

201007005B (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20～22年度 総合研究報告書

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20～22年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 聡  
平成23（2011）年5月

# 目 次

I.	総合研究報告書	
	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 - 19
	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 - 28
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

総合研究報告書

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)  
総合研究報告書

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、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 ( $\geq 0.2$ )、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. TGFβシグナル伝達因子と骨粗鬆症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TGFβシグナル伝達調節因子であるヒト Smad6 遺伝子における遺伝子多型に関して、TaqMan PCR 法を用いて genotype の分類を行い、骨密度ならびに各種臨床データに関する同時に測定し、得られたデータに関して統計学的な解析を行った。Smad6 遺伝子上にある 4SNP に関して連鎖不平衡解析を行った。

TGFβシグナルのリガンドである TGFβ1 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う SNP(Pro10Leu)の遺伝子型を、同様の方法にて決定し、各種臨床データに関して相関解析を行った。さらに、TGFβ1 遺伝子 Pro10LeuSNP と Smad6 遺伝子上の SNP との相互作用による骨量との相関に関する検討を行った。

### 4. Wnt-β カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症 (分担：井上)

日本人非血縁閉経後女性を対象として、Wnt-β カテニンシグナル伝達因子であるヒト LRP5 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う遺伝子多型(A1330V)に関して、TaqMan PCR 法を用いて genotype の分類を行い、SNP を決定した。各種臨床データに関して相関解析を行った。

293T 細胞に pcDNA3-LRP5 野生型 (LRP5-A1330)、もしくは pcDNA3-LRP5 遺伝子変異型(LRP5-V1330)、さらには pcDNA3-Wnt3A、以上の発現ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。同時に Wnt-β カテニンシグナルの下流シグナルである TCF-Lef 活性を測定する Luciferase ベクターである Topflash ベクターをトランスフェクションすることで LRP5 遺伝子多型が Wnt-β カテニンシグナルに与える影響を *in vitro* で検討した。

### 5. 骨芽細胞系における GR 応答遺伝子の解析 (分担：井上)

骨芽細胞系細胞としてヒトの骨肉腫由来細胞株である SaOS2 を用いた。SaOS2 細胞を Phenol red free の DMEM に活性炭処理した血清を 5% 加え、Dexamethasone  $10^{-8}$ M にて 6 時間刺激を行った。Dexamethasone 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 Cy3, Cy5 でラベルした cDNA を合成し、Agilent 社の 44K 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。

誘導が確認された遺伝子のうち、骨芽細胞系において新規に同定された TRIM63 に関しては、C 末に FLAG tag、HA tag を tandem に付加した蛋白を作成し、SaOS2 に恒常的に高発現する細胞をそれぞれ樹立した。これらの細胞を大量培養し、プロテオソーム阻害薬である MG132 にて処理した後、細胞溶解液を FLAG 抗体、HA 抗体による免疫沈降法にて 2 段階精製を行い、SDS-PAGE を行った後、PVDF メンブレンに転写、金コロイド染色を行った。共沈した蛋白をメンブレンより切り出し、TOF-MS にて結合蛋白の同定を試みた。

TRIM63 誘導の生物学的意義を解析するため、MTT アッセイにより増殖速度の解析を行い、定量的 Reverse transcriptase-PCR 法にて、分化マーカー(アルカリフォスファターゼ・オステオカルシン)の発現解析を行った。分化の解析は、分化刺激を与えた条件下(BMP9 刺激)にて行った。

### 6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞 (分担：井上)

ステロイド受容体のうち、グルココルチコイド受容体(GR)、ミネラルコルチコイド受容体(MR)、アンドロゲン受容体(AR)、プロゲステロン受容体(PR)の 4 つは、共通したゲノム上のステロイドホル



モン応答配列(SHRE)を認識し、ホモ二量体として SHRE に結合して、下流の応答遺伝子の転写制御を行っている。我々はこれまで、クロマチン免疫沈降法(ChIP)とDNAアレイを合わせたChIP-on-chip法を用いて、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における AR 結合部位の解析を行い、アンドロゲン受容体標的因子の同定に成功している(Takayama et al., *Oncogene*, 2007; Takayama et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; Takayama et al., *Cancer Res*, 2009)。本研究では、各ステロイド受容体を安定発現させたヒト胎児腎臓上皮 293 細胞をモデル細胞として作製し、ChIP-on-chip 法にて同定した AR 結合部位のゲノム領域について、クロマチン免疫沈降法による受容体の結合性を解析し、近傍遺伝子について、ステロイドによる遺伝子発現への影響を検討した。

GR、MR、AR を発現させた 293GR、293MR、293AR 細胞において、ホルモン枯渇 3 日後、溶媒(0.1%エタノール)または各受容体に対する特異的ステロイド(293GRには dexamethasone (Dex, 10 nM)、293MRには aldosterone (Aldo, 100 nM)、293ARには R1881 (10 nM))にて 1 時間刺激し、各受容体に対する特異的抗体(Santa Cruz Biotechnology 社)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、ホルモン刺激による受容体結合の濃縮倍率をリアルタイム PCR にて定量的に検討した。受容体結合部位の最も近傍の遺伝子発現におけるステロイド応答性について、経時的に各細胞より RNA を調整して、定量的 RT-PCR にて遺伝子発現量を検討した。

#### 7. 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

#### 8. 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。

#### 9. 骨芽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 $\alpha$ 、 $\beta$ 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。

#### 10. 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 $\alpha$ (caER $\alpha$ )の作製とルシフェラーゼアッセイ

ヒト ER $\alpha$  発現ベクターは Flag-タグをつけた ER $\alpha$  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 $\alpha$  (caER $\alpha$ )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(dcc-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 $\alpha$  または ER $\alpha$  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 $\beta$ -エストラジオール(E2)または 1 $\mu$ 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<sup>floxed</sup>-caER $\alpha$  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  $\beta$ -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 $\alpha$  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<sup>floxed</sup>-caER $\alpha$  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<sup>floxed</sup>-caER $\alpha$  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 ColI-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 ColII-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 $\alpha$  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 $\alpha$ <sup>ColI</sup> および caER $\alpha$ <sup>ColII</sup>)を作製した。ROSA26LacZ レポーターマウスと ColI-Cre または ColII-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  $caER\alpha^{Col1}$  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

$caER\alpha^{Col1}$  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  $\alpha$ -MEM 培地で播種し、 $caER\alpha$  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  $17\beta$ -エストラジオール (E2) または  $1\mu\text{M}$  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  $ER\alpha$ 、 $caER\alpha$  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

野生型マウスの骨髓細胞を採取し、10% FBS、5 ng/mL の M-CSF を含有する  $\alpha$ -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、 $caER\alpha^{Col1}$  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。

#### 11. エストロゲン受容体 $\alpha$ ( $ER\alpha$ )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  $\alpha$ ( $ER\alpha$ )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  $ER\alpha$  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。 $ER\alpha$  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  $ER\alpha$  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。

#### 12. ビタミン K 受容体 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 129Strain(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。

#### 13. 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。

14. 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( $\geq 0.2$ )、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。

15. 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)

1) *In vitro* で破骨細胞に分化しうる Raw 264.7 細胞を RANKL 刺激することで破骨細胞に分化させ、内在する  $ER\alpha$  に結合する因子群を  $ER\alpha$  抗体カラムで精製、同定した。その後、破骨細胞内での  $ER\alpha$  に対する転写活性への影響などを検討した

2) 骨芽細胞における  $ER\alpha$  の生体内高次機能を解明するために、 $ER\alpha$  遺伝子座に loxP 配列を挿入した  $ER\alpha$  flox マウスと骨芽細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Col.  $\alpha 1(I)$ -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  $ER\alpha$  KO (Ob- $ER\alpha$  KO) マウスを作出しその表現型を解析した。

3) 骨芽細胞における VDR の生体内高次機能を解明するために、VDR flox マウスと Col.  $\alpha 1(I)$ -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 VDR KO (Ob-VDR KO) マウスを作出しその表現型を解析した。

16. 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り、エストロゲン受容体と直接結合してその作用に関わる可能性があるなどのこれまでの研究から、骨粗鬆症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、Cas の接着・浸潤に関わる機能解析を行うとともに、シンガポール大学の澤田泰宏先生との共同研究で、骨において重要なメカニカルストレスを細胞にかけたときに、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、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。

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わ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、さらに解析を進めた。

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、そのほかの生理機能の探索など解析を進めた。

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した。

(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成した。実際には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できた。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た。

17. 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)

①ビスホスホネート不応例の臨床的特徴に関する検討: 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)、血清低カルボキシル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。

②GGCX 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関する検討: 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  $22.6 \pm 1.6$  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 Eiyokun (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。多型性部位を含む領域を 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-Weinberg 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。

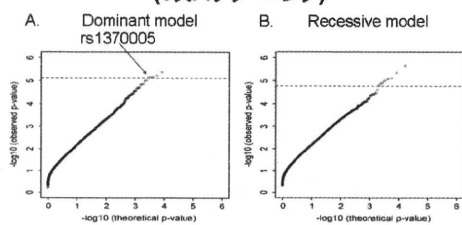
③ビスホスホネート製剤を処方する患者におけるビタミン K2 製剤併用に関するオーダーメイド医療の検討：ビスホスホネート製剤を処方する患者において、ビタミン K2 製剤を併用するか否かの決定に GGCX 遺伝子多型性の判定を利用することの有用性を検討するための臨床研究計画について、研究対象、研究実施場所、およびサンプルの解析体制について検討する。特に研究対象者数については、GCX 遺伝子の機能的 SNP における遺伝子型の分布ならびに、それぞれの遺伝子型によってもたらされる GGCX 蛋白質の酵素活性をもとに仮説の検証に要するに足るよう推定して決定する。

### 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)

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 ( $\geq 0.2$ )、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 1)。

Fig 1 50KSNP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)



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 1A, Dominant モデル 5SNPs, B, Recessive モデル 8SNPs, Table 1)。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二集団 499 名の閉経後女性 (平均年齢 +

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			
	dbSNP ID	Gene symbol <sup>1</sup>	Ch	Allele	MAF	Call Rate	HWE test	Higher	Lower	P value	Threshold
A											
rs1013880	-		3p14.2	C-T	0.275	1.000	0.547	98/19	72/82	3.94E-07	-0.048
rs165222	-		2q24.3	A-C	0.485	0.988	0.113	104/77	15/48	4.24E-06	-0.044
rs794607	-		17q22	C-T	0.264	0.996	0.250	69/50	110/21	5.93E-06	-0.053
rs229042	-	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	6.99E-06	0.112
B											
rs404442	-		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	16/15	195/25	4.38E-06	-0.086
rs2368569	-		16p12	C-T	0.318	1.000	0.489	55/64	26/105	7.69E-06	0.037
rs505989	-		17q22	T-C	0.256	0.972	0.294	106/23	81/52	8.24E-06	-0.048
rs1464236	-		9q21.3	C-C	0.447	0.988	0.177	79/10	153/8	1.90E-05	-0.149
rs10514346	-	GPR98	5q14.3	A-G	0.233	0.992	0.023	8/12	197/33	1.26E-05	-0.078
rs10494622	-		16p11	T-C	0.332	0.976	0.278	17/14	191/23	1.37E-05	-0.094
rs70915	-		9q31.3	C-C	0.209	0.992	0.346	5/35	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.

<sup>1</sup> SNP in or adjacent to (within 60 kb) a gene.

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)とて、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. TGFβ シグナル伝達因子と骨粗鬆症

TGFβ シグナル伝達因子である Smad6 のイントロン 3 に存在する SNP(rs755451) においては、全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた(Fig 2A, B, Table 1, 全身骨骨密度:  $P=0.0004$ , 腰椎骨密度:  $P=0.0052$ )。また、イントロン 3 に存

Fig 2

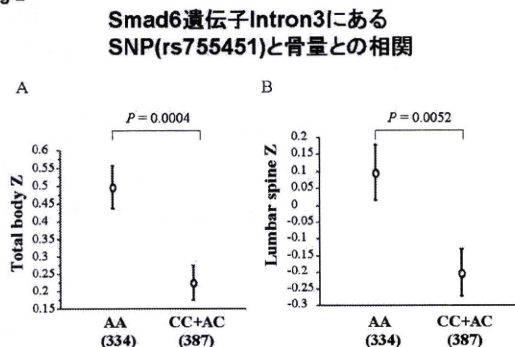


Table 2

**Smad6 遺伝子 Intron3 にある SNP(rs755451) と臨床データとの関連解析(IVS3+26115A>C, rs755451)**

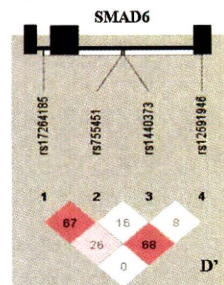
Items	Genotype (mean ± SD)		P value
	AA	CC + AC	
Number of subjects	334	387	
Age (years)	65.9 ± 7.3	66.0 ± 7.4	NS
Height (cm)	151.0 ± 5.6	150.4 ± 6.0	NS
Body weight (kg)	51.5 ± 7.8	50.6 ± 7.5	NS
Total body BMD (Z score)	0.50 ± 1.07	0.23 ± 0.98	0.0004
Lumbar spine BMD (Z score)	0.10 ± 1.48	-0.20 ± 1.38	0.0050
I-OC (ng/mL)	8.2 ± 4.5	8.3 ± 4.2	NS
DPD (pmol/μmol/Cr)	7.4 ± 4.2	7.6 ± 2.7	NS
Intact PTH (pg/mL)	37.3 ± 18.9	36.4 ± 14.9	NS
Calcitonin (pg/mL)	23.4 ± 10.1	23.5 ± 11.0	NS
BMI	22.5 ± 3.0	22.4 ± 3.1	NS

BMD, bone mineral density; I-OC, intact-osteocalcin; DPD, deoxypyridinoline; PTH, parathyroid hormone; BMI, body mass index; NS, not significant. Statistical analysis was performed according to the method described in the text.

在する rs755451 以外にも Smad6 遺伝子イントロン 1 に存在する SNP (rs17264185)、イントロン 3 における SNP (rs1440373)、さらにはエクソン 4 における SNP (rs12591946) も同時に決定し、これら遺伝子多型間の連鎖不平衡に関して検討を行った。その結果、これら遺伝子多型は連鎖不平衡にはないことが示された(Fig 3)。

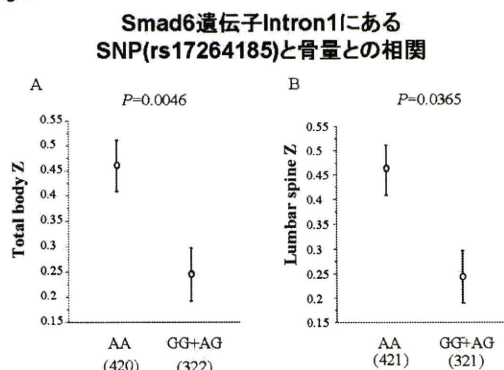
Fig 3

**Smad6 遺伝子上の SNP における連鎖不平衡に関する検討**



また、これら SNP の中では Smad6 遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP (rs17264185) も全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた(Fig 4A, B, Table 1, 全身骨骨密度:  $P=0.0046$ , 腰椎骨密度:  $P=0.036$ )。

Fig 4

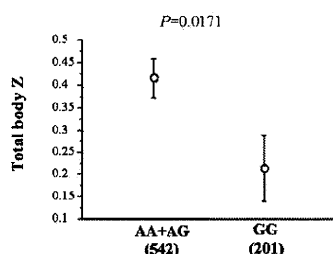


TGFβ シグナル伝達因子と骨量の関連解析においては、過去に、日本人を対象として、そのリガンドである TGFβ1 遺伝子上に存在するアミノ酸変異を伴う遺伝子多型(Pro10Leu, rs1800470)と骨量との関連に関して報告がある。そこで、今回、我々は本集団において TGFβ1 Pro10Leu と骨量との関連を検討した。その結果、

Pro10Leu 多型は全身骨骨密度と有意に相関した(Fig 5,  $P=0.0171$ )。さらに、Smad6

Fig 5

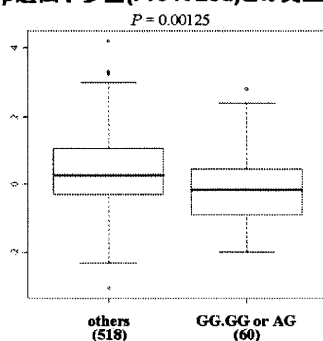
TGF $\beta$ 1遺伝子多型(Pro10Leu)と骨量との相関



遺伝子上の SNP の中で、TGF $\beta$ 1 遺伝子 Pro10Leu 多型と骨量との相関を示す P 値をさらに低下させる SNP を探索した結果、TGF $\beta$ 1 遺伝子において 10Leu 変異となるホモ体である GG 型で、かつ Smad6 遺伝子のイントロン 1 において GG もしくは AG 型となる集団とその他の集団においては全身骨骨量の相関を示す P 値が 0.00125 とさらに低下した (Fig 6,  $P=0.00125$ )。このことから、Smad6 のイン

Fig 6

Smad6遺伝子Intron1にあるSNP(rs17264185)とTGF $\beta$ 遺伝子多型(Pro10Leu)との交互作用



トロン 1 での SNP と TGF $\beta$ 1 遺伝子 Pro10Leu とは、相互作用を有して骨量を規定することを新たに見出した。

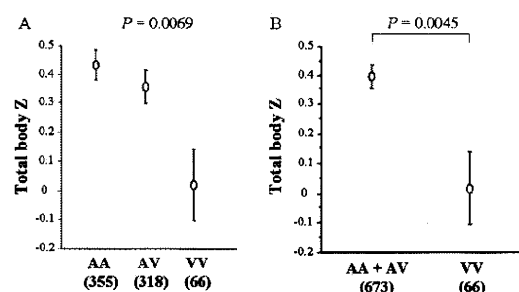
#### 4. Wnt- $\beta$ カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症

我々をはじめとする複数のグループが Wnt- $\beta$  カテニンシグナルの制御因子である LRP5 に存在する SNP が骨量と相関することを明らかにし、近年注目されている。今回、我々は今までに報告した集団

と別の集団 739 名を対象にした解析により、LRP5 遺伝子におけるアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)と全身骨骨量との相関解析を行った。その結果、AA 型 355 名、AV 型 318 名、VV 型 66 名の 3 群に genotyping された。これら 3 群と全身骨骨量との相関解析を Kruskal-Wallis 解析により行ったところ、有意な相関を認めた(Fig 7A,  $P=0.0069$ )。さらに AA 型+AV 型と VV

Fig 7

LRP5A>V多型と骨量との相関



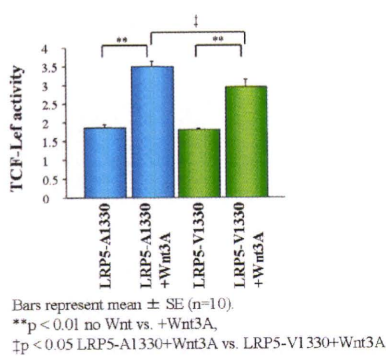
型とを un-paired t test により比較検討したところでも有意な相関を認めた(Fig 8B,  $P=0.0045$ )。以上より、今回の日本人集団においても本 SNP と骨量とは再現性をもって有意に相関した。

次に、A1330V 変異が Wnt- $\beta$  カテニンシグナルに与える影響を *in vitro* で検討した。293T 細胞に pcDNA3-LRP5 野生型 (LRP5-A1330)、もしくは pcDNA3-LRP5 遺伝子変異型 (LRP5-V1330)、さらには pcDNA3-Wnt3A、以上の発現ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションを行った。同時に Wnt- $\beta$  カテニンシグナルの下流シグナルである TCF-Lef 活性を測定する Luciferase ベクターである Topflash ベクターをトランスフェクションすることで、LRP5 遺伝子多型が Wnt- $\beta$  カテニンシグナルに与える影響を検討した。その結果、LRP5-A1330 は Wnt3A により活性化されるが、LRP5-V1330 では Wnt3A による活性化が減弱することを見出した(Fig 8, 次頁)。

#### 5. 骨芽細胞系における GR 応答遺伝子の

Fig 8

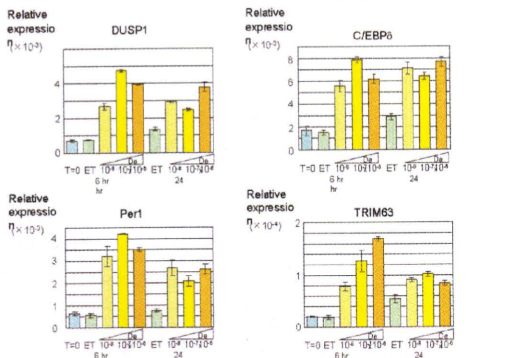
LRP5A>V多型がWntシグナルに与える影響



解析

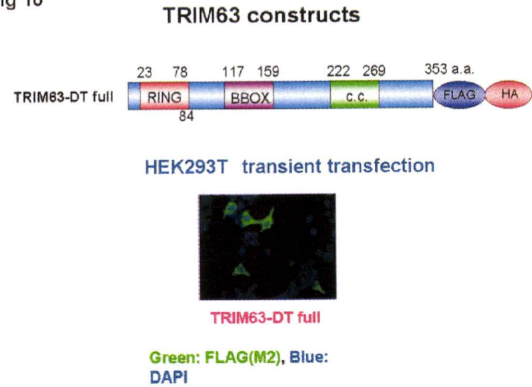
マイクロアレイにおいて、SaOS2 細胞の Dexamethasone 刺激により発現が誘導されていた遺伝子のうち、DUSP1、C/EBP $\delta$ 、Per1、TRIM63 に関して、定量的 Reverse transcriptase-PCR 法により 2 倍から 8 倍の発現上昇を確認した(Fig 9)。このうち、

Fig 9 Confirmation by quantitative real-time PCR method (Internal Control: 18S rRNA)



TRIM63 は、MuRF1 (Muscle Specific Ring Finger Protein)とも呼ばれ、従来骨格筋における発現しか知られていなかった。TRIM63 は筋組織においては、E3 ubiquitin ligase としての機能が知られ、心筋においては troponin I、骨格筋においてはミオシン重鎖の分解に関わることが報告されている。この骨芽細胞においても、何らかの蛋白分解に関わっていると考えた。FLAG tag、HA tag を tandem に付加した TRIM63 を恒常的に高発現した SaOS2 を樹立し(Fig 10)、FLAG 抗体および HA 抗体による二段階の免疫沈降法を用いた精製にて基質蛋白の同定を試みたが、TRIM63 自身の修飾蛋白のみしか検出す

Fig 10



ることができなかった(Fig 11)。

TRIM63 の高発現株の独立した 2 クローンを用いて増殖能・分化能を評価したところ、TRIM63 は SaOS2 の増殖は抑制したが(Fig 12)、SaOS2 の分化は促進する傾向を認めた(Fig 13, 次頁)。

Fig 11

Two step purification

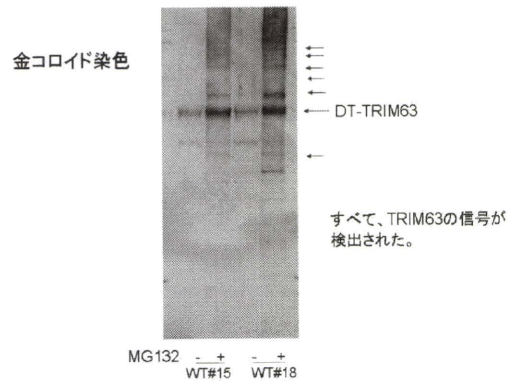
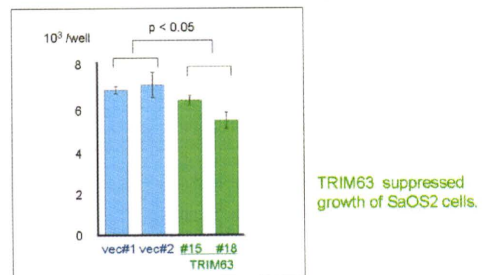


Fig 12

Growth assay of TRIM63 overexpressing cells

SaOS2 cells stably express wild type TRIM63 or vector clones were plated  $1 \times 10^3$  /well and cultured for 48 hours. Cell number was analyzed by MTT assay.



6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞

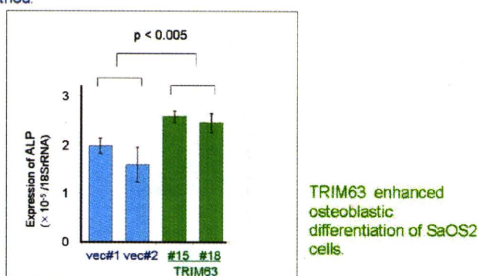
ヒト前立腺癌細胞における AR 結合部位の解析結果から、ステロイド受容体結合部位としても機能するゲノム領域を探



Fig 13

**ALP expression of TRIM63 overexpressing cells**

SaOS2 cells stably express wild type TRIM63 were treated with BMP9 for 4 days and mRNA of ALP was evaluated by quantitative RT-PCR method.



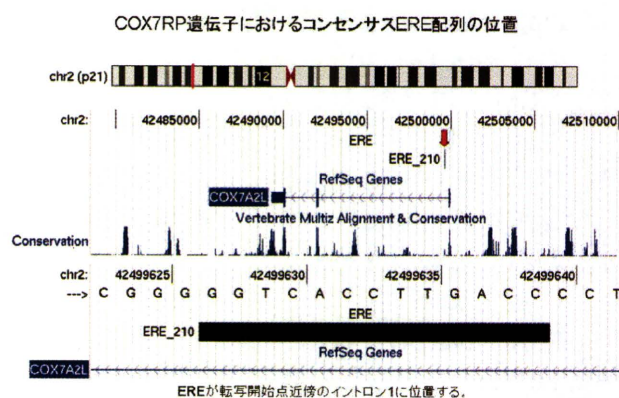
索する目的で、ENCODE 領域(米国におけるヒトゲノムの機能解析計画において、パイロット研究の領域として選択されたゲノムの約 1%にあたる 30 Mb の領域)における、ChIP-on-chip 法により同定された AR 結合部位 10 箇所(しきい値  $P < 1e-5$ , Table 2)について、リガンド依存性のステロイド受容体結合能について検討を行った。各細胞に対するリガンド 1 時間刺激により、2 倍以上の受容体結合性濃縮を認める領域として、GR では 4 箇所、MR では 6 箇所、AR では 4 箇所検出された。3 つの受容体に共通なりガンド依存性受容体結合性の高い領域の 1 つとして ARBS\_2 と ARBS\_10 があり、この部位は PGC (pepsinogen C)の近位プロモーターと CDH2(cadherin 2)のイントロン 1 に位置していた。PGC については、ヒト乳癌細胞 T47D における各種ステロイド刺激(アンドロゲン、グルココルチコイド、プロゲステロン)による遺伝子発現調節が報告されており(Balbín et al., *J Biol Chem*, 1996)、本手法により、各種ステロイドにより発現調節を受ける遺伝子の同定が可能であることが示された。PGC 遺伝子については、特に 293GR に対する GC 刺激により、発現上昇することが RT-PCR により示された。CDH2 のイントロン 1 はゲノム配列解析により、SHRE がクラスターを形成しているが、リガンド刺激による CDH2 遺伝子発現は大きく変化しないことから、このゲノム領域は、各種ステロイドにより発現制御を受けていることが考えられ

た。また、ARBS\_5 は GR と AR の 2 つの受容体において、受容体結合性が 2 倍以上に濃縮されており、これは PFTK1 遺伝子の転写開始 3 kb 上流に位置していた。ステロイド刺激による PFTK1 遺伝子の発現変化は 2 倍以下であった。ARBS\_1 については、MR で 2 倍以上、GR と AR では 2 倍に到達しないものの 2 倍近くの受容体結合性の濃縮が認められ、近傍遺伝子の UGT1A1 の発現については、GR と MR で、2 倍以上の発現上昇が認められた。

7. 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 $\alpha$  結合領域であることが、MCF7 細胞における ER $\alpha$  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 $\alpha$  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 14)。また、37 個の ERE を

Fig 14



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



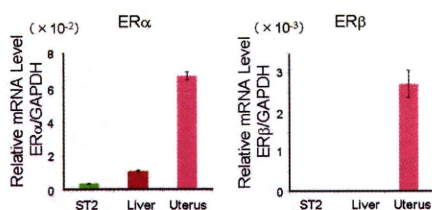
て E2 応答性が認められる遺伝子が数個同定され、特にγ-アミノ酪酸(GABA)代謝系酵素が2つ同定された。

### 8. 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 (ERα)が発現していることが確認され(Fig 15)、エスト

Fig 15

#### 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ERαの発現を認める。

ロゲン刺激にตอบสนองすることが推測された。尚、ST2 において、エストロゲン受容体β(ERβ)の発現は、認められなかった。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 細胞のエストラジオール刺激により発現が誘導されていた遺伝子を Table 3, 4 に、発現が抑制されていた遺伝子を Table 5 に示す。

Table 3 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
<b>Up-regulated genes</b>	
4.764755	GPCRX
2.419512	Guanylate binding protein 4 (Gbp4)
2.400259	Thrombospondin 2 (Thbs2)
2.080794	Neurtin 1 (Nrn1)
2.008124	Transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3)
1.855599	Proviral integration site 1 (Pim1)
1.870091	Myocyte enhancer factor 2A (Mef2a)
1.580994	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 (Ern1)
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)
<b>Down-regulated genes</b>	
0.627861	Nuclear factor I/B (Nfib), transcript variant 1
0.631207	UBX domain containing 4 (Ubx4d)
0.632484	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Nap1 l1)
0.641033	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 87 (Mki67)
0.648285	Angiotensin II (Angpt1)
0.662003	Vacuolar protein sorting 24 (Vps24)
0.666769	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)

Table 4 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
<b>Up-regulated genes</b>	
6.131075	GPCRX
5.014939	Guanylate binding protein 4 (Gbp4)
3.557787	Thrombospondin 2 (Thbs2)
2.528443	Neurtin 1 (Nrn1)
2.378116	Peptidase inhibitor 15 (Pi15)
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)
1.658867	Gamma-glutamyltransferase 5 (Ggt5)
1.650119	Ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 2 (Enpp2)
1.638222	ADP-ribosylation factor-like 5A (Arf5a)
1.624847	Gene regulated by estrogen in breast cancer protein (Greb1)
1.620890	Janus kinase 1 (Jak1)
1.607779	Glutathione peroxidase 3 (Gpx3), transcript variant 1
1.607116	Endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1 (Ern1)
1.603312	Synaptotagmin-like 5 (Sytl5)
1.597550	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 (Dixdc1)
1.517566	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14 (Kcnj14)

Table 5

#### 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
<b>Down-regulated genes</b>	
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 (Pb3)
0.656038	Cyclin A2 (Ccn2)
0.658269	Histone cluster 1, H1b (Hist1h1b)
0.659338	Argininosuccinate synthetase 1 (Ass1)
0.660918	Microsomal glutathione S-transferase 3 (Mgst3)
0.665328	RNA, Y1 small cytoplasmic, Ro-associated (Rny1) on chromosome 6

誘導されていた遺伝子のうち、GPCRX、Thrombospondin2、JAK1 は定量的 Reverse transcriptase-PCR 法により発現上昇を確認した(Fig 16, 17, 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。

マイクロアレイにおいて認めた Cyclin A2 のエストロゲンによる発現抑制は、定量的 RT-PCR 法にても確認され、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 18, 次頁)。そこで、骨髄ストローマ細胞の増殖に対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 19, 次頁)。

Fig 16

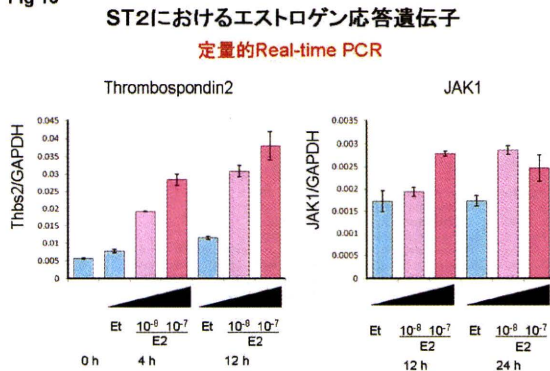


Fig 17

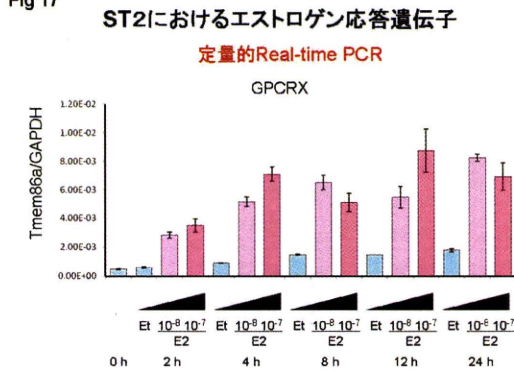


Fig 18

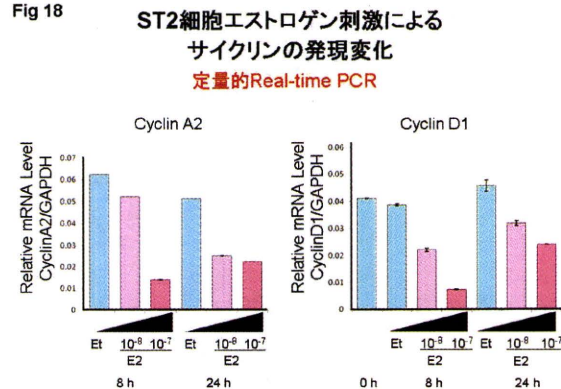
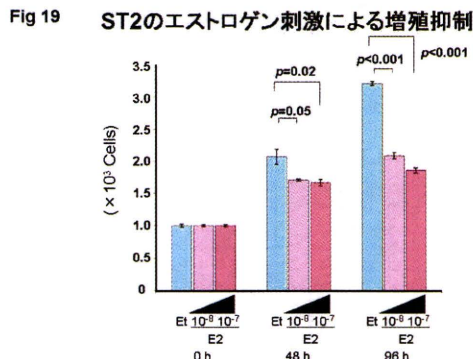


Fig 19

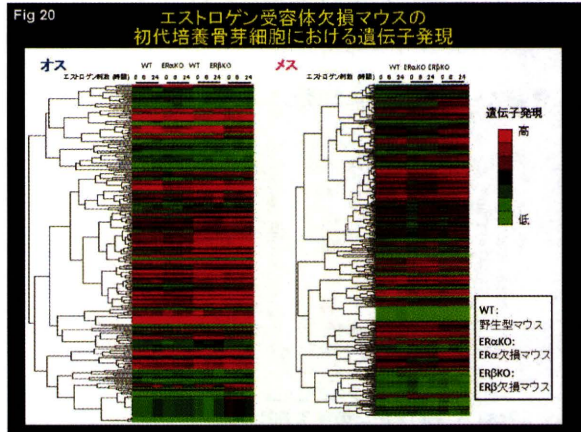


ST2をEstrogen刺激24時間前よりphenol red free, DCC-FCS 5% mediumにて培養。Estrogen刺激(Et,  $10^{-8}$   $10^{-7}$  M)下にてgrowth assay (Promega: Aqueous One使用)。

## 9. 骨芽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 20 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。



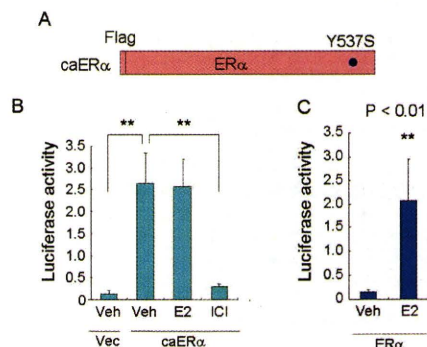
## 10. 活性型エストロゲン受容体の骨における役割

### 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 21A)。こ

Fig 21

### 活性型エストロゲン受容体ERα Y537S (caERα)



の 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