

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19555

研究課題名(和文) The investigation of Vitamin D system on muscle

研究課題名(英文) The investigation of Vitamin D system on muscle

研究代表者

MARIA TSOUNPRA (Maria, Tsoumpa)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・科研費研究員

研究者番号：80756198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉特異的ビタミンD受容体(VDR)ノックアウトマウスを作成した。本マウスでは、対照マウスに比較し握力の低下を認めた。さらにマイクロアレイを用いた筋肉の網羅的遺伝子発現解析、in vitroでの検討などにより、VDRを介する系がジストロフィン結合蛋白質複合体の構成要因の発現を調節することを見いだした。本研究の成果は、筋肉に作用する新たなVDRリガンドの開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The active form of vitamin D (VD3) is a calcium regulating hormone that exerts its tissue-specific biological actions through binding to its vitamin D receptor (VDR). I aimed to identify genes that exert a VD3/VDR direct action in muscle. I generated two muscle-specific VDR knockout (VDRKO) mice models that exhibited reduced grip power compared to control littermates. I performed microarray studies and focused on genes that were downregulated in muscle of VDRKO mice. I confirmed this VD3 dependent regulation by induction of myogenesis and promoter analyses using in vitro assays. Short-term (12-48 hrs) or long term (3-7 days) cell supplementation of VD3 affected members of dystrophin associated protein complex (DAPC) which is important for muscle integrity. Notably, DAPC genes were VDR-dependent regulated in early stages of muscle regeneration. This project is ongoing and the findings may lead to drug design of novel vitamin D analogues that will aid preservation of muscle strength.

研究分野：Endocrinology

キーワード：ビタミンD muscle

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン D は筋代謝に影響する可能性が指摘されており (Boland 1986; Girgis *et al.* 2013)、ビタミン D 欠乏は筋力低下や転倒と関連すると報告されている (Bischoff-Ferrari *et al.* 2009, Tieland *et al.*, 2013, Iolascon *et al.*, 2015)。一方 この作用の詳細や作用機序には不明な点が残されている。活性型ビタミン D である 1,25-水酸化ビタミン D (1,25D) はビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、標的遺伝子の転写を調節することによりカルシウム調節ホルモンとしての作用を発揮している。1,25D は、筋発生の過程で遺伝子発現を調節すること (Endo *et al.* 2003)、マウス筋細胞 C2C12 の増殖や分化に影響することが報告されている (Girgis *et al.* 2014)。しかし、これらの 1,25D 作用が VDR を介する作用であるのかについては、必ずしも明らかではない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、筋肉特異的 VDR ノックアウトマウスを用いて筋細胞の分化や筋肉機能に及ぼす VDR

の生理的作用を解明するとともに、筋肉における VDR の標的遺伝子を同定し、これらの遺伝子の筋発生や筋再生における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

VDR<sup>flox/flox</sup> マウス (Cromphaut *et al.* 2001) を、筋肉特異的に Cre 遺伝子を発現する HSA (human skeletal actin)-Cre、あるいは Mlc1f (myosin light chain 1f)-Cre トランスジェニックマウスと交配することにより (Miniou *et al.* 1999, Bothe *et al.* 2000)、筋肉特異的 VDR ノックアウトマウスを作成した。得られたマウスの握力を測定するとともに、前脛骨筋を用いたマイクロアレイ解析により、VDR 標的遺伝子を同定した。これらの遺伝子の作用を C2C12 細胞に加え、塩化バリウムを注入し筋再生を観察するモデルを用いて検討した。

## 4. 研究成果

### A) 握力

筋肉特異的 VDR ノックアウトマウスは、対照マウスに比較し握力の低下

傾向を示した。

## B) VDR 標的遺伝子の同定

マイクロアレイ解析により、筋肉特異的 VDR マウスで発現が増加する遺伝子として *biglycan* (*Bgn*)、*calcium/calmodulin-dependent protein kinase I* (*CamK1*)、*WD Repeat and FYVE domain containing 1* (*Wdfy1*)、および *TOX high mobility group box family member 4* (*Tox4*) が同定された。これらの結果は、PCR により確認された。

## C) VDR 標的遺伝子の筋細胞への作用

C2C12 への 1,25D の投与により、*Bgn*、*CamK1*、*Wdfy1*、および *Tox4* 発現は用量依存性に抑制された。*Bgn* 遺伝子産物はジストロフィン糖タンパク複合体と関連することから、他のジストロフィン糖タンパク複合体構成成分の遺伝子発現を検討した。その結果 1,25D は、*utrophin* (*Utrn*) と *syntrophin basic 1* (*Sntb1*) の発現を抑制し、*dystrobrevin alpha* (*Dtna1*) の発現を促進した。

## D) VDR 標的遺伝子の筋再生への関与

塩化バリウムを用いた筋再生モデルにおいて、筋再生の初期に *Wdfy1*、*Bgn*、*Dtna*、*Utrn* および *Sntb1* 発現が関与することが明らかとなった。またこれらの遺伝子発現の変化は、VDR ノックアウトマウスにおいて抑制されていた。今後、これらの遺伝子産物の作用につき、さらに検討を進める予定である。

## 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)

Tsoumpra M.K., Sawatsubashi S., Takashi Y. Matsumoto T, Fukumoto S. FGF23 enhances CYP24A1 transcription in Klotho-dependent way via ERK-Egr-1 pathway. *Folia Endocrinologica Japonica*, Vol 93 (2017), P295

Takashi Y., Kinoshita Y., Itoh S., Tsoumpra M.K. Sawatsubashi S.,

Matsumoto T., Fukumoto S.

FGF23 活性調節を担う GALNT3 遺

伝子の転写因子.Folia

Endocrinologica Japonica, Vol 93

(2017), P295

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者: Tsoumpra Maria

国立研究開発法人国立精神・神経医療

研究センター・神経研究所 遺伝子疾

患治療研究部・科研費研究員

研究者番号：16K19555

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )