

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事業)  
総括分担研究報告書

細胞内シグナル伝達・膜受容体・酵素系の  
骨粗鬆症・関連疾患における機能解析と応用

分担研究者 堀 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分野長

【研究要旨】

骨細胞系の増殖・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は、骨粗鬆症や関連疾患の予防・診断・治療などの面でも極めて重要である。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・骨芽細胞においてはその分化と機能維持のために必要であると考えられる。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て、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。今年度は Src ファミリーの基質のうち細胞の浸潤能や運動能に関わる Ephrin-B1、CDCP1、ARAP3 などの役割をいくつかの細胞モデルで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さらに明らかにして骨粗鬆症や関連疾患の病因の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の樹立を目指した。

A. 研究目的

近年、種々の疾患の原因蛋白質や発症メカニズムが解明され、その新たな治療法の開発に光明を与えている。他の組織と同様に骨の維持や修復にも多くの細胞内蛋白質群を介したシグナル伝達系が関与している。骨質における骨新生と骨破壊のバランスが崩れた状態である骨粗鬆症、加齢、物理的ストレス、酸化ストレス、ホルモンバランスなど幾つかの要因で増殖や機能調節の適切なコントロールが崩れた状態であり、他の内臓疾患と全く同様にその増殖や機能を司る蛋白質群の解析が重要であることは明かである。

本研究の目的は、このような骨を形成する細胞の機能がどのような機構により制御されているかを、細胞内シグナル伝

達の解析により明らかにすること、そしてそのメカニズムに基づいて有効な骨粗鬆症の治療モデルを提唱することである。骨でのシグナル伝達には多くの分子群の関わりが指摘されているが、本研究で特に焦点を絞って解析したいのは、非受容体型チロシンキナーゼに分類される Src ファミリーのチロシンキナーゼとそれによってチロシンリン酸化を受ける基質蛋白質群を介したシグナル伝達系である。

Src ファミリーキナーゼは非常に多彩ないくつもの生理機能を持ちその多くは骨細胞系においても極めて重要である。一つは細胞-細胞間の接着において、Src キナーゼはそれを直接感知するカドヘリン分子群や Eph-ephrin 分子群の直下において、接着の情報を細胞内に伝える役割を

果たしている。骨芽細胞表面に発現する EphB 蛋白質と破骨細胞表面に発現する ephrin-B 蛋白質は、両方の細胞が接触したときに双方向に活性化のシグナルを送りそれぞれの細胞のコントロールを行うことが最近明らかになって注目を集めているが、この破骨細胞における ephrin-B 活性化のプロセスにおいても、Src キナーゼによるリン酸化が重要な役割をしていることがわかっている。さらには、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の分泌もそのメカニズムの詳細は明らかになっていないが Src キナーゼ経路との深い関わりが指摘されている。MMP の分泌は骨粗鬆症における破骨細胞による骨吸収にも深く関わっている。

最終的には骨粗鬆症および関連疾患における Src ファミリーの活性化、各々の基質分子のリン酸化のメカニズムと、その媒介する細胞内シグナルの情報に基づいて、破骨細胞の細胞内 Src キナーゼ活性あるいはシグナルの制御により、その機能を調節する系をデザインする。

Src の基質として細胞間接着や浸潤に関わる分子を見出すために、スキルス胃がん細胞株(44As3 細胞)を用いた腹膜播種マウスモデルにおいて、形成された腫瘍内で特異的にチロシンリン酸化状態が変化する蛋白質を LC/MS/MS で解析することにより、CDCP1 や OSSA などの分子を同定し、報告を行ってきた。さらに、PI3K のエフェクター分子のひとつである ARAP3 も、腫瘍においてチロシンリン酸化に変化が認められる分子として同定された。ARAP3 の機能はもとより、がんとの関係についての報告はこれまでほとんどされていないことから、スキルス胃がんにおける ARAP3 の機能を解析し、創薬ターゲットとしての可能性について検討を行うことにした。

以上のような解析により病態と Src ファミリーのシグナルの関わりをできる限り正確に把握し、骨粗鬆症および関連疾

患の診断や、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. 研究方法

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) 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 染色をおこなった。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癌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。

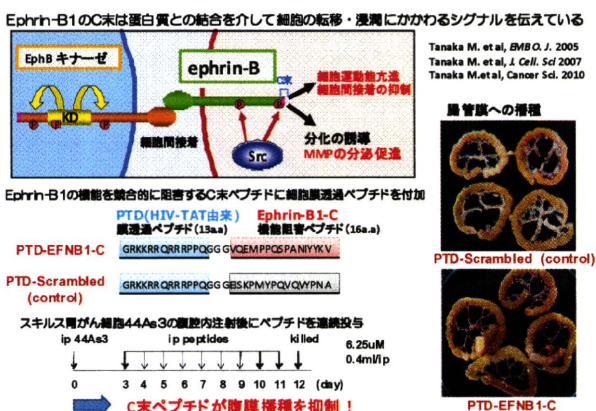
## C. 研究結果

### (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いだした。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かかわる 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(図 1)。

図 1 : Ephrin-B1のC末ペプチドによる腹膜播種抑制効果の検討



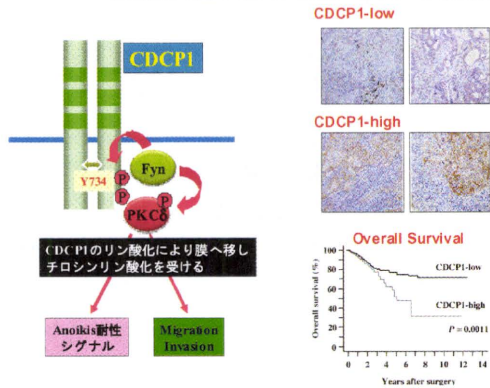
### (2) CDCP1 による細胞運動能・浸潤能の制御メカニズム

運動能、浸潤能に関して、CDCP1 が、PKCδ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、PKCδ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-PKCδ 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(図2)。CDCP1 はがん部に

図2：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



において発現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。

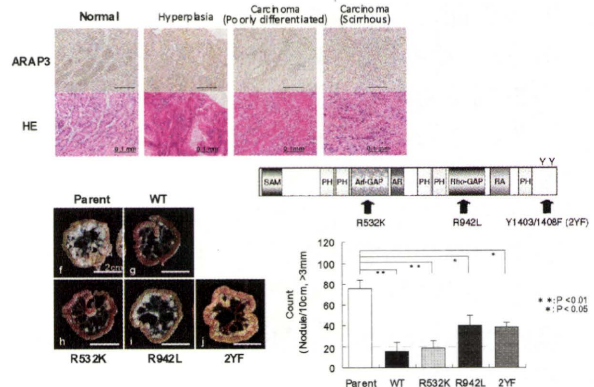
CDCP1 は正常腸管での発現はみられない。小腸、大腸粘膜などにおける発現が報告されているが、チロシンリン酸化レベルはがん部に比較し非常に低い。膜貫通型蛋白質であることから、CDCP1 の発現、もしくはリン酸化部位を標的とした分子標的療法のよい候補分子となりうると考えられた。

### (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がん細胞である 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(図3)。ARAP3 はチロシ

図3：ARAP3の組織発現と播種抑制機能の解析



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。

### D. 考察

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 ドメインや自身のチロシンリン酸化を介して下流に浸潤や播種を抑制するシグナルを伝えることが示唆された。細胞骨格形成の制御や基質接着能がこのような性質に影響を与えたと考えている。

Src による破骨細胞の機能制御は Rho によるアクチン骨格形成や基質との接着、メタロプロテアーゼによる基質分解の制御などが深く関わりと考えられるので、

その制御分子としての ARAP3 や CDCP1 の重要性が明らかになった。

Src ファミリーの各組織における機能を正確に理解するには、その場でリン酸化を受ける基質の同定と、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。その方向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情報を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て研究を押し進めることにより、骨細胞系においても高発現している個々の Src の基質群の機能の詳細を明らかにして、そのバランス制御のモデル系をさらに構築していけるものと考え

#### E. 結論

現在、癌などの分野では Src のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた基礎・臨床研究が進められているが、基質などのシグナル媒介・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、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。副作用が少なくなれば、骨粗鬆症など悪性腫瘍以外の疾患への応用も広がるであろう。骨粗鬆症のように老化などの過程で起こる代謝性変化の「疾患遺伝子」を研究する際には特に、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。その中で特に 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が、今後重要になってくる点は、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。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り、今後ますます必要とされるであろう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yagi, R., Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Nakanishi, Y., Kanai, Y., Sakai, R.: ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene* 30: 1413-1421, 2011.
2. Futami, H., Sakai, R.: All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. *Cancer Lett* 297: 220-225, 2010.
3. Tazaki, T., Sasaki, T., Uto, K., Yamasaki, N., Tashiro, S., Sakai, R., Tanaka, M., Oda, H., Honda, Z., Honda, H.: p130Cas, Crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration. *Hepatology* 52: 1089-1099, 2010.
4. Miyazawa, Y., Uekita, T., Hiraoka, N., Fujii, S., Kosuge, T., Kanai, Y., Nojima, Y., Sakai, R.: CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res* 70: 5136-5146,

2010.

5. Tanaka, M., Kamata, R., Yanagihara, K., Sakai, R.: Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide. *Cancer Sci* 101: 87-93, 2010.
6. Yamaguchi, H., Yoshida, S., Muroi E., Kawamura, M., Kouchi, Z., Nakamura, Y., Sakai, R., Fukami, K.: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase  $\alpha$  are required for invadopodia formation in human breast cancer cells. *Cancer Sci* 101: 1632-1638, 2010.

## 2. 学会発表

### 【国際学会】

1. Sakai, R., Tanaka, M.: A novel phosphoprotein, Ossa/C9orf10 protect cancer cells from oxidative stress-induced apoptosis. (2010.2.5-9) 8th Joint International Conference of AACR/JCA, Hawaii, USA.
2. Miyake, I., Kamata, R., Futami, H., Sakai, R.: Analysis of cellular mediators of oncogenic signaling originating from activated ALK in neuroblastoma cells. (2010.6.21-24) Advances in Neuroblastoma Research 2010, Stockholm, Sweden.
3. Miyake, I., Kamata, R., Futami, H., Sakai, R.: Analysis of oncogenic substrate proteins of activated ALK in neuroblastoma cells. (2010.8.18-22) 16th Protein Phosphorylation and Cell Signaling Meeting, La Jolla, USA.

### 【国内学会】

1. 上北尚正、堺隆一: 癌細胞の足場非依存性増殖における CDCP1 の Autophagy 抑制の重要性 (2010.6.16-17) 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 (金沢)
2. 山口英樹、堺隆一: PI3-キナーゼシグナルは乳癌細胞による浸潤突起形成及び細胞外基質分解を制御する (2010.6.16-17) 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 (金沢)
3. 二見仁康、堺隆一: 活性化 ALK を有する神経芽腫における RET の役割 (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)
4. 大木理恵子、堺隆一: p53 機能を制御する shRNA の網羅的スクリーニング (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)
5. 上北尚正、岩川麗香、横田淳、堺隆一: がん細胞の足場非依存性増殖及び運動能・浸潤能に關与する CDCP1 の Ras による発現誘導と機能制御 (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)
6. 宮澤悠里、上北尚正、山口英樹、堺隆一: がん細胞の浸潤に關与する CDCP1 及び下流因子 PKC $\delta$  の機能解析 (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)
7. 山口英樹、堺隆一、深見希代子: 乳癌細胞の浸潤突起形成における PI3-kinase シグナル伝達経路の役割 (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)
8. 八木礼子、上北尚正、堺隆一: 肺がんの骨転移モデル作成と骨転移関連因子の探索 (2010.9.22-24) 第 69 回日本癌学会総会 (大阪)

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イド研究)  
総括分担研究報告書

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

分担研究者 細井 孝之  
国立長寿医療センター臨床研究・治験推進部長

【研究要旨】

骨折発生抑制を目的とする薬物療法においてビスホスホネート製剤は中心的な役割を担っているが、いまだその効果は不十分でありすべての骨折を防ぐことはできない。我々は薬物療法の効果を上昇させ、さらなる骨折予防効果を得るために遺伝子情報、とくに骨代謝関連遺伝子の機能的遺伝子多型を活用する研究を進めている。今回の研究ではそのような研究の背景となるビスホスホネート製剤不応例の臨床的特徴を検討し、ビタミン K2 製剤の併用に関する方針決定に際しての標的 SNP としてガンマカルボキシラーゼ遺伝子の機能的 SNP を用いることの意義を確認した。

A. 研究目的

骨粗鬆症は骨の脆弱性亢進によって骨折しやすくなった状態であり、特に加齢に伴う骨量の減少と骨質の劣化による原発性骨粗鬆症の患者は我が国だけでも1000万人以上に及ぶことが報告されている。骨粗鬆症の合併症である脆弱性骨折は疼痛や変形による日常生活度や生活の質の低下のみならず、生命予後の悪化をももたらすことが知られている。骨粗鬆症による主な骨折としては、脊椎の圧迫骨折、前腕骨遠位端骨折、上腕骨近位端骨折、大腿骨近位部骨折などがあげられる。これらのうち最も重症である大腿骨近位部骨折の我が国における発生数は2007年において約15万例と推定されており、いまだ増加傾向にある。

骨粗鬆症の予防と治療は基礎治療としての生活習慣改善指導と骨折発生予防を目的とする薬物療法から成り立つ。近年の本領域における薬物療法の進歩には大

きなものがあり、特にビスホスホネート製剤を中心とする骨吸収抑制剤に関しては、骨折予防効果に関するエビデンスが蓄積され、第一選択薬の地位を確保している。一方、本薬剤による骨折発生抑制効果は骨折リスクを約半分にする程度にとどまっており、治療効果のさらなる改善が望まれている。そのためにビスホスホネート製剤に活性型ビタミン D3 製剤(アルファカルシドール)やビタミン K2 製剤(メナテトレノン)の併用が実臨床で行われている。しかしながらこれらの併用療法に対する臨床的根拠や基礎的な裏付けはいまだ十分ではない。

本研究ではビスホスホネートによる治療を受けていたにも関わらず脆弱性骨折が発生した患者、いわばビスホスホネート不応例の臨床的特徴を解析し、併用療法に求められる役割と併用療法に関する臨床的判断を行う際に活用しうる標的 SNP について検討した。



## B. 研究方法

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. 研究結果

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(表1)。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、後者で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(表1)。また、NTXに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

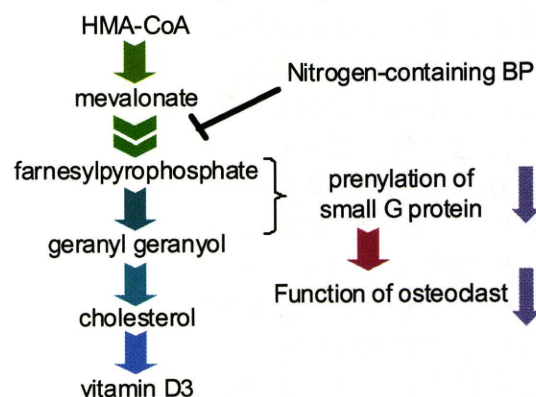
本研究によって、ビスホスホネート製剤服用患者のうち、新規骨折を発症した患者では骨折を発症しなかった患者に比べて、血清ucOCが高値であることが判明した。このことは、ビタミンK2の骨代謝面における不足状態がビスホスホネート製剤の骨折発生抑制効果を阻害していることを示唆する。

窒素含有ビスホスホネートはメバロン酸経路におけるfarnesyl pyrophosphate synthaseを阻害することがその作用機序であることが明らかにされている(図1)。

**表1 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 <sup>2</sup> )	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	<b>0.038</b>

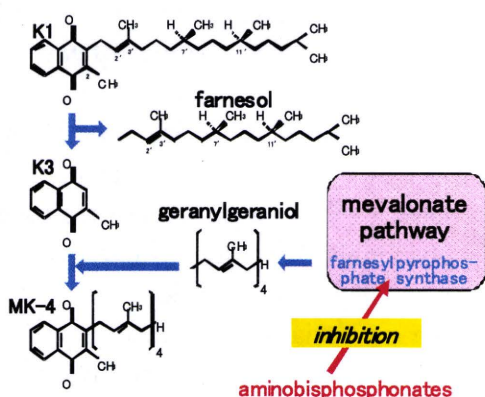
**図1 Nitrogen-containing bisphosphonate and mevalonate pathway**





一方、最近の研究によって、ビタミン K1 やメナテトレノン以外のビタミン K2 は体内でメナテトレノンに変換されることが確かめられ、その反応をつかさどる酵素も同定された(図 2)。この変換において

図2 ビタミンKの変換とメバロン酸経路



利用される geranylgeraniol はメバロン酸経路から供給されるため、窒素含有ビスホスホネートによってこの供給が抑制されることが考えられる。

以上のことから、窒素含有ビスホスホネートを骨粗鬆症の治療に用いた時、骨折予防効果が十分得られなかった患者において骨代謝の面におけるビタミン K 不足がもたらされており、このことは窒素含有ビスホスホネートのビタミン K 代謝に及ぼす影響を介している可能性が示唆された。

骨代謝面における血清 ucOC の高値に反映されるビタミン K 不足は、ビタミン K の摂取不足のみならず、ビタミン K の作用、特にガンマカルボキシラーゼ (GGCX) に対する補酵素としての作用不足が想定される。我々は、GGCX 遺伝子の機能的 SNP を解析した際、酵素活性の低い遺伝子型(325Arg)が存在し、日本人人口の約 4 分の 1 がこのタイプであることを見出した(Bone 40, 451-456, 2007)。ビスホスホネート製剤による骨粗鬆症の薬物療法を行うにあたってこの遺伝子型に関する情報があれば、酵素活性の低い遺伝

子型を持つ患者に対するビタミン K2 製剤の併用を勧めるのに有用であることが予想された。昨年の本研究において、ビスホスホネート製剤を処方する患者において、ビタミン K2 製剤を併用するか否かの決定に GG CX 遺伝子多型性の判定を利用することの有用性を検討するための臨床研究計画を立案した(図 3)。今回の研究

図3 個人の特性を生かした骨粗鬆症薬物療法システムの開発に関する研究の概要



結果はこの研究計画の意義を裏付けるものであり、今後の推進が期待される。また、この計画においてはビタミン K の摂取量に関する情報を収集する必要があり、そのための食生活に関するアンケート(表 2)を採用した。

表2 食生活に関するアンケート

納豆と野菜について、あてはまる番号に○を付けてください。

	①	②	③	④
納豆 (1パック: 50g)	ほとんど 食べない	週1~2回	週3~4回	1日1回以上
野菜 (1回の食事あたり)	ほとんど 食べない	少し食べる	普通に 食べる	たっぷり 食べる

野菜の「普通に食べる」は、きざんだ野菜を片手に1杯くらい、あるいは小鉢1杯くらいが目安。

## E. 結論

ビスホスホネート製剤による骨折予防効果をより向上させるためにビタミンK2製剤を併用することが有用であると思われた。ビタミンK2製剤を併用するか否かの決定にGGCX遺伝子多型性の判定を利用することの有用性を検討する意義が確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 上西一弘、田中司朗、石田裕美、細井孝之、大橋靖雄、門脇孝、折茂肇：牛乳・乳製品摂取とメタボリックシンドロームに関する横断的研究。日本栄養・食糧学会誌 63, 151-159, 2010.
2. Shiraki, M., Yamazaki, Y., Shiraki, Y., Hosoi, T., Tsugawa, N., Okano, T.: High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab* 28, 578-584. 2010.
3. Hosoi, T.: Genetic aspects of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 28, 601-607, 2010.
4. Tanaka, S., Yoshimura, N., Kuroda, T., Hosoi, T., Saito, M., Shiraki, M.: The Fracture and Immobilization Score (FRISC) for risk assessment of osteoporotic Fracture and immobilization in postmenopausal women-A joint analysis of the Nagano, Miyama, and Taiji Cohorts. *Bone* 47, 1064-1070, 2010.
5. Shiraki, M., Kuroda, T., Miyakawa, N., Fujinawa, N., Tanzawa, K., Ishizuka, A., Tanaka, S., Tanaka, Y., Hosoi, T., Itoi, E., Morimoto, S., Itabashi, A., Sugimoto, T., Yamashita, T., Gorai, I., Mori, S., Kishimoto, H., Mizunuma, H., Endo, N., Nishizawa, Y., Takaoka, K., Ohashi, Y., Ohta, H., Fukunaga, M., Nakamura, T., Orimo, H.: Design of a pragmatic approach to evaluate the effectiveness of concurrent treatment for the prevention of osteoporotic fractures: rationale, aims and organization of a Japanese Osteoporosis Intervention Trial (JOINT) initiated by the Research Group of Adequate Treatment of Osteoporosis (A-TOP). *J Bone Miner Metab* 29, 37-43, 2011.
6. Urano T, Narusawa K, Sasaki N, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: A single-nucleotide polymorphism in the hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) gene is associated with spinal osteophyte formation and disc degeneration in Japanese women. *Eur Spine J* 20, 572-577, 2011.
7. Sogabe, N., Maruyama, R., Baba, O., Hosoi, T., Goseki-Sone, M.: Effects of long-term vitamin K1 (phyloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* 48, 1036-1042, 2011.
8. Kou, I., Takahashi, A., Urano, T., Fukui, N., Ito, H., Ozaki, K., Tanaka, T., Hosoi, T., Shiraki, M., Inoue, S., Nakamura, Y., Kamatani, N., Kubo, M., Mori, S., Ikegawa, S.: Common Variant s in a Novel Gene, *FONG* on Chromosome 2q33.1 Confer Risk of Osteoporosis in Japanese. *PLoS ONE* 6, e19641, 2011.

### 2. 学会発表

#### 【国内発表】

1. 細井孝之：[パネルディスカッション] 高齢者の転倒-オーバービュー (2010. 6.24-26) 第 52 回日本老年医学会学術集会 (東京)
2. 細井孝之：[イブニングセミナー・特別講演] 第 7 回ビスフォスフォネー

ト Update：わが国の骨粗鬆症診療における FRAX の位置づけとその活用 (2010.7.21-23) 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (東京)

3. 細井孝之：[カレントコンセプト] 骨の老化とアンチエイジング:骨の老化と骨粗鬆症 (2010.7.21-23) 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (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, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Identification of non-synonymous polymorphisms in the WDSOF1 gene as novel susceptibility markers for low bone mineral density in Japanese postmenopausal women.	<i>Bone</i>	47	636-642	2010
8	Azuma K, Casey SC, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Kirchner S, Blumberg B, <u>Inoue S</u>	Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption.	<i>J Endocrinol</i>	207	257-263	2010
15	Urano T, Narusawa K, Kobayashi S, Shiraki M, Horie-Inoue K, Sasaki N, <u>Hosoi T</u> , Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	Association of HTRA1 promoter polymorphism with spinal disc degeneration in Japanese women.	<i>J Bone Miner Metab</i>	28	220-226	2010
22	Fujita M, Sugama S, Sekiyama K, Sekigawa S, Tsukui T, Nakai M, Waragai M, Takenouchi T, Takamatsu Y, Wei J, Rockenstein E, LaSpada AR, Masliah E, <u>Inoue S</u> , Hashimoto M	A $\beta$ -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain.	<i>Nat Commun</i>	1	110	2010
31	Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, Hanneschlager N, Schlee M, Rothenfusser S, Barchet W, Kato H, Akira S, <u>Inoue S</u> , Endres S, Peschel C, Hartmann G, Hornung V, Ruland J	RIG-I is a dual activator of Card9 and inflammasome signaling for IL-1 $\beta$ production upon RNA virus recognition.	<i>Nat Immunol</i>	11	63-69	2010
39	Azuma K, Urano T, Ouchi Y, <u>Inoue S</u>	Glucocorticoid-induced gene tripartite motif-containing 63 (TRIM63) promotes differentiation of osteoblastic cells.	<i>Endocr J</i>	57	455-462	2010
47	Ikeda K, Fukushima T, Ogura H, Tsukui T, Mishina M, Muramatsu M, <u>Inoue S</u>	Estrogen regulates the expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit epsilon 4 (Grin2d), that is essential for the normal sexual behavior in female mice.	<i>FEBS Lett</i>	584	806-810	2010
52	Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Takita H, Kabasawa S, Kawasaki I, Ohkubo T, Kurihara S, Iizuka H, Miyashita Y, Katayama S, Awata T, Yoneya S, <u>Inoue S</u>	Phenotype and Genotype Characteristics of Age-related Macular Degeneration in a Japanese Population.	<i>Ophthalmol</i>	117	928-938	2010

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
63	Kurosawa T, Hiroi H, Momoeda M, <u>Inoue S</u> , Taketani Y	Clomiphene citrate elicits estrogen agonistic/antagonistic effects differentially via estrogen receptors $\alpha$ and $\beta$ .	<i>Endocr J</i>	57	517-521	2010
68	Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ijichi N, Ikeda K, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Muramatsu M, Homma Y, <u>Inoue S</u>	Differential expression of estrogen-related receptors $\beta$ and $\gamma$ (ERR $\beta$ and ERR $\gamma$ ) and their clinical significance in human prostate cancer.	<i>Cancer Sci</i>	101	646-651	2010
74	Ueyama K, Ikeda K, Sato W, Nakasato N, Horie-Inoue K, Takeda S, <u>Inoue S</u>	Knock-down of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and <i>in vivo</i> tumor growth.	<i>Cancer Gene Ther</i>	17	624-632	2010
83	Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, Takagi K, Akahira JI, Sakyu T, Watanabe M, <u>Inoue S</u> , Ishida T, Ohuchi N, Sasano H	Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression.	<i>Cancer Sci</i>	101	2670-2675	2010
89	Murata T, Takayama K, Katayama S, Urano T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Takahashi S, Kawazu C, Hasegawa A, Ouchi Y, Homma Y, Hayashizaki Y, <u>Inoue S</u>	miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression.	<i>Prostate Cancer Prostatic Dis</i>	13	356-361	2010
95	Oyama M, Nagashima T, Suzuki T, Kozuka-Hata H, Yumoto N, Shiraishi Y, Ikeda K, Kuroki Y, Gotoh N, Ishida T, <u>Inoue S</u> , Kitano H, Okada-Hatakeyama M	Integrated Quantitative Analysis of the Phosphoproteome and Transcriptome in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer.	<i>J Biol Chem</i>	286	818-829	2011
107	Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, <u>Inoue S</u>	Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells.	<i>Oncogene</i>	30	619-630	2011
119	Urano T, Narusawa K, Sasaki N, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, <u>Inoue S</u>	A single-nucleotide polymorphism in the hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) gene is associated with spinal osteophyte formation and disc degeneration in Japanese women.	<i>Eur Spine J</i>	20	572-577	2011

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
125	Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Fujimura T, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, <u>Inoue S</u>	Estrogen-related receptor $\gamma$ modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	123	1-7	2011
132	Tsuchihashi T, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Kabasawa S, Takita H, Ueyama K, Okazaki Y, <u>Inoue S</u> , Awata T, Katayama S, Yoneya S	Association of the gene variants of compliment factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes with response of age-related macular degeneration to photodynamic therapy.	<i>Ophthalmol</i>	118	93-100	2011
140	Nakajima Y, Osakabe A, Suzuki T, Kishimoto Y, Kuroda T, Fujimura T, Homma Y, Murayama A, <u>Inoue S</u> , Yanagisawa J	KLF5-ER $\beta$ pathway is responsible for the contradictory effects of estrogen on prostate tumor formation.	<i>Sci Signal</i>	4	ra22	2011
152	Kou I, Takahashi A, Urano T, Fukui N, Ito H, Ozaki K, Tanaka T, <u>Hosoi T</u> , Shiraki M, <u>Inoue S</u> , Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M, Mori S, Ikegawa S	Common Variant s in a Novel Gene, FONG on Chromosome 2q33.1 Confer Risk of Osteoporosi s in Japanese.	<i>PLoS ONE</i>	6	e19641	2011
160	Obinata D, Takayama K, Urano T, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Ouchi Y, Takahashi S, <u>Inoue S</u>	Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer.	<i>Int J Cancer</i>	<i>in press</i>		
168	Ikeda K, Tsukui T, Horie-Inoue K, <u>Inoue S</u>	Conditional expression of constitutively active estrogen receptor $\alpha$ in osteoblasts increases bone mineral density in mice.	<i>FEBS Lett</i>	<i>in press</i>		
175	Akimoto C, Ueda T, Inoue K, Yamaoka I, Sakari M, Obara W, Fujioka T, Nagahara A, Nonomura N, Tsutsumi S, Aburatani H, Miki T, Matsumoto T, Kitagawa H, <u>Kato S</u>	Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	107	19891-19896	2010
181	Yokoyama A, Okuno Y, Chikanishi T, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R, <u>Kato S</u>	KIAA1718 is a histone demethylase that erases repressive histone methyl marks.	<i>Genes Cells</i>	15	867-873	2010
188	Youn MY, Takada I, Imai Y, Yasuda H, <u>Kato S</u>	Transcriptionally active nuclei are selective in mature multinucleated osteoclasts.	<i>Genes Cells</i>	15	1025-1035	2010
199	Takada I, Kouzmenko AP, <u>Kato S</u>	PPAR- $\gamma$ signaling crosstalk in mesenchymal stem cells.	<i>PPAR Research</i>	2010	341671	2010

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
205	Matsuyama R, Takada I, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Tsuji N, Kitagawa H, Fujiki R, Kim M, Kouzu-Fujita M, Yano T, <u>Kato S</u>	Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1.	<i>J Biol Chem</i>	285	18166-18176	2010
216	Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, <u>Kato S</u>	Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor- $\alpha$ .	<i>Mol Endocrinol</i>	24	877-885	2010
226	Chikanishi T, Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, <u>Kato S</u>	Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	39	865-870	2010
232	Takada I, Tsuji N, Youn MY, Fujiyama S, Okada M, Imai Y, Kondo S, Kitakawa H, Yasuda H, <u>Kato S</u>	Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts.	<i>Ann N Y Acad Sci</i>	1192	201-207	2010
239	Youn MY, Fujiyama-Nakamura S, Takada I, Imai Y, <u>Kato S</u>	Identification of osteoclastic factors in the nuclear envelope of mature, multinucleated osteoclasts.	<i>Biosci Biotechnol Biochem</i>	74	1956-1959	2010
243	Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, Fujiki R, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Kimura S, Fujiyama S, Ueda T, Umetsu D, Ito T, Takeyama K, <u>Kato S</u>	A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor.	<i>Genes Dev</i>	24	159-170	2010
255	Ochiai E, Kitagawa H, Takada I, Fujiyama S, Sawatsubashi S, Kim MS, Mezaki Y, Tsushima Y, Takagi K, Azuma Y, Takeyama K, Yamaoka K, <u>Kato S</u> , Kamimura T	CDP/cut is an osteoblastic coactivator of the vitamin D receptor (VDR).	<i>J Bone Miner Res</i>	25	1157-1166	2010
265	Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, <u>Kato S</u> , Chambon P, Metzger D	Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	107	14327-14332	2010
271	Takahashi S, Watanabe T, Okada M, Inoue K, Ueda T, Takada I, Watabe T, Yamamoto Y, Fukuda T, Nakamura T, Akimoto C, Fujimura T, Hoshino M, Imai Y, Metzger D, Miyazono K, Minami Y, Chambon C, Kitamura T, Matsumoto T, <u>Kato S</u>	Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	107	4938-4943	2011



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
277	Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer AC, Igarashi K, Kanno J, Brown M, <u>Kato S</u>	Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex.	<i>Nat Cell Biol</i>		<i>in press</i>	
300	Tazaki T, Sasaki T, Uto K, Yamasaki N, Tashiro S, <u>Sakai R</u> , Tanaka M, Oda H, Honda Z, Honda H	p130Cas, Crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration.	<i>Hepatology</i>	52	1089-1099	2010
311	Futami H, <u>Sakai R</u>	All-trans retinoic acid downregulates ALK in neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK.	<i>Cancer Lett</i>	297	220-225	2010
317	Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, <u>Sakai R</u>	CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation.	<i>Cancer Res</i>	70	5136-5146	2010
329	Tanaka M, Kamata R, Yanagihara K, <u>Sakai R</u>	Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1-derived peptide.	<i>Cancer Sci</i>	101	87-93	2010
336	Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, Kawamura M, Kouchi Z, Nakamura Y, <u>Sakai R</u> , Fukami K	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and PIP5-kinase Ia are required for invadopodia formation in human breast cancer cells.	<i>Cancer Sci</i>	101	1632-1638	2010
343	Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y, <u>Sakai R</u>	ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion	<i>Oncogene</i>	30	1413-1421	2011
352	Shiraki M, Yamazaki Y, Shiraki Y, <u>Hosoi T</u> , Tsugawa N, Okano T	High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment.	<i>J Bone Miner Metab</i>	28	578-584	2010
359	<u>Hosoi T</u>	Genetic aspects of osteoporosis.	<i>J Bone Miner Metab</i>	28	601-607	2010
366	Tanaka S, Yoshimura N, Kuroda T, <u>Hosoi T</u> , Saito M, Shiraki M	The Fractura and Immobilization Score(FRISC) for risk assessment of osteoporotic Fracture and immobilizationin postmenopausal women-A joint anaiysis of the Nagano, Miyama, and Taiji Cohorts.	<i>Bone</i>	47	1064-1070	2010

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
373	Shiraki M, Kuroda T, Miyakawa N, Fujinawa N, Tanzawa K, Ishizuka A, Tanaka S, Tanaka Y, <u>Hosoi T</u> , Itoi E, Morimoto S, Itabashi A, Sugimoto T, Yamashita T, Gorai I, Mori S, Kishimoto H, Mizunuma H, Endo N, Nishizawa Y, Takaoka K, Ohashi Y, Ohta H, Fukunaga M, Nakamura T, Orimo H	Design of a pragmatic approach to evaluate the effectiveness of concurrent.	<i>J Bone Miner Metab</i>	29	37-43	2011
380	Sogabe N, Maruyama R, Baba O, <u>Hosoi T</u> , Oseki-Sone M	Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats.	<i>Bone</i>	48	1036-1042	2011

刊行物の別刷

創業基盤推進事業

刊行物(総括)

東京大学・井上 聡

TDK CD-R 700