

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 20 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・骨吸収に関与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

## 研究成果の概要（和文）：

マウスBAMBIプロモータをクローニングし、骨芽細胞分化と共にBAMBI発現が著明に上昇する結果を得た。プロモータ活性を検討し、BMPシグナル系及びb-カテニンシグナル系の双方の影響を受けることを示した。siRNA導入によって骨芽細胞株での分化マーカーの動きを検討した。マウス各組織でプロモータ領域メチル化をスクリーニングし、特に転写開始部位周辺のメチル化状態を検討した。BAMBIは骨芽細胞分化において発現低下によって最終分化を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*In vitro* studies revealed that BAMBI mRNA expression significantly increased during osteoblastic differentiation. It was suggested that BAMBI expression plays an important role as part of the negative feedback loop system in TGF- $\beta$ /BMP signaling and BAMBI is regulated by both TGF- $\beta$ /BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways. I then assessed the methylation status of the BAMBI promoter region and found tissue-specific distribution of promoter hypermethylation. It is therefore speculated that the epigenetic regulation of BAMBI gene expression by CpG hypermethylation is physiologically involved in tissue- and development-specific BAMBI expression. BAMBI is a target gene of both BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and may be involved in preventing some of the osteoblast precursors from terminal differentiation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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- $\beta$ , BMP, pseudoreceptor

1. 研究開始当初の背景  
 破骨細胞抑制因子オステオプロテグリン  
 Osteoprotegerin (以下 OPG) は、腫瘍壊死因

子受容体スーパーファミリーに属する細胞膜  
 貫通領域を持たない分泌蛋白である。OPG は

骨芽細胞/ストローマ細胞によって産生・分泌される。OPGは破骨細胞分化因子RANKLとそのレセプターであるRANKとの結合をデコイレセプターとして阻害し、破骨細胞形成を抑制する。このように破骨細胞の分化には、正に制御するRANKLと負に制御するOPGの二つの因子が重要であり、この二つの因子のreciprocalな調節が骨代謝の恒常性を維持する上で重要と考えられる。OPGは、骨粗鬆症などの様々な骨代謝性疾患、癌の骨転移形成などの病理病態にも深く関わっており、OPGの発現調節機構を解明することは疾患の病態解明や治療戦略の標的という点で非常に意義深い。

一方、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- $\beta$ /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- $\beta$ の偽受容体として機能する。ヒト癌ではTGF- $\beta$ の癌増殖抑制シグナルを遮断することにより癌の進展に寄与することが報告されているが、骨形成における役割はいまだ不明な点が多い。一般的にdesmoid腫瘍では $\beta$ -cateninの点突然変異により分解が阻害され、核内に $\beta$ -cateninが高度に蓄積することが腫瘍化に重要とされている。その一方で、間葉系細胞において $\beta$ -cateninは骨形成シグナルであるが、通常desmoid腫瘍では骨形成をみることはまれである。desmoid腫瘍では $\beta$ -cateninシグナルの亢進と同時に、BMPの偽受容体であるBAMBIがBMPシグナルを遮断することにより骨形成が抑制されていることが明らかになった。骨形成巣を伴うdesmoid腫瘍では骨形成巣においてのみBAMBI遺伝子プロモータのCpG islandメチル化によるBAMBI発

現低下を認め、BAMBIによるBMPに対する抑制シグナルの解除により局所的な異所性骨形成に到ることを共同研究者が明らかにしていた(Kitazawa et al. JBMR 2005)。

BAMBIはTGF- $\beta$ /BMPシグナル系及びWnt  $\beta$ -cateninシグナル系両者により発現調節を受けていることが推定されていた。申請者らがその一部のクローニングに成功していたマウスBAMBIプロモータ領域は、ヒトBAMBIプロモータ領域と基本的な構造が極めて類似しており、ヒトマウスに共通した発現調節機構が推定されていた。また、造骨性骨転移を形成することの多い前立腺癌では、BMP/TGF- $\beta$ シグナルが亢進し、BAMBIの発現は前立腺癌では低下していることが推測されていた。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

本研究計画においては、当初以下の点について詳細な解析を加える予定であった。

- (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

## 4. 研究成果

(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ー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プロモータ活性を検討し、TGF- $\beta$ 、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- $\beta$  /BMPシグナル系及び $\beta$ -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。サザンブロット法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。

(3)前立腺癌癌化過程におけるBAMBIの役割を臨床病理学的に解析した。ヒトBAMBI蛋白に対する抗体に関しては、細胞外ドメインをターゲットとしたマウスポリクローナル抗体を作製し、その特異性はウェスタンブロット法を用いて確認した。その上で前立腺癌臨床検体にて予備実験とし、BAMBIの発現を検索した。典型例を用いた免疫染色の予検討では、ヒト正常前立腺組織においてBAMBIは、何らかの膜構造と関連してドット状に陽性所見を認めた。前立腺上皮内新生物 (PIN)では、BAMBI発現が低下し、癌では完全に陰性であった。

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 *et al.* J Bone Miner Res 2004)を愛媛大学大学院医学系研究科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。なお、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  $\beta$  signalingに関する総説は共同研究者のDr.SandaがCancers誌に投稿し、受理された (論文業績2)。

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7件)

1. A p.D116G mutation in CREB1 leads to novel multiple malformation syndrome resembling CrebA knockout mouse.  
Kitazawa S, Kondo T, Mori K, Yokoyama N, Matsuo M, Kitazawa R. Hum Mutat, 有, in press
2. Khin SS, Kitazawa R, Kondo T, Idei, Fujimoto M, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa S. Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) Signaling in Cancer Cancers, 有, 3, 982-993, 2011
3. 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- $\kappa$ B. Mol Cell Biochem, 有, 350, 29-38, 2011
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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 BAMB1 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

2. 近藤武史ほか、マウス BAMB1 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

〔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/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者