

自己評価報告書

平成 23年 3月 13日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2011
 課題番号：20790283
 研究課題名(和文) 骨形成・骨吸収に関するおとり受容体の解析：前立腺癌とその骨転移における役割
 研究課題名(英文) Analysis of decoy receptors in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis: a role in prostate cancer and its bone metastasis
 研究代表者
 近藤 武史 (KONDO TAKESHI)
 神戸大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：20335441

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学
 キーワード：BAMBI, TGF- β , BMP, pseudoreceptor

1. 研究計画の概要

骨代謝制御を司るおとり受容体(デコイレセプター)の中でも特に OPG と BAMBI を中心に解析し、その骨代謝調節機構と前立腺癌骨転移に関する役割につき解析する。本研究計画においては、以下の点について詳細な解析を加える。

- (1) OPG の転写調節機構の解析をプロモータ構造を中心に行う
- (2) 骨化及び骨芽細胞分化における BAMBI の役割を *in vitro* で細胞株を用いて検討する
- (3) 前立腺癌癌化過程における BAMBI の役割(臨床病理学的解析)
- (4) 前立腺癌骨転移巣での BAMBI の役割(臨床病理学的解析)
- (5) 骨特異的に BAMBI を高発現させた transgenic mouse の作製及びその解析

2. 研究の進捗状況

BMP (Bone Morphogenetic protein: 骨形成因子)は、骨形成・骨芽細胞分化に重要なサイトカインである。BMP and activin membrane-bound inhibitor(以下BAMBI)は、TGF- β /BMP type I受容体類似の膜貫通型の糖蛋白であり、キナーゼ領域を有さないためBMPやTGF- β の偽受容体pseudoreceptorとして機能する。

(1) 骨化及び骨芽細胞分化におけるBAMBIの役割を *in vitro* で細胞株を用いて検討した。まず、マウスBAMBIプロモータ領域の一部をクロニングすることに成功し、その構造解析を

進めた。次にマウスBAMBI遺伝子の転写開始部位を5' -RACE法にて決定した。次に骨芽細胞の分化段階でBAMBI発現がどう変化するかを検討するために、C2C12筋芽細胞をBMP-2にて処理し骨芽細胞に分化させ、この間のBAMBI mRNA発現の変化をrealtime PCR法にて検討した。骨芽細胞への分化と共にBAMBI発現が著明に上昇するという結果を得た。マウスBAMBI遺伝子上流領域を用いてST2細胞に一時導入してpromoter活性を検討し、TGF- β 、BMP-2、LiCl、LY294002等の薬剤で処理し、プロモータ活性の変化を調べ、TGF- β /BMPシグナル系及びb-cateninシグナル系の双方の影響を受けることを示した。

(2) 骨芽細胞株ST2細胞において一過性のsiRNA導入によってBAMBI発現を抑制し、骨芽細胞分化マーカーの動きを詳細に検討すると共に、BAMBI siRNA発現ベクターのstable transfectantを作製し、骨芽細胞分化マーカーの動きを検討した。Southern blotによってマウス各組織のBAMBIプロモータ領域のメチル化をスクリーニングし、マウスBAMBI遺伝子プロモータのメチル化を検討し、臓器特異的なBAMBI発現との関連をみた。特にマウスBAMBI遺伝子転写開始部位周辺のCpG islandのメチル化状態をbisulphite mappingによって検討した。

現在得られた成果については論文にまとめると共に更なる実験の計画を行なっている。また、BAMBIを含むTGF- β signalingに関する総説を共同研究者のDr. Sandaが執筆し、Cancers誌に投稿中である。

3. 現在までの達成度

④遅れている。

(理由)

細胞株を用いた解析は比較的進捗している(計画(1)(2))。臨床病理学的解析の予備的検討は進んでいるが、症例の収集の遅れより本格的に着手できていない(計画(3)(4))。また、計画(5)のマウス作製も遅れている。

4. 今後の研究の推進方策

当初の研究計画には含まれていないものであるが、RANK-RANKLシグナル系のおとり受容体として機能するOPGのプロモータ領域の解析については、さきに作製したマウスOPGプロモータコンストラクト(Kondo T *et al.* J Bone Miner Res 2004)を癌研究会癌研究所生化学部(現愛媛大学)の今村健志先生に供与し、今まであまり知られていないBMP2の骨吸収制御機構についての共同研究を進めており現在論文投稿中である。

本来の実験計画に含まれており、かつ成果の出ているものについては、平成23年度中に部分的にでも論文作製を急ぐこととしている。

また、平成23年度には前立腺癌臨床検体の収集を鋭意進め、免疫染色を中心とした解析を急ぐと共に、遺伝子改変動物の作製を急ぐ予定としている。

5. 代表的な研究成果

(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6件)

1. Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaki A, Horiuchi K, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF- κ B. Mol Cell Biochem, 有, in press
2. Khin SS, Kitazawa R, Win N, Aye TT, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer. Int J Cancer, 有, 125, 328-338, 2009.
3. Kitazawa R, Mori K, Yamaguchi A, Kondo T, Kitazawa S. Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and vitamin D3. J Cell Biochem, 有, 105, 1289-1297, 2008.

4. Ishii J, Kitazawa R, Mori K, McHugh KP, Morii E, Kondo T, Kitazawa S.

Lipopolysaccharide suppresses RANK gene expression in macrophages by down-regulating PU.1 and MITF. J Cell Biochem, 有, 105, 896-904, 2008.

5. Kondo T, Kitazawa R, Kitazawa S. Gastric remnant adenocarcinoma with micropapillary component. Dig Dis Sci, 有, 53, 2287-2289, 2008.

[学会発表] (計2件)

1. 近藤武史ほか、マウスBAMBI遺伝子発現調節機構の解析、第98回日本病理学会総会、2009年5月、京都
2. 近藤武史ほか、マウスBAMBI遺伝子発現の調節機構、第97回日本病理学会総会、2008年5月、金沢

[図書] (計1件)

1. 近藤武史、榎木英介、岩波書店、わたしの病気は何ですか?-病理診断科への招待-、2010年、96ページ

[その他]

ホームページ

<http://researchmap.jp/takeshikondo/>