

200907012A (CD付)

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡

平成 22(2010)年 5 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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成22（2010）年5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 - 17
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

總括研究報告書

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背痛や骨折、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ならびに25万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、疾患感受性に寄与している遺伝子群を明らかにした。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。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. ゲノムワイドスキャンによるアミノ酸変異を伴う骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (50K アレイ) (分担：井上)

55-83歳の閉経後女性750名を対象とした。750名の血液よりDNAを抽出した。この集団のうち第1集団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を決定した。全身骨骨量との関連解析を行い、骨量を制御する候補遺伝子を選択した。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。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の中から、そのSNPの近傍にアミノ酸変異を伴うSNPの存在を探索し、アミノ酸変異が存在するWDSOF1遺伝子上のSNPに関してはさらなる解析を行った。

55-83歳の閉経後女性750名を対象とし、WDSOF1遺伝子上の5SNPに関し、遺伝子型を決定した。WDSOF1遺伝子上にある5SNPに関して連鎖不平衡解析を行った。これら遺伝子型と750名の集団における全身骨骨量との関連解析を行った。マウス由来初代培養骨芽細胞ならびに破骨細胞からRNAを採取し、定量的リアルタイムPCR法により骨細胞におけるマウスWDSOF1 mRNAの発現解析を行った。

2. ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (250K アレイ) (分担：井上)

55-83歳の閉経後女性において第1集団271名について、AFFYMETRIX社のMapping 250K Nsp SNP Arrayに含まれる、約25万SNPについて同社GeneChip Mapping Assay法を用いてgenotypingを決定した。全身骨骨量との相関解析を行ない、骨量を制御する候補遺伝子を選択した。Hardy-Weinberg平衡、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。

3. ゲノムワイドスキャンによる肥満関連遺伝子多型の探索(50K アレイ) (分担：井上)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とした。この集団のうち第 1 集団 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 を決定した。DXA 法により全身体脂肪率(%FAT)を測定した。各 genotyping と %FAT との相関解析を行ない、体脂肪率を制御する候補遺伝子を選択した。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。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。

本解析により再現性が確認された遺伝子 X のイントロン 2 に存在する SNP に関し、さらなる探索を行った。55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、遺伝子 X 上ならびに近傍に存在する SNP に関し、遺伝子型を決定し、これら遺伝子型と 750 名の集団における全身体脂肪率との関連解析を行った。

4. 骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲン作用の解析 (分担：井上)

骨髄ストローマ細胞として、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を有するマウスの骨髄ストローマ細胞株 ST2 を用いた。まず、ST2 細胞にエストロゲン受容体が発現しているかを RT-PCR 法にて確認した。次に、ST2 細胞を Phenol red free の RPMI 1640 medium に活性炭処理した血

清を 5% 加え、エストラジオール 10^{-7} M にて 8 時間、24 時間刺激を行った。エストラジオール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 Affymetrix 社の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。細胞の増殖は、Aqueous One (Promega)を用いた吸光度法により解析を行った。

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)

129 Strain の 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、4 ヶ月齢の PXR 遺伝子欠損マウス(メス n=8)、および 1 ヶ月間同様の環境で生育させた野生型の 129 Strain(メス n=8)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、マイクロ CT、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。

6. ミトコンドリア関連のエストロゲン受容体標的遺伝子 (分担：井上)

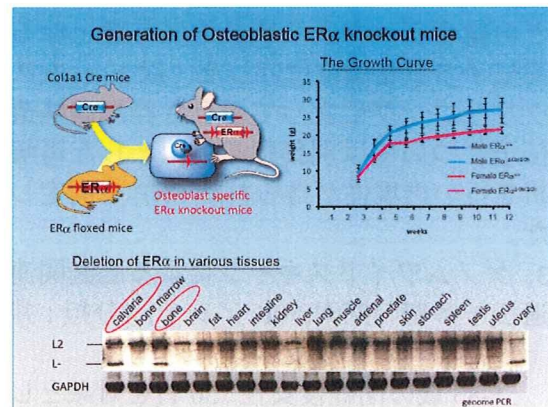
エストロゲンは女性生殖系をはじめとして様々な臓器に対する生理的機能をもつ他、乳癌や子宮癌などのホルモン依存性癌の増殖に重要な役割を果たすホルモンであることが知られている。エストロゲンは、エネルギー代謝やアポトーシスなどのミトコンドリア作用の調節にも関わる可能性が今までに報告されており、代謝・肥満症、腫瘍増殖の観点から注目される機能であると考えられる。しかしながら、エストロゲンは、ミトコンドリアに発現するどのような遺伝子に作用するかについては未だ明らかになっていない。本研究では、ヒトゲノム上の 5'-GGTCAnnnTGACC-3'の ERE を *in silico*

に解析し、Gene Ontology 分類上のミトコンドリア発現遺伝子の近傍に位置する ERE において、ChIP アッセイにより機能的 ER α 結合部位を探索することにより、ミトコンドリア発現エストロゲン標的遺伝子を同定する。ER α 発現モデルとしてヒトエストロゲン依存性乳癌細胞(MCF7)を用い、クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイにおいては、ホルモン枯渇 2 日後 estradiol (E2, 100 nM)または溶媒(0.1%エタノール)による刺激を 45 分行った。ER α 特異的ウサギ抗血清を用いて ChIP を行い、ChIP を行っていない Input DNA をコントロールにして、ミトコンドリア発現遺伝子近傍の ERE におけるホルモン依存性の ER α 結合濃縮倍率を Real-time PCR にて定量的に検討した。機能的 ERE を近傍にもつミトコンドリア発現遺伝子の E2 応答性について、定量的 RT-PCR により遺伝子発現量を検討した。ミトコンドリア発現エストロゲン標的遺伝子の骨芽細胞系におけるエストロゲン応答性について、米国 Myles Brown 教授研究室により公表されているヒト骨芽細胞系 U2OS 細胞の発現アレイデータに基づいて解析した。

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)

分担研究者の所属する研究室では、骨細胞種における性ホルモン作用を解明するために、これまでに破骨細胞特異的な ER α 欠損マウスを作出してきた。本研究では、骨芽細胞における ER α の生体内での機能を解明するために、cre-loxP システムを用いて骨芽細胞特異的 ER α 欠損マウスを作出した。具体的には I 型コラーゲンのプロモーターを用いた cre 発現トランスジェニックマウスと ER α flox マウスを交配することにより目的のマウスを作出した(Fig 1)。その後、DXA、 α CT、軟 X 線写真撮影などにより作出したマウスの表現型の解析を行った。

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 の基質蛋白質群の機能解析

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という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。

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関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、そのほかの生理機能の探索など解析を進める。

ephrin-B1 は細胞膜表面に発現するリガンドであり、同じく細胞膜表面に発現する EphB 受容体と細胞間接着によって出会うことでチロシンリン酸化され、接触した細胞同志に双方向性のシグナルを送り repulsion や adhesion などの指令を出すことが知られていた。最近、破骨細胞の細胞膜で発現する ephrin-B と骨芽細胞の表面で発現する EphB が細胞間接着により同時に活性化され、破骨細胞を分化誘導の方向に、骨芽細胞を分化抑制の方向に導くことが示され、骨代謝における EphB と ephrin-B の重要性があらためて浮き彫りになった。我々は Src キナーゼの基質としての ephrin-B1 の機能については以前から幅広く研究を進めてきており、ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタロプロテアーゼ分泌を促すことが分かった。今年度はこの ephrin-B1 の作用に必要な C 末側のペプチドの生物学的機能を解析する。

(2) *in vivo* イメージングを用いた骨転移モデルの作成とその解析

骨吸収および骨融解のモデルとして固

形腫瘍の骨転移モデルを作製している。具体的な方法として、ルシフェラーゼ遺伝子を発現させた高転移性の癌細胞株をヌードマウスに注射し、イメージング装置で癌細胞の動態を経時的に観察する。一度全身に回っていた癌細胞が数週間後に骨や脳に転移巣を形成することが確認されているが、骨転移巣より元のヒト癌細胞に由来する細胞をルシフェラーゼの発現を指標にして摘出し、組織培養する。これを再びマウスに注射するという操作を繰り返し行なうことで骨に強く転移する細胞株を樹立する。形成された腫瘍や *in vivo* で継代した培養細胞を生化学的手法や細胞生物学的手法により親株と比較する。このような解析により、骨融解を伴う骨転移にかかわるシグナル伝達分子を明らかにして、さらに骨粗鬆症への関わりについて調べる。

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 (分担: 細井)

テーラーメイド医療への臨床応用を達成するための研究対象、研究実施場所、およびサンプルの解析体制について検討する。特に研究対象者数については、GCX 遺伝子の機能的 SNP における遺伝子型の分布ならびに、それぞれの遺伝子型によってもたらされる GGCX 蛋白質の酵素活性をもとに仮説の検証に要するに足るよう推定して決定する。

C. 結果

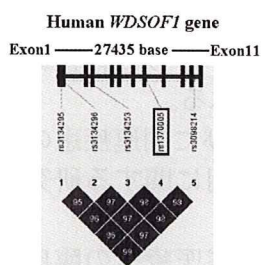
1. ゲノムワイドスク্যানによるアミノ酸変異を伴う骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (50K アレイ)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、この集団のうち第 1 集団 251 名について、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。

ゲノムワイドスキャンにより選定された SNP の中で近傍にアミノ酸変異を伴う SNP があるものを探索した。その結果、今回 rs1370005SNP に注目した。本 SNP は WDSOF1 遺伝子上に位置し、WDSOF1 遺伝子上には 3 種類のアミノ酸変異を伴う SNP(rs3134295; Arg47Ser, rs3134296; Pro108Leu, rs3134253; Ile194Val)が存在した。

我々は 750 名の閉経後女性を対象にこれらアミノ酸変異を伴う 3SNP を含めた WDSOF1 遺伝子上の 5SNP の genotyping を行い、連鎖不平衡解析を行った。その結果、これら 5SNP 間の各 r^2 値は 0.86 から 0.96 の間であった(Fig 2)。したがって、

Fig 2



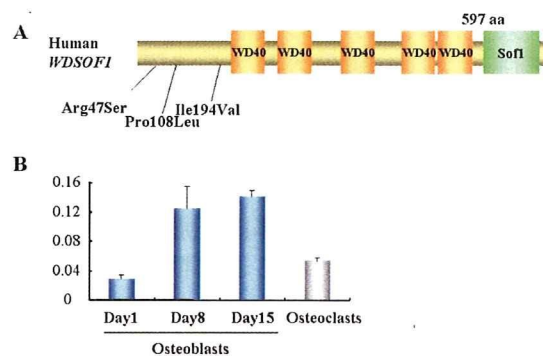
WDSOF1 遺伝子上 SNP のゲノム上での位置と連鎖不平衡解析

この 5SNP が存在する 30-kb の領域は連鎖不平衡ブロックを形成していることが示唆された。

WDSOF1 蛋白は WD40 ドメインの 5 回繰り返し構造が中心部に存在し、C 末端には SOF1 ドメインが存在する(Fig 3A)。定量的リアルタイム PCR により WDSOF1 は骨芽細胞ならびに破骨細胞において発現していることが確認された(Fig 3B)。このことは WDSOF1 が骨代謝において何らかの機能を有している可能性がある。

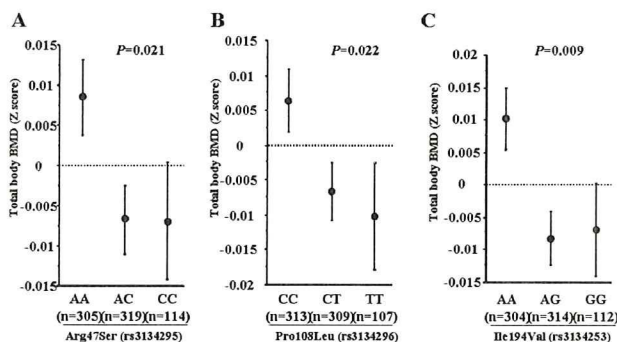
次に、WDSOF1 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う SNP(rs3134295; Arg47Ser, rs3134296; Pro108Leu, rs3134253; Ile194Val)と骨量との関連解析を行った。Trend test により全身骨骨量(Z score)と各

Fig 3 WDSOF1 蛋白構造の模式図と骨細胞(骨芽細胞ならびに破骨細胞)における発現解析



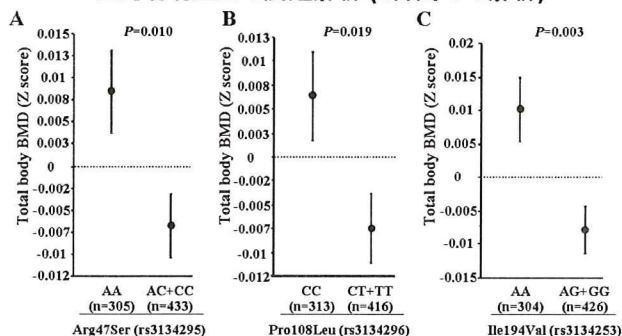
SNP の遺伝子型とに有意な関連を認めた(Fig 4A, B, C)。また、マイナーアレルを 1

Fig 4 アミノ酸変異を伴う WDSOF1 遺伝子上の SNP と全身骨骨量との関連解析 (3 群間での解析)



もしくは 2 アレルを有する群とメジャーアレルを 2 個有する群との間での比較においても有意に関連することが unpaired t test により確認された(Fig 5A, B, C)。背景データならびに生化学データでは各群間で有意な関連を認めなかった。

Fig 5 アミノ酸変異を伴う WDSOF1 遺伝子上の SNP と全身骨骨量との関連解析 (2 群間での解析)



2. ゲノムワイドスクランによる骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (250K アレイ)

55-83 歳の閉経後女性において第 1 集団 271 名に対し、AFFYMETRIX 社の Mapping 250K Nsp SNP Array に含まれる、約 25 万 SNP について同社 GeneChip Mapping Assay 法を用いて genotyping を決定した。全身骨骨量との関連解析を現在施行した。その一例を Fig 6 に示す。Fig 6 において矢印で指し示した、遺伝子 Y のイントロン上に存在する SNP は recessive mode において低い P 値を示しているが、本 SNP は別集団においても骨粗鬆症との関連が確認された。

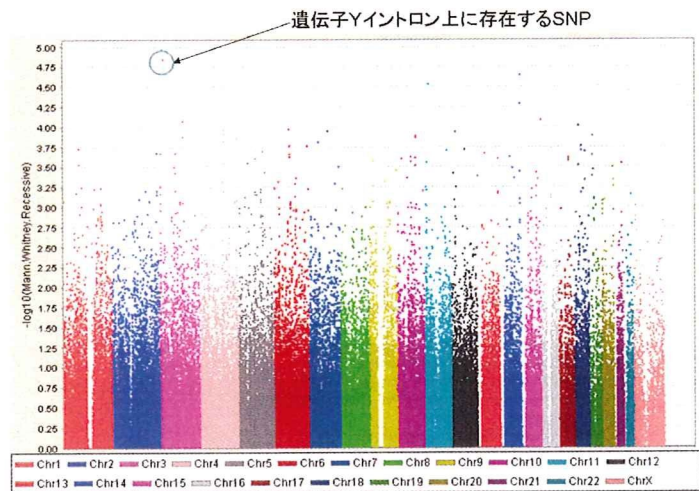
3. ゲノムワイドスクランによる肥満関連遺伝子多型の探索(50K アレイ)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、第 1 集団 251 名に対し、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 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。その結果、第一集団で有意であった遺伝子 X 上のイントロン 2 に存在する SNP が第二集団においても低い P 値を認めた。そこで我々は 750 名の閉経後女性を対象に、本遺伝子上ならびに近傍の SNP の genotyping を行い、連鎖不平衡解析を行った。その結果、遺伝子 X 上のイントロン 2 に存在する SNP は 750 名の集団においても有意な関連を認めた。

4. 骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲン作用の解析

骨髄ストローマ細胞より RNA を抽出し、エストロゲン受容体の発現を確認したところ、エストロゲン受容体 α (ER α)が発現していることが確認され(Fig 7)、エストロ

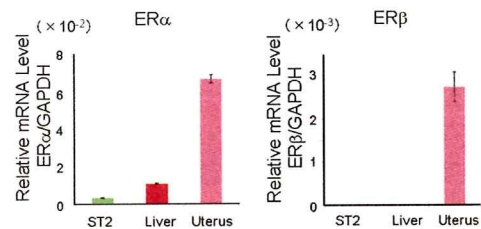
Fig 6 250K SNPアレイを用いた骨量との関連解析の結果 (Recessive mode, 1次スクリーニング)



ゲン刺激に反応しうるということが推測された。なお、ST2 において、エストロゲン受容体 β (ER β)の発現は、認められなかった。

Fig 7

骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲン受容体の発現



Liver, UterusはメスのBALB/c nude miceより抽出
ST2においてER α の発現を認める。

エストロゲン受容体発現のコントロールとしては、ヌードマウスの肝臓および子宮を用いた。

マイクロアレイにおいて、ST2 細胞のエストロゲン刺激により発現が誘導されていた遺伝子を Table 1, 2(次頁)に、発現が抑制されていた遺伝子を Table 3(次頁)に示す。誘導されていた遺伝子のうち、GPCRX、Thrombospondine2、JAK1 は定量的 Reverse transcriptase-PCR 法により発現上昇を確認した(Fig 8, 9(次頁))。このうち、GPCRX は、機能未知の 7 回膜貫通蛋白であり、現在機能解析を進めている。

Table 1 ST2におけるエストロゲン応答(誘導および抑制)遺伝子(8時間刺激)

エストラジオール(100 nM), 8時間刺激後 mRNAを抽出。
Affymetrix社 GENE arrayにて解析。1.5倍以上差のある遺伝子を表示。

Fold Induction	Description
Up-regulated genes	
4.764755	GPCRX
2.419512	Guanylate binding protein 4 (Gbp4)
2.400259	Thrombospondin 2 (Thbs2)
2.080794	Neuritin 1 (Nm1)
2.008124	Transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3)
1.855599	Proviral integration site 1 (Pim1)
1.670091	Myocyte enhancer factor 2A (Mef2a)
1.560994	ZKD family zinc finger C (Zkdc), transcript variant 2
1.558430	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (Gpam), nuclear gene encoding mitochondrial protein
1.547228	Endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1 (Em1)
1.512916	Transforming acidic coiled-coil containing protein 1 (Tacc1), transcript variant 1
1.510130	Gene regulated by estrogen in breast cancer protein (Greb1)
1.508410	Transforming growth factor, beta 2 (Tgfb2)
Down-regulated genes	
0.627861	Nuclear factor I/B (Nf1b), transcript variant 1
0.631207	UBX domain containing 4 (Ubx4)
0.632484	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Nap11)
0.641033	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Mki67)
0.648285	Angiotensin 1 (Angpt1)
0.662003	Vacuolar protein sorting 24 (Vps24)
0.666769	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)

Table 2 ST2におけるエストロゲン応答(誘導)遺伝子(24時間刺激)

Fold Induction	Description
Up-regulated genes	
6.131075	GPCRX
5.014939	Guanylate binding protein 4 (Gbp4)
3.957787	Thrombospondin 2 (Thbs2)
2.528443	Neuritin 1 (Nm1)
2.378116	Peptidase inhibitor 15 (Pih15)
2.335007	Collagen, type VIII, alpha 1 (Col8a1)
2.169615	Myocyte enhancer factor 2A (Mef2a)
2.162519	Coagulation factor XIII, A1 subunit (F13a1)
2.062030	Transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3)
1.812059	Proviral integration site 1 (Pim1)
1.784642	Dual specificity phosphatase 1 (Dusp1)
1.780455	Natriuretic peptide receptor 3 (Npr3), transcript variant 1
1.740099	Neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1), transcript variant 1
1.730740	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1 (Tacc1), transcript variant 1
1.718312	ZKD family zinc finger C (Zkdc), transcript variant 2
1.692234	Sphingomyelin synthase 2 (Sgms2)
1.656867	Gamma-glutamyltransferase 5 (Ggt5)
1.650119	Ecdonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 2 (Enpp2)
1.638222	ADP-ribosylation factor-like 5A (Arl5a)
1.624847	Gene regulated by estrogen in breast cancer protein (Greb1)
1.620860	Janus kinase 1 (Jak1)
1.607779	Glutathione peroxidase 3 (Gpx3), transcript variant 1
1.607116	Endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1 (Em1)
1.603312	Synaptotagmin-like 5 (Syt15)
1.599750	Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1 (Aldh3a1), transcript variant 1
1.560801	Transforming growth factor, beta 2 (Tgfb2)
1.558430	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (Gpam), nuclear gene encoding mitochondrial protein
1.523936	DIX domain containing 1 (Dixc1)
1.517566	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14 (Kcnj14)

Fig 8 ST2におけるエストロゲン応答遺伝子 定量的Real-time PCR

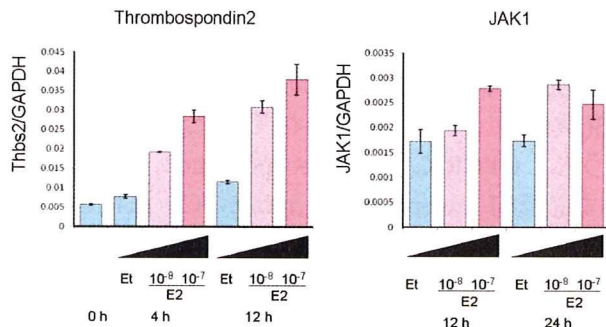
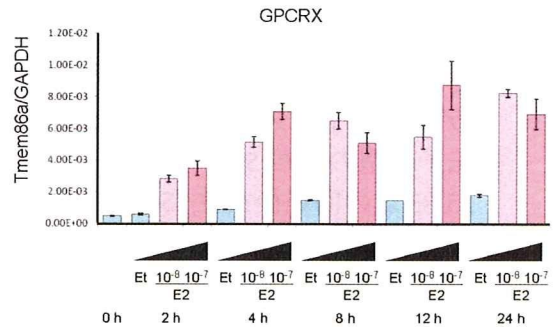


Table 3 ST2におけるエストロゲン応答(抑制)遺伝子(24時間刺激)

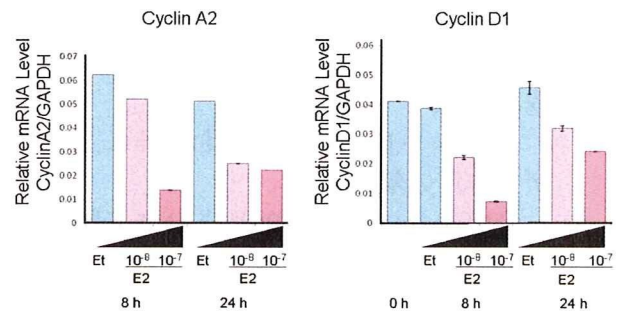
Fold Induction	Description
Down-regulated genes	
0.521957	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)
0.600201	PDZ binding kinase (Pbk)
0.610951	Histone cluster 1, H2ab (Hist1h2ab)
0.629211	Thymidine kinase 1 (Tk1)
0.629795	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (Nqo1)
0.631225	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1 (Ly6c1)
0.633282	Histone cluster 1, H4f (Hist1h4f)
0.633856	Absent in melanoma 1 (Aim1)
0.636178	Cytoskeleton associated protein 2 (Ckap2)
0.638804	Ribonucleotide reductase M2 (Rrm2)
0.649685	Pentraxin related gene (Plx3)
0.656038	Cyclin A2 (Ccn2)
0.658269	Histone cluster 1, H1b (Hist1h1b)
0.659338	Argininosuccinate synthetase 1 (Ass1)
0.660918	Mitochondrial glutathione S-transferase 3 (Mgst3)
0.665328	RNA, Y1 small cytoplasmic, Ro-associated (Rny1) on chromosome 6

Fig 9 ST2におけるエストロゲン応答遺伝子 定量的Real-time PCR



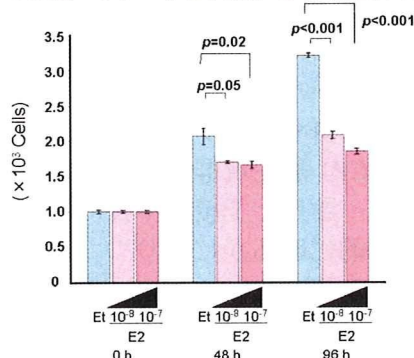
マイクロアレイにおいて認められた Cyclin A2 のエストロゲンによる発現抑制は、定量的 RT-PCR 法にて確認され、他の細胞周期にかかわる Cyclin D1 も調べたところ抑制されていることが示された(Fig 10)。そこで、骨髄ストローマ細胞の増殖に対

Fig 10 ST2細胞エストロゲン刺激によるサイクリンの発現変化 定量的Real-time PCR



するエストロゲンの影響を解析すると、増殖抑制を認めた(Fig 11)。

Fig 11 ST2のエストロゲン刺激による増殖抑制

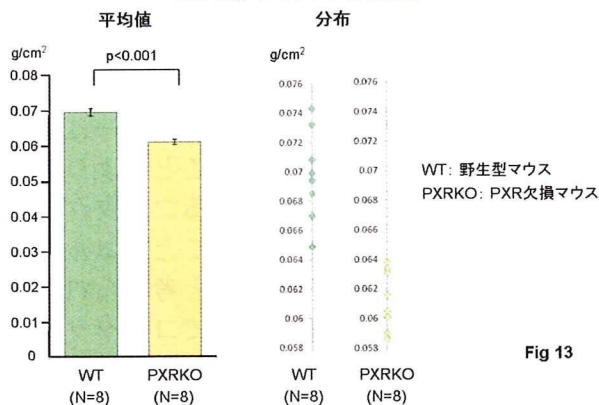


ST2をEstrogen刺激24時間前よりphenol red free, DCC-FCS 5% mediumにて培養。Estrogen刺激(Et, 10⁻⁸ 10⁻⁷ M)下にてgrowth assay (Promega: Aqueous One使用)。

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、KO マウスは 0.059 g/cm²、WT マウスは 0.068 g/cm² であり、KO マウスでは WT マウスに比べ有意な骨密度の低下(P<0.001)を認めた(Fig 12)。マイクロ CT による三次元海綿

Fig 12 4カ月齢マウスの骨密度



骨の骨量(BV/TV)解析においても、KO マウスでは著明な骨量減少を呈し(P<0.001)、他の 3 次元パラメータも骨の脆弱性が KO マウスで高くなっていることを示唆する結果であった。骨形態計測では、海綿骨における骨量(BV/TV)が、KO マウスにおいて著明な減少を認め、KO マウスにおいて骨形成の低下、骨吸収の亢進を認めた。

6. ミトコンドリア関連のエストロゲン受容体標的遺伝子

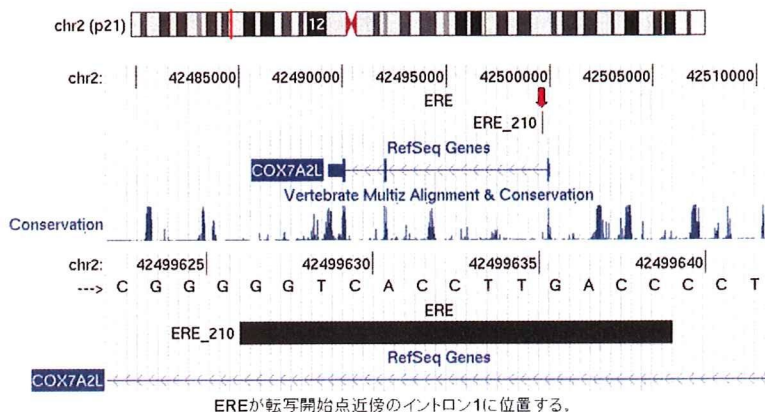
Gene Ontology にて分類される 808 個のミトコンドリア発現遺伝子において、37 個の遺伝子領域とその上流および下流の 20 kb 以内に完全一致のコンセンサス ERE 配列が同定された。37 個の遺伝子のうち、特にミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム c オキシダーゼ系にかかわる遺伝子が 3 個含まれていた。3 遺伝子近傍の ERE はいずれも機能的 ER α 結合領域であることが、MCF7 細胞における ER α の ChIP アッセイから明らかになった。このうちの 1 つとして、我々が以前、ER α の DNA 結合ドメインを用いたゲノム結合部位クローニング法によりエストロゲン標的遺伝子として同定した COX7RP が含まれていた(Fig 13)。また、37 個の ERE を近傍にもつミトコンドリア発現遺伝子のうち、U2OS 細胞の発現アレイ解析において E2 応答性が認められる遺伝子が数個同定され、特に γ -アミノ酪酸(GABA)代謝系酵素が 2 つ同定された。

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

これまで骨芽細胞特異的な ER α 欠損マウスを作出し、その基本的な表現型の解析を行ってきた。その結果、大腿骨 BMD と腰椎の BV(Bone Volume) / TV(Tissue

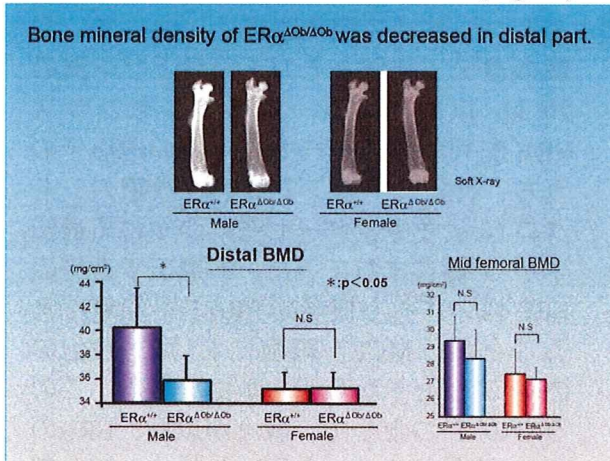
Fig 13

COX7RP 遺伝子におけるコンセンサス ERE 配列の位置

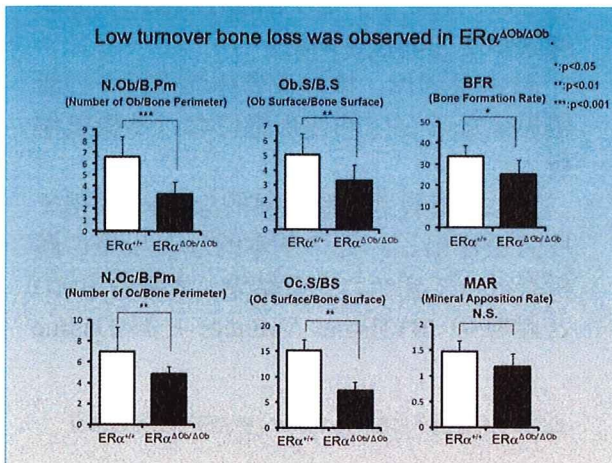


EREが転写開始点近傍のイントロン1に位置する。

Volume)の解析から、雄の骨芽細胞特異的 ER α 欠損マウスは大腿骨遠位部において骨量減少を示すことが確認された(Fig 14)。



一方、雌の骨芽細胞特異的 ER α 欠損マウスでは骨量変化が観察されなかった。さらに骨形態計測を行った結果、破骨細胞数・破骨細胞面・骨芽細胞数・骨芽細胞面が雄の骨芽細胞特異的 ER α 欠損マウスにおいては有意に減少することが観察された(Fig 15)。



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

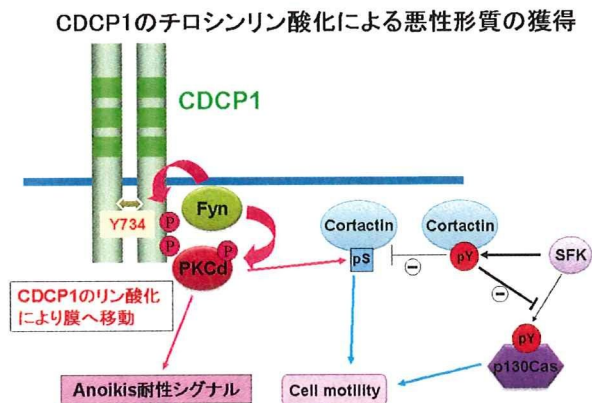
(1) Src の新規基質の機能解析

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。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、造腫瘍能などに対する影響は見られない。一方で、他施設との共同研究も併せて肺がん、膵がんなどの系で、CDCP1 高発現群は低発現群と比較して、はっきりと予後が不良であることが統計学的に明らかになりつつある。以上のことから、CDCP1 は Src の活性化に応じて足場非依存性を含めた複数の悪性形質を固形腫瘍に付与することにより、腫瘍の転移・浸潤に関わっていることが示された。さらに CDCP1 は膵がんの系では MMP9 を中心としたメタロプロテアーゼ分泌に関わることを示したが、このメタロプロテアーゼ分泌の制御も CDCP1 を介した PKC δ のチロシンリン酸化が重要である。また PKC δ が Src ファミリーの基質で細胞の運動能・浸潤能に密接に関係するコルタクチンと物理的に結合していることが分かり、CDCP1-PKC δ -コルタクチン経路が転移浸潤の制御の中心となるシグナル伝達経路であることが示唆された。PKC δ は Src ファミリーによりチロシンリン酸化されることにより活性化し恒常的に結合しているコルタクチンをセリンでリン酸化することでコルタクチンの機能を活性化すると考えられる。以前我々は胃がん細胞の系でコルタクチンのチロシン残基でのリン酸化が細胞運動能を抑制することを示したが、それと併せてコルタクチンがセリンによるリン酸化とチロシンによるリン酸化で正負の両方向に制御される分子であることが想像され今後解析を進めていく(Fig 16、次頁)。

スキルス胃がん 44As3 細胞をマウス腹腔内に注射すると腸間膜転移を起こすが、この腸間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

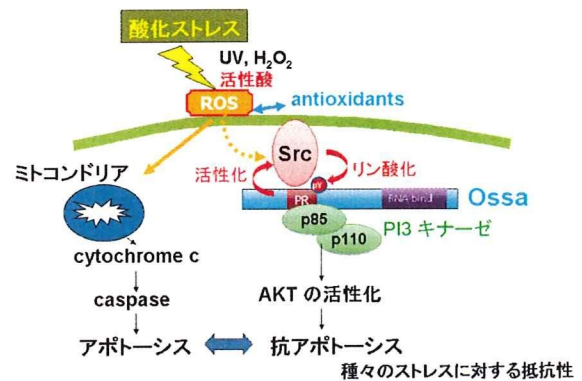
Fig 16



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癌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 17 にまとめる。以上のように腫瘍が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する際に重要な分子であることが示された。Ossa は酸化ストレスに伴う Src の恒

Fig 17

Ossaは酸化ストレスによるアポトーシスを抑制する
Ossa: Oxidative Stress-associated Src Activator

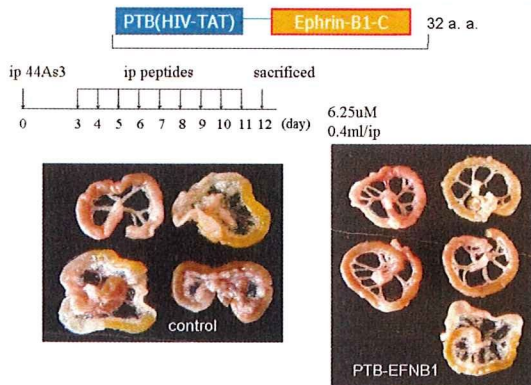


常的活性化にも深く関わっていることが示され、Src-Ossa 間のシグナルをブロックすることにより、腫瘍特異的に Src ファミリーの恒常的活性化を抑えることができる可能性もある。腫瘍は酸化ストレスを含め飢餓・低酸素など各種ストレスに抵抗性を有することが、その異常増殖・転移・浸潤をもたらす大きな要因であり、場合によっては治療抵抗性にも関わる。Ossa を軸にしてこのストレス抵抗性を解除する薬剤がデザインできれば、腫瘍細胞の正常化という方向性を持つ全く新しい薬剤の開発につながる可能性がある。

膜型のリガンドである ephrin-B1 がスキルス胃癌や膵癌などの腫瘍において、その C 末領域を介するシグナル伝達によ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、HIV の TAT 由来の細胞膜透過に関わる PTD (protein transduction domain) のペプチドと ephrin-B1 の C 末のペプチドの融合ペプチドを合成してその生理活性を解析中である。スキルス胃癌細胞を腹腔内に注射した後、

この融合ペプチドの反復投与を行うと腹膜播種が著明に抑制されることが示された(Fig 18)。

Fig 18 Ephrin-B1ペプチドによる腹膜播種治療効果の検討

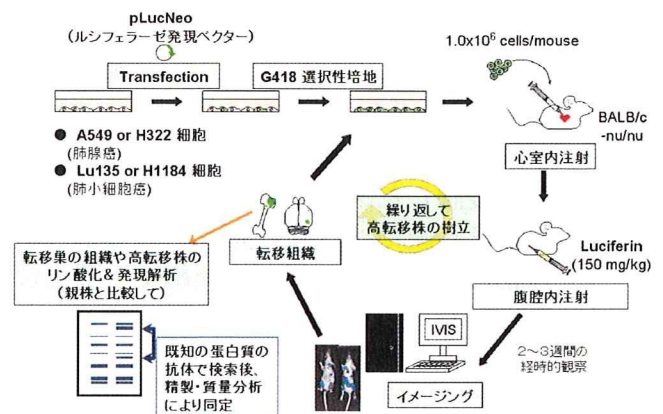


(2) *in vivo* イメージングを用いた骨転移モデルの作成とその解析

A549を始めとする数種類の肺癌細胞株に Luciferase 遺伝子を発現させた細胞株をマウス左心室に投与した後、基質となる Luciferin を腹腔内に投与、10分後にイメージング装置で Luciferase 反応を検出し、細胞が全身に回っていることを確認した。1週間後までには顎、脚、腰の骨などに転移していることが視覚的に確認できた。骨等への転移は経過的に拡大、進展したが、脳転移については2週間以降に観察されることが多かった。数週間後に再び観察を行い、転移巣の形成をモニターし、そのうちの骨/脳に転移した腫瘍を培養し、再びマウスに投与する操作を繰り返し行うことで骨に強く転移する細胞株の樹立を目指した。インジェクション-骨転移-培養のサイクルを3~6サイクル繰り返したところ、親株に比較して骨に転移指向性を持つ細胞株を数株樹立することができた(Fig 19)。現在までの解析では、このような骨指向性の細胞では *in vivo* で多臓器転移の減少、*in vitro* で Migration / Invasion 低下、E-cadherin の発現上昇と N-cadherin の発現低下、FAK、Cas などの細胞内チロシンリン酸化の上昇、基質接着の亢進等が見られ、更に浮

遊培養時に Akt が低下せず、Erk が上昇しないなどの特徴が見られた。このような細胞ではいくつか親株と比較して新規と思われる蛋白質のチロシンリン酸化の亢進や低下が認められるので、現在抗リン酸化チロシン抗体による精製の上、同定を試みている。

Fig 19 肺がんの骨転移モデルの作成



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

a. 研究の対象及び実施場所

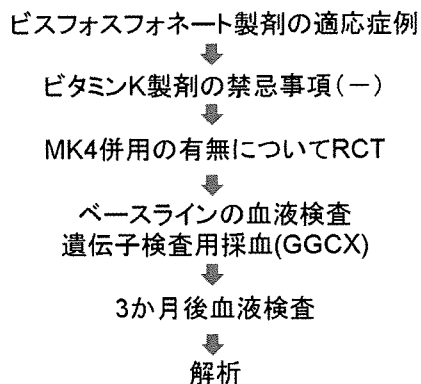
研究参加施設の外来を受診している患者のうち、「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版」に照らし合わせて薬物療法の対象者であることが判断された患者であり、ビスフォスフォネート製剤が治療薬として選択された患者を対象とする。ただし、ワルファリンを服用しており、ビタミン K2 製剤の処方禁忌であるものは対象外とする。対象者には、研究計画について文書による説明を行い、書面でインフォームドコンセントを得た者を研究参加者とする。血清 ucOC の測定は各施設で採取された血清について、1 検査機関で行う。GGCX 遺伝子多型性の解析は、東京大学医学部附属病院抗加齢医学講座において一括して行う。

b. 研究デザイン

研究参加者はビスフォスフォネート製剤を開始する時点で、封筒法により無作為にビタミン K2 製剤(メナテトレノン 45mg/日)併用群(70 例)と非併用群(70 例)

に振り分けられる。研究参加者から採取された血液検体は血清 ucOC の測定ならびに GGCX 遺伝子多型性の解析に供される (Fig 20)。GGCX 遺伝子多型性の解析結

Fig 20



果は匿名化された臨床情報とのみ連結され、研究参加者ご本人には通知されない。薬剤の内服開始から 3 か月の時点で血清 ucOC を再度測定する。血清 ucOC の変動について、ビスフォスフォネート製剤単独群における GGCX325Arg 群(低活性群)と GGCX325Gln 群、ビタミン K2 製剤併用群における GGCX325Arg 群(低活性群)と GGCX325Gln 群の計 4 群間の比較検討を行う。なお、遺伝子解析については、GGCX 遺伝子に加えて、ビタミン K サイクル関連遺伝子であるビタミン K 還元酵素(VKOR)、カルメニン、および核内の標的である SXR についても多型性を解析する。なお、日本人のビタミン K 摂取量における最も強力な規定因子である納豆の摂取状況について、その摂取頻度を聞き取り調査する。

c. 対象の選択基準

研究参加施設の外来を受診している患者のうち、「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版」に照らし合わせて薬物療法の対象者であることが判断された患者であり、ビスフォスフォネート製剤が治療薬として選択された患者を対象とする。

d. 対象の除外基準

ワルファリンを服用しており、ビタミン K2 製剤の処方が禁忌であるもの。

e. 症例数の設定とその根拠

先行研究により、GGCX325Arg 群と GGCX325Gln 群の比はほぼ 1:3 であり、ビスフォスフォネート治療による血清 ucOC の低下度合いが最小有意変化 (minimal significant change, MSC) を上回る割合が、GGCX325Gln 群で 70%、GGCX325Arg 群で 10%と仮定した場合、危険率 0.05 で両側検定を行い、有意な差が認められる確率 (パワー) を 80% になるための必要総症例数は、ビタミン K2 製剤併用または非併用の GGCX325Arg 群が約 12 例であり、総症例数は 96 例(12x4 x 2=96 例)となる。それぞれを 60%と 20%と仮定した場合は 184 例 (23x4 x 2 =184 例) と計算される。本研究ではこれらの値の平均値である 140 例(非併用群 70 例、併用群 70 例)を対象症例数として設定した。

f. 対象者の臨床情報

年齢、身長、体重、脊椎 X 線所見、骨塩定量値、一般生化学測定項目 (総蛋白、アルブミン、ALP、AST、ALT、総コレステロール、BUN、クレアチニン、血清カルシウム、血清リン)、骨代謝関連検査値 (血清 ucOC、血清 total ucOC、骨型 ALP、血清 NTX)。血清 ucOC は免疫電気化学的方法 (“Picolumi”) によって定められた検査機関 (SRL 等) において一括して測定する。納豆の摂取頻度 (聞き取り)。

g. 遺伝子解析

EDTA 加血液 0.5ml から DNA を抽出し、GGCX、VKOR、カルメニン、SXR の各遺伝子多型性を決定する。遺伝子解析は研究代表者の施設で一括して行われる。

h. 研究における医学倫理的配慮について

- ① 研究等の対象とする個人の人権擁護
研究計画はヘルシンキ宣言に基づいて立案され、遺伝子情報は当施設の管理者のもとで厳密に管理される。
- ② 研究等の対象となる者 (本人又は家

族) の理解と同意

文書による説明と同意を得る。

- ③ 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性と医学上の貢献の予測

骨粗鬆症の薬物療法における併用療法の有用性はまだ確立されておらず、併用療法を行うか否かについては臨床的判断にゆだねられている。本研究は併用療法に対する理論的根拠を得るために有用な研究であり、医学的貢献が得られると考えられる。また薬物療法に用いる薬剤は骨粗鬆症に対して保険適用を得ているもののみであり、その使用において患者への不利益はない。

D. 考察

1. ゲノムワイドスキャンによるアミノ酸変異を伴う骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (50K アレイ)

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、その近傍にアミノ酸変異を有する SNP が存在する遺伝子を探索した結果、WDSOF1 遺伝子を同定した。今回、我々は骨芽細胞ならびに破骨細胞といった骨細胞における WDSOF1 遺伝子の発現を見出した。BODYMAP データベース (<http://bodymap.ims.u-tokyo.ac.jp/human/gscard.php?gs=GS06321#>) は様々な遺伝子の発現パターンを公開しているデータベースであるが、このデータベースにおいては、WDSOF1 mRNA はヒトの様々な臓器や細胞の中で、骨芽細胞において最も多く発現していた。このことは我々の発見と一致しており、WDSOF1 遺伝子が骨代謝において何らかの役割を有していることを示唆させる。

WDSOF1 遺伝子のヒト骨組織での役割は未だ明らかにされていない。酵母のオルソログである SOF1 は核内のリボソーム RNA プロセッシングに関与することが

示されており、その変異体は増殖能が低下することが示されている。また原虫のオルソログである TcSof1 はその変異体でも増殖能が低下することが示されている。またヒト乳癌組織を用いた解析においてヒト WDSOF1 はエストロゲン受容体陰性乳癌で高発現することが指摘されている。これらのデータから WDSOF1 遺伝子は骨細胞(骨芽細胞ならびに破骨細胞)における増殖を制御する可能性がある。

2. ゲノムワイドスキャンによる骨粗鬆症関連遺伝子多型の探索 (250K アレイ)

55-83 歳の閉経後女性において第 1 集団 271 名を無作為に選択し、AFFYMETRIX 社の Mapping 250K Nsp SNP Array に含まれる、約 25 万 SNP について同社 GeneChip Mapping Assay 法を用いて genotyping を決定した。本解析においても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。さらに現在、全身骨骨量に加え、腰椎骨量、体脂肪率、脊椎変形といった骨粗鬆症ならびにその関連疾患のパラメータとなる指標との関連解析を行っている。

3. ゲノムワイドスキャンによる肥満関連遺伝子多型の探索(50K アレイ)

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。その結果遺伝子 X のイントロン 2 に存在する SNP が最も低い P 値を示した。

遺伝子 X がマウス白色脂肪組織にて高発現していること、さらには高脂肪食でその発現が誘導されることを示した。遺伝子 X の脂肪組織での役割は未だ明らかにされていない。しかしながら遺伝子 X は細胞内ではミトコンドリアに存在することが明らかにされており、脂肪組織においてミトコンドリアの機能を制御することで体脂肪率に影響を与えている可能性がある。

4. 骨髄ストローマ細胞におけるエストロ

ゲン作用の解析

マウスの骨髄ストローマ細胞 ST2 はエストロゲンに応答することが本研究より示され、ヒトにおいてもエストロゲンは骨芽細胞だけでなくその前駆細胞の段階から分化や増殖等の機能に影響を及ぼしうることが推測された。

発現が誘導される遺伝子に関しては、GPCRX、Thrombospondine2、JAK1 が定量的 Reverse transcriptase-PCR 法により確認された。このうち GPCRX は、7 回膜貫通型の蛋白であり、G 蛋白と共役している何らかの膜レセプターであることが推測された。GPCRX はヒトにおいても相同性の高い分子が存在し、ヒトにおいても骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲンシグナルを媒介している可能性が示唆された。リガンドおよび下流シグナルの同定が今後の課題である。JAK1 は、骨芽細胞の分化作用を有する Oncostatin M 受容体の下流で働いていることが報告されており、エストロゲンの骨芽細胞分化促進作用を担っている可能性が示唆された。

骨髄ストローマ細胞において、エストロゲンにより CyclinA2、CyclinD1 が抑制されることが示された。CyclinD1 は乳癌においてはエストロゲンにより誘導される遺伝子として知られており、細胞によって同じ遺伝子が正反対の方向にエストロゲンにより制御される興味深い結果となった。また、Cyclin の抑制より細胞周期の抑制が推測されたが、増殖速度を測定したところ推測通り骨髄ストローマ細胞の増殖はエストロゲンにより抑制される結果となった。このことが、エストロゲンによる骨保護効果にどのような意味を持つかという点については、分化に対する影響も含めて今後さらなる解析が必要であると思われる。

5. PXR ノックアウトマウスの骨格系表現系の解析

4 カ月齢 PXR 遺伝子欠損マウスは、13 カ月齢 PXR 遺伝子欠損マウス同様に骨粗

鬆症を呈した。骨形態計測の結果では、13 カ月齢において骨形成パラメータ、骨吸収パラメータ双方の高値を呈したのに対し、4 カ月齢では、骨吸収は亢進していたが、骨形成は抑制されるという結果であった。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、小腸においても発現し、ビタミン D 代謝酵素の発現制御作用やリン輸送蛋白の発現制御も報告されている。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 代謝やリンの吸収調節、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. ミトコンドリア関連のエストロゲン受容体標的遺伝子

ミトコンドリアに発現するエストロゲン標的遺伝子として、複数個の呼吸鎖関連の遺伝子が同定されたことから、エストロゲンがエネルギー代謝を調節する際の作用点として機能する可能性が示唆された。骨芽細胞系においても、これら呼吸鎖関連の遺伝子が、エストロゲン依存性の細胞増殖作用にも関与する可能性が考えられる。

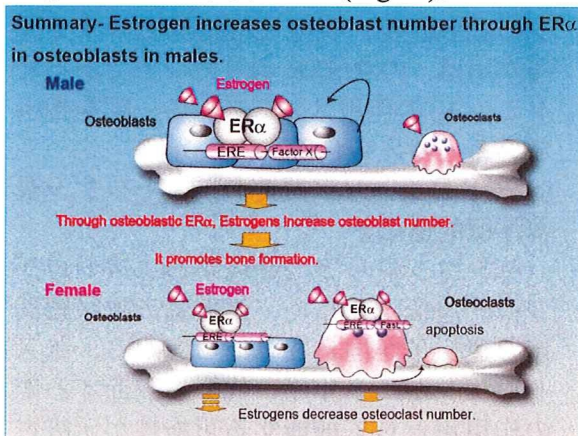
また、GABA 代謝系酵素が、骨芽細胞系のミトコンドリア発現エストロゲン標的遺伝子として同定された。GABA は神経細胞系において、抑制伝達物質として作用することが知られているが、GABA 受容体や GABA 代謝系酵素の欠損マウスにおいて、口蓋裂が報告されており、骨・軟骨形成における GABA の機能を示唆するものとして注目される。

本研究により同定された遺伝子については、今後その発現を調節した骨芽細胞系における機能解析を行うことにより、骨粗鬆症ならびに関連疾患における作用を明らかにすることができると期待され

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

これまでのデータから、エストロゲンは骨芽細胞の ER α を介して骨芽細胞数を正に制御していることが示唆された。また、本マウスと既に報告済みの破骨細胞特異的な ER α 欠損マウスの表現型を比較すると、雌では破骨細胞の ER α を介した骨防御作用が骨芽細胞の ER α に比べて優位なことが、一方、雄では骨芽細胞の ER α を介した作用が破骨細胞の ER α に比べて優位なことが示唆された(Fig 21)。



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

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。

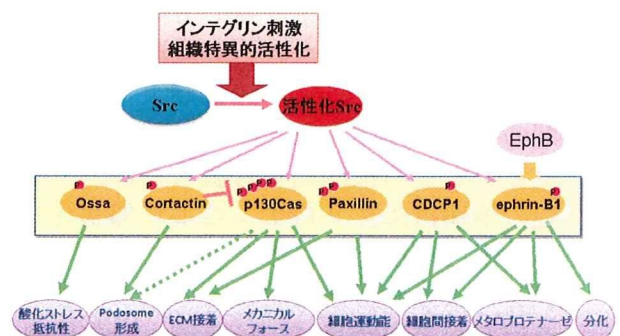
本研究で Src の基質群の中で CDCP1 や ephrin-B1 がメタロプロテナーゼ分泌に関わることが示されたが、このような分子を介したメタロプロテナーゼ分泌は、破

骨細胞による骨融解の過程にも大きく関係している可能性がある。さらに既にコルタクチンや p130Cas など複数の Src 基質がアクチンとの結合を介して、アクチン繊維の再構成や形態形成、運動能に関わることが示されていることから、破骨細胞がアクチンリングを形成して骨融解の場を作る際にこのような特定の Src 基質群が重要であることが示唆される。

骨代謝と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などが言われているが、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 22 にまとめる。

Fig 22 破骨細胞機能のエフェクターとしての Src 基質群の役割



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

本研究計画によって検証される仮説を Fig 23(次頁)に示す。血清 ucOC 濃度は骨代謝におけるビタミン K の充足状態のマ