

201007005A (CD有り)

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 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡

平成 23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成23（2011）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 - 7
	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 - 13
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：

国立がん研究センター研究所

転移浸潤シグナル研究分野・部長

細井 孝之：

国立長寿医療センター

臨床研究・治験推進部・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、それら750名の血液よりDNAを抽出した。この集団から無作為に第1集団251名を選定した。第1集団の251名から抽出したDNAを用いて、AFFYMETRIX社のGeneChip Mapping 100K Setに含まれる、約5万SNPについて同社GeneChip Mapping Assay法を用いてgenotypingを決定した。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選択された13SNPに関しては1次スクリーニングとして別集団である499名を対象に遺伝子型を決定し、骨量との関連解析を行った。

2次スクリーニングにおいて選定されたSNPの近傍に位置するGPR98遺伝子に関して、その遺伝子の機能を探索するため、GPR98ノックアウトマウスを用いて骨における表現型を解析した。

2. 250K アレイによるゲノムワイドSNP関連解析

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。骨量をはじめとする各種臨床パラメーターとの関連解析を行い、それら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. ゲノムワイドスクランによる肥満関連遺伝子多型の探索 (50K アレイ) (CNV 解析) (分担：井上)

55-83歳の閉経後女性750名を対象とする。750名の血液よりDNAを抽出した。この集団を無作為に第1集団251名と第2集団499名とに群分けした。第1集団の251名から抽出したDNAを用いて、AFFYMETRIX社のGeneChip Mapping 100K Setに含まれる、約5万SNPについて同社GeneChip Mapping Assay法を用いてgenotypingを決定した。DXA法により全身体脂肪率(%FAT)を測定した。各genotypingと%FATとの関連解析を行い、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13SNPに関し、遺伝子型を決定した。遺伝子X上ならびに近傍に存在する13SNP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体脂肪率との関連解析を行った。さらに、このSNPの近傍、イントロン1にコピー数多型を見出し、遺伝子型を決定し、脂肪量との関連解析を行った。

4. エストロゲン受容体 α (ER α)ノックアウトマウスの関節と軟骨 (分担：井上)

15週齢のエストロゲン受容体 α (ER α)欠損マウス(メス n=4)および野生型マウス(メス n=4)の膝軟骨の形態計測を行った。また、同マウスの膝関節軟骨から抽出したRNAを用い、変形性関節症関連遺伝子(Aggrecan, Collagen 2a1, Adamts4, Adamts5,

Collagen 10a1, Mmp3, Runx2, Patched-1, EPAS1)の発現を定量的RT-PCRにて検討した。また、生後5日のER α 欠損マウスおよび野生型マウスの肋軟骨より初代培養軟骨細胞を採取し、1回継代後にRNAを抽出した後、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。ER α 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも発現が低い遺伝子を軟骨細胞におけるER α 応答遺伝子候補と考え、エストロゲン刺激を6時間行った軟骨前駆細胞株ATDC5から抽出したRNAを用いてvalidationを行った。

5. 骨芽細胞、軟骨細胞におけるエストロゲン受容体(ER)の役割 (分担：井上)

生後4日のマウス頭蓋骨より初代骨芽細胞を採取し、100 nMのエストロゲンにて刺激後8時間、24時間にてRNAを抽出。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。マイクロアレイの結果に対しクラスター解析を行い、応答パターンによって遺伝子を群に分け、新規エストロゲン応答遺伝子候補の同定を行った。本実験は、ER α 、 β それぞれのノックアウトマウスを用い、またオス、メスごとに解析を行い、受容体のサブタイプおよび性別ごとのエストロゲン応答遺伝子の違いも視野に解析を行った。

6. ビタミンK受容体PXRの関節における役割 (分担：井上)

カルフォルニア大学アーバイン校のBruce Blumberg教授とともにPXR遺伝子欠損マウス(PXRKO)および同月齢の野生型マウス(WT)を用いて、関節における表現系の解析を行った。研究には、4ヶ月齢メス(WT; n=8, PXRKO; n=8)、8ヶ月齢メス(WT; n=6, PXRKO; n=6)、13ヶ月齢メス(WT; n=5, PXRKO; n=4)を用い、関節軟骨幅の計測を行った。さらに、軟骨における応答遺伝子を同定するため、軟骨前駆細胞株ATDC5にアデノウイルスにてSXRを導入した。また、negative controlとしてDsRed遺伝子のアデノウイルスベ

クターを用いた。SXR を発現させた ATDC 株に対し、ビタミン K2 (MK-4) 10 mM、SXR のリガンドとして報告されている rifampicin 10 mM、vehicle として ethanol にて刺激を 48 時間行った。DsRed を発現させた ATDC 株に対しては、vehicle およびビタミン K2 (MK-4) 10 mM 刺激を 48 時間行った。これらの細胞より RNA を抽出し、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。その結果を用い、Cluster 3.0 によりクラスター分析を行い、結果を Java Treeview にて表示した。SXR 存在時にリガンド依存性に誘導されている遺伝子を抽出し、定量的 RT-PCR 法にて validation を行った。

7. 活性型エストロゲン受容体の骨における役割 (分担：井上)

1) 活性型 ER α (caER α) の作製とルシフェラーゼアッセイ

ヒト ER α 発現ベクターは Flag-タグをつけた ER α のオープンリーディングフレームを pcDNA3 に挿入することにより調製した。537 番目のチロシンをセリンに置換 (Y537S) した活性型 ER α (caER α) は、site directed mutagenesis 法により作製した。ルシフェラーゼアッセイは、24 ウェルプレートにフェノールレッド不含 DMEM 培地 (10% デキストラン被覆活性炭処理したウシ血清 (dccc-FBS) を含む) で HeLa 細胞を播種した後、エストロゲン応答配列によって転写活性化の起こるホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する ERE-tk-Luc、内部標準化のためのコントロールであるウミシイタケルシフェラーゼレポーター PRL-CMV、ならびに caER α または ER α の発現ベクターをリポフェクタミン 2000 試薬を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 12 時間後に、10 nM の 17 β -エストラジオール (E2) または 1 μ M の ICI182780 (ICI) を添加し、24 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイは Dual luciferase assay kit (Promega) を用いて測定した。

2) 導入遺伝子の構築

CAG-GFP^{floxed}-caER α プラスミドはサイトメガロウイルスのエンハンサー、ニワトリ β -アクチンのプロモーターから成る CAG プロモーターの下流に、loxP サイトで挿まれた GFP を挿入し、さらにその下流に、caER α を挿入して作製した。

3) トランスジェニックマウスの作製

CAG-GFP^{floxed}-caER α プラスミドを制限酵素にて消化し、直線状化した。このプラスミドを C57BL/6 マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作出した。トランスジェニックマウスの genotyping は、尾部から抽出したゲノム DNA を用いて GFP に特異的な PCR 法を行うことにより判定した。CAG-GFP^{floxed}-caER α 遺伝子導入マウスと、骨芽細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する Col1-Cre マウスおよび軟骨細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する Col11-Cre マウスを交配することにより、骨芽細胞と破骨細胞で caER α を発現するコンディショナルトランスジェニックマウス (caER α ^{Col1} および caER α ^{Col11}) を作製した。ROSA26LacZ レポーターマウスと Col1-Cre または Col11-Cre マウスを交配したマウスを LacZ 染色することによって、Cre 組換え酵素の発現細胞特異性を確認した。

4) 骨形態計測

15 週齢の caER α ^{Col1} および野生型メスマウスを用いて、骨を採取する 4 日前に 30 mg/kg のテトラサイクリンおよび 2 日前に 16 mg/kg のカルセインを投与した。脛骨を採取した後、70% エタノールで固定し、非脱灰骨標本の作製、Villanueva bone 染色を施行し、骨形態計測を行った。大腿骨の骨密度 (BMD) は PIXImus (Lunar 社) を用いて測定した。

5) 定量的 PCR と OPG タンパク質量の測定

caER α ^{Col1} および野生型マウスの新生児 (5 日齢) の頭蓋骨から初代骨芽細胞を分離

し、培養した。Total RNA は Isogen (ニッポンジーン) を使用して抽出した。エストロゲン応答遺伝子の発現解析には、野生型マウスから調製した初代骨芽細胞を 10% dcc-FBS 含有フェノールレッド不含の α -MEM 培地で播種し、caER α または DsRed を発現する組換えアデノウイルスを感染した。その後、10 nM の 17 β -エストラジオール (E2) または 1 μ M の ICI182780 (ICI) で 24 時間処理し、total RNA を単離した。定量的 PCR は、マウス OPG、マウス IL-6、マウスとヒトに共通の ER α 、caER α に特異的なプライマーを用いて行い、発現量を評価した。定量的 PCR の内部標準としては GAPDH を使用した。OPG タンパク質の定量はマウス OPG/TNFRSF11B 免疫測定キットを用いて行った。

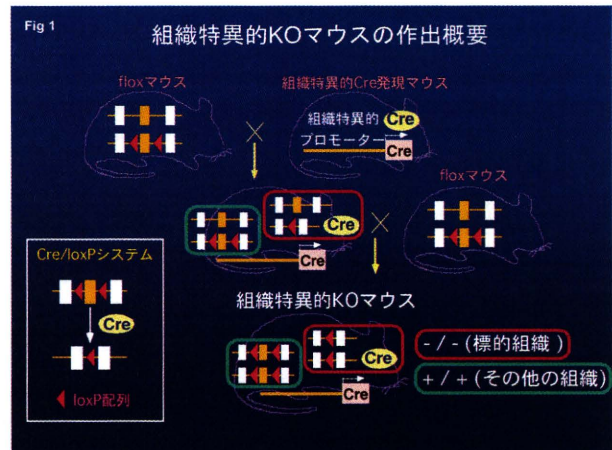
6) 破骨細胞形成アッセイ

野生型マウスの骨髄細胞を採取し、10% FBS、5 ng/mL の M-CSF を含有する α -MEM 培地で 16 時間培養した。非接着細胞を採取し、30 ng/mL の M-CSF でさらに 3 日間培養した後、付着細胞を前駆破骨細胞として使用した。前駆破骨細胞を 30 ng/mL の M-CSF と 50 ng/mL の RANKL 存在下で 7 日間培養した。この際に、caER α ^{Col1} 初代骨芽細胞により調製した培地を等量追加し、TRA 陽性多核細胞を計測した。

8. 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)

まず VDR 遺伝子座に loxP 配列を挿入した VDR flox マウスを作出し、骨芽細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Col.1(I)-Cre トランスジェニックマウスとの交配により骨芽細胞特異的 VDRKO (Ob-VDRKO) マウスを作出しその表現型を解析した (Fig 1)。

9. 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だし、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ふ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) ephrin-B1 の C 末ペプチドによる浸潤能の制御

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わかった。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) CDCP1 による細胞運動能・浸潤能の制御メカニズム

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り、固形腫瘍の遠隔転移に関わることが明らかになった。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わかりつつあった。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、さらに理解を深めることが重要である。マトリックスメタロプロテアーゼの同定や、浸潤能の制御メカニズムについて細胞生物学および生化学的手法を用いて解析する。

3) 新規の Src 基質 ARAP3 の腹膜播種における役割

ARAP3 がほとんど発現せず、腹膜播種しやすい 58As9 細胞株に、アデノウイルスで ARAP3 を過剰発現させ、ヌードマウス腹腔内に移植し、腹膜播種に与える ARAP3 の影響を検証した。また、腹膜播種に関わると考えられる細胞の浸潤能・運動能や基質接着能、細胞骨格形成について、*in vitro* のトランスウェルアッセイや、細胞外基質との接着アッセイ、アクチン骨格の Phalloidin 染色を行った。ARAP3 は複数のドメインを持った分子であるが、各ドメインがどの様に機能してスキルス胃がんの腹膜播種を抑制するかは分かっていない。そこで、ARAP3 が腹膜播種を抑制する機構を検証するために、Arf-GAP ドメイン、Rho-GAP ドメイン、C 末端のチロシンリン酸化サイト内それぞれについて機能ドメイン変異体を作製し、それによる影響を実験方法 2) と同様の *in vitro* 及び、*in vivo* のアッセイにより評価した。

10. 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)

対象は成人病診療研究所の外来を受診する 45 歳以上の原発性骨粗鬆症の女性患者であり、窒素含有ビスホスホネート剤であるアレンドロネートまたはリセドロネートによる治療を 2000 年 1 月から 2008 年 8 月の期間内に受けていた患者である。これらの患者は Nagano Cohort Study に登録された患者であり、臨床研究に関する説明と書面による同意を得た者である。また研究計画は施設の倫理委員会で審議の上了承されている。

これらの対象についてはベースラインにおける身長、体重、DXA による腰椎および大腿骨近位部の骨密度、血清カルシウム、血清リン、尿中タイプ I コラーゲン N テロペプチド (NTX)、血清低カルボキシ化オステオカルシン (ucOC) 等の測定、X 線写真による椎体の形態観察が行われた。これらの指標について平均 3.4 年間追跡した。

C. 結果

1. 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 (50K アレイ)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、この集団から無作為に第 1 集団 251 名を選定した。第 1 集団 251 名の遺伝子上にランダムに存在する約 5 万 SNP における genotype を決定した。Hardy-Weinberg 平衡、Minor allele frequency (≥ 0.2)、Fisher の検定などの総合データより統計的に有意となる遺伝子多型を順位付けした (Fig 2, 次頁)。

ゲノムワイドスキャンによる 1 次スクリーニングにより 13SNPs を選定した (Fig 2A, Dominant モデル 5SNPs, B, Recessive モデル 8SNPs, Table 1, 次頁)。次に 1 次スクリーニングにより選択された 13SNP に関し、2 次スクリーニングとして第 2 集団 499 名の閉経後女性 (平均年

Fig 2 50K SNPアレイを用いた骨量との関連解析の結果 (1次スクリーニング)

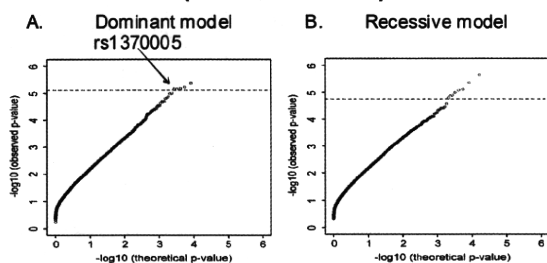


Table 1 1次スクリーニングによる骨量との関連解析の結果

SNP information	Information of alleles					Number of subjects		Association test		
	Gene symbol*	Ch	Allele	MAF	Call Rate	HWE test	Higher	Lower	P value	Threshold
A										
rs10510890	-	3p14.2	C-T	0.275	1.000	0.547	98/19	72/82	3.94E-07	-0.048
rs165222	-	2q24.3	A-G	0.486	0.968	0.113	104/77	15/48	4.26E-06	-0.004
rs4794907	-	17q22	C-T	0.264	0.996	0.250	69/50	110/21	5.93E-06	-0.055
rs225042	ADAMTS1	21q21.3	T-C	0.490	0.988	0.995	179/11	41/17	6.66E-06	-0.108
rs1370005	WDSOF1	8q22.3	A-C	0.391	0.976	0.378	4/147	19/75	6.98E-06	-0.112
B										
rs4404442	-	3p14.2	T-C	0.287	0.957	0.113	68/59	94/20	2.27E-06	-0.048
rs7143770	-	14q13.1	A-G	0.350	1.000	0.991	18/15	155/25	4.38E-06	-0.086
rs2368569	-	1q31.2	C-T	0.318	1.000	0.689	55/64	26/106	7.65E-06	0.037
rs6504989	-	17q22	T-C	0.256	0.972	0.294	106/25	61/52	8.24E-06	-0.048
rs1448239	-	9q21.3	C-C	0.447	0.968	0.117	70/10	163/0	1.00E-05	-0.149
rs10514346	GPR98	5q14.3	A-G	0.233	0.992	0.025	8/12	157/33	1.26E-05	-0.078
rs10494622	-	1q31.1	T-C	0.332	0.976	0.278	17/14	191/23	1.33E-05	-0.094
rs870915	-	9q31.3	C-C	0.205	0.992	0.346	5/155	18/71	1.60E-05	0.111

Total body BMD was evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and age- and body weight-adjusted Z scores of total body BMD were categorized into two groups with higher (higher risk) and lower (lower risk) values based on the individual threshold for each SNP estimated by maximum likelihood method.

* SNP is or adjacent to (within 50 kb) a gene.

齢 + 標準偏差; 65.3 + 8.2 歳)を対象として遺伝子型を決定し全身骨骨密度との関連解析を行った。2次スクリーニングにおいても有意な関連が見出された SNP 上もしくは近傍に存在する遺伝子に注目し、本遺伝子群の骨代謝における重要性に関し検討を行った。

1次、2次スクリーニングにより 5SNP が有意な関連を示した。これら 5SNP 上もしくは近傍に存在する遺伝子として GPR98, WDSOF1, ADAMTS1 の 3 種の遺伝子が存在していた。

これら SNP の中で GPR98 遺伝子における SNP は白人の大規模臨床スタディであるフラミンガムスタディでのデータベースにおいても骨量と有意な関連を呈していた。また、さらに骨折発症に関する追跡検討を行った(追跡期間; 5.5±0.1 年)ところ、本 SNP は骨折発症のリスクとも関連することを見出した。以上の結果より GPR98 は骨量、骨折を制御する遺伝子である可能性が示唆された。そこで、我々は GPR98 ノックアウトマウスを用いてマウス骨量を測定した。その結果、GPR98 ノックアウトマウスは 12 週齢のマウスに

おいて低骨量を呈していた。また、GPR98 ノックアウトマウスの大腿骨は骨強度が低下しており易骨折性を呈していた。

また、日本人集団で有意な関連を呈していた SNP が存在する WDSOF1 遺伝子上にはアミノ酸変異を伴う 3 つの SNP が存在した (Arg47Ser, Pro108Leu, Ile94Val)。これらアミノ酸変異を伴う SNP は今回 SNP アレイで同定された SNP と連鎖不平衡の関係にあった。さらにリアルタイム PCR 法により WDSOF1 遺伝子ならびに ADAMTS1 はマウス骨芽細胞での発現が確認された。

2. 250K アレイによるゲノムワイド SNP 関連解析

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。BMD をはじめとする臨床パラメーターとの関連解析を施行し、1次スクリーニングの結果を得るとともに、第 2 集団で検証した。

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) (CNV 解析)

55-83 歳の閉経後女性 750 名を対象とし、この集団を第 1 集団 251 名と第 2 集団 499 名とに群分けした。第 1 集団 251 名の遺伝子上にランダムに存在する約 5 万 SNP における genotype を決定した。Hardy-Weinberg 平衡、Minor allele frequency (>0.2)、Fisher の検定などの総合データより統計的に有意となる遺伝子多型を順位付けした。本解析により選定された 49SNPs 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、Dominant モデルにおいて第 1 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 2

集団においても $P=1.09 \times 10^{-4}$ と最も低い P 値を認めた。そこで我々は 750 名の閉経後女性を対象に、この遺伝子 X は 10 個のエクソンで構成されているが、本遺伝子上ならびに近傍の 13SNP の genotyping を行い、連鎖不平衡解析を行った。その結果、遺伝子 X は 5'近傍領域からイントロン 6 までの領域において連鎖不平衡ブロックを形成していることが示唆された。また、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。

近年、新たな遺伝子多様性としてコピー数多型(CNV)が注目されている。そこでこの遺伝子 X 内、近傍における CNV を探索したところ遺伝子 X のイントロン 1 に CNV が存在した。そこで我々は 527 名の閉経後女性を対象として本遺伝子 CNV の遺伝子型を決定し解析したところ、CNV=0 と CNV1 以上の群での体脂肪を比較すると CNV1 以上の群では有意に体脂肪が低下していた。

4. エストロゲン受容体 α (ER α)ノックアウトマウスの関節と軟骨

15 週齢のエストロゲン受容体 α (ER α)欠損マウス(メス $n=4$)および野生型マウス(メス $n=4$)の膝軟骨の形態計測の結果、ER α 欠損マウスにおいて有意な脛骨側外側の関節軟骨幅の菲薄化を認めた。また、膝組織より抽出した RNA の RT-PCR 法による解析にて、膝軟骨において野生型マウスでは ER α が発現していることも示し、エストロゲンの軟骨細胞に対する直接作用も示唆する結果であった。

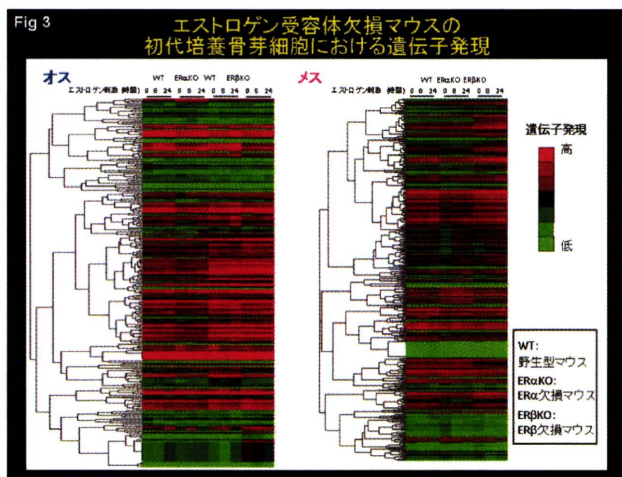
変形性関節症関連遺伝子の発現を定量的 RT-PCR にて検討した結果、ER α 欠損マウスにおいて Aggrecan, Col2a1 の低下を認め、軟骨の細胞外基質の産生低下を示唆する結果であった。さらに、Adamts4, Adamts5 の発現も ER α 欠損マウスにおいて亢進しており、これらは軟骨における細胞外基質の分解の亢進も示唆する結果であった。しかし、肥大軟骨層関連の遺

伝子や Hedgehog シグナルの ligand である Patched-1, EPAS1 は ER α 欠損マウスにおいて上昇しておらず、従来知られてきたメカニズム以外の機序にて軟骨の変性が起こっていることが示唆された。

また、生後 5 日の ER α 欠損マウスおよび野生型マウスの肋軟骨より初代培養軟骨細胞を採取し、1 回継代後に RNA を抽出した後、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。ER α 欠損マウスにおいて野生型マウスよりも発現が低い遺伝子を軟骨細胞における ER α 応答遺伝子候補と考え、一番大きな差の生じた cholecystokinin および Wnt シグナルに関連する Sfrp1 に着目し、エストロゲン刺激を 6 時間行った軟骨前駆細胞株 ATDC5 から抽出した RNA を用いて validation を行った。その結果、cholecystokinin, Sfrp-1 の両者とも ATDC 細胞においてエストロゲンにより誘導されていることを確認し得た。

5. 骨芽細胞、軟骨細胞におけるエストロゲン受容体(ER)の役割

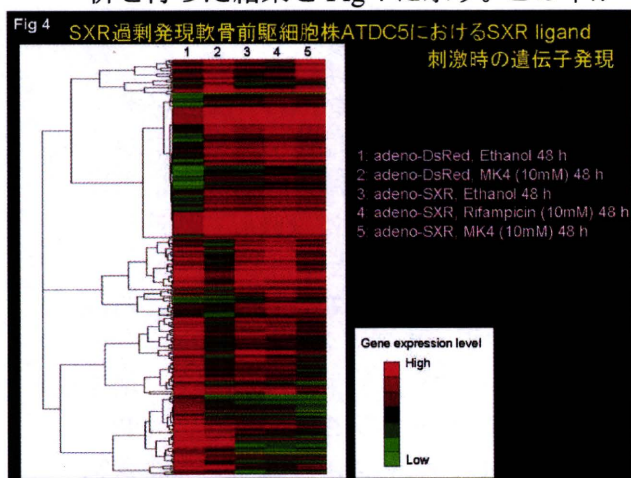
生後 4 日のマウス頭蓋骨由来の初代骨芽細胞を 100 nM のエストロゲンにて刺激後 RNA を抽出。マイクロアレイの結果に対しクラスター解析を行った結果を Fig 3 に示す。エストロゲンに対する応答パターンにより、複数のエストロゲン受容体応答遺伝子を抽出した。



6. ビタミン K 受容体 PXR の関節における役割

PXR 遺伝子欠損マウス(PXRKO)の膝軟骨の形態を月齢ごとに解析した結果、4ヶ月齢から8ヶ月齢にかけて脛骨側外側の膝関節軟骨幅の増加を認めず、13ヶ月齢においては、8ヶ月齢と比べ菲薄化を認めた。13ヶ月齢のマウスにおいては、膝関節面のずれも増大しており、変形性関節症様の変化を呈した。これは、野生型(WT)において4ヶ月齢から8ヶ月齢にかけて脛骨側外側の膝関節軟骨幅の増大を認め、さらに13ヶ月齢において軟骨幅が維持されていることと対照的であり、そのためPXRKOとWTを比較した際に有意な脛骨側外側の関節軟骨幅の菲薄化を認めた。

軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて、SXR 過剰発現および SXR のリガンド刺激を行った際の遺伝子発現に対しクラスター解析を行った結果を Fig 4 に示す。この中か



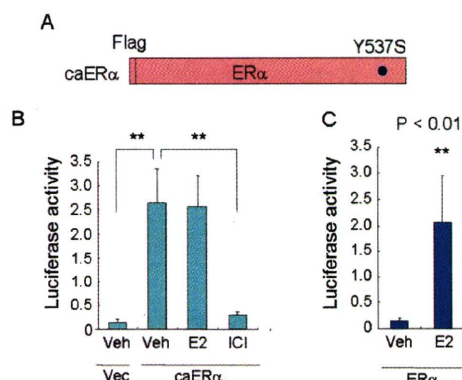
ら SXR 存在時にリガンド依存性に誘導されている遺伝子候補として Itih2 (Inter-alpha-trypsin inhibitor H2)を抽出し、定量的 RT-PCR 法にて validation を行った。

7. 活性型エストロゲン受容体の骨における役割

1) caERα の作製

in vivo での ERα の機能を評価するため、Y537S 置換を有し恒常的に活性型となるヒト ERα 変異体を作製した(Fig 5A)。この

Fig 5 活性型エストロゲン受容体 ERα Y537S (caERα)

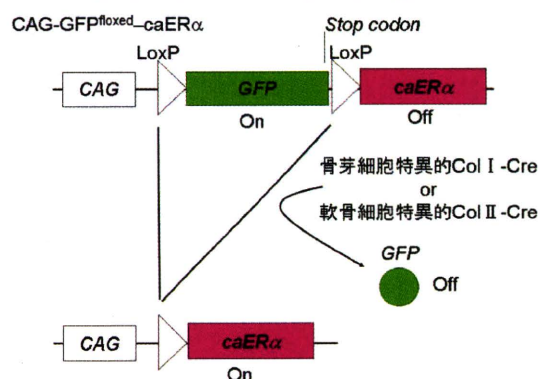


537 番目のチロシン残基は、リン酸化部位として重要であり、リガンド結合、二量体形成、転写活性に関与している。エストロゲン応答配列(ERE)によって制御される ERE-ルシフェラーゼを用いたアッセイによって、本研究で作製した caERα はエストロゲンの存在に関係なく転写を活性化することが明らかになった(Fig 5B)。caERα の転写活性は、抗エストロゲン剤である ICI によって抑制された。caERα の転写活性は、野生型 ERα と同じ水準だった(Fig 5C)。caERα は、リガンド刺激がなくても高い転写活性を示すことから、生体内で ERα の機能獲得実験での解析に有用であると考えられた。

2) 骨芽細胞および軟骨細胞において caERα を発現するコンディショナルトランスジェニックマウスの作製

caERα の過剰発現による *in vivo* での効果を解析するため、コンディショナルトランスジェニックマウスを作製した(Fig 6)。まず、CAG-GFP^{flox}-caERα をトラン

Fig 6 活性型エストロゲン受容体(caERα) トランスジェニックマウスの作製

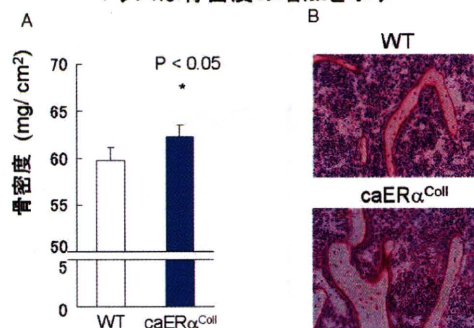


スジーンとして有する遺伝子改変マウスを作製した。CAG プロモーターは、様々な組織でユビキタスな発現をもたらすが、GFP 配列の直下にポリ(A)シグナル配列を有するために、GFP のみを発現し、caERα は発現しないと考えられる。しかし、Cre リコンビナーゼによって組換えが生じると、GFP の配列は削除され、caERα が発現することになる。この CAG-GFP^{flox}-caERα コンストラクトをマイクロインジェクションによって C57BL / 6 マウスの前核期卵に導入し、トランスジェニックマウスを得た。Genotyping の確認は、ゲノム DNA を GFP 特異的プライマーを用いて PCR を行うことによって確認した。また、トランスジーンからの発現は、トランスジェニックマウスの尾を蛍光観察し、GFP タンパク質の発現で確認した。この CAG-GFP^{flox}-caERα マウスと骨芽細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する ColI-Cre マウスまたは軟骨細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する ColIII-Cre マウスとを交配し、骨芽細胞ならびに軟骨細胞特異的に caERα を発現する caERα^{ColI} マウスおよび caERα^{ColIII} マウスをそれぞれ作製した。

3) 骨芽細胞において caERα を発現するマウスにおける骨密度の上昇

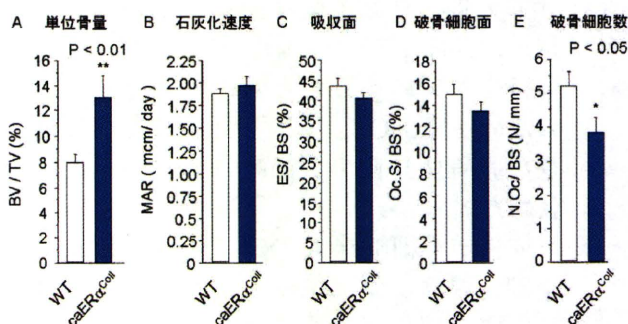
二重エネルギー X 線吸収測定法を用いて、メスの caERα^{ColI} マウスの大腿骨骨密度を野生型マウスと比較した。その結果、大腿骨骨密度が caERα^{ColI} マウスで増加していることが明らかになった(Fig 7A)。骨

Fig 7 骨芽細胞において活性型エストロゲン受容体を発現するマウスは骨密度の増加を示す



に対する caERα の効果をさらに解析するため、脛骨の形態計測を行った。Fig 7B に示すように、caERα^{ColI} マウスは、骨髄腔における類骨の形成が増加していることが示された。さらに、caERα^{ColI} マウスでは有意に骨量(BV/TV)が増加している一方で、骨吸収の組織学的指標である破骨細胞数(N.Oc / BS)が有意に減少していることが明らかになった(Fig 8)。その他の

Fig 8 骨芽細胞において活性型エストロゲン受容体を発現するマウスにおける破骨細胞数の減少

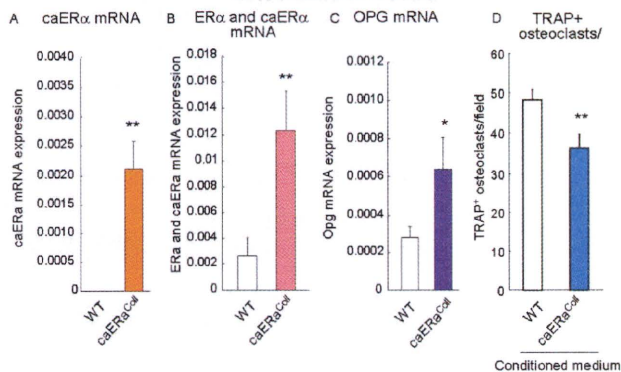


骨吸収の組織学的指標である破骨細胞面 (Oc.S / BS)と吸収面(ES/ BS)も減少する傾向を示した。しかしながら、caERα^{ColI} マウスは、石灰化速度に差は見られなかった。これらのデータは、骨芽細胞における caERα の過剰発現は骨吸収を減速し、骨量を上昇させることを示している。

4) caERα を発現する初代骨芽細胞における OPG 産生の上昇

caERα^{ColI} マウスにおける骨密度の増加のメカニズムをさらに調べるため、OPG、RANKL、IL-6 の mRNA の発現レベルを頭蓋骨から調製した初代培養骨芽細胞を用いて定量化した。導入した caERα 遺伝子の発現は、caERα^{ColI} マウスから調製した初代培養骨芽細胞で確認した(Fig 9A, 次頁)。内因性のマウス ERα とトランスジーン caERα の両方の ERα を合わせた発現レベルは、マウスとヒトの ERα mRNA に共通の配列を有するプライマーを用いて検討した(Fig 9B, 次頁)。その結果、caERα^{ColI} 初代骨芽細胞で ERα が野生型に比べて 4

Fig 9 活性型エストロゲン受容体を発現する骨芽細胞におけるオステオプロテグリン(OPG)の発現亢進と破骨細胞分化の抑制



倍以上多く発現していることが示された。興味深いことに、caERα^{Col1} マウスの初代骨芽細胞において OPG mRNA が有意に発現上昇していることが示された(Fig 9C)。caERα^{Col1} マウス由来の初代骨芽細胞を培養した培地中でも OPG タンパク質の濃度が高いことが確認されたことから、OPG の産生・分泌が促進されていることが判明した。また、IL-6 mRNA の発現が低下していることが明らかになり、Rankl の発現変化は明らかではなかった。これらの結果は、ER は骨芽細胞において OPG の発現を促進し、一方で IL-6 の発現を抑制することが示された。

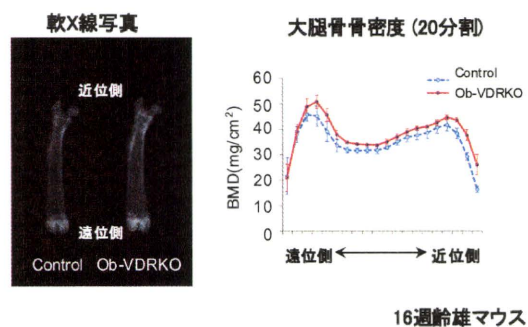
これらの破骨細胞関連遺伝子の発現に対するエストロゲンの影響を調べるため、野生型マウス由来の初代骨芽細胞に caERα を発現する組換えアデノウイルスまたはコントロールのアデノウイルス(DsRed)を感染させ、E2 または ICI で処理した。その結果、OPG mRNA の発現量は E2 処理または caERα アデノウイルスの感染によって亢進された。Rankl mRNA の発現レベルは、これらの処理によって変動しなかったが、IL-6 mRNA は E2 処理または caERα アデノウイルスの感染のいずれかによって抑制された。さらに、ICI は OPG mRNA のエストロゲン依存性の増加を阻害し、IL-6 mRNA のエストロゲン依存性の抑制を回復させた。これらの結果は、caERα のシグナリングは野生型の骨芽細胞における内在性 ERα のシグナル伝

達を模倣していることを示しており、caERα を発現する骨芽細胞における OPG および IL-6 の異なる遺伝子発現は caERα トランスジェニックマウスにおける骨吸収の減少と骨密度の上昇を示す骨組織の変化の起因となっていることを示している。次に、caERα^{Col1} 初代骨芽細胞によって調整された培地によって、破骨細胞の分化が影響を受けるか否か検証した。その結果、TRAP 陽性多核細胞の数が、caERα^{Col1} 初代骨芽細胞によって調整された培地によって減少することが明らかになった(Fig 9D)。

8. 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

Ob-VDRKO マウスを解析した結果、対照群と比較し、血中カルシウム、リン、PTH 濃度はいずれも正常であったが、骨量および骨密度の増加が認められた(Fig 10)。

Fig 10 Ob-VDRKOマウス の骨量および骨密度は増加する



骨形態計測の結果 Ob-VDRKO マウスでは、骨形成の指標には変化が見られなかったが、骨吸収の指標が減少していた。さらに Ob-VDRKO マウスでは骨吸収を担う成熟破骨細胞への分化誘導因子である RANKL の遺伝子発現が有意に減少していた。

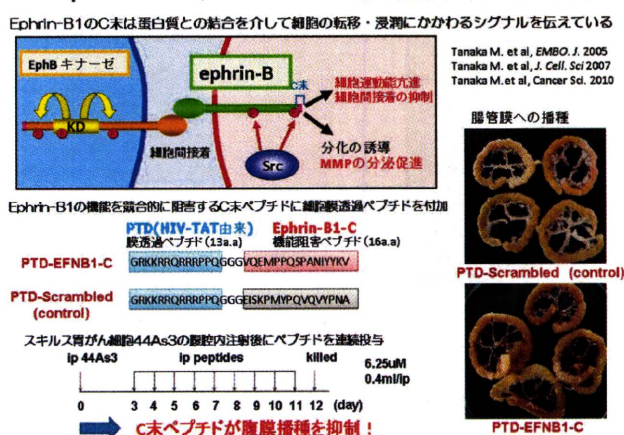
9. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

1) ephrin-B 1 の C 末ペプチドによる浸潤

能の制御

膜型のリガンドである ephrin-B1 がスキルス胃がん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。スキルス胃がん細胞を腹腔内に注射したのち、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 11)。

Fig 11 Ephrin-B1のC末ペプチドによる腹膜播種抑制効果の検討

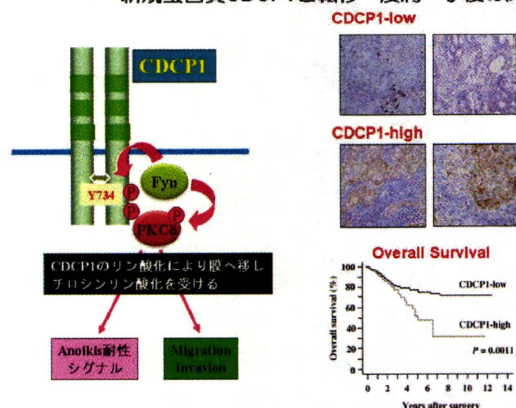


2) CDCP1 による細胞運動能・浸潤能の制御メカニズム

運動能、浸潤能に関して、CDCP1 が、PKC δ や cortactin と複合体を形成して機能していると考えられた。また、その複合体形成は CDCP1 のチロシンリン酸化に依存し、PKC δ のキナーゼ活性を介していると可能性が示された。浸潤能に関しては、CDCP1-PKC δ のシグナルにより MMP-9

やその他の matrix protease による基質分解能に影響を与えることが示された。さらに、膵がん臨床検体を用いた組織染色により CDCP1 の発現率が生命予後に相関することが明らかとなり、CDCP1 が独立した生命予後因子となることが示唆された(Fig 12)。CDCP1 はがん部において発現

Fig 12 固形腫瘍の足場非依存性を制御する新規蛋白質CDCP1と転移・浸潤・予後の関わり



とリン酸化が上昇する蛋白質であるが、がんにおける遺伝子増幅などの報告はない。そのことから CDCP1 の発現を制御している上流のがん遺伝子の存在が想定され、現在研究を進めている。

CDCP1 は正常膵管での発現は見られない。小腸、大腸粘膜などにおける発現が報告されているが、チロシンリン酸化レベルはがん部に比較し非常に低い。膜貫通型蛋白質であることから、CDCP1 の発現、もしくはリン酸化部位を標的とした分子標的療法の良い候補分子となりうると考えられた。

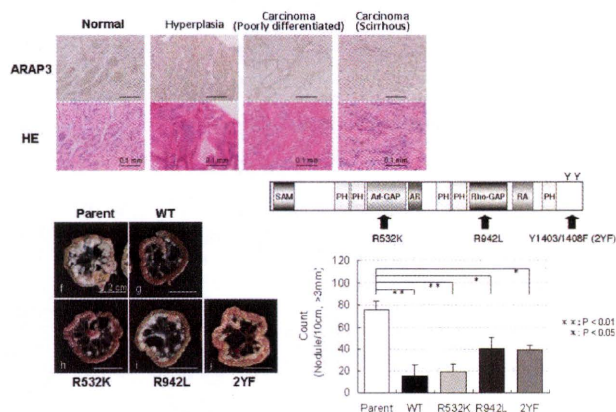
3) 新規の Src 基質 ARAP3 の腹膜播種における役割

ARAP3 発現がほとんど無いスキルス胃がん細胞株のひとつである 58As9 細胞に ARAP3 を恒常的に発現させたところ、ヌードマウス腹膜播種モデルにおける腸間膜転移や血清腹水の産生が顕著に抑制された。また、腹膜播種に関わると考えられる性質について *in vitro* で解析をおこなったところ、ARAP3 を発現させることで細胞外基質との接着が弱くなること、細

胞の浸潤能・運動能が低下することが分かった。また、ARAP3 を発現するスキルス胃癌細胞である 44As3 細胞から ARAP3 の発現を恒常的に抑制したところ、細胞の接着能と浸潤能・運動能が亢進することが分かった。ARAP3 変異体を発現させる実験によりこの腹膜播種抑制能は ARAP3 の RhoGAP 活性を持つドメインと、チロシンリン酸化部位が重要であることが明らかになった(Fig 13)。ARAP3 はチロ

Fig 13

ARAP3の組織発現と播種抑制機能の解析



シンリン酸化を介した他分子との結合と低分子量 G 蛋白質の Rho の制御によって浸潤や腹膜播種を抑制する分子であることが示された。

11. 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

観察期間中に新規脊椎圧迫骨折が発生した患者は 71 名、発生しなかった患者は 160 名であった(Table 2)。観察開始時の平均年齢は前者が 74.3±1.1 歳、後者が 69.0±0.7 歳であり、有意差があった。2 群間での body mass index、血清カルシウム、血清リン、NTX については有意差はなかった。また、観察開始時の脊椎圧迫骨折数の平均は前者で 2.58 個、後方で 1.09 個であった。平均 3.4 年間の観察期間後に骨折を発症しなかった群と骨折を発症した群で各指標を比較した結果、腰椎 BMD は両群で差はなく、ビスホスホネートによる骨量増加効果は両群にもたらされていたと考えられた(Table 2)。また、NTX に

Table 2

Bone-related outcomes in the patients with or without incident fractures at the end of treatment with amino-bisphosphonates

	incident fracture (-)	incident fracture (+)	p
n	160	71	
LBMD (g/cm ²)	0.854 ± 0.011	0.823 ± 0.017	0.131
Ca (mg/dl)	9.26 ± 0.03	9.16 ± 0.05	0.091
P (mg/dl)	3.54 ± 0.04	3.43 ± 0.06	0.140
NTX (nM/mM Cr)	28.6 ± 1.5	33.2 ± 2.3	0.104
ucOC (ng/ml)	2.28 ± 0.13	2.75 ± 0.19	0.038

も有意差を認めなかったことから、骨吸収抑制効果は両群において発揮されたと考えられていた。血清カルシウム、血清リンには有意差を認めなかった。一方、血清 ucOC は骨折群で有意に高値であった。

さらに多変量解析を行ったところ、観察開始時の既存脊椎圧迫骨折数、年齢、ucOC、腰椎骨密度の 4 つの因子について 2 群間で統計学的有意差が認められた。

D. 考察

1. 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 (50K アレイ)

SNP アレイを用い、約 5 万 SNP の genotyping を行い、1 次スクリーニングと 2 次スクリーニングにより 5SNP が統計学的に有意であることを見出した。これら 5SNP 上もしくは近傍に存在する遺伝子として GPR98, WDSOF1, ADAMTS1 の 3 種の遺伝子が存在していた。特に GPR98 遺伝子近傍の SNP は白人集団でも再現されており、人種を超えた骨量を規定する SNP として興味深い。また GPR98 ノックアウトマウスは低骨量と骨強度の低下を示していた。さらに、GPR98 遺伝子近傍の SNP は実際に骨折発症とも関連することから、GPR98 遺伝子が骨粗鬆症と骨折発症を制御する遺伝子であることが見出された。また、今回の検索では GPR98 以外にも WDSOF1 遺伝子ならびに

ADAMTS1 遺伝子が骨粗鬆症関連遺伝子として注目された。WDSOF1 遺伝子は遺伝子内に 3 種のアミノ酸変化を伴う SNP を有し、これらは全て連鎖不平衡にあった。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/gs_card.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、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。

また ADAMTS1 遺伝子は今回イントロン 8 に存在する SNP が骨量と関連することを見出したが、この遺伝子のエクソン 1 にはアミノ酸変異を伴う SNP が存在し、これら SNP 間は連鎖不平衡にあることから、このアミノ酸変異が ADAMTS1 の機能に影響を与えている可能性がある。ADAMTS1 ノックアウトマウスは成長障害や脂肪組織の減少を呈することが明らかにされており、今後 ADAMTS1 ノックアウトマウスにおける骨の表現型の解析が期待される。

2. 250K アレイによるゲノムワイド SNP 関連解析

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。1 次スクリーニング、2 次スクリーニングにより遺伝子 A 近傍に位置する SNP が BMD をはじめとする臨床パラメーターと有意に関連することを見出した。さらに、それ以外にも全身骨骨量に加え、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ーとなる指標との関連が見出されている。

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) (CNV 解析)

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。さらに遺伝子 X のイントロン 1 に存在する CNV も体脂肪量と関連することを見出した。興味深いことに遺伝子 X に存在する SNP と CNV は連鎖不平衡にあることを見出しており、今回 SNP アレイで見出した表現型の機能は CNV が担っている可能性がある。今後遺伝子 X の機能検索をさらに行っていくことで肥満とるい瘦に関する新たなメカニズムが明らかになる可能性がある。

4. エストロゲン受容体 α (ER α)ノックアウトマウスの関節と軟骨

エストロゲン受容体 α 欠損マウスや卵巣摘出マウスにおいては、従来は半月板を人工的に障害を与えたモデルにおいて関節軟骨の変性が進行しやすいという報告があったが、本研究により初めて、通常の飼育環境においても関節軟骨の変性が 15 週齢という早い段階で生じることが

示された。また、発現遺伝子の解析により、エストロゲン受容体 α 欠損マウスにおいては、軟骨細胞の細胞外基質の産生低下、破壊亢進が示唆された。このメカニズムとしては、従来報告されてきたような肥大軟骨層に特徴的な遺伝子マーカーや Hedgehog シグナルは関与せず、Cholecystinin や Sfrp-1 の誘導を介する新規メカニズムが推測された。Cholecystinin は、膵液分泌や胆汁分泌促進といった消化管における作用が有名であるが、大脳辺縁系や視床下部における生殖行動の制御といった消化管外での作用も注目されている。軟骨組織における作用は、ほとんど報告がなく今後解析予定である。Sfrp-1 は、Wnt と直接結合することにより、Wnt シグナルを抑制する分子である。Wnt シグナルに関しては、軟骨組織に保護的に働くという報告と破壊的に働くという報告の両者が存在し、本研究においては保護的に作用することが間接的に示唆される。今後詳細な解析を予定している。

5. 骨芽細胞、軟骨細胞におけるエストロゲン受容体(ER)の役割

クラスター解析を行い、複数のエストロゲン遺伝子を同定しており、validationを進めた。これらの遺伝子の中には、オス・メスに共通して制御されている遺伝子だけでなく、性別によって応答の異なる遺伝子も存在しており、骨に対するエストロゲン作用の性差の解明にもつながることが期待される。

6. ビタミン K 受容体 PXR の関節における役割

PXR 欠損マウスにおいては、4 ヶ月齢以降、加齢に伴い関節の摩耗が時間をかけて進行することが示された。軟骨細胞における SXR/PXR 応答遺伝子候補としてクラスター解析により同定された Itih2 (Inter-alpha-trypsin inhibitor H2)は、プロテオグリカンなどの細胞外基質に結合し安定化させる役割が知られており、軟骨基

質の安定化に SXR/PXR のシグナルが関与している可能性が示唆された。

7. 活性型エストロゲン受容体の骨における役割

本研究では、活性型 ER α である caER α 変異体を使用して、ER α の生体内機能を探検するための CRE/ loxP システムを使用したコンディショナルトランスジェニックマウス CAG- GFPfloxed -caER α を作製した。このマウスを ColI-Cre マウスと交配することにより骨芽細胞で caER α を発現する caER α ColI マウスを作製した。caER α ColI マウスは、野生型マウスと比較して骨密度が上昇しており、骨形態計測学的分析から、破骨細胞数が有意に減少していることが明らかになった。さらに、caER α ColI マウスからの初代骨芽細胞において、OPG mRNA とタンパク質の発現が上昇し、IL-6 mRNA 発現が減少していることが判明した。したがって、これらの結果は ER α は骨芽細胞において、破骨細胞分化に関連のある遺伝子の発現に重要な役割を果たしており、破骨細胞による骨吸収に影響を与えることが示唆された。

OPG は RANKL に結合する TNF 受容体スーパーファミリーのメンバーである。OPG は RANKL を中和する分泌型デコイ受容体として働き、破骨細胞の分化、活性、生存を負に制御している。RANKL /OPG の比率は破骨細胞の分化と骨吸収の重要なパラメーターであると想定されている。OPG は卵巣摘出ラットに投与すると骨量減少を防ぎ、OPG ノックアウトマウスでは骨粗鬆症を誘発し、OPG 過剰発現マウスでは大理石骨病を促進する。エストロゲンは、用量依存的に培養骨芽細胞における OPG mRNA およびタンパク質の発現を増加させるとの報告があり、本研究の結果は骨芽細胞における ER α は OPG の分泌を媒介することを強く支持するものと考えられた。

エストロゲンはまた、骨芽細胞や破骨

細胞における IL-1、IL-6、TNF α 、M-CSF、プロスタグランジン、TGF β などの発現を調節している。本研究において、caER α ColI から調製された初代骨芽細胞において、骨吸収を誘導する IL-6 の発現が減少していたことが示された。従って、骨芽細胞における ER α は破骨細胞に影響を及ぼすサイトカイン産生に影響を与えることも考えられた。

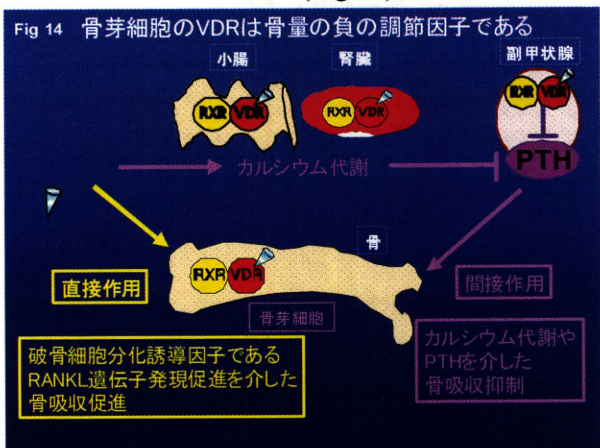
caER α ColI マウスの骨形態計測において石灰化速度に変化が見られなかったことから、caER α を発現する骨芽細胞の分化は生体内で影響を受けていないと推測できる。しかしながら、ER α とエストロゲンが骨芽細胞の分化を促進することも報告されており、この可能性も否定できない。加えて、caER α ColI メスマウスは、卵巣摘出による骨量の減少に抵抗性を示すことが推測されるほか、caER α ColI マウスは、オスにおいても ER α の機能を解析するのに有用であると考えられた。これらの点については今後の研究課題と考えられた。

ER α と ER β を欠損した KO マウスが骨組織における ER の機能解析に利用されている。しかしながら、骨量減少および高回転型の骨代謝はこれらの KO マウスでは観察されていない。このような予想外の結果は、KO マウスにおいてエストラジオールとテストステロンが増加していることに起因すると考えられる。なぜなら、ER の不活化は下垂体を介するホルモン産生のネガティブフィードバックを阻害するからである。近年、破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウスが作製され、メスにおいて海綿骨が減少し、閉経後骨粗鬆症の骨と似ている表現型を示すことが明らかになった。さらに、ER α は破骨細胞における Fas リガンド(FasL)の発現に必要であり、エストロゲン誘導性のアポトーシスに関与していることが示された。これらの結果は、エストロゲンの破骨細胞に対する直接的な作用を説明するもの

と考えられる。

8. 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

本研究の結果、Ob-VDRKO マウスでは血中カルシウム、リン、PTH 濃度はいずれも正常であったことから、生体内におけるカルシウム代謝は正常であると考えられる。にもかかわらず Ob-VDRKO マウスでは骨吸収の抑制による骨量増加が認められたことから、VDR は腎臓、小腸、副甲状腺においてカルシウム代謝を調節することにより骨に対して間接的に作用するばかりではなく、骨芽細胞の VDR が骨代謝制御に直接関与しており、骨芽細胞の VDR は骨量の負の調節因子として働くことが示唆された(Fig 14)。



9. 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

破骨細胞と骨芽細胞の相互調節にも関わる ephrin-B1 の C 末ペプチドに膜透過ドメインを付加することにより ephrin-B1 の機能を制御することが骨細胞系でもうまくいけば、骨粗鬆症の治療にも応用できる可能性がある。またメタロプロテアーゼの分泌制御に関わる CDCP1 も Src の基質として貴重な細胞外ドメインを持つ蛋白質であり、細胞外ドメインに結合する分子により機能が制御できる可能性がある。また今回の解析により、ARAP3 が機能ドメインである Rho-GAP ドメインや自