

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591084  
 研究課題名（和文） 核内受容体と翻訳後蛋白修飾を介するビタミン K 標的分子ネットワークの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of vitamin K target gene network mediated by nuclear receptors and post-translational protein modification  
 研究代表者  
 堀江 公仁子（HORIE KUNIKO）  
 埼玉医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：90261982

研究成果の概要：骨芽細胞におけるビタミン K 作用として、メナキノ-4 特異的なプロテインキナーゼ A のリン酸化修飾による新しい作用経路を発見した。クロマチン免疫沈降を用いたゲノムタイリングアレイによるステロイド受容体結合部位のデータを活用し、骨芽細胞系におけるステロイド標的遺伝子を同定する手法を確立した。当グループが明らかにした骨におけるビタミン K 作用点である核内受容体 SXR については、本研究により骨代謝における調節因子としての重要性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ビタミン K、核内受容体、翻訳後蛋白修飾、骨芽細胞、遺伝子発現調節

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者における骨粗鬆症の発症増加は社会的問題であり、副作用が少ない治療薬としてビタミン K が我が国で用いられてきた。骨芽細胞系におけるビタミン K 作用としては、従来の翻訳後蛋白修飾を介する  $\gamma$ -カルボキシラーゼ経路のみならず、核内受容体ステロイド X 受容体（SXR）を介する経路が重要であることが最近の研究で明らかになりつつ

ある。申請者らは、ビタミン  $K_2$  が SXR を介して細胞外マトリクス蛋白質の発現調節を行い、骨基質を形成するコラーゲンの蓄積促進をもたらす作用を明らかにした実績がある（J Biol Chem 281:16927-34, 2006）。

(2) 核内受容体を始めとする転写因子の標的分子の探索法に関しては、クロマチン免疫沈降法（chromatin immunoprecipitation、

ChIP)により得られた転写因子結合部位を網羅的に解析するChIP-on-chip法が最近開発された。ChIP-on-chip法は、ゲノム上の転写因子結合部位をマッピングし、その近傍の遺伝子の中から、目的とする転写因子の一次標的分子をする手法として優れており、国内外の研究機関において、各種転写因子の標的分子の体系的解析が行われる状況にあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞系におけるビタミン K の作用機構を複合的に理解する目的で、古典的経路として知られているカルボキシラーゼ(GGCX)を介する経路以外の作用に主に注目し、1)核内ステロイドX受容体(SXR)を介する作用経路と、2)SXR系の検討過程でクローズアップされてきた第3の経路について検討を行った。さらに、3)ビタミン K 標的遺伝子との比較を行う目的で、ビタミン K と同様に核内受容体に作用するが、骨粗鬆症に対して促進的作用をすると考えられるステロイド(グルココルチコイド: GC)に関して、骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) PXR 欠損マウスにおける骨形態観察

骨代謝に対する SXR の作用を生体で解析するため、SXR のマウスにおけるオルソローグ受容体 PXR が欠損するマウス(米国カリフォルニア大学アーバイン校 Bruce Blumberg 教授より資料供与)を用いて、骨密度測定ならびに骨形態観察を行った。

### (2) 骨芽細胞系におけるビタミン K 標的遺伝子の解析

骨芽細胞系における SXR を介するビタミン K の標的遺伝子を解析するため、Flag タグ標識の SXR (Flag-SXR)および VP16 活性化ドメインのカルボキシル末端を結合した Flag タグ標識の SXR (Flag-VP16C-SXR) の発現プラスミドを作製し、ヒト骨芽細胞系細胞株 MG63 細胞における 2 種類の安定発現細胞を、コントロールベクターのみを安定発現させた細胞と共に、数ラインずつ作製した。MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞と、コントロール

ベクター安定発現 MG63 細胞をビタミン K<sub>2</sub> (メナキノン-4: MK-4)で刺激し、2 細胞系で共通して発現が誘導されかつ SXR 応答遺伝子には含まれない遺伝子をマイクロアレイ解析により探索することにより、主に SXR 以外の新規経路によるビタミン K 標的遺伝子の同定を行った。MK-4 により発現上昇が認められた遺伝子について、親株 MG63 細胞と MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞を用いて、リファンピシンと MK-4 で刺激した時の mRNA の発現変化を定量的 RT-PCR により比較し、SXR の関与を検討した。また、ビタミン K およびその関連構造の種類による作用を検討するため、Gla 化作用に必要な基本骨格である 2-メチル-1,4-ナフトキノンを持たないゲラニルゲラニオールと、同一の基本骨格を有するが側鎖構造の異なるビタミン K<sub>1</sub> および MK-4 より側鎖の長いビタミン K<sub>2</sub> である MK-7 を用いて、同様に遺伝子の発現誘導を解析した。ビタミン K 依存性γ-カルボキシラーゼ(GGCX)の関与を検討するため、GGCX siRNA による発現誘導への効果を解析した。

### (3) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

GC 受容体(GR)は、アンドロゲン受容体(AR)、プロゲステロン受容体(PR)、ミネラルコルチコイド受容体(MR)と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。本研究グループでは、ヒト前立腺癌細胞 LNCaP における AR 結合部位について、ChIP-on-chip 法により同定しており、AR 結合部位として機能するゲノム領域のうち、ヒト骨芽細胞様細胞 SaOS2、不死化ヒト胎児骨芽細胞株 hFOB 1.19 および GR 安定発現 293 細胞(293GR)において、GR 結合部位として機能するものがあるかについて検討を行った。方法は、SaOS2、hFOB 1.19 および 293GR 細胞において、ホルモン枯渇条件の培養 3 日後、合成ステロイド Dexamethasone (10 nM) または溶媒(0.1%エタノール)による刺激を 1 時間行い、GR 特異的抗体を用いて 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 GR 結合の濃縮倍率を

Real-time PCRにて定量的に検討した。GR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。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨芽細胞系におけるビタミン K 標的遺伝子の解析

高転写活性でリガンド応答性のあるMG63/Flag-VP16C-SXR細胞とコントロールベクター発現MG63細胞をそれぞれMK-4と溶媒コントロールで刺激し、マイクロアレイ解析を行った。溶媒コントロールに対してMK-4により発現上昇を認めるもののうち、MG63/Flag-VP16C-SXR細胞とベクター発現MG63細胞の両方において発現量が上昇する遺伝子はSXR依存性遺伝子として除外して、それ以外の遺伝子をMK-4標的遺伝子として同定した。このうち、骨代謝への関与が予想されるgrowth differentiation factor 15 (GDF15)とstanniocalcin 2 (STC2)について解析を行い、どちらの遺伝子もMG63細胞においてMK-4刺激後48時間におけるmRNAの発現誘導が強く認められた。マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1においても、MK-4刺激により、容量依存的にGDF15およびSTC2 mRNAの著明な発現誘導を認めた。MG63細胞におけるGDF15およびSTC2 mRNAの発現誘導は、MK-4の側鎖構造であるゲラニルゲラニオールだけでは起こらず、他のビタミンK構造であるビタミン $K_1$ とビタミン $K_2$ のうちで側鎖のイソプレニ鎖の長さが異なるMK-7でも起こらなかった。MK-4によるGDF15とSTC2 mRNAの発現誘導において、 $\gamma$ -カルボキシラーゼ (GGCX)の関与を検討するため、MG63細胞にGGCX siRNAを作用させたところ、GGCX mRNA発現はノックダウンする条件において、GDF15とSTC2 mRNAの発現に対する影響は認められず、GGCX非依存性のMK-4作用が示された。また、SXRを介する発現誘導でない点についても、SXRの代表的リガンドであるリファンピシンによりSXR応答遺伝子CYP3A4のmRNA発現は誘導される条件にて、両者のmRNA発現上昇は起こらないことを確認した。以上から、ビタミンK (MK-4)にはSXRお

よびGGCX非依存性の新しい作用があることが示唆された。

##### (2) 骨芽細胞系におけるPKAを介したビタミン K 作用経路の検討

MK-4による新しいビタミンK作用の1つの可能性として、骨芽細胞系の転写調節機構として重要なプロテインキナーゼA (PKA)のリン酸化に注目した。骨芽細胞系においては、副甲状腺ホルモンや $\beta$ 2 アドレナリン受容体を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMP産生が上昇し、PKAリン酸化が起こることが知られている。MG63細胞において、MK-4 (10  $\mu$ M)の24時間までの刺激により、PKA蛋白質のリン酸化が経時的に誘導されることがWesternプロットにより示された。フォルスコリンによりアデニル酸シクラーゼを直接活性化することによっても、GDF15とSTC2 mRNAの発現上昇は有意に起こることが示された。また、MK-4によるGDF15とSTC2 mRNAの発現誘導は、PKA阻害薬のH89とPKA特異的siRNAによっても有意に抑制され、PKAの関与が示された。

##### (3) 骨芽細胞系におけるステロイド応答遺伝子の解析

ヒト前立腺癌細胞におけるAR結合部位の解析結果から、骨芽細胞系においてGR結合部位としても機能するゲノム領域を探索する目的で、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法によりしきい値 $P < 1e-5$ として同定されたAR結合部位について、リガンド依存性のGR結合能について検討を行った。細胞系としては、ヒト骨芽細胞様細胞SaOS2、不死化ヒト胎児骨芽細胞株hFOB 1.19およびGR安定発現293細胞(293GR)を用いた。このうち、全ての細胞株において、dexamethasone (10 nM) 1時間刺激により、1.5倍以上のGR結合性濃縮を認める領域として、2箇所が同定された。本研究方法により、骨芽細胞系において、ステロイドホルモン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。

#### (4) PXR 欠損マウスにおける骨形態観察

PXR 欠損マウスでは、海綿骨および皮質骨の双方において骨量減少が認められたため、ビタミン K の作用点である SXR が骨代謝の調節因子として重要である可能性が示された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Horie-Inoue K, Inoue S. Steroid and xenobiotic receptor mediates a novel vitamin K2 signaling pathway in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab* 26: 9-12, 2007, 査読有

Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39: 239-247, 2007, 査読有

Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 26: 4453-4463, 2007, 査読有

Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S. Increased expression of estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer*. 120:2325-2330, 2007 査読有

Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S. Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate* 67:1029-1037, 2007 査読有

Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 358:813-818, 2007 査読有

Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, Yoneya S, Okazaki Y, Inoue S. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet* 52:636-641, 2007, 査読有

Takayama K, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Murakami K, Hayashizaki Y, Ouchi Y, Inoue S. FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374:388-393, 2008, 査読有

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* 1789:71-77, 2009, 査読有

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, 査読有

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, 査読有

Takayama K, Tsutsumi S, 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, 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Horie-Inoue K, Takayama K, Inoue S.  
ChIP-on-chip analysis reveals novel  
glucocorticoid response genes adjacent  
to genomic binding sites for steroid  
hormone receptor in osteoblastic cells.  
第29回米国骨ミネラル研究学会年会,  
2007.9.17, 米国・ホノルル

Horie-Inoue K, Takayama K, Inoue S.  
Common and differential responses to  
steroid hormones via their cognate  
receptor-binding sites in human genome.  
21st International Mammalian Genome  
Conference, 2007.10.28, 京都

Horie-Inoue K, Takayama K, Ikeda K,  
Inoue S. Systemic identification of  
common and unique response genes for  
various steroid hormones in the human  
ENCODE genomic regions. CBI Annual  
Meeting 2008 International Symposium,  
2008.10.23, 東京

東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、  
堀江公仁子、大内尉義、Bruce Blumberg、  
井上聡. 核内受容体 PXR ノックアウトマウスは海綿骨および皮質骨の骨量減少を呈する. 第26回日本骨代謝学会, 2008.10.29, 大阪

東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、  
堀江公仁子、大内尉義、Bruce Blumberg、  
井上聡. 核内受容体 PXR ノックアウトマウスは著明な骨量減少を呈する. 第12回 Vitamin K & Aging 研究会, 2009.2.14, 東京

〔図書〕(計1件)

堀江公仁子、井上聡(五十嵐和彦、深水昭吉、大熊芳明、山本雅之編). 転写因子による生命現象解明の最前線 第4章 遺伝情報発現と疾患 6節: ビタミン K 作用と疾患 核内受容体を介する発現調節機構への新展開(分担執筆). 7 ページ数(242 ページ中), 2007, 羊土社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE KUNIKO)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90261982

(2) 研究分担者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)  
埼玉医科大学・医学部・客員教授  
研究者番号: 40251251