
23. Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kato, S.: Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27, 4888-4899, 2008.
24. Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T., Kato, S.: Androgen receptor functions in male and female physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 236-241, 2008.
25. Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Kouzmenko, A.P., Furutani, T., Takeyama, K., Kato, S.: RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 2255-2261, 2008.
26. Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627, 2008.
27. Sasagawa, S., Shimizu, Y., Kami, H., Takeuchi, T., Mita, S., Imada, K., Kato, S., Mizuguchi, K.: Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile. *Steroids* 73, 222-231, 2008.
28. Honzawa, S., Yamamoto, Y., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M.A., Kato, S., Kittaka, A.: The  $2\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D<sub>3</sub> analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu). *Bioorg Med Chem* 16, 3002-3024, 2008.
29. Yanase, T., Fan, W., Kyoya, K., Min, L., Takayanagi, R., Kato, S., Nawata, H.: Androgens and metabolic syndrome: Lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 254-257, 2008.
30. Iriyama, A., Fujiki, R., Inoue, Y., Takahashi, H., Tamaki, Y., Takezawa, S., Takeyama, K., Jang, W.D., Kato, S., Yanagi, Y.: A2E, a pigment of the lipofuscin of retinal pigment epithelial cells, is an endogenous ligand for retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 283, 11947-11953, 2008.
31. Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N., Chiba, H.: Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for



- vitamin D-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 19, 1912-1921, 2008.
32. Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., Kobayashi, T.: STAT6 Inhibits TGF- $\beta$ 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the *Foxp3* promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 283, 14955-14962, 2008.
  33. Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Coactivation of estrogen receptor  $\beta$  by a gonadotropin-induced cofactor GIOT. *Mol Cell Biol* 29, 83-92, 2009.
  34. Suzuki, E., Zhao, Y., Ito, S., Sawatsubashi, S., Murata, T., Furutani, T., Shirode, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Fujiyama, S., Lim, J., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Aigaki, T., Tabata, T., Takeyama, K., Kato, S.: Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 3818-3822, 2009.
  35. Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K., Kato, S.: Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Metab* 27, 127-130, 2009.
  36. Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol* 77, 474-484, 2009.
  37. Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear protein GlcNAcylation facilitates retinoic acid-induced granulopoiesis through histone activating methylation. *Nature* (in press).
  38. Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A., Kato, S.: Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* (in press).
  39. Jia, L., Uekita, T., Sakai, R.: Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas. *Mol Cancer Res* 6, 654-662, 2008.
  40. Uekita, T., Tanaka, M., Takigahira, M., Miyazawa, Y., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Yanagihara, K., Sakai, R.: CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma. *Am J Pathol* 172, 1729-1739, 2008.
  41. Nakamoto, T., Seo, S., Sakai, R., Kato, T., Kutsuna, H., Kurokawa, M., Noda, M., Miyasaka, N., Kitagawa, S.: Expression and tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) protein in human neutrophils. *J Cell Biochem* 105, 121-128, 2008.
  42. Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K., Sakai, R.: A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10 regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 29, 402-413, 2009.
  43. Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Sakai, R.: Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28, 662-673, 2009.
  44. Ikeda, J., Oda, T., Inoue, M., Uekita, T., Sakai, R., Okumura, M., Aozasa, K., Morii, E.: Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients

- with adenocarcinoma of lung *Cancer Sci* (in press).
45. Sogabe, N., Oda, K., Nakamura, H., Orimo, H., Watanabe, H., Hosoi, T., Goseki-Sone, M.: Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T > C) associated with bone mineral density. *Biomed Res* 29, 213-219, 2008.
  46. Arai, T., Sawabe, M., Hosoi, T., Tanaka, N.: Role of DNA repair systems in malignant tumor development in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 8, 65-72, 2008.
  47. Tokuda, H., Takai, S., Hanai, Y., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamauchi, J., Harada, A., Hosoi, T., Ohta, T., Kozawa, O.: (-)-Epigallocatechin gallate inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Horm Metab Res* 40, 674-867, 2008.
  48. Mori, S., Kou, I., Sato, H., Emi, M., Ito, H., Hosoi, T., Ikegawa, S.: Association of genetic variations of genes encoding thrombospondin, type 1, domain-containing 4 and 7A with low bone mineral density in Japanese women with osteoporosis. *J Hum Genet* 53, 694-697, 2008.
  49. Orimo, H., Goseki-Sone, M., Hosoi, T., Shimada, T.: Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U2OS osteoblast-like cells. *Mol Genet Metab* 94, 375-381, 2008.
  50. Fujiwara, S., Nakamura, T., Orimo, H., Hosoi, T., Gorai, I., Oden, A., Johansson, H., Kanis, J.A.: Development and application of a Japanese model of the WHO fracture risk assessment tool (FRAX). *Osteoporos Int* 19, 429-435, 2008.
  51. Tokuda, H., Hosoi, T., Hayasaka, K., Okamura, K., Yoshimi, N., Kozawa, O.: Overexpression of protein kinase C- $\delta$  plays a crucial role in Interleukin-6-producing pheochromocytoma presenting with Acute Inflammatory Syndrome: A Case Report. *Horm Metab Res*, in press.
2. 著書
    1. 井上聡:40歳からの女性の医学 骨粗鬆症 -骨のアンチエイジング- 岩波書店 全111頁 (2008.10.16刊)
  3. 学会発表
 

【国際学会】

    1. Azuma, K., Urano, T., Ouchi, Y., Inoue, S.: Comprehensive and functional analyses of glucocorticoid responsive genes in osteoblastic cells. (2008.5.16-17) Annual Meeting of Korean Endocrine Society 2008, Seoul, South Korea.
    2. Inoue, S.: Target gene networks in hormone dependent tumor growth. (2008.6.24-27) The 21<sup>st</sup> Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [1], Yamanashi, Japan.
    3. Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Gene expression profiles of nuclear hormone receptors regulated by estrogen in human breast cancer MCF-7 cells. (2008.9.22-24) The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research, Kurashiki, Okayama, Japan.
    4. Inoue, S.: [Symposium, Invited Talk] New estrogen target gene (2008.11.8-12) 13<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Rio de Janeiro, Brazil.
    5. Inoue, S.: [Invited Talk] New Target Genes for Steroid Hormones (2008.10.22-24) CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, Tokyo, Japan.



6. Horie-Inoue, K., Takayama, K., Ikeda, K., Inoue, S.: Systemic identification of common and unique response genes for various steroid hormones in the human ENCODE genomic regions (2008.10.22-24) CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, Tokyo, Japan.
7. Ikeda, K., Ijichi, N., Kubo, M., Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Estrogen-related receptors in fats and adipogenesis (2008.10.22-24) CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, Tokyo, Japan.
8. Inoue, K., Matsumoto, T., Yamagata, K., Akimoto, C., Yonezawa, M., Kato, S.: DEAD-box RNA helicase is required for Drosha-mediating processing of a subset of microRNAs. (2008.3.25-4.1) 2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA), Whistler, Canada.
9. Suzuki, E., Sawatsubashi, S., Ito, S., Z Yao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Fujiyama, S., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Tomari, Y., Siomi, H., Kato, S.: Identification of novel insulator function to regulate chromatin formation through Dcr-2/Ago2 pathway. (2008.3.25-4.1) 2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA), Whistler, Canada.
10. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Kato, S.: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function. (2008.3.29-4.5) 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada.
11. Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S., Kato, S.: Novel corepressor, SNASH induces neurogenesis through the transcriptional repressing for notch signaling. (2008.3.29-4.5) 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada.
12. Ueda, T., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Yamagata, K., Zhao, Y., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S., Miki, T., Takeyama, K., Kato, S.: Aberrant expression of a novel androgen corepressor in testicular tumors. (2008.3.29-4.5) 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada.
13. Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.: Switching of chromatin-remodeling complexes for estrogen receptor  $\alpha$ . (2008.4.7-13) 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA.
14. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase, LSD1. (2008.4.7-13) 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA.
15. Murata, T., Sawatsubashi, S., Ito, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Suzuki, E., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, T., Ueda, H., Matsukawa, K., Takeyama, K., Kato, S.: Analysis of a novel co-repressor, Z4 with *Drosophila* molecular genetics



- and proteomics. (2008.4.7-13) 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA.
16. Kimura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.: *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) modulates ecdysone receptor-mediated transcription in *Drosophila* metamorphosis. (2008.4.7-13) 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA.
  17. Kato, S.: Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of RAIGIN during retinoic acid-induced differentiation. (2008.4.6-10) International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest under Stress, Okinawa, Japan.
  18. Kato, S.: Sex steroid hormones mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle. (2008.4.10-12) 11<sup>th</sup> Frontiers in Nuclear Receptor Action Conference, Savannah, USA.
  19. Kato, S.: Nuclear receptor function in skeletal tissues. NYAS on Integrative Physiology, New York, USA (2008.5.14-16)
  20. Kato, S.: Control of gene expression by the VDR. (2008.6.15-18) The Endocrine Society's 90th Annual Meeting, San Francisco, USA.
  21. Kato, S.: Function of nuclear sex hormone receptors in target tissues. (2008.8.25-28) Annual Scientific Meeting of Endocrine Society of Australia (ESA) & Society for Reproductive Biology (SRB), Melbourne, Australia.
  22. Kato, S., Imai, Y., Nakamura, T.: Estrogen mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle. (2008.8.28-30) Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS), Melbourne, Australia.
  23. Kato, S., Takada, I.: A non-canonical Wnt signal induces osteoblastogenesis through attenuatin PPARgamma-mediated adipogenesis. (2008.8.28-30) Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS), Melbourne, Australia.
  24. Kato, S.: The molecular mechanism of osteo-protective actions of sex hormones. (2008.9.4) Erasmus MC Lectures on Endocrinology, Rotterdam, The Netherlands.
  25. Takada, I., Young, M.-Y., Imai, Y., Kato, S.: Biochemical characterization of ER $\alpha$  co-regulators in multinucleated mature osteoclasts. (2008.9.12-16) American Society of Bone and Mineral Research 30<sup>th</sup> Annual Meeting, Montreal, Canada.
  26. Young, M.-Y., Takada, I., Kondou, S., Imai, Y., Kato, S.: Multinuclear expression of ER $\alpha$  in mature osteoclasts. (2008.9.12-16) American Society of Bone and Mineral Research 30<sup>th</sup> Annual Meeting, Montreal, Canada.
  27. Kato, S.: Coactivator mediation of MR AF-1. (2008.9.10-12) The Mineralcorticoid Receptor-update on Biology, Structure and Ligands, Berlin, Germany.
  28. Kato, S.: The mechanism of gene regulations by VDR. (2008.9.17) HSDM Grand Rounds Series at Harvard School of Dental Medicine, Boston, USA.
  29. Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. (2008.10.20-21) Dioxin Toxicity:

Mechanisms, Models, & Potential Health Risks, East Lansing, USA.

30. Kato, S.: Estrogen mediate osteoprotective by controlling osteoclast life cycle. (2008.11.22) The 20<sup>th</sup> Korean Society of Bone Metabolism Autumn Scientific Congress, Jeju-do, South Korea.

【国内学会】

1. 田北博保、森圭介、樺沢昌、土橋尊志、上山数弘、飯塚裕幸、粟田卓也、堀江公仁子、井上聡、米谷新：日本人加齢黄斑変性(AMD)とポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の発生関連遺伝子と眼底病変の関連 (2008.4.17-20) 第112回日本眼科学会総会 (横浜)
2. 土橋尊志、森圭介、樺沢昌、田北博保、上山数弘、堀江公仁子、井上聡、飯塚裕幸、粟田卓也、米谷新：加齢黄斑変性に対する光線力学療法の治療効果に関連する遺伝因子 (2008.4.17-20) 第112回日本眼科学会総会 (横浜)
3. 東浩太郎、堀江公仁子、大内尉義、林慎一、堺隆一、井上聡：乳癌における細胞膜局在エストロゲン受容体の新規核外作用の解析 (2008.5.10) 第4回SERM 学術研究会学術集会 (品川)
4. 井上聡：[シンポジウム] アンチエイジングとサクセスフルエイジングの望ましい関係ー健康な老年期を送るための更年期医学 (Pre-Geriatric Medicine)を考える：サクセスフルエイジング達成を目標に (2008.6.6-7) 第8回日本抗加齢医学会総会 (東京)
5. 浦野友彦、成澤研一郎、白木正孝、白井貴彦、大内尉義、中村利孝、井上聡：[最優秀奨励賞] 加齢に伴う脊椎変形を規定する遺伝子多型群の探索と同定 (2008.6.6-7) 第8回日本抗加齢医学会総会 (東京)
6. 浦野友彦、藤村哲也、高橋悟、大内尉義、井上聡：前立腺癌における Efp の発現とその役割に関する検討 (2008.6.19-21) 第50回日本老年医学会総会 (千葉)
7. 東浩太郎、浦野友彦、大内尉義、井上聡：骨芽細胞のグルココルチコイド刺激による TRIM63 の誘導 (2008.6.19-21) 第50回日本老年医学会総会 (千葉)
8. 浦野友彦、白井貴彦、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症発症に関与する遺伝子多型群の探索 (2008.7.12) 第8回東京骨関節フォーラム (東京)
9. 伊地知暢広、窪麻由美、池田和博、堀江公仁子、井上聡：エストロゲン関連受容体ファミリーの脂肪細胞分化における役割 (2008.8.22) 第13回アディポサイエンス研究会シンポジウム (大阪)
10. 井上聡：[特別講演] 女性ホルモンの作用機構とホルモン補充療法 (2008.8.30-31) 第26回日本美容皮膚科学会総会 (大阪)
11. 窪麻由美、伊地知暢広、池田和博、堀江公仁子、竹田省、井上聡：脂肪細胞分化モデルとマウス高脂肪食モデルを用いたエストロゲン関連受容体 ERR $\gamma$  の機能解析 (2008.10.17-18) 第29回日本肥満学会 (大分)
12. Urano, T., Murata, T., Fujimura, T., Suzuki, T., Takayama, K., Kumagai, J., Sasano, H., Takahashi, S., Kitamura, T., Homma, Y., Ouchi, Y., Inoue, S.：[Workshop] Estrogen-responsive finger protein is a tumor-promoting factor and a new potential biomarker for prostate cancer. (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)
13. Azuma, K., Urano, T., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue, S.：[Workshop] Association of Estrogen Receptor  $\alpha$  and HDAC6 causes novel nongenomic action in breast cancer cells. (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)



14. Takayama, K., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Urano, T., Ouchi, Y., Inoue, S.: [Workshop] Negative feedback loop of androgen receptor signal by a novel androgen regulated gene FOXP1 in prostate cancer. (2008.10.28-30) 第67回日本癌学会学術総会 (名古屋)
15. 東浩太郎, Stephanie Casey, 浦野友彦, 堀江公仁子, 大内尉義, Bruce Blumberg, 井上聡: 核内受容体 PXR ノックアウトマウスは海綿骨および皮質骨の骨量減少を呈する (2008.10.29-31) 第26回日本骨代謝学会 (大阪)
16. 古谷武文, 小竹茂, 八子徹, 南谷由紀, 浦野友彦, 井上聡, 鎌谷直之: 関節リウマチにおける骨折リスクの検討: 大規模前向き観察コホート(IORRA)から分かったこと (2008.10.29-31) 第26回日本骨代謝学会 (大阪)
17. 浦野友彦, 臼井貴彦, 白木正孝, 大内尉義, 井上聡: TGF $\beta$  シグナル伝達関連遺伝子における遺伝子多型と骨量との相関解析 (2008.10.31-11.2) 第10回日本骨粗鬆症学会 (大阪)
18. 高山賢一, 堀江公仁子, 浦野友彦, 鈴木貴, 藤村哲也, 高橋悟, 堤修一, 油谷浩幸, 大内尉義, 井上聡: 前立腺癌における新規アンドロゲン応答遺伝子 RUNX1 の転写調節および臨床的意義の解析 (2008.11.22) 第16回日本ステロイドホルモン学会 (福井)
19. 伊地知暢広, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡: EPAS1/HIF2 $\alpha$ はグルココルチコイドにより発現が誘導され, 骨芽細胞分化を抑制する (2008.11.22) 第16回日本ステロイドホルモン学会 (福井)
20. 上山和也, 池田和博, 堀江公仁子, 竹田省, 井上聡: エストロゲン応答遺伝子 Efp を標的とする二本鎖核酸分子による乳癌・子宮癌細胞の増殖, 腫瘍形成抑制効果 (2008.11.22) 第16回日本ステロイドホルモン学会 (福井)
21. 井上聡: [シンポジウム] エストロゲンレセプターとエネルギー代謝 (2008.12.9-12) BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) (神戸)
22. 浦野友彦, 臼井貴彦, 武田志津, 池田和博, 石田佳子, 岩柳隆夫, 大友純, 大内尉義, 井上聡: Terf (Testis RING finger protein; TRIM17)結合蛋白の探索 (2008.12.9-12) BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) (神戸)
23. 池田和博, 伊地知暢広, 村上佳代子, 堀江公仁子, 河合純, 林崎良英, 井上聡: 乳癌細胞 MCF7 における核内受容体およびフォークヘッド転写因子のエストロゲンによる発現調節と機能 (2008.12.9-12) BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) (神戸)
24. 北川浩史, 山岡育子, 目崎善弘, 清水崇史, 加藤茂明: グルココルチコイドレセプター(GR)による未知炎症制御メカニズムの解析 (2008.5.16-18) 第81回日本内分泌学会学術総会 (青森)
25. 金藤紫乃, 今井祐記, 高田伊知郎, 中村貴, 松本高広, 加藤茂明: 芽細胞を介したエストロゲンの直接作用—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスの作出 (2008.10.29-31) 第26回日本骨代謝学会 (大阪)
26. 延珉榮, 高田伊知郎, 金藤紫乃, 今井祐記, 加藤茂明: 成熟多核破骨細胞におけるエストロゲン受容体 ER $\alpha$  の発現解析 (2008.10.29-31) 第26回日本骨代謝学会 (大阪)
27. 北川浩史, 山岡育子, 岡田麻衣子, 藤山沙理, 加藤茂明: グルココルチコイドレセプター(GR)による未知炎症制御メカニズムの解析 (2008.11.22) 第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (福井)
28. 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、林珍仙、武山健一、加藤茂明：新規クロマチン構造調節因子 BAHD1 を介した転写抑制機構の解明 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
29. 井上和樹、松本高広、山形 薫、秋本千央、米澤正祥、加藤茂明：Y 染色体遺伝子 Dby の miRNA 産生制御における機能解析 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
30. Min-Young Young, Ichiro Takada, Shino Kondoh, Yuuki Imai, Shigeaki Kato: Multinuclear expression of ER $\alpha$  in mature osteoclasts. (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
31. 奥野陽亮、馬場敦史、大竹史明、加藤茂明：絶食シグナルによるヒストン脱メチル化酵素 PHF2 活性制御機構の解明 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
32. 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 の転写抑制を介した神経幹細胞未分化維持機構の解明 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
33. 岡田麻衣子、大竹史明、加藤茂明：ER $\alpha$  は M 期特異的に E3 ligase 複合体を形成する (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
34. 金藤紫乃、今井祐記、高田伊知郎、中村貴、松本高広、加藤茂明：骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスを用いて (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
35. 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、林珍仙、汐崎裕美、武山健一、加藤茂明：女性ホルモン・エストロゲンによる miRNA 産生抑制機構の解析 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
36. 村田拓哉、沢津橋俊、伊藤紗弥、鈴木絵里子、山形薫、趙越、田辺真彦、藤山沙理、木村周平、上田崇、松川紘之、林珍仙、武山健一、加藤茂明：ショウジョウバエ Zn-finger タンパク Z4 の新規クロマチン凝集化機能の解析 (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
37. 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、木村周平、村田拓哉、藤山沙理、上田崇、松川紘之、林珍仙、多羽田哲也、伊藤敬、加藤茂明：新規ヒストンシャペロン *Drosophila* DEK はクロマチン構造変換を介してエクダイソンレセプターの転写反応を正に制御する転写共役因子である (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
38. 高田伊知郎、須澤美幸、加藤茂明：[シンポジウム] 骨組織分化における PPAR $\gamma$  機能制御因子群の解析—組織幹細胞とニッシャー (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
39. 大竹史明、岡田麻衣子、西川亜美、藤井義明、加藤茂明：[シンポジウム] リガンド依存性転写因子はユビキチンリガーゼ複合体として機能する—タンパク質分解を介した新たな生理機能— (2008.12.9-12) 第 31 回日本分子生



- 物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
40. 堺隆一: 肺癌細胞の足場非依存性と転移能を制御する新規蛋白質 CDCP1 の解析 (2008.7.24-25) 第 17 回日本がん転移学会学術集会・総会 (鹿児島)
41. 田中正光、鎌田礼子、佐々木一樹、堺隆一: スキルス型癌の間質浸潤におけるリン酸化蛋白質の解析(2008.10.28-30) 第 67 回日本癌学会総会 (名古屋)
42. 森井英一、池田純一郎、上北尚正、堺隆一、青笹克之: 肺腺癌における新規レセプターCDCP1 の発現意義 (2008.10.28-30) 第 67 回日本癌学会総会 (名古屋)
43. 宮澤悠里、上北尚正、堺隆一: CDCP1 によるがん細胞の運動能・浸潤能制御機構の解析 (2008.10.28-30) 第 67 回日本癌学会総会 (名古屋)
44. 上北尚正、堺隆一: がん細胞の足場非依存性増殖を制御する CDCP1 の機能ドメインの解析 (2008.10.28-30) 第 67 回日本癌学会総会 (名古屋)
45. 曾我部夏子、丸山里枝子、祓川摩有、細井孝之、五関正江: ビタミン K1 またはビタミン K2 経口投与によるラット小腸アルカリホスファターゼ活性誘導作用について (2008.5.2-4) 第 62 回日本栄養・食糧学会大会 (埼玉)
46. 細井孝之: 骨粗鬆症 update 新たな潮流 介護・寝たきり予防のための骨粗鬆症対策 (2008.6.6-7) 第 8 回日本抗加齢医学会総会 (東京)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称: 「骨粗鬆症感受性遺伝子、及び骨粗鬆症罹患リスクの測定方法」、出願番号: PCT/JP2008/001453、出願日 2008 年 6 月 6 日、発明者: 井上聡・浦野友彦・大内尉義・白木正孝、出願人: 国立大学法人東京大学
2. 発明の名称: 「骨粗鬆症感受性遺伝子、及び骨粗鬆症罹患リスクの測定方法」、特願 2008-163679、出願日: 2008 年 6 月 23 日、発明者: 井上聡・浦野友彦・大内尉義・白木正孝、出願人: 国立大学法人東京大学
3. 発明の名称: 「ヒト体脂肪量と関連する遺伝子多型に基づく肥満発症リスクの判定方法」、出願番号: PCT/JP2008/070457、出願日: 2008 年 11 月 11 日、発明者: 井上聡・浦野友彦・大内尉義・白木正孝、出願人: 国立大学法人東京大学

分担研究報告書



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

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

分担研究者 加藤 茂明  
東京大学分子細胞生物学研究所 教授

【研究要旨】

性ホルモン（アンドロゲン・エストロゲン）は主要な骨代謝調節因子の一つであり、強力な骨量維持作用をもつ。しかしながらその作用機構は未だに不明であった。昨年まで我々は破骨細胞特異的 ERKO マウスの作出および解析により、破骨細胞内 ER $\alpha$ が骨代謝制御に直接関与している事を明らかにし、骨組織に対する性ステロイドホルモン作用メカニズムの一端を解明した。本年は、さらにその作用メカニズムを明らかにするために、破骨細胞内で ER に結合する因子を生化学的手法を用いて精製同定した結果、ER $\alpha$ の転写活性を上昇させる因子 EAZ(ER $\alpha$  associated Zn finger protein)を同定した。今後はその生理作用への関与を漢籍していく予定である。

A. 目的

骨基質はコラーゲンを主成分とする基質にハイドロキシアパタイトが沈着した硬組織であるにも関わらず、内外からの刺激に応じて常に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を活発に繰り返している（骨リモデリング）。この過程は、骨吸収と骨形成の正負の調節の上に成立するため、正常な骨組織の維持には骨リモデリングのバランス維持が重要である。骨リモデリングには数多くの代謝制御因子が知られているが、なかでも性ステロイドホルモンは主要制御因子として知られている。実際、近年顕在化している閉経後骨粗鬆症は、女性ホルモン（エストロゲン）欠乏によって引き起こされることが広く知られており、閉経後骨粗鬆症における骨折予防を目的として、ホルモン補充療法 (HRT: Hormone

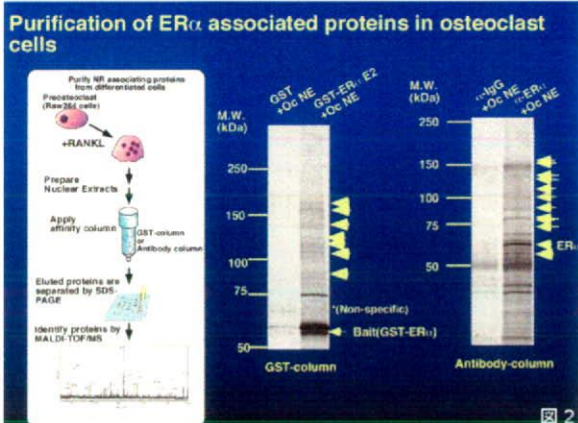
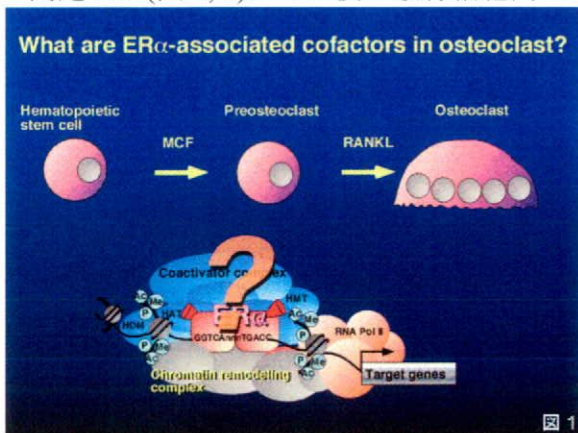
Replacement Therapy)が導入されたがホルモン作用の副作用が認められたため、副作用改善を目的として、比較的骨量回復のみを認める合成リガンドとして SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator)が導入されてはいるもののその詳細な作用メカニズムは不明である。エストロゲンの生理作用はリガンド依存性転写制御因子であるエストロゲン受容体(ER)を介した標的遺伝子の転写制御により発揮されと考えられている。ところが、全身的 ER 遺伝子欠損マウスでは、アンドロゲンをはじめとした全身の内分泌バランスによるホメオスタシスの維持のため、骨量に著明な変化は認めない。昨年までの解析において、我々は破骨細胞特異的 ER 遺伝子欠損(OcERKO)マウスを作出し、この破骨細胞特異的な ER $\alpha$ の作用を明らかにした。そこで本年度は、ER $\alpha$ の作用メカ



ニズムを明らかにするために、生化学的なアプローチを行った。

### B. 方法

*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 $\alpha$  に結合する因子群を ER $\alpha$  抗体カラムで精製、同定した(図 1, 2)。その後、破骨細胞内で

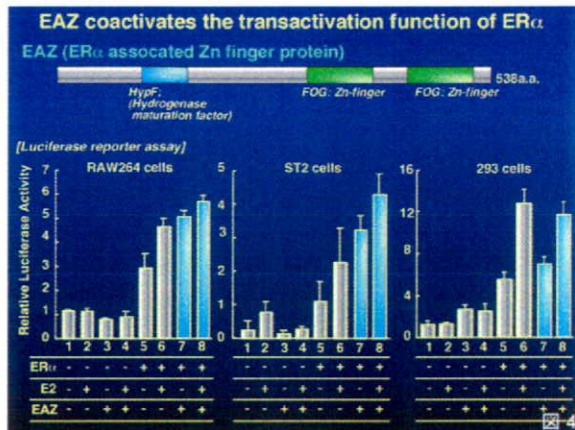
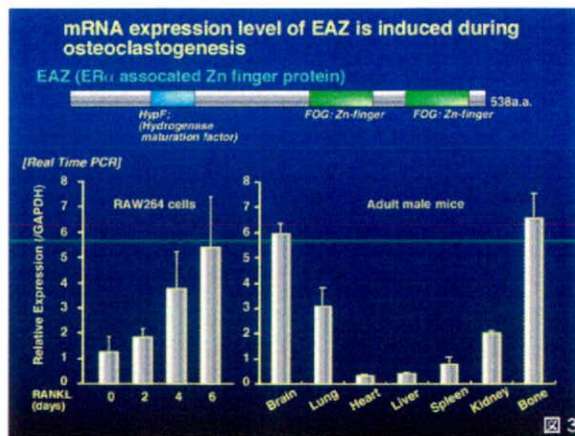


の ER $\alpha$  に対する転写活性への影響などを検討した(図 3 以降)。

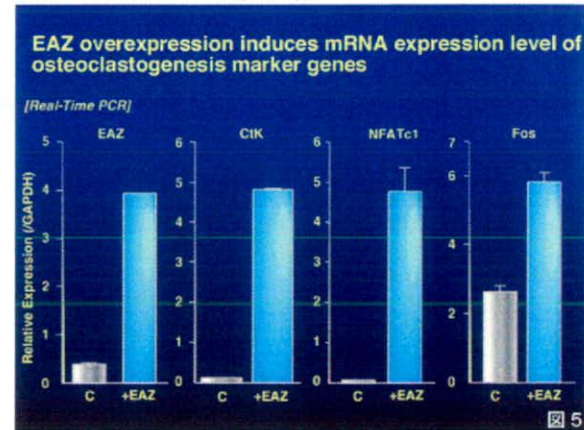
### C. 結果

結合因子のなかのひとつ EAZ (ER $\alpha$  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(図 3)。また、いくつかの細胞内で確かに ER $\alpha$  の転写活性を上昇させた(図 4)。また、Raw 細胞の RANKL 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(図 5)。



### D. 考察

破骨細胞の分化を促進させる因子である EAZ が ER $\alpha$  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 $\alpha$  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。

#### E. 結論

破骨細胞の分化段階で ER $\alpha$ に結合し、その転写活性を上昇させる EAZ を同定した。この因子は破骨細胞分化マーカーを上昇させる因子であることから、今後、破骨細胞分化と ER $\alpha$ の転写との未知の相関メカニズムが明らかにされる可能性がある。

#### F. 発表

##### 1. 論文発表

1. Tanabe, M., Kouzmenko, A., Ito, S., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Fujiyama, S., Yamagata, K., Zhao, Y., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.: Activation of facultatively silenced *Drosophila* loci associates with increased acetylation of histone H2AvD. *Genes Cells* 13, 1279-1288, 2008.
2. Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H.G., Krasnov, A., Georgieva, S.G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L.: A TF1C/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 29, 92-101, 2008.
3. Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S. Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor- $\alpha$ . *EMBO Rep* 9, 563-568, 2008.
4. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. *Mol Cell Biol* 28, 3995-4003, 2008.
5. Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Yaegashi, N., Kato, S.: *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 889-893, 2008.
6. Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 541-546, 2008.
7. Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kato, S.: Ligand-dependent interaction between estrogen receptor  $\alpha$  and adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 13 723-730, 2008.
8. Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T., Kato, S.: Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes Cells* 13, 623-633, 2008.
9. Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Kato, S.: Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27, 4888-4899, 2008.
10. Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T., Kato, S.: Androgen receptor functions in male and female physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 236-241, 2008.
11. Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., Matsukawa, H., Kouzmenko, A.P., Furutani, T., Takeyama, K., Kato, S.: RNA-binding protein hoip accelerates

- polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **Biosci Biotechnol Biochem** 72, 2255-2261, 2008.
12. Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H.: Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. **Science** 319, 624-627, 2008.
  13. Sasagawa, S., Shimizu, Y., Kami, H., Takeuchi, T., Mita, S., Imada, K., Kato, S., Mizuguchi, K.: Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile. **Steroids** 73, 222-231, 2008.
  14. Honzawa, S., Yamamoto, Y., Yamashita, A., Sugiura, T., Kurihara, M., Arai, M.A., Kato, S., Kittaka, A.: The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D<sub>3</sub> analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu). **Bioorg Med Chem** 16, 3002-3024, 2008.
  15. Yanase, T., Fan, W., Kyoya, K., Min, L., Takayanagi, R., Kato, S., Nawata, H.: Androgens and metabolic syndrome: Lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. **J Steroid Biochem Mol Biol** 109, 254-257, 2008.
  16. Iriyama, A., Fujiki, R., Inoue, Y., Takahashi, H., Tamaki, Y., Takezawa, S., Takeyama, K., Jang, W.D., Kato, S., Yanagi, Y.: A2E, a pigment of the lipofuscin of retinal pigment epithelial cells, is an endogenous ligand for retinoic acid receptor. **J Biol Chem** 283, 11947-11953, 2008.
  17. Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N., Chiba, H.: Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes. **Mol Biol Cell** 19, 1912-1921, 2008.
  18. Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., Kobayashi, T.: STAT6 Inhibits TGF- $\beta$ 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. **J Biol Chem** 283, 14955-14962, 2008.
  19. Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Matsumoto, T., Yamaoka, I., Sawatsubashi, S., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Coactivation of estrogen receptor  $\beta$  by a gonadotropin-induced cofactor GIOT. **Mol Cell Biol** 29, 83-92, 2009.
  20. Suzuki, E., Zhao, Y., Ito, S., Sawatsubashi, S., Murata, T., Furutani, T., Shirode, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Fujiyama, S., Lim, J., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Aigaki, T., Tabata, T., Takeyama, K., Kato, S.: Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci USA** 106, 3818-3822, 2009.
  21. Imai, Y., Nakamura, T., Matsumoto, T., Takaoka, K., Kato, S.: Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. **J Bone Miner Metab** 27, 127-130, 2009.
  22. Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. **Biochem Pharmacol** 77, 474-484, 2009.



23. Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear protein GlcNAcylation facilitates retinoic acid-induced granulopoiesis through histone activating methylation. *Nature* (in press).
  24. Imai, Y., Kondoh, S., Kouzmenko, A., Kato, S.: Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* (in press).
2. 学会発表  
【国際学会】
1. Inoue, K., Matsumoto, T., Yamagata, K., Akimoto, C., Yonezawa, M., Kato, S.: DEAD-box RNA helicase is required for Drosha-mediating processing of a subset of microRNAs. 2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA), Whistler, Canada (2008.3.25-4.1)
  2. Suzuki, E., Sawatsubashi, S., Ito, S., Z Yao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Ueda, T., Murata, T., Fujiyama, S., Matsukawa, H., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Tomari, Y., Siomi, H., Kato, S.: Identification of novel insulator function to regulate chromatin formation through Dcr-2/Ago2 pathway. 2008 Keystone Symposia Conference (RNAi, MicroRNA, and Non-Coding RNA), Whistler, Canada (2008.3.25-4.1)
  3. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Kato, S.: A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma function. 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada (2008.3.29-4.5)
  4. Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S., Miki, T., Takeyama, K., Kato, S.: Novel corepressor, SNASH induces neurogenesis through the transcriptional repressing for notch signaling. 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada (2008.3.29-4.5)
  5. Ueda, T., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Yamagata, K., Zhao, Y., Tanabe, M., Kimura, S., Murata, T., Matsukawa, H., Fujiyama, S., Miki, T., Takeyama, K., Kato, S.: Aberrant expression of a novel androgen corepressor in testicular tumors. 2008 Keystone Symposia Conference (Nuclear Receptors: Orphan Brothers), Whistler, Canada (2008.3.29-4.5)
  6. Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.: Switching of chromatin-remodeling complexes for estrogen receptor  $\alpha$ . 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA (2008.4.7-13)
  7. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase, LSD1. 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA (2008.4.7-13)
  8. Murata, T., Sawatsubashi, S., Ito, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Suzuki, E., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, T., Ueda, H., Matsukawa, K., Takeyama, K., Kato, S.: Analysis of a novel co-repressor, Z4 with *Drosophila* molecular genetics

- and proteomics. 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA (2008.4.7-13)
9. Kimura, S., Ito, S., Sawatsubashi, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., Murata, T., Matsukawa, H., Takeyama, K., Kato, S.: *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) modulates ecdysone receptor-mediated transcription in *Drosophila* metamorphosis. 2008 Keystone Symposia Conference (Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena), Snowmass, USA (2008.4.7-13)
  10. Kato, S.: Nuclear O-glycosylation regulates histone methyltransferase activity of RAIGIN during retinoic acid-induced differentiation. International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest under Stress, Okinawa, Japan (2008.4.6-10)
  11. Kato, S.: Sex steroid hormones mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle. 11<sup>th</sup> Frontiers in Nuclear Receptor Action Conference, Savannah, USA (2008.4.10-12)
  12. Kato, S.: Nuclear receptor function in skeletal tissues. NYAS on Integrative Physiology, New York, USA (2008.5.14-16)
  13. Kato, S.: Control of gene expression by the VDR. The Endocrine Society's 90th Annual Meeting, San Francisco, USA (2008.6.15-18)
  14. Kato, S.: Function of nuclear sex hormone receptors in target tissues. Annual Scientific Meeting of Endocrine Society of Australia (ESA) & Society for Reproductive Biology (SRB), Melbourne, Australia (2008.8.25-28)
  15. Kato, S., Imai, Y., Nakamura, T.: Estrogen mediate osteoprotective effects by controlling osteoclast life cycle. Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS), Melbourne, Australia (2008.8.28-30)
  16. Kato, S., Takada, I.: A non-canonical Wnt signal induces osteoblastogenesis through attenuatin PPARgamma-mediated adipogenesis. Australian & New Zealand Bone & Mineral Society (ENZBMS), Melbourne, Australia (2008.8.28-30)
  17. Kato, S.: The molecular mechanism of osteo-protective actions of sex hormones. Erasmus MC Lectures on Endocrinology, Rotterdam, The Netherlands (2008.9.4)
  18. Takada, I., Young, M.-Y., Imai, Y., Kato, S.: Biochemical characterization of ER $\alpha$  co-regulators in multinucleated mature osteoclasts. American Society of Bone and Mineral Research 30<sup>th</sup> Annual Meeting, Montreal, Canada (2008.9.12-16)
  19. Young, M.-Y., Takada, I., Kondou, S., Imai, Y., Kato, S.: Multinuclear expression of ER $\alpha$  in mature osteoclasts. American Society of Bone and Mineral Research 30<sup>th</sup> Annual Meeting, Montreal, Canada (2008.9.12-16)
  20. Kato, S.: Coactivator mediation of MR AF-1. The Mineralcorticoid Receptor-update on Biology, Structure and Ligands, Berlin, Germany (2008.9.10-12)
  21. Kato, S.: The mechanism of gene regulations by VDR. HSDM Grand Rounds Series at Harvard School of Dental Medicine, Boston, USA (2008.9.17)
  22. Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. Dioxin Toxicity: Mechanisms, Models, &