

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08298

研究課題名(和文) 大腸癌および炎症性腸疾患に関わるVDRの高次機能の解明

研究課題名(英文) Tissue-specific function of VDR on colitis and colitic cancer

研究代表者

山本 陽子 (YAMAMOTO, YOKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30376644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸特異的VDRKOマウスを作出し、炎症性腸疾患および炎症性発癌モデル実験をおこない、両疾患に対する大腸のVDRの機能解明をめざした。大腸特異的VDRKOマウスは炎症性発癌による死亡率が高かったが、生存したマウスについては両モデルともコントロールマウスとの差は認められなかった。これは両モデルにおいてコントロールマウスの大腸におけるVdr遺伝子発現が減少したためであると考えられた。一方コントロールマウスで高頻度に認められた脱肛および腸管の周辺組織への癒着は大腸特異的VDRKOマウスでは認められず、大腸のVDRがこれらの表現型に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated biological functions of vitamin D receptor (VDR) on colitis and colitic cancer. Colon epithelium-specific VDRKO mice were generated with CDX2P-CreERT2 transgenic mice and VDR flox mice. Although colon epithelium-specific VDRKO mice with colitic cancer had worse overall survival than control mice with colitic cancer, no differences were observed in colitis or colitic cancer specific phenotypes between colon epithelium-specific VDRKO and control mice, since decreased expression of Vdr gene in colon of control mice treated with DSS or AOM/DSS was observed.

研究分野：大腸肛門外科学

キーワード：VDR 大腸癌 炎症性腸疾患 ビタミンD 遺伝子欠損マウス

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン D は古くから骨代謝の主要調節因子として知られてきたが、この他にカルシウム代謝や細胞の増殖抑制・分化誘導を制御することも証明されている。ビタミン D の生理作用はリガンドである活性型ビタミン D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) がビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、標的遺伝子の転写制御を行うことにより発揮される。現在までにビタミン D は大腸癌の発症リスクを低下させたり、大腸癌患者の生存率を高めるといった疫学的研究報告がなされているが、これらは血中の活性型ビタミン D の前駆体である  $25(\text{OH})\text{D}$  濃度や日照時間と罹患率や生存率との相関を検討したものである。また他にも VDR 遺伝子多型と大腸癌発症率との関連も多数報告されていることから、大腸癌の発症には VDR が深く関わっていることが示唆されるが、それらの分子メカニズムについては不明な点が多く、カルシウム代謝を介した間接的な作用によるものか、大腸における VDR の直接作用によるものかは明らかになっていない。

研究代表者はこれまで Cre/loxP システムによる組織特異的 *Vdr* 遺伝子欠損マウスの作出に不可欠な、*Vdr* 遺伝子座への *loxP* 配列導入マウスである VDR flox マウスを作出し、さらにこの VDR flox マウスと全身の Cre 発現マウスとを交配させることで全身型の VDRKO マウスを作出した。この VDRKO マウスは成長障害、低カルシウム・低リン血症、高副甲状腺ホルモン (PTH) 血症、著しい血中  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  高値、骨形成不全 (骨量・骨密度低下、非石灰化骨(類骨)増加、成長板軟骨層形成異常)、脱毛といった 2 型くる病に典型的な表現型を示し、16 週齢頃までに大部分が致死となるが、高カルシウム食にて飼育すると、致死性は回避され、血中カルシウムおよびリンの値は正常値まで回復し、成長障害や骨形成不全もほぼ完全に回復するが、血中 PTH および  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  濃度はやや改善する

ものの元に戻らず、脱毛は全く改善されなかった。この VDRKO マウスに実験的炎症性腸疾患誘発モデルである 5% Dextran Sodium Sulfate (DSS) (平均分子量 約 5,000) 飲水投与実験をおこなった結果、VDRKO マウスは野生型マウスに比べ炎症性腸疾患の症状が重篤化することが明らかになり、VDR は炎症性腸疾患の症状を抑制する効果があることが示唆された。しかしながら DSS による実験的炎症性腸疾患誘発モデルでは症状が進むにつれマウスの食餌摂取量が減少するため高カルシウム食によるカルシウム代謝正常化が必ずしも期待できず、これらの表現型がカルシウム代謝を介した間接的な作用によるものか、大腸における VDR の直接作用によるものか、詳しい分子メカニズムを明らかにするには至らなかった。

VDR flox マウスは組織特異的な Cre 発現マウスとの交配により、Cre/loxP システムによる組織特異的 VDRKO マウスを作出することが可能であり、研究代表者はこれまでに VDR flox マウスと骨芽細胞特異的な Cre 発現マウスとを交配させることで骨芽細胞特異的 VDRKO マウスを作出し解析を行った。この結果、骨芽細胞特異的 VDRKO マウスは野生型と比較し、カルシウム代謝に変化はみられないものの、骨量および骨密度が増加していることを見出した。これらのことから VDR は単に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いることが示唆され、VDR はカルシウム代謝を介して骨量を正に調節するが、骨組織においては負に調節していることを明らかにした。

このように組織特異的 VDRKO マウスの解析により、小腸や腎臓におけるカルシウム代謝調節を無視できる系において、各組織における VDR の機能の解明が可能となる。前述のように、大腸癌および炎症性腸疾患の発症

には VDR が深く関わっていることが示唆されるが、それらの分子メカニズムについては不明な点が多く、カルシウム代謝を介した間接的な作用によるものか、大腸における VDR の直接作用によるものかは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では大腸特異的 *Cre* 発現マウスと VDR flox マウスとの交配により大腸特異的 VDRKO マウスを作出し、Dextran Sodium Sulfate (DSS) による炎症性腸疾患誘発モデル、Azoxymethan (AOM) および DSS による炎症性発癌モデル実験をおこない、その表現型を詳細に解析することにより、これらの疾患に対する大腸における VDR の機能の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸特異的 VDRKO マウスの作出及び表現型の解析

Cre/loxP システムを用いた大腸特異的 VDRKO マウスは VDR flox マウスとタモキシフェン誘導性の大腸特異的 *Cre* 発現マウス (*CDX2P-CreER<sup>T2(tg/0)</sup>*) とを交配させ得られた 8-10 週齢の *CDX2P-CreER<sup>T2(tg/0)</sup>/Vdr<sup>flox/flox</sup>* マウスに、体重 1 kg あたり 100 mg のタモキシフェンの腹腔内投与を連続 3 日間行うことにより作出した。

### (2) VDR 標的遺伝子の同定

マウスの各組織から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて発現量に差が見られる遺伝子を網羅的に解析することにより、VDR の標的遺伝子の候補を見出した。さらに得られた候補遺伝子について、リアルタイム PCR

によりさらなる検討をおこなった。

### (3) DSS による炎症性腸疾患誘発モデル (Colitis モデル)を用いた大腸特異的 VDRKO マウスの表現型の解析

タモキシフェン投与後 2 週の大腸特異的 VDRKO マウスに、2% DSS (M.W. 36,000-50,000 Da)を 5 日間自由飲水させた後、翌日あるいは 1 週間後にサンプリングし、表現型を解析した。

### (4) AOM/DSS による炎症性発癌モデル (Colitic Cancer モデル)を用いた大腸特異的 VDRKO マウスの表現型の解析

タモキシフェン投与後 2 週の大腸特異的 VDRKO マウスに、体重 1 kg あたり 10 mg の AOM を腹腔内投与し、投与 5 日後より 2% DSS を 5 日、水を 15 日、2% DSS を 5 日、水を 15 日、2% DSS を 5 日飲水させた後、通常飲水に戻し、AOM 投与から 150 日後まで飼育後にサンプリングし表現型を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸特異的 VDRKO マウスの作出及び表現型の解析

当初の予定では、大腸特異的 *Cre* 発現マウスは Jackson Laboratory から *Carbonic anhydrase 1 promoter (Car1)-Cre* マウスの凍結胚を入手する予定であったが、*Car1-Cre* マウスは凍結胚で維持されているものの、凍結胚を直接入手することができず、Jackson Laboratory において凍結胚から個体化されたマウスしか入手できないことが判明した。これでは当初予定していた計画よりも余計に時間も個体化費用もかかってしまうため、計画を変更し成体マウスで系統維持されてい

るタモキシフェン誘導性の大腸特異的 *Cre* 発現マウス  $CDX2P-CreER^{T2(tg/0)}$  を用いることとした。

タモキシフェン誘導性の  $CDX2P-CreER^{T2(tg/0)}/Vdr^{flox/flox}$  マウスを作成し、タモキシフェン投与後4週における *Vdr* の遺伝子発現を検討した結果、このマウスの小腸、腎臓における *Vdr* 遺伝子発現はコントロールである  $VDR^{flox/flox}$  マウスとの有意差が認められず、両組織における *VDR* の標的遺伝子である *Sl100g* の遺伝子発現についても有意差は認められなかった。また、血中カルシウム、リン濃度についても有意差は認められなかった。

次に大腸における *Vdr* の遺伝子発現を検討したところ、このマウスでは近位大腸における *Vdr* の遺伝子発現量が有意に減少しており大腸特異的 *VDRKO* マウスであることが判明したが、遠位大腸においては *Vdr* の遺伝子発現量は減少していたものの個体差が大きく有意差は認められなかった。

## (2) *VDR* 標的遺伝子の同定

大腸特異的 *VDRKO* マウスとコントロールマウスの近位大腸における遺伝子発現の違いをマイクロアレイにより検討したところ、*VDR* の新規標的遺伝子候補がいくつか同定できた。

## (3) DSS による炎症性腸疾患誘発モデル (Colitis モデル) を用いた大腸特異的 *VDRKO* マウスの表現型の解析

いずれのマウスにおいても 2% DSS の 5 日間自由飲水により、体重減少や下血、下痢、軟便、腸管の短縮といった炎症性腸疾患の症状が観察され、その後 1 週間で体重減少や便の状態、腸管の長さは回復傾向が認められたが、大腸特異的 *VDRKO* マウスとコントロー

ルマウスで有意差は認められなかった。また、*Vdr* の遺伝子発現について検討したところ、2% DSS の 5 日間自由飲水により、コントロールマウスの近位および遠位大腸において *Vdr* の遺伝子発現の減少が認められた。よって大腸特異的 *VDRKO* マウスとコントロールマウスで表現型に差が認められなかった原因については 2% DSS の 5 日間自由飲水によりコントロールマウスの大腸における *Vdr* 遺伝子発現が減少したため、大腸特異的 *VDRKO* と同様の表現型を示したと考えられた。

## (4) AOM/DSS による炎症性発癌モデル (Colitic Cancer モデル) を用いた大腸特異的 *VDRKO* マウスの表現型の解析

Colitic Cancer モデルでは大腸特異的 *VDRKO* マウスの方が死亡率が高かったが、AOM 投与 150 日後まで生存したマウスでは、小腸、腎臓における *Vdr* 遺伝子発現および血中カルシウム、リン濃度についてはコントロールマウスとの有意差は認められなかった。また、Colitis モデル同様、Colitic Cancer モデルにおいてもコントロールマウスの近位および遠位大腸において *Vdr* の遺伝子発現の減少が認められ、いずれのマウスにおいても遠位大腸における発癌は認められたが、大腸特異的 *VDRKO* マウスとコントロールマウスの表現型の比較では Colitic Cancer に対する *VDR* の高次機能の解明には至らなかった。しかしながらコントロールマウスで高頻度に認められた脱肛および薬剤の腹腔内注射刺激によって誘発された腸管の周辺組織への癒着は大腸特異的 *VDRKO* マウスでは認められず、大腸の *VDR* がこれらの表現型に関与していることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山本 陽子 (YAMAMOTO, Yoko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30376644

### (2)研究分担者

渡邊 聡明 (WATANABE, Toshiaki)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80210920  
(平成 29 年度まで研究分担者)