

Potential Health Risks, East Lansing, USA (2008.10.20-21)

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

【国内学会】

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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)
15. 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ェ— (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)
16. 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)

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテラーメード研究)  
分担研究報告書

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

分担研究者 堺 隆一  
国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部部長

【研究要旨】

骨粗鬆症の予防・診断・治療それぞれの向上のために、骨細胞系の細胞の増殖・機能異常の本態を理解し、その異常に関わる細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることが極めて重要である。様々なシグナル伝達分子群の中でチロシンキナーゼである Src ファミリーの分子とその基質群は、破骨細胞・骨芽細胞においてその分化と機能維持のために必須の機能を持つことがこれまでの解析により示されている。本研究では Src ファミリーの活性変化や組織による基質特異性を解析することにより、骨細胞における Src ファミリーの役割を詳細に解析し、骨粗鬆症の病因の本質的な理解を目指すとともに、Src のシグナル経路を標的とした治療への発展につながる基盤を作成する。我々は欠損変異体や RNAi などの手法を用いて Src ファミリーキナーゼの基質群である Cortactin、Cas などの新しい機能を見だし、更に新規の基質 CDCP1 や Ossa などを同定してこれらが独自の生物学的機能を持つことを明らかにした。これらの機能は骨の分化や機能維持に密接に関係していると考えられ、さらには骨粗鬆症や関連疾患に対する選択的な治療薬開発につながると考えられる。

A. 目的

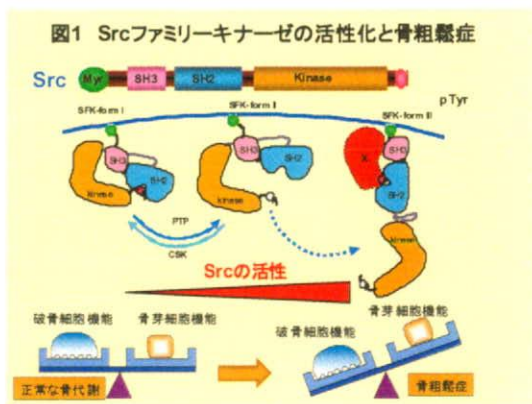
骨粗鬆症とは、骨吸収と骨形成からなる骨代謝のバランスが崩れることで、骨量の病的減少が引き起こされた状態と考えられる。ここには骨吸収に関わる破骨細胞機能と骨形成に関わる骨芽細胞機能の力関係が、加齢や生活習慣によって変化することが大きく関わっている。本研究では破骨細胞の機能制御に最も深く関わると考えられる分子群の一つである Src ファミリーキナーゼとその基質群の機能解析について重点的に行う。そもそも c-Src のノックアウトマウスが破骨細

胞機能障害により骨大理石病を呈することが 1991 年の Cell 誌に報告されて以来、Src の活性化と破骨細胞の機能が密接に関係しているものと予測されて多くの研究が進められてきたが、数々の状況証拠や関連分子の発見にもかかわらずその分子メカニズムについては現在に至るまで完全に解明されてはいない。Src およびその基質の伝えるシグナル作用機序についてさらに詳細な解析を行うことにより、Src キナーゼの活性またはシグナルの調節による破骨細胞機能の抑制が骨粗鬆症の標的治療として有効であることを示し、

そのような Src の特異的ブロックのモデルを樹立することを主たる目標とする。

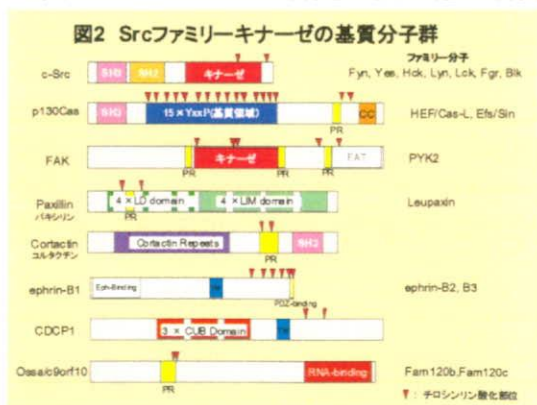
c-Src の一次構造は、C 末側のチロシンキナーゼとしての活性を持つキナーゼドメインとその N 末側の機能調節領域に存在する SH2 と SH3 が特徴的である。更に細かい機能解析で N 末端には脂質修飾により膜局在に関わる部位、C 末端側にリン酸化されることに自己のキナーゼ活性を抑えるチロシン(チロシン 527)がある。以上の特徴的な構造、モチーフは種を超えて保存されており、Src ファミリーと呼ばれる蛋白質群に共通して保存されている。Src ファミリーの SH2 はリン酸化チロシンを含むモチーフに、SH3 はプロリンを多く含むモチーフに特異的かつ高親和的な結合をすることが知られている。X 線構造解析によって通常 Src が活性化していない状態では Src の SH2 が C 末のチロシン 527 のリン酸化した形に、SH3 がキナーゼドメインと SH2 の間にある領域と結合することにより 2 重にロックされた形でその活性を封じこめていることが明らかになった。チロシン 527 のリン酸化状態により Src ファミリーは活性化と不活性化の平衡状態にあると考えられる。Csk (C-terminal Src kinase)は、チロシン 527 を特異的にリン酸化することで Src の SH2 とチロシン 527 との分子内結合を誘導するため Src の活性を抑制する方向に作用する。一方これと逆にチロシン 527 の脱リン酸化を誘導する複数のホスファターゼは Src を活性化する方向に働く。基本的な Src ファミリーの活性は Csk の活性とホスファターゼの活性のバランスによって調節されていると考えられる。ここに SH3 や SH2 と結合する分子が結合することにより Src ファミリーは開かれた状態に保たれ恒常的活性化が引き起こされると考えられる。(図 1)

従って Src ファミリーの各組織における活性を正確に理解するには、その場でリン酸化を受けて Src と結合する基質の



同定と、基質が下流に伝えるシグナルを明らかにすることが極めて重要である。しかるに基質からのアプローチが遅れている背景には、このような基質蛋白質の機能解析に現在主流となった DNA チップのような発現量解析では得るのが難しい幾つかの情報、すなわち 1) 蛋白質のチロシンリン酸化の状態、2) 蛋白質の複合体形成とその結合相手、3) 蛋白質の細胞内局在、などの情報が必要不可欠である事がある。我々はこの目的の遂行のために効率的にチロシンリン酸化を含む蛋白質群を精製し、質量分析に持ち込むため新しい技術の開発を行ってきた。この手法と、プロテオーム解析や古典的な細胞生物学的解析をうまく組み合わせることで研究を押し進めることにより、各種刺激により骨細胞に起こる細胞内変化に蛋白質発現-蛋白質修飾-複合体形成-細胞内局在の4つの側面からアプローチし、その結果を総合的に評価して実際に起きている現象を理解することを試みる。

図 2 にこれまで当研究室及び他の研究



室で同定された主要な Src の基質蛋白質群を示す。このような蛋白質群は、チロシンリン酸化部位以外はそれぞれまったく異なる構造を持ち、独自の生物学的機能を発揮することによって Src の活性化シグナルを伝えているものと考えられることができる。

本研究は以上のような手法を用いて Src ファミリー及びその基質群のシグナルという視点で骨粗鬆症の病態をできる限り正確に把握し、骨粗鬆症の診断や、分子レベルでの治療法の開発に結びつけることをめざすものである。

## B. 方法

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

### (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与す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 $\delta$  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与することがわかりつつある。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  $\alpha$ V $\beta$ 3 を中心とするインテグリンが接着刺激を受け取る。このような接着能・運動能を維持し、機能を発揮するにはインテグリンシグナルを細胞内に伝える Src キナーゼが必要である。また変形性関節症で病的減少が見られる軟骨細胞の増殖には回りのコラーゲンによるインテグリン  $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 $\beta$ 1 複合体刺激が必要で、細胞内シグナル伝達はやはり Src キナーゼからその基質であるパキシリン、PYK、コルタクチンなどのリン酸化を介する経路を用いると考えられる。特に破骨細胞においては骨融解の場を作る sealing zone の形成に

先立って、podosome という小さな構造体が形成されることが重要とされる。この podosome は約 1 $\mu$ m の点状の接着構造で、破骨細胞だけでなくマクロファージ 樹状細胞、活性型 Src など Transform した細胞、などに観察される。培養した破骨細胞においても podosome が集合して環状の構造体を形成し、更に大きくなってアクチンが濃縮することにより Sealing Zone のような構造を取ることが観察される。この podosome の形成には Src キナーゼの活性化が深く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。

Podosome の重要な構成成分で Src ファミリーの基質であるコルタクチンは種々の細胞において RNAi によってコルタクチンの発現を抑制して生物学的機能を解析する実験を行っていたが、スキルス胃がんの細胞においてコルタクチンの発現抑制が細胞運動能に大きな影響を与えることがわかった。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。

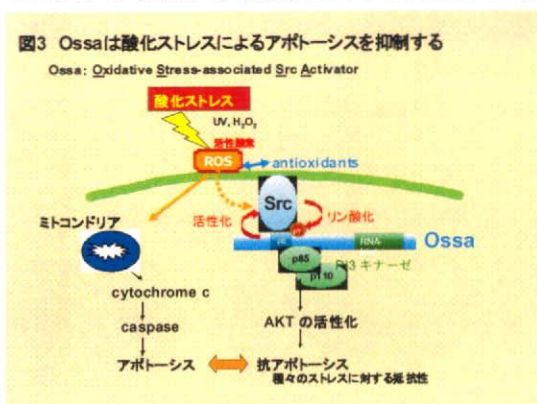
3) 乳癌における BCAR1/p130Cas の過剰発現が、タモキシフェン耐性獲得につながる、などのこれまでの研究から、骨粗鬆症や変形性関節症などの骨・軟骨疾患においても、その成因に関与するのではないかと以前から考えていた。そのため、単純に RNAi を用いた発現抑制を用いて Cas のシグナルが腫瘍の特性にどのような影響を与えているか解析するとともに、Src との結合部位のみを発現するアデノウイルスベクターを用いて、Src から Cas に来るシグナルだけを選択的にブロックする系の樹立を試みてきた。一方で、米コロンビア大学の澤田泰宏先生との共同研究で、細胞に物理的な外力すなわちメカニカルストレスをかけたときに、細胞内の Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が大きく変化する現象について解析を進めてきた。そのようなメカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、澤田先生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。

## C. 結果

### (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。解析の結果 Ossa は紫外線や過酸化水素などの酸化ストレス刺激によって細胞内で Src ファミリーキナーゼによ

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、スキルス胃癌細胞のOssaの発現をRNAiにより抑制するとそのマウス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を進めていく予定である。酸化ストレス刺激におけるOssaの役割を図3にまとめる。



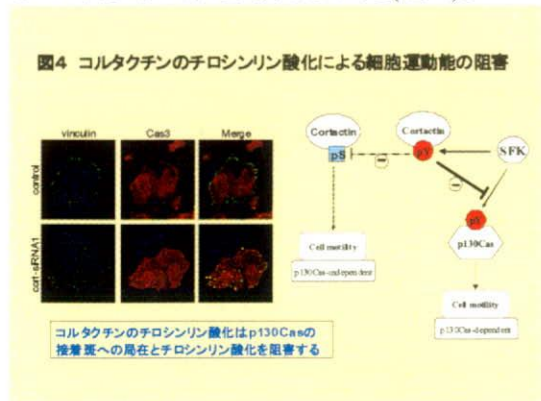
固形腫瘍の足場非依存性増殖に関わる分子として2007年に肺癌細胞から同定したCDCP1は、Srcファミリーによりリン酸化して下流のエフェクター分子PKC $\delta$ を膜にリクルートすることで、固形腫瘍の足場非依存性増殖や運動能・浸潤能を制御することがわかった。浸潤能に関してはCDCP1及びPKC $\delta$ があとで述べるコルタクチンと複合体をつくること、さらにCDCP1は未同定のメタロプロテアーゼ分泌に関わることも示された。ヒトスキルス胃癌44As3細胞においてCDCP1をRNAiによって抑制するとマウス腹腔内に注射した際に生ずる腸間膜転移が強く抑制されるが、造腫瘍能などに対す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など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もスキルス胃癌や膵癌などの腫瘍において、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など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、胃癌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癌細胞ではコルタクチンの抑制は細胞運動能の低下をもたらした。これに対しチロシンリン酸化レベルが高い細胞群ではRNAiによるコルタクチンの発現抑制がさらに細胞運動能の亢進を引き起こした。この際に細胞内のチロシンリン酸化蛋白質の変化を観察すると、コルタクチンの発現低下に伴ってCasのチロシンリン酸化が強く誘導されていた。共焦点レーザー顕微鏡による観察ではチロシンリン酸化したコルタクチンがピンキュリンと共局在して接着斑にいたりと考えられるが、この状態でCasの接着斑への局在とそこにおけるチロシンリン酸化

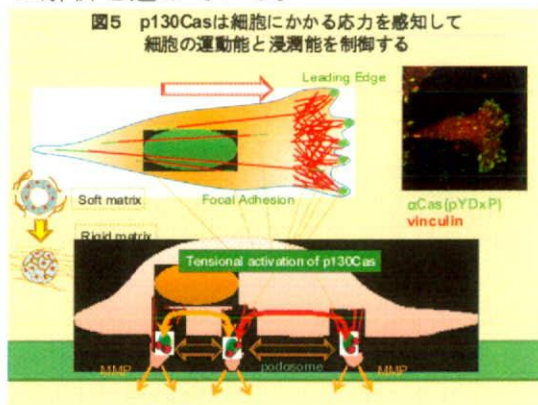
が抑えられており、コルタクチンの発現抑制とともに一部の Cas 蛋白質が接着斑に移動しチロシンリン酸化されることが観察された。Cas が細胞運動に重要な蛋白質であることは、我々を含め多くのグループが既に報告しており、コルタクチンの機能の少なくとも一部は Cas と競合して、それを接着斑から排斥することによるのではないかと考えられた(図 4)。



(3)メカニカルストレスと Src の基質分子 Cas との関わりを解析

Src キナーゼが活性化した癌細胞などでは 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わかった。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知して、転移浸潤に関わるモデルが示され、実際 Cas によるマトリックス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(図 5)。骨など硬度の高い組織において podosome などに局在する Cas が末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。



#### D. 考察

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・軟骨細胞など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。

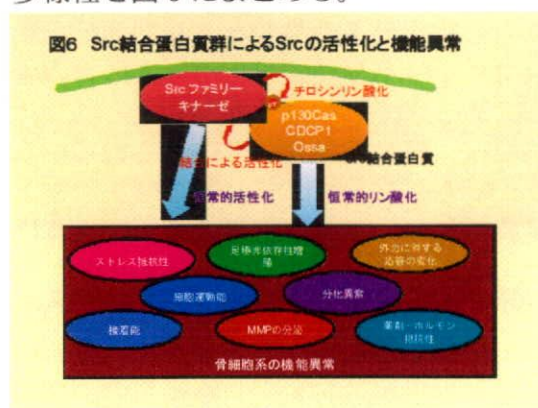
本研究で骨肉腫細胞の解析をきっかけに焦点を当てることとなった接着班に関連する分子 Cas は Src チロシンキナーゼの主要な基質として破骨細胞においても高い発現レベルを持つばかりか、常時チロシンリン酸化をしていることが報告されており、シグナルの調節機構などは細胞がん化などとの関わりで研究が進んでいるので、破骨細胞におけるコンディショナルノックアウトの解析が待たれる。

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図 6 にまとめる。



## E. 結論

骨粗鬆症などのような老化などの過程で起こる代謝性変化は、特定の遺伝子の変異や発現の ON/OFF のようなはっきりとしたスイッチがあると考えるよりも、いくつかの蛋白質の量的な変化により、バランスが取りきれなくなった状態と考えられる。その意味で「疾患遺伝子」を研究する際に、疾患の引き金となる遺伝

子変化を追い求めるだけでなく、疾患の状態を生み出しているエフェクターとしての遺伝子群が重要になると考える。Src など疾患に関係する一つの蛋白質もその種々の基質を介した多彩なシグナルが老化と関係した多くの変化をもたらしているであろう。ここに Src のシグナルを伝えるリン酸化蛋白質を包括的に理解することの意味がある。細胞機能を制御するリン酸化蛋白質群の解析は、通常のマイクロアレイ法や 2 次元スポット解析だけでは手の届かない分野である。治療薬開発の面でも、実際の標的となる蛋白質を発現解析からだけでなく、リン酸化などの修飾とそれによる複合体形成の変化などの解析から正確に理解することはきわめて重要なことであると考え。Src キナーゼに関わる細胞内シグナル伝達分子の分子間結合を阻害することにより破骨細胞の機能やアポトーシスに関わるシグナルを選択的にブロックすることが可能になると考える。今後最も重要な点は、骨・軟骨代謝・機能を特異的かつ適切な程度に阻害する分子の設計と、長期間それを全身にデリバリーするための方法論の確立であろう。

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

## F. 発表

### 1. 論文発表

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Sakai, R.: Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene* 28, 662-673, 2009.
6. 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.

## 2. 学会発表

### 【国内学会】

1. 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)
2. 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)
3. 東浩太郎、浦野友彦、林慎一、堺隆一、大内尉義、井上聡：乳癌細胞におけるエストロゲン受容体  $\alpha$ /HDAC6 複合体による新規 nongenomic 作用 (2008.10.28-30) 第 67 回日本癌学会総会 (名古屋)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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)

【国際学会】

1. Sakai, R., Ohira, M., Nakagawara, A., Miyake, I.: ShcC protein controls differentiation of neuroblastoma cells. (2008.5.21-24) Advances in Neuroblastoma Research 2008, Chiba, Japan.
2. Sakai R.: Roles of phosphotyrosine-containing molecules in tumor progression. (2008.11.12) Kyoto Prize 2008 Memorial Workshop, Kyoto, Japan.
3. Sakai, R., Uekita, T., Miyazawa, Y.: Analysis of domain function of CDCP1 in anoikis resistance of cancer cells. (2007.8.13-17) Mechanisms & Models of Cancer Meeting, Cold Spring Harbor, USA.

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)  
分担研究報告書

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

研究分担者 細井孝之  
国立長寿医療センター 先端医療部長

【研究要旨】

$\gamma$ -carboxylase(GGCX)遺伝子において、酵素活性の差をもたらす機能的な一塩基置換多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) がビタミン K 摂取状況と骨代謝関連ビタミン K 依存性蛋白質 (オステオカルシン) との関連の及ぼす影響について検討した。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は統計学的に有意な負の相関をしめしたが、この相関は酵素活性が低い GGCX 遺伝子型の集団でのみ認められた。これらの結果から、骨粗鬆症の予防と治療におけるビタミン K を用いた栄養学的または薬理的介入において、GGCX の遺伝子型を考慮したオーダーメイド医療の観点があることが示唆された。

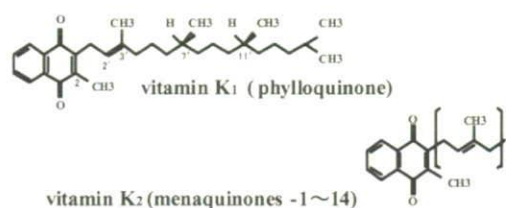
A. 目的

骨量に遺伝性があることが知られており、脆弱性骨折の発症に関しては骨量と別の遺伝的素因が関連していることも示唆されている。骨折予防の観点からも遺伝的素因を把握しておくことの重要性は「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版」でも薬物療法の開始にあたって「大腿骨頸部骨折の家族歴」が勘案されることにも反映されている。しかしながら、骨粗鬆症をはじめとする多因子遺伝病における遺伝的素因を同定する作業は決して容易なものではない。結果の再現性に乏しいことやそれぞれの多型性の骨量決定における寄与度が低いこと、生物学的意義が不明である多型性がほとんどあること、生活習慣因子などの交絡が無視できないことなどの課題は多い。生物学的意義の裏づけが得られた SNP はいまだ少ないが、われわれは骨代謝関連遺

伝子のうち、tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP) 遺伝子と  $\gamma$ -carboxylase (GGCX) 遺伝子において、酵素活性の差をもたらす機能的な一塩基置換多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) を報告した。GGCX の補酵素としてはたらくビタミン K (図 1) は元来正常な血

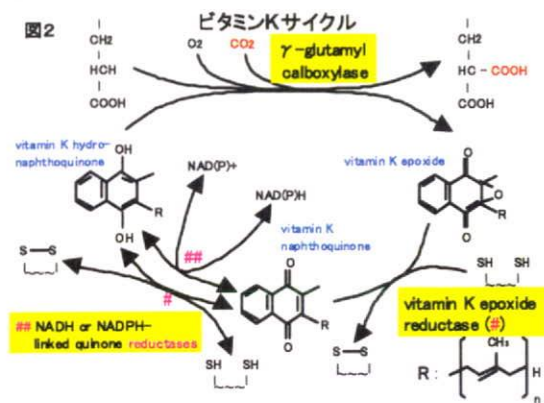
図 1

ビタミン K の構造



液凝固に必要なビタミンとして発見され、ビタミン K サイクルにおいて GGXC の補酵素として機能することが知られている

(図2)が、ビタミンK 依存性蛋白質には骨代謝に大きくかかわることが示唆されているものもある。本研究では、GGCX の機能的SNPがビタミンK 摂取状況と骨代謝関連ビタミンK 依存性蛋白質(オステオカルシン)との関連の及ぼす影響について検討した。



### B. 方法

東京都内在住の健康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Eiyo-kun(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、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,

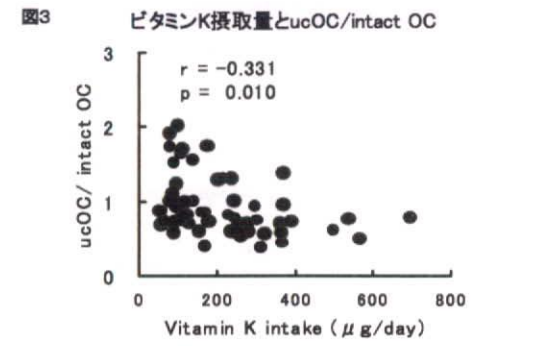
Amersham)で塩基配列を決定することによって遺伝子型を得た。遺伝子型の分布についてはHardy-Weinber 平衡について検討した。

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。

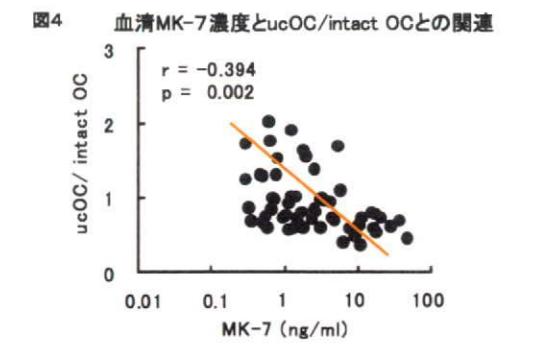
(倫理的配慮)本研究は日本女子大学の倫理委員会で検討され、承認されたものである。被験者からは研究内容が説明され、書面による承諾を得た。

### C. 結果

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(図3)。この相関は総ビタミン

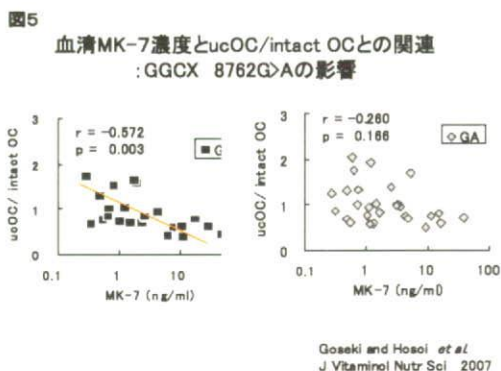


K量をビタミンK2(MK7)摂取に置き換えても認められた(図4)。また、集団をGGCX



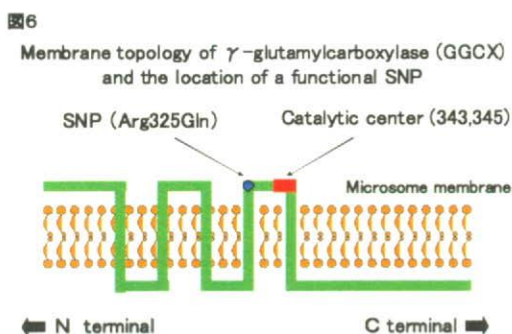
の遺伝子型によって層別化し、それぞれにおいてMK7 摂取量とucOC/OC比との関連を検討したところ、GG型の集団では

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(図5)。

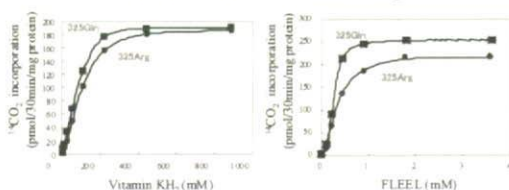


#### D. 考察

われわれが検討した GG CX 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(図6)。この多型性は酵素活性の差異をもたらされることを報告している(図7)。



**図7**  
Influence of vitamin KH2 or FLEEL on the carboxylase activity of GG CX 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

骨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 GG CX 遺伝子の特定の genotype でのみ認められることが確認された。以上の結果から、GG CX 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

骨粗鬆症の予防と治療におけるビタミン K を用いた栄養学的または薬理的介入において、GGCX の遺伝子型を考慮したオーダーメイド医療の観点が有用であることが示唆された。

#### F. 発表

##### 1. 論文発表

1. 細井孝之、原田敦、福永仁夫、中村利孝、白木正孝、太田博明、大橋靖雄、藤原佐枝子、坂田清美、堀内敏行、森聖二郎、折茂肇：骨粗鬆症診療の標準

- 的調査項目および全国的データベース構築の検討. *Osteoporosis Japan* 16, 323-329, 2008.
2. 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.
  3. 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.
  4. 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.
  5. 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.
  6. 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.
  7. 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.
8. 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.
  9. 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.
2. 学会発表  
【国内学会】
    1. 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)
    2. 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)



研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

IV-	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1	Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, <u>Hosoi T</u> , Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women.	<i>Spine</i>	33	1256-1261	2008
7	Shiraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao-Koshizuka M, <u>Inoue S</u>	The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures.	<i>J Bone Miner Metab</i>	26	595-602	2008
15	Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	374	388-393	2008
21	Kubo M, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Takeda S, <u>Inoue S</u>	Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation.	<i>Biochim Biophys Acta - Gene Regulatory Mechanisms</i>	1789	71-77	2009
28	Kumagai J, Urano T, Ogushi T, Takahashi S, Horie-Inoue K, Fujimura T, Azuma K, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, <u>Inoue S</u>	EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer.	<i>Int J Cancer</i>	124	799-805	2009
35	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,	Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth.	<i>Cancer Res</i>	69	137-142	2009
41	Takeo C, Ikeda K, Horie-Inoue K, <u>Inoue S</u>	Identification of Igf2, Igfbp2 and Enpp2 as Estrogen-Responsive Genes in Rat Hippocampus.	<i>Endocrin J</i>	56	113-120	2009
49	Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Liu X, Ogushi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitamura T, Homma Y, <u>Inoue S</u>	EBAG9 expression and its clinical significance in human testicular cancer	<i>Int J Urol</i>	16	329-332	2009
53	Azuma K, Urano T, Horie-Inoue K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of estrogen receptor a and histone deacetylase 6 causes rapid decetylation of tubulin in breast cancer cell.	<i>Cancer Res</i>	69	2935-2940	2009

59	Furuya T, Urano T, Ikari K, Kotake S, <u>Inoue S</u> , 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.	<i>Mod Rheumatol</i>	19	140-144	2009
66	Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Murata T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, <u>Inoue S</u>	Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer.	<i>Urology</i>		in press	
77	Urano W, Furuya T, Inoue E, Taniguchi A, Urano T, Kotake S, Sekita C, <u>Inoue S</u> , 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.	<i>J Bone Miner Metab</i>		in press	
87	Urano T, Usui T, Shiraki M, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Association of a single nucleotide polymorphism in the constitutive androstane receptor (CAR) gene with bone mineral density.	<i>Geriatric Gerontol Int</i>		in press	
99	Urano T, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Bone mass effects of a Smad6 gene polymorphism in Japanese postmenopausal women.	<i>J Bone Miner Metab</i>		in press	
104	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			2008
105	Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, <u>Kato S</u> , Saftig P, Takayanagi H	Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis.	<i>Science</i>	319	624-627	2008
109	Zhao Y, Lang G, Ito S, Bonnet J, Metzger E, Sawatsubashi S, Suzuki E, Le Guezennec X, Stunnenberg HG, Krasnov A, Georgieva SG, Schüle R, Takeyama K, <u>Kato S</u> , Tora L	A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing.	<i>Mol Cell</i>	29	92-101	2008
119	Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T, <u>Kato S</u>	Androgen receptor functions in male and female physiology.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	109	236-241	2008
125	Okada M, Takezawa S, Mezaki Y, Yamaoka I, Takada I, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor- $\alpha$ .	<i>EMBO Rep</i>	9	563-568	2008
131	Yokoyama A, Takezawa S, Schüle R, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1.	<i>Mol Cell Biol</i>	28	3995-4003	2008

140	Honzawa S, Yamamoto Y, Yamashita A, Sugiura T, Kurihara M, Arai MA, <u>Kato S</u> , Kittaka A	The 2 $\alpha$ -(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu).	<i>Bioorg Med Chem</i>	16	3002-3024	2008
163	Yanase T, Fan W, Kyoya K, Min L, Takayanagi R, <u>Kato S</u> , Nawata H	Androgens and metabolic syndrome: Lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	109	254-257	2008
167	Kouzu-Fujita M, Mezaki Y, Mtsumoto T, Yamaoka I, Sawatsubashi S, Yano T, Taketani Y, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Coactivation of estrogen receptor $\beta$ by a gonadotropin-induced cofactor GIOT.	<i>Mol Cell Biol</i>	29	83-92	2009
177	Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, <u>Kato S</u>	Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism.	<i>J Bone Miner Metab</i>	27	127-130	2009
181	Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, <u>Kato S</u>	Regulation of bone metabolism by nuclear receptors.	<i>Mol Cell Endocrinol</i>	in press		
189	Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, Ito H, Takada I, Roeder RG, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Nuclear protein GlcNAcylation facilitates retinoic acid-induced granulopoiesis through histone activating methylation.	<i>Nature</i>	in press		
209	Nakamoto T, Seo S, <u>Sakai R</u> , 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.	<i>J Cell Biochem</i>	105	121-128	2008
217	Uekita T, Tanaka M, Takigahira M, Miyazawa Y, Nakanishi Y, Kanai Y, Yanagihara K, <u>Sakai R</u>	CUB-domain containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma.	<i>Am J Pathol</i>	172	1729-1739	2008
228	Jia L, Uekita T, <u>Sakai R</u>	Hyperphosphorylated cortactin in cancer cells plays an inhibitory role in cell motility by regulating tyrosine phosphorylation of p130Cas.	<i>Mol Cancer Res</i>	6	654-662	2008
237	Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Hoshino Y, Yanagihara K, <u>Sakai R</u>	A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10, regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis.	<i>Mol Cell Biol</i>	29	402-413	2009
249	Miyake I, Ohira, M, Nakagawara A, <u>Sakai R</u>	Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma.	<i>Oncogene</i>	28	662-673	2009
261	Ikeda J, Oda T, Inoue M, Uekita T, <u>Sakai R</u> , 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.	<i>Cancer Sci</i>	in press		