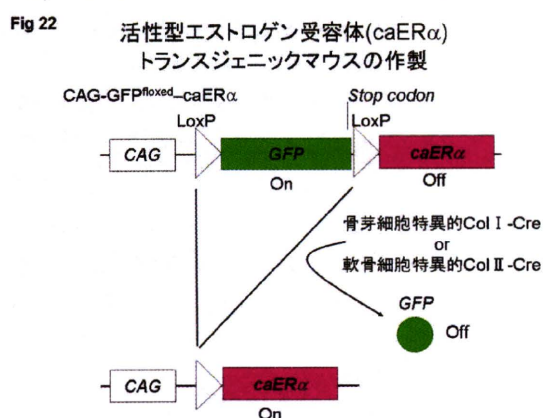


21B)。caER α の転写活性は、抗エストロゲン剤である ICI によって抑制された。caER α の転写活性は、野生型 ER α と同じ水準だった(Fig 21C)。caER α は、リガンド刺激がなくても高い転写活性を示すことから、生体内で ER α の機能獲得実験での解析に有用であると考えられた。

2) 骨芽細胞および軟骨細胞において 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の作製

caER α 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 22)。まず、CAG-GFP^{flxed}-caER α をトラン



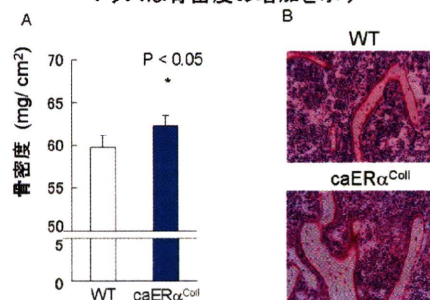
スジーンとして有する遺伝子改変マウスを作製した。CAG プロモーターは、様々な組織でユビキタな発現をもたらすが、GFP 配列の直下にポリ(A)シグナル配列を有するために、GFP のみを発現し、caER α は発現しないと考えられる。しかし、Cre リコンビナーゼによって組換えが生じると、GFP の配列は削除され、caER α が発現することになる。この CAG-GFP^{flxed}-caER α コンストラクトをマイクロインジェクションによって C57BL/6 マウスの前核期卵に導入し、トランスジェニックマウスを得た。Genotyping の確認は、ゲノム DNA を GFP 特異的プライマーを用いて 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^{flxed}-caER α 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 ColII-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 caER α を発現する caER α ^{ColI} マウスおよび caER α ^{ColII} マウスをそれぞれ作製した。

3) 骨芽細胞において caER α を発現するマウスにおける骨密度の上昇

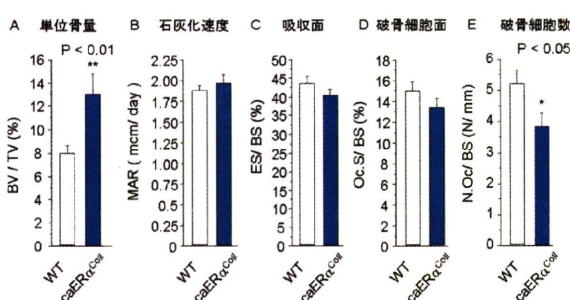
二重エネルギー X 線吸収測定法を用いて、メスの caER α ^{ColI} マウスの大腿骨骨密度を野生型マウスと比較した。その結果、大腿骨骨密度が caER α ^{ColI} マウスで増加していることが明らかになった(Fig 23A)。

Fig 23 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



骨に対する caER α 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 23B に示すように、caER α ^{ColII} マウスは、骨髓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、caER α ^{ColII} 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 24)。その他

Fig 24 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

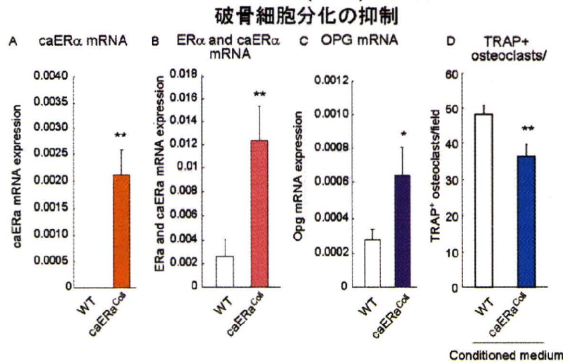


の骨吸収の組織学的指標である破骨細胞面(Oc.S / BS)と吸収面(ES/ BS)も減少する傾向を示した。しかしながら、caERα^{Coll} マウスは、石灰化速度に差は見られなかった。これらのデータは、骨芽細胞における caERα の過剰発現は骨吸収を減速し、骨量を上昇させることを示している。

4) caERα を発現する初代骨芽細胞における OPG 産生の上昇

caERα^{Coll} 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^{Coll} マウスから調製した初代培養骨芽細胞で確認した(Fig 25A)。

Fig 25 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



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 25B)。その結果、caERα^{Coll} 初代骨芽細胞で ERα が野生型に比べて4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^{Coll} 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 25C)。caERα^{Coll} 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^{Coll} 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^{Coll} 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 25D)。

11. エストロゲン受容体α(ERα)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(ERα)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、ERα 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。

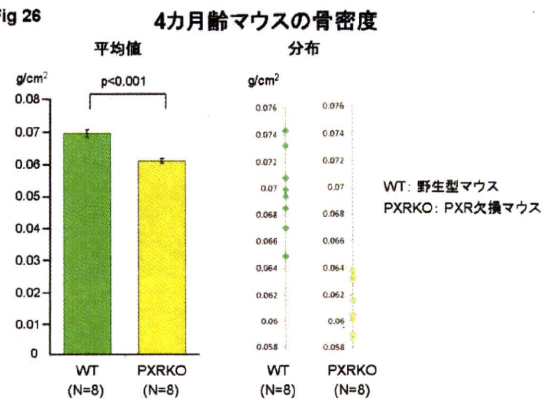
変形性関節症関連遺伝子の発現を定量的 RT-PCR にて検討した結果、ER α 欠損マウスにおいて Aggrecan、Col2a1 の低下を認め、軟骨の細胞外基質の産生低下を示唆する結果であった。さらに、Adamts4、Adamts5 の発現も ER α 欠損マウスにおいて亢進しており、これらは軟骨における細胞外基質の分解の亢進も示唆する結果であった。しかし、肥大軟骨層関連の遺伝子や Hedgehog シグナルの ligand である Patched-1、EPAS1 は ER α 欠損マウスにおいて上昇しておらず、従来知られてきたメカニズム以外の機序にて軟骨の変性が起こっていることが示唆された。

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。

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

大腿骨の骨密度測定の結果、KO マウスは 0.059 g/cm²、WT マウスは 0.068 g/cm² であり、KO マウスでは WT マウスに比べ有意な骨密度の低下 ($P < 0.001$) を認めた (Fig 26)。マイクロ CT による三次元海綿骨の骨量 (BV/TV) 解析においても、KO マウスでは著明な骨量減少を呈し ($P < 0.001$)、

Fig 26

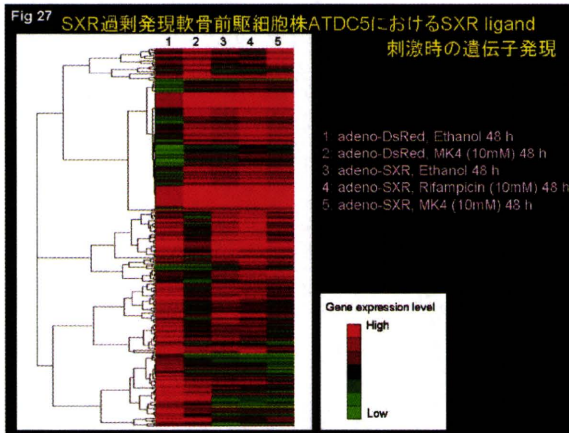


他の 3 次元パラメーターも骨の脆弱性が KO マウスで高くなっていることを示唆する結果であった。骨形態計測では、海綿骨における骨量 (BV/TV) が、KO マウスにおいて著明な減少を認め、KO マウスにおいて骨形成の低下、骨吸収の亢進を認めた。

13. 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 27 (次頁) 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。



14. 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)

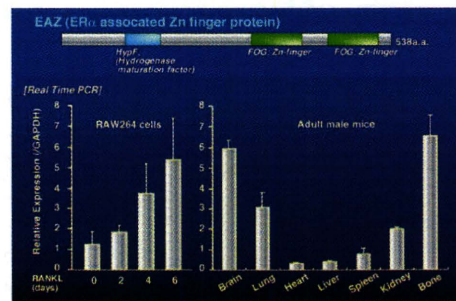
SNP アレイを用い、約 5 万 SNP の genotyping を行い、1 次スクリーニングにより有意差が見出された SNP に関して、2 次スクリーニングを行った。その結果遺伝子 X のイントロン 2 に存在する SNP が最も低い P 値を示した。さらに遺伝子 X のイントロン 1 に存在する CNV も体脂肪量と関連することを見出した。興味深いことに遺伝子 X に存在する SNP と CNV は連鎖不平衡にあることを見出しており、今回 SNP アレイで見出した表現型の機能は CNV が担っている可能性がある。今後遺伝子 X の機能検索をさらに行っていくことで肥満とるい瘦に関する新たなメカニズムが明らかになる可能性がある。

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

1) 破骨細胞を用いた ER α 結合因子群の精製の結果、複数の因子の同定に成功した。それらの結合因子のうち、EAZ (ER α associated Zn finger protein)の解析を行った結果、EAZ は骨組織特異的に高発現する因子であり、Raw 264.7 細胞が破骨細胞へと分化した際に発現が上昇すること (Fig 28)、また、ER α の転写活性を促進させることが明らかになった。さらに、Raw 264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞分化系において EAZ は破骨細胞分化マーカーの発現を上昇させる因子であること

Fig 28

EAZの遺伝子発現量はRAW264細胞の破骨細胞への分化にともない上昇する



が明らかになった。

2) Ob-ER α KO マウスの解析の結果、雄の Ob-ER α KO マウスは大腿骨遠位部において骨量減少を示すことが確認された。一方、雌の Ob-ER α KO マウスでは骨量変化が観察されなかった。さらに骨形態計測を行なった結果、破骨細胞数・破骨細胞面・骨芽細胞数・骨芽細胞面が雄の Ob-ER α KO マウスにおいては有意に減少することが観察された。

3) 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。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。

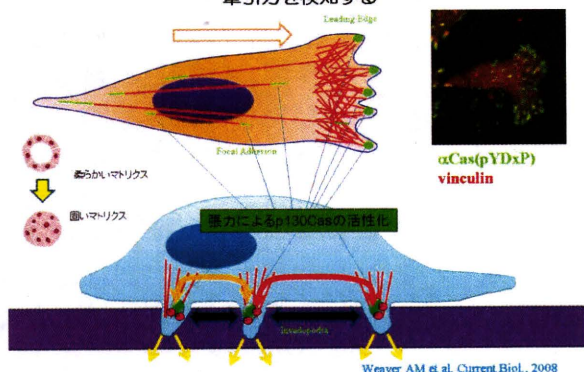
16. 細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素系の骨粗鬆症疾患遺伝子としての役割

(1) Src の基質蛋白質群の機能解析

Src キナーゼが活性化した癌細胞などでは Cas 蛋白質の広範な恒常的なリン酸化が観察されるが、正常細胞における Cas 蛋白質のチロシンリン酸化は、接着斑などにごく限られた部位に局限してみられる。一方、このような細胞の足場をストレッチすることにより、メカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシ

ンリン酸化が著明に亢進することがわかった。実際、蛍光分子断片によって Cas 蛋白質の N 末と C 末をラベルすることにより相互の距離を推定すると、Cas が外力により伸長しうる構造であることが示された。また Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止め、Src キナーゼによるリン酸化の受けやすさが変化することにより、下流にメカニカルストレスのシグナルを伝える分子であることが明らかになった。腫瘍の転移浸潤において Cas は invadopodia や接着斑などにつながるアクチン束の端に位置して、このような構造体にかかる張力を感知して転移浸潤を制御するモデルが示され、実際 Cas によるメタロプロテアーゼ分泌シグナルなどがその足場となる細胞外基質の硬度依存性に伝えられることが他施設から示された(Fig 29)。骨など硬

Fig 29 p130Cas は細胞の運動や浸潤におけるアクチン繊維の牽引力を検知する

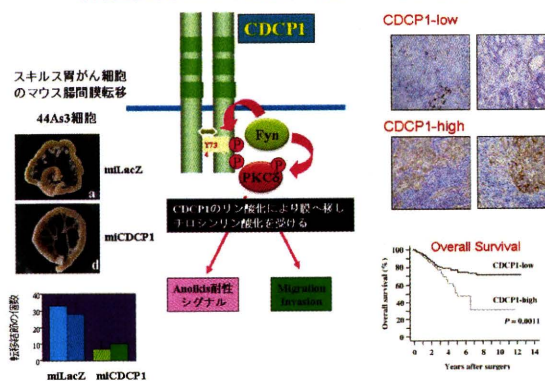


度の高い組織において podosome などに局在する Cas が、未融解部位を認識して破骨細胞の融解シグナルを送る分子センサーとしての役割を果たすのではないかと考え、解析を進めている。

固形腫瘍の足場非依存性増殖に関わる分子として 2007 年に肺がん細胞から同定した CDCP1 は、Src ファミリーによりリン酸化して下流のエフェクター分子 PKC δ を膜にリクルートすることで、固形腫瘍の足場非依存性増殖や運動能・浸潤能を制御することがわかった。浸潤能に関しては、CDCP1-PKC δ のシグナルによ

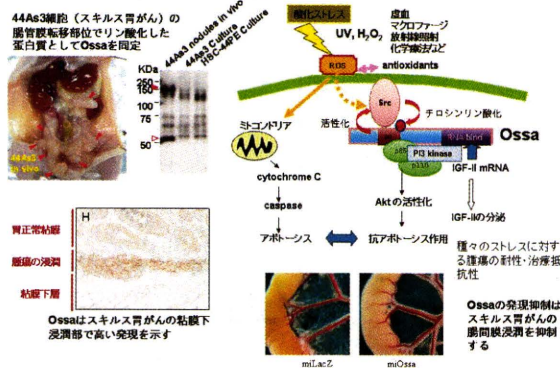
り MMP-9 やその他の matrix protease による基質分解能に影響を与えることが示された。さらに、膵がん臨床検体を用いた組織染色により CDCP1 の発現率が生命予後に相関することが明らかとなり、CDCP1 が独立した生命予後因子となることが示唆された(Fig 30)。

Fig 30 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



スキルス胃がん 44As3 細胞をマウス腹腔内に注射すると腸管膜転移を起こすが、この腸管膜転移部位で通常培養時に比べ強くチロシンリン酸化された蛋白質として新規蛋白質 Ossa が質量分析により同定された。解析の結果 Ossa は紫外線や過酸化水素などの酸化ストレス刺激によって細胞内で Src ファミリーキナーゼによってチロシンリン酸化を受け、リン酸化依存的に PI3 キナーゼと会合し PI3 キナーゼ-AKT シグナルを活性化することが分かった。また Ossa は C 末側に RNA 結合ドメインを持ち、この領域を介して IGF-II などの発現を調節していることが明らかになった。この結果として Ossa を高発現する細胞は酸化ストレスによるアポトーシスに対して抵抗性を獲得していると考えられ、スキルス胃がん細胞の Ossa の発現を RNAi により抑制するとそのマウスモデルでの腸管膜浸潤が抑えられた。Ossa による酸化ストレスに対する抵抗性は骨細胞を含めた多くの細胞が *in vivo* での働きに関与すると考えられるため、ノックアウトマウスを含めた機能解析に進めていく予定である。酸化ストレス刺激における Ossa の役割を Fig 31(次頁)にま

Fig 31 腫瘍の酸化ストレスに対する抵抗性に関わる新分子Ossa (Oxidative Stress-associated Src Activator)



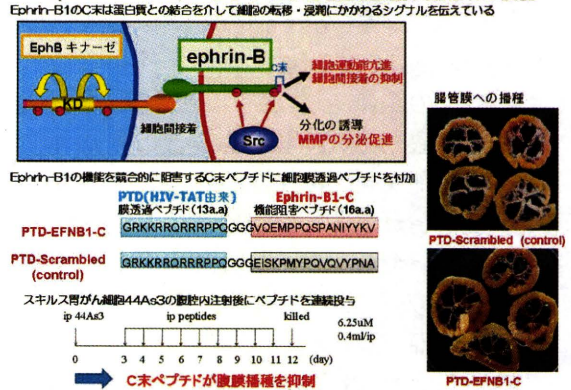
とめる。Ossa を軸にしてこのストレス抵抗性を解除する薬剤がデザインできれば、腫瘍細胞の抑制のみならず、骨粗鬆症など老化に伴う一連の疾患に効果のある全く新しい薬剤の開発につながる可能性がある。

膜型のリガンドである ephrin-B1 がスキルス胃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した。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 32)。このようなペプチドは破骨細胞と骨芽細胞の相互調節にも関わる ephrin-B1 の機能抑制分子として、骨粗鬆症の治療にも応用できる可能性がある。

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

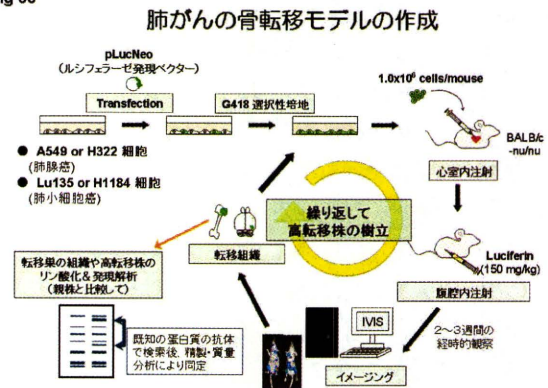
A549 を始めとする数種類の肺癌細胞株

Fig 32 Ephrin-B1のC末ペプチドによる腹膜播種抑制効果の検討



に Luciferase 遺伝子を発現させた細胞株をマウス左心室に投与した後、基質となる Luciferin を腹腔内に投与、10 分後にイメージング装置で Luciferase 反応を検出し、細胞が全身に回っていることを確認した。1 週間後までには顎、脚、腰の骨などに転移していることが視覚的に確認できた骨などへの転移は経過的に拡大、進展したが、脳転移については 2 週間の意向に観察されることが多かった。数週間後に再び観察を行ない、転移巣の形成をモニターし、そのうちの骨/脳に転移した腫瘍を培養し、再びマウスに投与する操作を繰り返し行なうことで骨に強く転移する細胞株の樹立を目指した。インジェクション-骨転移-培養のサイクルを 3 ~6 サイクル繰り返したところ、親株に比較して骨に転移指向性を持つ細胞株を数株樹立することができた(Fig 33)。このよ

Fig 33



うな骨指向性の細胞では *in vivo* で多臓器転移の減少、*in vitro* で Migration / Invasion 低下、E-cadherin の発現上昇と N-cadherin

の発現低下、FAK, Cas などの細胞内チロシンリン酸化の上昇、基質接着の亢進などがみられ、さらに浮遊培養時に Akt や Erk の活性変化が見られないなどの特徴がみられた。親株と蛋白質のチロシンリン酸化を比較すると、幾つかリン酸化の変化する蛋白質が認められるので、現在抗リン酸化チロシン抗体による精製の上、同定を試みている。

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

①ビスホスホネート不応例の臨床的特徴に関する検討：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 6)。観

Table 6

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

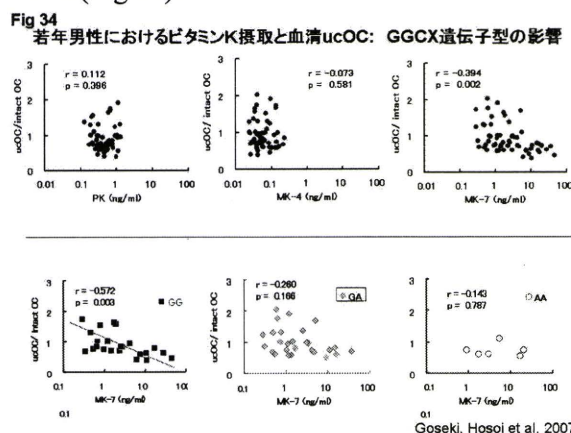
	incident fracture (-)	incident fracture (+)	P
n	160	71	
LBMD (g/cm ²)	0.854 ± 0.011	0.823 ± 0.017	0.131
Ca (mg/dl)	9.26 ± 0.03	9.16 ± 0.05	0.091
P (mg/dl)	3.54 ± 0.04	3.43 ± 0.06	0.140
NTX (nM/mM Cr)	28.6 ± 1.5	33.2 ± 2.3	0.104
ucOC (ng/ml)	2.28 ± 0.13	2.75 ± 0.19	0.038

Shiraki M, Hosoi T et al. JBMM 2010

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 BMB 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。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。

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：総ビタミン K 摂取量と非グラ化オステオカルシン/オステオカルシン比(ucOC/OC 比) は統計学的に有意な負の相関を示した。この相関は総ビタミン K 量をビタミン K2 (MK7) 摂取に置き換えても認められた。また、集団を GGCX の遺伝子型によって層別化し、それぞれにおいて MK7 摂取量と ucOC/OC 比との関連を検討したところ、GG 型の集団では統計学的に有意な相関が認められたが、GA 型の集団では有意な相関は認められなかった(Fig 34)。



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：

a. 研究の対象及び実施場所

研究参加施設の外来を受診している患者のうち、「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版」に照らし合わせて薬物療法の対象者であることが判断された患者であり、ビスホスホネート製剤が治療薬として選択された患者を対象とする。ただし、ワルファリンを服用しており、ビタミン K2 製剤の処方が禁忌であるものは対象外とする。対象者には、研究計画について文書による説明を行い、書面

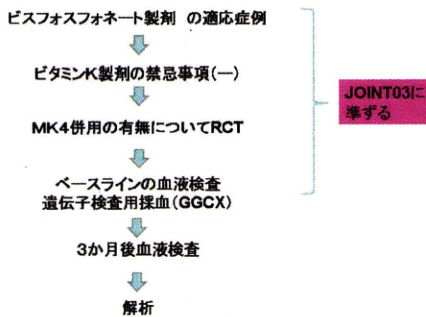
でインフォームドコンセントを得た者を研究参加者とする。血清 ucOC の測定は各施設で採取された血清について、1 検査機関で行う。GGCX 遺伝子多型性の解析は、東京大学医学部抗加齢医学講座において一括して行う。

b. 研究デザイン

研究参加者はビスホスホネート製剤を開始する時点で、封筒法により無作為にビタミン K2 製剤(メナテトレノン 45mg/日)併用群(70 例)と非併用群(70 例)に振り分けられる。研究参加者から採取された血液検体は血清 ucOC の測定ならびに GGCX 遺伝子多型性の解析に供される。GGCX 遺伝子多型性の解析結果は匿名化された臨床情報とのみ連結され、研究参加者ご本人には通知されない。薬剤の内服開始から3か月の時点で血清 ucOC を再度測定する(Fig 35)。血清 ucOC の変動に

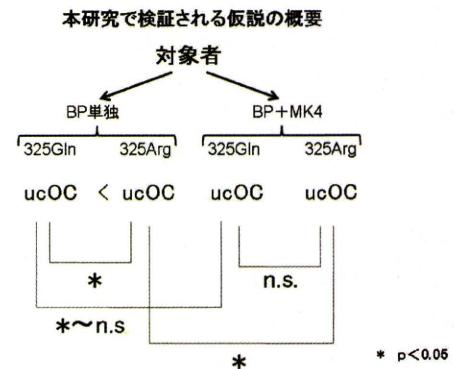
Fig 35

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



ついて、ビスホスホネート製剤単独群における GGCX325Arg 群(低活性群)と GGCX325Gln 群、ビタミン K2 製剤併用群における GGCX325Arg 群(低活性群)と GGCX325Gln 群の計 4 群間の比較検討を行う(Fig 36)。なお、遺伝子解析については、GGCX 遺伝子に加えて、ビタミン K サイクル関連遺伝子であるビタミン K 還元酵素(VKOR)、カルメニン、および核内の標的である SXR についても多型性を解析する。なお、日本人のビタミン K 摂取量における最も強力な規定因子である納豆の摂取状況について、その摂取頻度を聞き取り調査する。

Fig 36



c. 対象の選択基準

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

d. 対象の除外基準

ワルファリンを服用しており、ビタミン K2 製剤の処方禁忌であるもの。

e. 症例数の設定とその根拠

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

f. 対象者の臨床情報

年齢、身長、体重、脊椎 X 線所見、骨塩定量値、一般生化学測定項目(総蛋白、アルブミン、ALP、AST、ALT、総コレス

テロール、BUN、クレアチニン、血清カルシウム、血清リン)、骨代謝関連検査値(血清 ucOC、血清 total ucOC、骨型 ALP、血清 NTX)。血清 ucOC は免疫電気化学的方法(“Picolumi”)によって定められた検査機関(SRL 等)において一括して測定する。納豆の摂取頻度(聞き取り)。

g. 遺伝子解析

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

h. 研究における医学倫理的配慮について

- ① 研究等の対象とする個人の人權擁護
研究計画はヘルシンキ宣言に基づいて立案され、遺伝子情報は当施設の管理者のもとで厳密に管理される。
- ② 研究等の対象となる者(本人又は家族)の理解と同意文書による説明と同意を得る。
- ③ 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性と医学上の貢献の予測

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

D. 考察

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

SNP アレイを用い、約 5 万 SNP の genotyping を行い、1 次スクリーニングと 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. TGF β シグナル伝達因子と骨粗鬆症

今回、我々は TGF β シグナル伝達因子である Smad6 のイントロン 3 ならびにイントロン 1 に存在する SNP は、骨量と有意に関連することを世界に先駆けて見出した(Urano et al., *J Bone Miner Metab*, in press)。一方、TGF β シグナル伝達因子と骨量の相関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 TGF β 1 遺伝子上に存在する Pro10Leu 多型と骨量との相関に関して報告がある(Yamada et al., *JAMA* 2001)。今回、我々は本集団において TGF β 1 Pro10Leu と骨量も有意に関連することを見出した。本 SNP と骨量との相関解析において再現性が認

められたことにより、TGF β 1 遺伝子多型は日本人において骨量を予測する遺伝子マーカーとしての有用性がある可能性が示唆された。Smad6 のイントロン 1 での SNP と TGF β 1 遺伝子 Pro10Leu とは相互作用を有して骨量を規定することも新たに見出した。このことは、TGF β 1 と Smad6 遺伝子が同じシグナル伝達経路の上で相互作用をすることで骨量を規定している可能性を示唆させる。

4. Wnt- β カテニンシグナル伝達因子と骨粗鬆症

Wnt- β カテニンシグナル伝達経路は、哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年、このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LDL receptor-related protein 5(LRP5)遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は今までに、LRP5 の SNP と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は腰椎骨密度と有意に関連することを発見した(Urano et al., *J Bone Miner Metab*, 2004)。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)が腰椎骨密度と有意に関連することも見出した(Ezura et al., *Bone*, 2007)。この LRP5 遺伝子における A1330V 多型は近年、欧米でゲノムワイドスクリーニングを行った結果でも同定されており、骨量を規定する再現性の高い SNP として注目されている(Richards et al., *Lancet*, 2008)。今回、我々は新たな日本人集団において A1330V SNP が骨量と有意に関連することを明らかにした。さらに、今回この遺伝子変異により Wnt- β カテニンシグナルが減弱することを *in vitro* で見出した。LRP5 ノックアウトマウスは骨量の減少が示されている。またヒトにおいて LRP5

の機能低下変異は骨量低下を、機能亢進変異は高骨量となることが報告されている。今回の *in vitro* でのデータと今までの報告を併せ考えると、A1330V 変異により Wnt- β カテニンシグナルの低下が直接、低骨密度を誘導している可能性が示唆された。

5. 骨芽細胞系における GR 応答遺伝子の解析

本研究によって SaOS2 においていくつかの遺伝子が同定された。このうち DUSP1 は、マクロファージにおいてグルココルチコイドによって誘導されることは既に報告があり、MAPK シグナルの抑制作用が知られている。骨芽細胞における DUSP1 の誘導は、骨芽細胞の生存や増殖を抑制することが推測され、骨芽細胞の機能低下をもたらすと考えられる。また、C/EBP δ は脂肪細胞の分化促進因子であり、骨芽細胞と脂肪細胞が同じ幹細胞から分化することを考慮すると、分化レベルにて骨芽細胞に対し、抑制的に働いていることが推測される。Per1 は時計遺伝子として知られるが、血液単核球におけるグルココルチコイドによる誘導も知られていた。また、骨芽細胞の増殖抑制作用も報告されており、グルココルチコイドによる骨芽細胞機能抑制のメカニズムの一つであることが推測される。

TRIM63 に関しては、骨芽細胞の増殖は抑制するが、分化に関しては促進効果があり、骨芽細胞機能に対して二面的な作用を持っていると考えられた。TRIM63 は、E3 ubiquitin ligase であり、骨芽細胞においても何らかの蛋白を基質としていると考えられるが、その同定にはさらなる研究が必要である。

6. ステロイド受容体応答遺伝子、骨芽細胞

本研究では、ステロイド受容体結合部位の包括的解析である ChIP-on-chip 法によるゲノム情報を活用して、各ステロイド受容体結合部位の機能解析が可能であ

る実験系が示された。骨芽細胞・軟骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子のマイクロアレイ発現解析については、GC についていくつかの研究グループから報告されているが、各種ステロイドによる応答遺伝子については明らかになっていない。本研究における、ステロイド受容体結合部位のゲノム情報とステロイド応答性遺伝子発現データを組み合わせることにより、さらに新規のステロイド受容体標的遺伝子の同定が可能になるものと考えられる。本研究で作製したステロイド受容体発現細胞は、複雑に絡み合うステロイド受容体のシグナルネットワークを検討する上で有用なツールであり、ここで得られる情報に基づき、さらに骨芽細胞系における各種ステロイド受容体の機能解析が進むことが期待される。細胞増殖作用、骨芽細胞系分化作用、アポトーシス作用、抗炎症作用に対して、各種ステロイドが異なる作用をもたらすかについても、研究を要すると思われる。

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

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

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

本研究により同定された遺伝子につい

ては、今後その発現を調節した骨芽細胞系における機能解析を行うことにより、骨粗鬆症ならびに関連疾患における作用を明らかにすることができるかと期待される。

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

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

発現が誘導される遺伝子に関しては、GPCRX、Thrombospondin2、JAK1 が定量的 Reverse transcriptase-PCR 法により確認された。このうち GPCRX は、7 回膜貫通型の蛋白であり、G 蛋白と共役している何らかの膜レセプターであることが推測された。GPCRX はヒトにおいても相同性の高い分子が存在し、ヒトにおいても骨髄ストローマ細胞におけるエストロゲンシグナルを媒介している可能性が示唆された。リガンドおよび下流シグナルの同定が今後の課題である。JAK1 は、骨芽細胞の分化作用を有する Oncostatin M 受容体の下流で働いていることが報告されており、エストロゲンの骨芽細胞分化促進作用を担っている可能性が示唆された。

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

する影響も含めて今後さらなる解析が必要であると思われる。

9. 骨芽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 を進めている。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。

10. 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-GFP^{Floxed}-caER α を作製した。このマウスを ColII-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 ColII マウスを作製した。caER α ColII 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 ColII 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み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思われる。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参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。

11. 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、Cholecystokinin や Sfrp-1 の誘導を介する新規メカニズムが推測された。Cholecystokinin 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。

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

4カ月齢 PXR 遺伝子欠損マウスは、13カ月齢 PXR 遺伝子欠損マウス同様に骨粗鬆症を呈した。骨形態計測の結果では、13カ月齢において骨形成パラメーター、骨吸収パラメーター双方の高値を呈したのに対し、4カ月齢では、骨吸収は亢進していたが、骨形成は抑制されるという結果であった。PXR/SXR は、骨芽細胞における発現が知られているが、肝臓や腎臓、小腸においても発現し、ビタミンD代謝酵素の発現制御作用やリン輸送蛋白の発現制御も報告されている。また、炎症性の転写因子である NF- κ B を抑制する作用もあり、炎症を抑制することによる骨代謝への影響も推測される。PXR/SXR の骨芽細胞への直接作用やビタミンD代謝やリンの吸収調節、炎症反応抑制を介する間接作用は、PXR/SXR のリガンドであるビタミンKの作用メカニズムの一部を担っていると考えられる。

13. 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。

14. 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

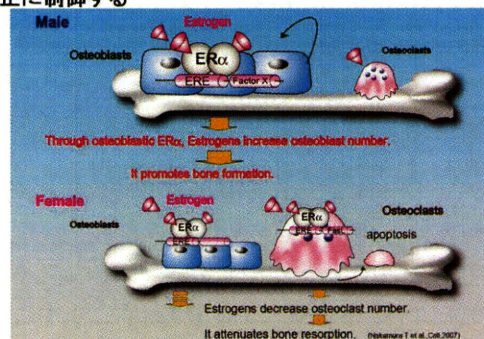
のイントロン1に存在する CNV も体脂肪量と関連することを見出した。興味深いことに遺伝子 X に存在する SNP と CNV は連鎖不平衡にあることを見出しており、今回 SNP アレイで見出した表現型の機能は CNV が担っている可能性がある。今後遺伝子 X の機能検索をさらに行っていくことで肥満と痩に関する新たなメカニズムが明らかになる可能性がある。

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

本研究 1)の結果、破骨細胞の分化を促進させる因子である EAZ が ER α の転写活性を上昇させる転写共役因子複合体の中に存在する可能性が明らかになった。昨年までの研究から成熟破骨細胞内での ER α の機能が明らかとなったが、成熟破骨細胞への前分化段階での作用には不明な点が多く、今回の研究がその解明の端緒になる可能性があると考えられる。

また本研究 2)の結果から、エストロゲンは骨芽細胞の ER α を介して骨芽細胞数を正に制御していることが示唆された (Fig 37)。また、Ob-ER α KO マウスとす

Fig 37
エストロゲンは骨芽細胞の ER α を介して骨芽細胞数を正に制御する



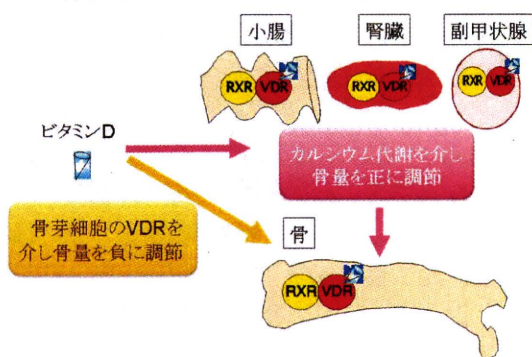
に報告済みの Oc-ER α KO マウスの表現型を比較すると、雌では破骨細胞の ER α を介した骨防御作用が骨芽細胞の ER α に比べて優位なことが、一方、雄では骨芽細胞の ER α を介した作用が破骨細胞の ER α に比べて優位なことが示唆された。

さらに本研究 3)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 38)。

Fig 38

骨芽細胞のVDRは骨量の負の調節因子である



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

本研究で Src の基質群の中で CDCP1 や ephrin-B1 がメタロプロテナーゼ分泌に関与することが示されたが、このような分子を介したメタロプロテナーゼ分泌は、破骨細胞による骨融解の過程にも大きく関係している可能性がある。さらに既にコルタクチンや p130Cas など複数の Src 基質がアクチンとの結合を介して、アクチン繊維の再構成やメカニカルフォースの伝達、運動能などに関与することが示されていることから、破骨細胞がアクチンリングを形成して骨融解の場を作る際にこのような特定の Src 基質群が重要であることが示唆される。また骨代謝と酸化ストレスと老化との深い関係は以前からよく知られているが、加齢が主たる要因となる骨粗鬆症におい

ても酸化ストレスとの関係は重要だと考えられる。酸化ストレスによる T 細胞の活性化が骨髄で TNF の産生を促し、骨喪失を亢進させること、酸化ストレスが破骨細胞の分化に関与することなどが言われているが、Ossa を介した酸化ストレス抵抗性のシグナルの ON/OFF も骨粗鬆症の発症に影響を与えている可能性がある。今後骨細胞系における Src 基質群の発現パターンの加齢による変化についてもさらに検討をしていく必要がある。本研究によって、肺腺がん細胞の骨転移実験動物モデル系を作製することができた。このモデル系では個体差なく、ほぼ同様の時期に同様の位置に転移巣を形成し、同様な腫瘍の進展が認められたこと、骨以外への転移がほとんど認められなかったことから、骨転移に対する薬剤や分子治療ターゲットの評価やスクリーニングに使用できる可能性がある。

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

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くらべて、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。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。この変換において利用される 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 γ -carboxylase (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。

我々が検討した GGCX 遺伝子の SNP は catalytic center の近傍にあり、アミノ酸置換を伴う nonsynonymous SNP である。この多型性は酵素活性の差異がもたらされることを報告している。骨代謝に関連する主要なビタミン K 依存性蛋白質であるオステオカルシンのカルボキシル化はビタミン K の摂取状況と負の相関を示すことを確認し、このことは血清中のビタミン K2、とくに MK7 との有意な関連に反映されていた。さらにこの関連は上記で見出した GGCX 遺伝子の特定の genotype でのみに認められることが確認された。以上の結果から、GGCX 遺伝子の多型性が骨代謝からみたビタミン K 充足状態の機能的な個人差に関連していることが示唆され、ビタミン K に関する介入を栄養学的または薬理的に検討していく際に考慮すべきであることが示唆された。

骨粗鬆症は骨量の低下に加えて「骨の質」によってもたらされた骨脆弱性が亢進した疾患である。骨強度の規定因子として、骨量に加えて骨質の重要性が強調されてきたのはこの 10 年あまり前からである。骨粗鬆症の診療においても、骨量のみでは説明がつかないことがあり、「骨量以外」のことを骨質という概念にまとめているともいえる。いずれにしても骨粗鬆症の合併症である骨折の発症を予防することが、骨粗鬆症の予防と治療における最大の目標であり、その目安として骨量とそれ以外のファクターを考える必要がある。わが国における骨粗鬆症診療に関するガイドラインは 1998 年から整備されてきた。最近のガイドラインである「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 版」では骨粗鬆症性骨折の危険因子をより広くとらえる観点から、診断基準とは別に骨折発生抑制を目的とする薬物療法開始の目安が検討された。その結果、原発性骨粗鬆症の診断基準にあてはまる場合のみならず、「骨量減少」のレベルでも、喫煙、過度のアルコール摂取、そして両親いずれかにおける大腿骨頸部骨折の既往といった、骨量や既存骨折とは独立した骨折の危険因子のうちいずれか一つをもっている場合は薬物療法の開始を検討するという提案がなされた。これらのうち、「両親いずれかの大腿骨頸部骨折の既往」が骨粗鬆症性骨折における遺伝的因子の関与が臨床的にも有意なものであることを示している。しかしながら、この遺伝的因子を説明する遺伝子(群)についてはまだ結論が得られていないことが事実である。Kanis によって率いられた WHO の国際共同研究グループは総数 6 万人にもおよぶ大規模な前向きコホートを用いて、脆弱性骨折の絶対骨折リスクを算出するアルゴリズムを作成した。「fracture risk assessment tool」に由来する FRAX と呼ばれるこのプログラムに掲載されている脆弱性骨折の発症に独立して

寄与する 10 の因子について入力すると、前向きに 10 年間に於ける大腿骨頸部ならびに 4 つの主要骨粗鬆症製骨折(脊椎、上腕骨、前腕骨、大腿骨頸部)の絶対骨折発生率(%)を得ることができる。これは個人ごとの骨折発生率を得るものであり、診断基準による疾患群と非疾患群へのグループわけとは異なる評価方法である。年齢や性によっても多少異なるが、このプログラムにおいて、「両親の大腿骨頸部骨折」は骨折リスクを約 2 倍に増加させる。個人ごとの骨折リスクを把握した上で、骨粗鬆症の広い意味でのオーダーメイド医療が進展する可能性がある。遺伝子情報も用いた病態の個人差や薬物反応性の個人差が診療の場で活用されることも期待される。

本研究計画によって検証される仮説を資料 2 に示す。血清 ucOC 濃度は骨代謝におけるビタミン K の充足状態のマーカーとなるものであり、その濃度が高いことはビタミン K の不足状態を示唆する。本研究計画における対象者は 4 群にわけられ、薬物療法開始後 3 カ月の時点で血清 ucOC 濃度が測定される。ucOC 濃度がより低下していることがビスホスホネート製剤による治療効果の指標と考えられるが、GGCX 活性が高い遺伝子型(GGCX325Gln)を持つ場合にはビスホスホネート製剤単独と MK4 併用群で有意差がないのに対して、GGCX 活性が低い遺伝子型(GGCX325Arg)を持つ場合には有意差が見出されることなどが予想される。

E. 結論

(1) 骨粗鬆症ならびに関連疾患の診断・治療の分子標的の同定機能解析とテーラーメイド医療への応用

本研究では、ゲノム医学を活用した ChIP-chip 法(クロマチン免疫沈降法に基づくゲノムタイリングアレイ解析)、ChIP-シーケンス法、独自の GBS 法とマイクロアレイ法等により、骨粗鬆症ならびに関

連疾患に関わる遺伝情報制御分子、診断・治療の分子標的を網羅的に探索し、機能解析を行った。特に、エストロゲン、ビタミン K、グルココルチコイドをはじめとする各種骨作用薬の新規標的因子を明らかにし、分子標的の探索を行い、成長因子、サイトカインシグナル経路に関わる因子や GPCR をはじめとする複数の候補遺伝子を得た。さらに、ヒト遺伝解析について、これまでの 5 万 SNP ならびに 25 万 SNP による遺伝解析により対象者の骨密度、骨関節変形指数、骨加齢疾患・関連疾患に関わる各種バイオマーカーとの関連を 250 人規模の第 1 集団で検討を行い、第 2 集団での検証により、研究協力者である統計専門家と共に詳細な解析を進め複数の疾患感受性遺伝子を明らかにした。CNV 解析により新しいマーカーを得た。知財の確保として、東大 TLO を介して特許出願を行った。有望な候補に対して、細胞レベル、動物レベルならびに臨床検体を用いた機能解析を行い、薬の標的としての可能性を示した。

(2) 核内受容体と共役因子の同定とその骨粗鬆症ならびに関連疾患との関連

骨代謝と関連疾患に関わる核内受容体と共役因子について、破骨細胞、軟骨細胞ならびに骨芽細胞特異的ノックアウトマウスのシステムを活用して生体機能解析を行った。特にエストロゲン、アンドロゲン、ビタミン D、ステロイド X 受容体による結果は骨の病態を引き起こすものであり、新しい疾患モデルとして薬物の効果を調べるのに有用である。

(3) 新しい細胞内シグナル伝達因子・膜受容体・酵素の同定、機能解析と骨粗鬆症ならびに関連疾患との関連

細胞内シグナル伝達系では、蛋白質レベルの修飾が大きな意義を持っている。特に、エストロゲンをはじめとする骨作用薬もしくはメカニカルストレスによるリン酸化、さらにはエピジェネティックな蛋白修飾に関わるシグナル伝達機構の

解析を進め、新規リン酸化、アセチル化修飾メカニズムを明らかにし、治療標的としての意義を明らかにした。

(4) 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

ビスフォスフォ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を進めた。

F. 発表

1. 論文発表

1. Urano, T., Narusawa, K., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine* 33, 1256-1261, 2008.
2. Shiraki, M., Urano, T., Kuroda, T., Saito, M., Tanaka, S., Miyao-Koshizuka, M., Inoue, S.: The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab* 26, 595-602, 2008.
3. Takayama, K., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Urano, T., Murakami, K., Hayashizaki, Y., Ouchi, Y., Inoue, S.: FOXF1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 388-393, 2008.
4. Kubo, M., Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 71-77, 2009.
5. Kumagai, J., Urano, T., Ogushi, T., Takahashi, S., Horie-Inoue, K., Fujimura, T., Azuma, K., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitamura, T., Inoue, S.: EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer. *Int J Cancer* 124, 799-805, 2009.
6. Takayama, K., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Kaneshiro, K., Fujimura, T., Kumagai, J., Urano, T., Sakaki, Y., Shirahige, K., Sasano, H., Takahashi, S., Kitamura, T., Ouchi, Y., Aburatani, H., Inoue, S.: Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res* 69, 137-142, 2009.
7. Takeo, C., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Inoue, S.: Identification of Igf2, Igfbp2 and Enpp2 as Estrogen-Responsive Genes in Rat Hippocampus. *Endocr J* 56, 113-120, 2009.
8. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Liu, X., Ogushi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitamura, T., Homma, Y., Inoue, S.: EBAG9 expression and its clinical significance in human testicular cancer. *Int J Urol* 16, 329-332, 2009.
9. Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of estrogen receptor α and histone deacetylase 6 causes rapid decetylation of tubulin in breast cancer cell. *Cancer Res* 69, 2935-2940, 2009.
10. Furuya, T., Urano, T., Ikari, K., Kotake, S., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19,

- 140-146, 2009.
11. Urano, T., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: Bone mass effects of a Smad6 gene polymorphism in Japanese postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 27, 562-566, 2009.
 12. Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of estrogen receptor α and histone deacetylase 6 causes rapid decetylation of tubulin in breast cancer cell. *Cancer Res* 69, 2935-2940, 2009.
 13. Urano, T., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: A1330V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decrease Wnt signaling and affect the total body bone mineral density in Japanese women. *Endocr J* 56, 625-631, 2009.
 14. Urano, T., Shiraki, M., Yamaga, R., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a sequence variation in the gene encoding adiponectin receptor 1 (*ADIPOR1*) with body mass index in the Japanese population. *Anti-Aging Med* 6, 79-82, 2009.
 15. Urano, T., Usui, T., Shiraki, M., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the constitutive androstane receptor gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 9, 235-241, 2009.
 16. Urano, W., Furuya, T., Inoue, E., Taniguchi, A., Urano, T., Kotake, S., Sekita, C., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: Associations between methotrexate treatment and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with incident fractures in Japanese female rheumatoid arthritis patients. *J Bone Miner Metab* 27, 574-583, 2009.
 17. Azuma, K., Urano, T., Ouchi, Y., Inoue, S.: Vitamin K2 suppresses proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells by activating steroid and xenobiotic receptor. *Endocr J* 56, 843-849, 2009.
 18. Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.S., Huang, I.C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., García-Sastre, A.: Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by RIG-I. *Cell Host Microbe* 5, 439-449, 2009.
 19. Ijichi, N., Ikeda, K., Fujita, M., Usui, T., Urano, T., Azuma, K., Ouchi, Y., Horie-Inoue, K., Inoue, S.: EPAS1, a dexamethasone-inducible gene in osteoblasts, inhibits osteoblastic differentiation. *Open Bone J* 1, 28-37, 2009.
 20. Kumagai, J., Urano, T., Ogushi, T., Takahashi, S., Horie-Inoue, K., Fujimura, T., Azuma, K., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Kitamura, T., Inoue, S.: EBAG9 is a tumor-promoting and prognostic factor for bladder cancer. *Int J Cancer* 124, 799-805, 2009.
 21. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Kumagai, J., Murata, T., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Homma, Y., Inoue, S.: Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* 74, 391-397, 2009.
 22. Urano, T., Usui, T., Takeda, S., Ikeda, K., Okada, A., Ishida, Y., Iwayanagi, T., Otomo, J., Ouchi, Y., Inoue, S.: TRIM44 interacts with and stabilizes terf, a TRIM ubiquitin E3 ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 263-268, 2009.
 23. Suzuki, H., Forrest, A.R., Erik van Nimwegen, Daub C.O., Balwierz, P.J., Irvine, K.M., Lassmann, T., Ravasi, R., Hasegawa, Y., de Hoon, M.J., Katayama,

- S., Schroder, K., Carninci, P., Tomaru, Y., Kanamori-Katayama, M., Kubosaki, A., Akalin, A., Ando, Y., Arner, E., Asada, M., Asahara, H., Bailey, T., Bajic, V.B., Bauer, D., Beckhouse, A.G., Bertin, N., Björkegren, J., Brombacher, F., Bulger, E., Chalk, A.M., Chiba, J., Cloonan, N., Dawe, A., Dostie, J., Engström, P.G., Essack, M., Faulkner, G.J., Fink, J.L., Fredman, D., Fujimori, K., Furuno, M., Gojobori, T., Gough, J., Grimmond, S.M., Gustafsson, M., Hashimoto, M., Hashimoto, T., Hatakeyama, M., Heinzl, S., Hide, W., Hofmann, O., Hörnquist, M., Huminiecki, L., Ieko, K., Imamoto, N., Inoue, S., Inoue, Y., Ishihara, R., Iwayanagi, T., Jacobsen, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kerr, M.C., Kimura, R., Kimura, S., Kimura, Y., Kitano, H., Koga, H., Kojima, T., Kondo, S., Konno, T., Krogh, A., Kruger, A., Kumar, A., Lenhard, B., Lennartsson, A., Lindow, M., Lizio, M., MacPherson, C., Maeda, N., Maher, C.A., Maqungo, M., Mar, J., Matigian, N.A., Matsuda, H., Mattick, J.S., Meier, S., Miyamoto, S., Miyamoto-Sato, E., Nakabayashi, K., Nakachi, Y., Nakano, M., Nygaard, S., Okayama, T., Okazaki, Y., Okuda-Yabukami, H., Orlando, V., Otomo, J., Pachkov, M., Petrovsky, N., Plessy, C., Quackenbush, J., Radovanovic, A., Rehli, M., Saito, R., Sandelin, A., Schmeier, S., Schönbach, C., Schwartz, A.S., Semple, C.A., Sera, M., Severin, J., Shirahige, K., Simons, C., St-Laurent, G., Suzuki, M., Suzuki, T., Sweet, M.J., Taft, R.J., Takeda, S., Takenaka, Y., Tan, K., Taylor, M.S., Teasdale, R.D., Tegnér, J., Teichmann, S., Valen, E., Wahlestedt, C., Waki, K., Waterhouse, A., Wells, C.A., Winther, O., Wu, L., Yamaguchi, K., Yanagawa, H., Yasuda, J., Zavolan, M., Hume, D.A., Arakawa, T., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Kaiho, A., Kawashima, T., Kawazu, C., Kitazume, Y., Kojima, M., Miura, H., Murakami, K., Murata, M., Ninomiya, N., Nishiyori, H., Noma, S., Ogawa, C., Sano, T., Simon, C., Tagami, M., Takahashi, Y., Kawai, J., Hayashizaki, Y.: The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line. *Nat Genet* 41, 553-562, 2009.
24. Urano, T., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: Identification of non-synonymous polymorphisms in the WDSOF1 gene as novel susceptibility markers for low bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Bone* 47, 636-642, 2010.
25. Azuma, K., Casey, S.C., Ito, M., Urano, T., Horie, K., Ouchi, Y., Kirchner, S., Blumberg, B., Inoue, S.: Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 207, 257-263, 2010.
26. Urano, T., Narusawa, K., Kobayashi, S., Shiraki, M., Horie-Inoue, K., Sasaki, N., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Association of HTRA1 promoter polymorphism with spinal disc degeneration in Japanese women. *J Bone Miner Metab* 28, 220-226, 2010.
27. Fujita, M., Sugama, S., Sekiyama, K., Sekigawa, S., Tsukui, T., Nakai, M., Waragai, M., Takenouchi, T., Takamatsu, Y., Wei, J., Rockenstein, E., LaSpada, A.R., Masliah, E., Inoue, S., Hashimoto, M.: A β -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. *Nat Commun* 1, 110, 2010.
28. Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O.,