

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780091
 研究課題名 (和文) 炎症性疾患に対するリガンド非依存的なビタミン D 受容体の機能の解明
 研究課題名 (英文) Tissue specific function of liganded/unliganded VDR on inflammatory disease.
 研究代表者
 山本 陽子 (YAMAMOTO YOKO)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員
 研究者番号：30376644

研究成果の概要 (和文)：

本研究では炎症性疾患に対するビタミン D 受容体 (VDR) の高次機能の解明を目指し研究を行った。VDR 遺伝子欠損 (KO) マウス、VDR のリガンド生合成の鍵酵素の KO (Cyp27b1KO) マウスおよび野生型マウスに炎症性腸疾患を発症させると、VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスは野生型と比較し、より顕著な異常を示した。しかしながら VDRKO マウスと Cyp27b1KO マウスでは両者の表現型に差がなかったため、炎症性腸疾患に対しては、リガンド依存的な VDR の機能が重要であり、症状を抑制する効果があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： The present study aims to find out biological functions of Vitamin D receptor (VDR) on inflammatory disease. VDRKO mice as well as Cyp27b1KO mice exhibit more severe phenotype than WT mice when treated with dextran sodium sulphate (DSS) to induce colitis. However no significant difference was observed in VDRKO mice and Cyp27b1KO mice. These data indicated that vitamin D is indispensable for biological function of VDR in colon and liganded VDR relieved the symptoms of inflammatory bowel disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養化学、ビタミンD、VDR、炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

抗くる病因子として発見されたビタミン D はカルシウム代謝調節、骨や皮膚の増殖抑制・分化促進、免疫応答制御など様々な生理作用を持つ。ビタミン D の生理作用はビタミン D の活性本体である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がリガンド依存性の転写調節因子であるビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、標的遺伝子の転写を制御することによって発揮される。

これまで個体レベルでの VDR の高次機能を明確にするため VDR 遺伝子欠損 (VDRKO) マウスが作出された。VDRKO マウスは離乳後に II 型くる病に典型的な成長障害、骨形成不全、カルシウム代謝異常、脱毛といった表現型を示した。しかし VDRKO マウスで観察された骨形成不全はカルシウム補充により改善され、カルシウム代謝を介した間接的な作用であった。しかしながらカルシウム補充した VDRKO マウスの皮膚における脱毛の改善は観察されなかった。一方 VDR のリガンドである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 合成の鍵酵素である Cyp27b1KO マウスでは脱毛が観察されないことから、皮膚ではリガンド非依存的な VDR の高次機能があると考えられる。

研究代表者らはこれまで $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写活性を示さない VDRAF-2 領域変異導入マウスおよび VDRKO マウスの比較により、皮膚では $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的な VDR の高次機能が確かに存在することを明らかにした。さらにマイクロアレイ解析により皮膚にお

ける $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的な VDR の標的遺伝子の一つとして S100a8 を同定し、VDR は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的に S100a8 遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。この遺伝子の発現は皮膚に限らず、乾癬や関節リウマチ、炎症性腸疾患の患者で高発現しており、これら炎症性疾患の病因の一つであると考えられている。これらの疾患は今だ病気のメカニズムが十分解明されておらず、ビタミン D とこれらの炎症性疾患との関わりも示唆されてはいるものの、その作用機序については不明である。このため $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的な VDR の機能も免疫系に関与するのではないかと考えられる。これまでビタミン D と免疫システムの研究は、VDRKO マウスあるいは Cyp27b1KO マウスを用いた実験や $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与実験で個々になされてきたが、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の免疫系における生理作用については相反する成績も報告され、未解明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では上記に述べたマウスの比較検討により、免疫システムにおける $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存/非依存的な VDR の高次機能を明らかにし、これまで不明であった炎症性疾患のメカニズム解明の糸口とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写活性を示さない VDRAF-2 領域変異導入マウスの解析。

現在までに、*in vitro* の解析により大過剰のリガンド存在下では VDRAF-2 領域変異体にもリガンドが結合する可能性があることが明らかになり、また VDRAF-2 領域変異導入マウスは VDRKO マウス同様、血中 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が顕著に上昇するため、大過剰のリガンドの存在により、生体内で $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写活性をもつことが懸念された。そこで VDRAF-2 領域変異導入マウスと $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 合成の鍵酵素である Cyp27b1KO マウスのダブルミュータントマウスの作出を試み、その表現型の解析をおこなった。

(2) VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスの炎症性腸疾患に対する表現型の解析。

VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスに実験的炎症性腸疾患誘発モデルである 5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 飲水投与をおこない体重変化、大腸長、血便、組織切片像といった炎症性腸疾患の重篤度を判別する項目について検討をおこなった。また大腸組織から RNA を抽出し、皮膚における $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的な VDR の標的遺伝子の一つとして同定した、また炎症性腸疾患の患者で高発現していることが報告されている、S100a8 遺伝子の発現量を RT-PCR 法により検討した。

4. 研究成果

(1) $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写活性を示さない VDRAF-2 領域変異導入マウスの解析。

VDRAF-2 領域変異導入マウスと Cyp27b1KO マウスのダブルミュータントマウスでは血中 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の上昇は見られず、皮膚における表現型についても VDRAF-2 領域変異導入マウスや Cyp27b1KO マウス同様、変化が現れなかった。よって脱毛が観察される VDRKO マウスと異なり、これらのマウスで皮膚が正常であることは $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 非依存的な VDR の高次機能を反映していると考えられる。

(2) VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスの炎症性腸疾患に対する表現型の解析。

VDRKO マウス、Cyp27b1KO マウスともに、体重減少、大腸の長さの短縮、血便、組織切片の異常といった炎症性腸疾患の重篤度を判別する項目について、いずれも野生型と比較し、より顕著な異常を示した。しかしながら VDRKO マウスと 1α KO マウス間の比較では両者の表現型に明らかな差は認められなかった。また大腸における S100a8 遺伝子発現量の変化は VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスで同じパターンを示し、いずれも野生型とは異なっていたが、VDRKO マウスおよび Cyp27b1KO マウスでは野生型に比べ常に遺伝子発現量が上昇しているわけではなく、DSS 飲水投与開始からの経過日数によっては野生型よりも遺伝子発現量が減少する場合もあった。

以上の事から炎症性疾患に対するリガンド依存／非依存的な VDR の機能は組織特異性があると考えられ、DSS 誘発炎症性腸疾患モデルにおいて VDRKO マウスと 1α KO マウスは同じ表現型を示したため大腸における炎症性腸疾患に対しては、リガンド依存的な VDR の機能が重要であり、リガンドの結合した

VDR は炎症性腸疾患の症状を軽減する効果があることが示唆された。

研究開始当初の背景でも述べたように乾癬、関節リウマチ、炎症性腸疾患といった炎症性疾患は今だ病気のメカニズムが十分解明されておらず、ビタミンDとこれらの炎症性疾患との関わりも示唆されてはいるものの、その作用機序については不明である。本研究のように種々のマウスの表現型の比較検討により、今後、免疫システムにおける $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存／非依存的な VDR の高次機能の存在が明らかになれば、これまで不明であった炎症性疾患のメカニズム解明の糸口とすることができるのではないかと考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 陽子 (YAMAMOTO YOKO)
東京大学 分子細胞生物学研究所
特任研究員
研究者番号：30376644

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：