

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06791

研究課題名（和文）動脈硬化抑制に関わる核内受容体の制御ネットワークの解明と創薬応用

研究課題名（英文）Analysis of transcriptional network for nuclear receptor involved in atherosclerosis suppression and its application for drug discovery

研究代表者

松岡 浩史（Matsuoka, Hiroshi）

福山大学・薬学部・准教授

研究者番号：00527533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動脈硬化抑制に作用するROR 核内受容体について、その制御下にある標的遺伝子の同定とともに、その活性化法について検討した。CRISPR-Cas9システムによりROR 遺伝子欠損細胞を作成し、その遺伝子発現と*in vitro*結合性の評価によってROR 標的遺伝子を同定した。また、その標的遺伝子の発現は、ROR を活性化させる合成アゴニストの作用により誘導された。さらなる研究によって、ROR アゴニストによる治療応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化の薬物治療において脂質降下薬が臨床応用されている。しかし、すでに細胞内に蓄積された脂質の除去効果は十分でなく、新たな治療薬の開発が必要である。核内受容体はリガンドにより活性制御が可能であることから、創薬の重要な標的分子として注目されている。本研究では、動脈硬化抑制に作用するROR 核内受容体について、その標的遺伝子を同定し、その制御系をROR アゴニストにより活性化することで細胞内の蓄積脂質の除去作用が示された。今後、ROR 制御系とその活性化様式をより詳細に解析することで、創薬への発展を目指す。

研究成果の概要（英文）：We identified the target genes of the ROR nuclear receptor that suppresses atherosclerosis and analyzed the activation methods of these genes. First, ROR gene-deficient cells were generated by the CRISPR-Cas9 system. Next, target genes of ROR were identified by gene expression and *in vitro* binding ability analysis. In addition, expression of its target genes was induced by synthetic agonists that activate ROR. Further research is expected to lead to therapeutic applications of ROR agonists.

研究分野：遺伝生化学

キーワード：動脈硬化 脂質代謝 核内受容体 発現制御 アゴニスト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患と脳血管疾患は本邦の死因上位であり、その主因は動脈硬化により惹き起こされる。また、動脈硬化の薬物治療においては、スタチン、フィブラートなどの薬剤が臨床現場で応用されている。しかし、これら薬剤は脂質降下作用により予防には効果的であるが、すでに蓄積された脂質を除去する効果は十分でなく、新たな治療薬の開発が必要である。

核内受容体はリガンドにより活性制御が可能であることから、創薬の重要な標的分子として注目されている。ROR (Retinoid-related Orphan Receptor alpha) 核内受容体のノックアウトマウスの表現型は、血漿 HDL コレステロールの低下や過剰な炎症反応を引き起こし、高脂肪食摂取により動脈硬化病変の増悪が示される。すなわち、ROR による転写制御ネットワークのはたらきには、動脈硬化の進展抑制作用があると推測される。このような背景により、ROR 標的遺伝子群の探索とともに、ROR を制御する創薬応用への研究に着手した。

### 2. 研究の目的

動脈硬化抑制に寄与する ROR の標的遺伝子群を探索するとともに、その制御系の活性化に対する ROR アゴニストの効果の評価することで、動脈硬化治療を目指した標的分子の同定および動脈硬化に対する効果的な治療薬の開発を目的とする。

我々がこれまでに確立した ROR 核内受容体の標的遺伝子候補群の選出法を発展させ、ROR 機能欠損細胞を用いた抑制系に加えて、ROR アゴニストを用いた活性化系を組み合わせることで、標的遺伝子を絞り込む。この戦略が確立できれば、他の核内受容体の標的探索やアゴニストの薬理作用を評価する際にも応用可能で汎用性がある。

本研究の発展により、ROR の制御ネットワークを効果的に調節する基盤技術が確立でき、動脈硬化治療への応用が期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、ROR 遺伝子欠損細胞を用いた逆遺伝学的アプローチによる発現解析、および ROR アゴニストを用いた薬理的アプローチによる発現解析を組み合わせ、動脈硬化抑制に関わる遺伝子群を同定した。これら遺伝子は、ROR アゴニストにより調節可能な抗動脈硬化遺伝子であり、動脈硬化モデル動物の病変部位との関連性を評価することにより、動脈硬化の抑制機序の解明と新規薬物療法の基盤開発につながると期待される。

#### (1) ROR 機能欠損細胞により発現減少する遺伝子群の選出

ROR の制御下にある遺伝子群を選出するために、ROR 遺伝子をノックアウトした ROR 機能欠損細胞を用いて、RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。ROR 機能欠損細胞は、CRISPR-Cas9 システムの PITCH-KIKO 法を用いて、ROR 遺伝子の第3エクソン内への薬剤耐性および緑色蛍光タンパク質の遺伝子カセットを挿入することで作成した。この細胞を用いて、RNA-seq 法およびリアルタイム PCR 法により、ROR の抑制により発現減少する遺伝子群を標的候補として選出した。

#### (2) ROR アゴニストにより発現増加する遺伝子群の選出

ROR を活性化させるアゴニストの薬理効果を評価するために、ROR アゴニストの処理細胞を用いて RNA-seq 法およびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。これにより、ROR アゴニストで発現増加する遺伝子群を選出した。

#### (3) 多面的発現比較解析による ROR 標的遺伝子の選出

上記の(1)(2)で選出した各遺伝子群の中から、ROR の標的遺伝子を同定するために、ROR 機能欠損で発現減少し、尚且つ ROR アゴニストで発現増加する遺伝子を多面的アプローチにより抽出した。これにより、ROR 制御下にある遺伝子で、尚且つ ROR アゴニストにより調節可能な遺伝子を選出した。その遺伝子に対して、ROR 過剰発現系や各種 ROR リガンドによる発現への影響をリアルタイム PCR 法で評価した。

#### (4) ROR アゴニスト活性化能の評価系の確立

ROR を活性化させるアゴニストの活性化能を評価するために、HEK293 培養細胞による分泌型ルシフェラーゼアッセイ系を確立した。*Metridia Longa* 由来の分泌型ルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に、ROR 応答配列を含むプロモーターを連結させた pMet-Luc レポーターシステムを用いることで、細胞培養の上清中にルシフェラーゼを分泌させる実験系を構築した。

#### 4. 研究成果

国際ゲノムプロジェクトの成果で得られた48種の核内受容体のノックアウト解析により病態に関連する転写因子が同定され、その一部はすでに国内外で臨床応用されている。例えば、PPAR を標的とする脂質異常症薬（フィブラート系）、PPAR を標的とする糖尿病薬（チアゾリジン系）、GR を標的とする抗炎症薬（ステロイド系）など、多くの核内受容体を分子標的とした薬剤が広く利用されている。一方、本研究で着目する ROR は、動脈硬化の抑制に寄与することは明らかにされているが、その標的遺伝子とアゴニストについては多くの部分が不明である。そこで本研究では、ROR の標的遺伝子を同定するとともに、ROR アゴニストによる活性化の評価系の構築に取り組んだ。この解析技術が確立できれば、疾病に関わる他の核内受容体にも応用可能であり、今後の創薬および生命科学研究の発展に貢献できると期待される。

(1) ROR 機能欠損細胞により発現減少する遺伝子群を選出するために、CRISPR-Cas9 システムの PITCH-KIKO 法によって、ROR 遺伝子内への Puromycin 耐性および緑色蛍光タンパク質の遺伝子カセットを挿入することで ROR 機能欠損の HEK293 細胞を作成した。ROR 機能欠損の確認において、PCR 法によりゲノム DNA への遺伝子カセットの挿入が認められ、リアルタイム PCR 法により ROR の mRNA 発現減少も認められた。さらに、我々がこれまでに明らかにした ROR 標的遺伝子であるオキシステロール代謝酵素 CYP39A1 やコレステロール逆転送系酵素 NCEH1 の mRNA 発現減少も認められた。

ROR 機能欠損細胞および野生型細胞を用いて、RNA-seq 法によりトランスクリプトームを比較した。結果、ROR 欠損により2倍以下に発現減少する327遺伝子および2倍以上に発現増加する230遺伝子を選出された。これら発現減少した遺伝子の中には、既知の ROR 標的遺伝子の他に、新たな ROR 標的遺伝子候補として、免疫、炎症、糖代謝、脂質代謝、細胞接着などの関連遺伝子を選出された。

(2) ROR アゴニストにより発現増加する遺伝子群を選出するために、ROR アゴニストを48時間処理した HEK293 細胞を用いて RNA-seq 法およびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。結果、ROR アゴニストにより2倍以上に発現増加する112遺伝子および2倍以下に発現減少する567遺伝子を選出された。

肝細胞に対する ROR リガンドの影響を評価するために、HepG2 細胞を用いて ROR アゴニストである SR1078 を処理したところ、ROR 標的遺伝子である CYP39A1 の発現亢進が示された。その一方で、ROR インバーサアゴニストである SR1001 を処理したところ、CYP39A1 の発現減少が示された。

(3) 多面的発現比較解析により ROR の標的遺伝子を選出するために、上記の(1)(2)で選出した遺伝子群の中から、ROR 機能欠損で発現減少し、尚且つ ROR アゴニストで発現増加する遺伝子を抽出した。その遺伝子に対して、ROR 過剰発現細胞を用いたリアルタイム PCR 法により mRNA レベルでの発現増加を評価した。これにより、ROR 制御下にある遺伝子で尚且つ ROR アゴニストにより調節可能な遺伝子を選出した。これら遺伝子については、動脈硬化との関連性を明らかにするために、詳細な解析を進めている。

(4) ROR アゴニストの活性化能を評価するために、HEK293 培養細胞による分泌型ルシフェラーゼアッセイ系の確立を試みた。*Metridia Longa* 由来の分泌型ルシフェラーゼ遺伝子上流に、ROR 応答配列を含むプロモーターを連結させた pMet-Luc レポーターシステムを作成し、これを用いて HEK293 細胞による分泌型ルシフェラーゼ実験系を構築した。既知の ROR アゴニストによる活性化能を評価するために、合成 SR1078 および天然化合物ノビレチンを処理したところ、いずれの化合物においても活性化が示され、ROR アゴニストの評価系が確立された。

今後、本研究により選出した ROR 標的遺伝子群において、それらの ROR アゴニストを介した動脈硬化抑制作用について解析を進め、創薬分野への応用を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 松岡浩史、道原明宏	4. 巻 50
2. 論文標題 ROR 核内受容体を標的分子とした動脈硬化治療への応用	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 32～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Hiroshi	4. 巻 143
2. 論文標題 Identification of Target Genes for Retinoid-related Orphan Receptors Involved in the Suppression of Atherosclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 27～36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.22-00144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Hiroshi, Yamaoka Alice, Hamashima Takahiro, Shima Akiho, Kosako Marin, Tahara Yuma, Kamishikiryo Jun, Michihara Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 EGF-Dependent Activation of ELK1 Contributes to the Induction of CLDN1 Expression Involved in Tight Junction Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1792～1792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10081792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Hiroshi, Michihara Akihiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Identification of the ROR Transcriptional Network Contributes to the Search for Therapeutic Targets in Atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1607～1616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 核内受容体を標的とした血管疾患の新規治療法の確立 ~ ROR 作動性リガンドによる創薬を目指して ~
3. 学会等名 2023年度福山大学研究成果発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深坂日向子、松岡浩史、小迫舞鈴、井野蒼、高橋希弥、道原明宏
2. 発表標題 ヒドロキシコレステロール代謝調節に係わるROR 核内受容体による作動性リガンドの探索
3. 学会等名 第62回 日本薬学会中国四国学術大会（高知）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西江智美、櫻井優人、桑田裕貴、石川小百合、松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 神経変性疾患に関するCYP39A1の新規転写調節機構
3. 学会等名 第62回 日本薬学会中国四国学術大会（高知）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松岡浩史、徳永吏紀、片山未由、細田雄一朗、宮薫子、角拳斗、大石亜美、上敷領淳、志摩亜季保、道原明宏
2. 発表標題 レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 はマクロファージにおけるコレステロールエステル水解酵素を発現誘導させて脂肪滴形成を縮小させる [27P1-am1-063]
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本優人、松本達也、松岡浩史、小川祥二郎、稗田雄三、小嶋英二郎、道原明宏
2. 発表標題 脳卒中易発症ラットにおいて量的変化を示すスクワレンエポキシダーゼの新規活性測定法の開発 [6G-10-30]
3. 学会等名 第61回 日本薬学会中国四国支部学術大会（広島）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川千晴、浅田一樹、秋山拓哉、松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 脳卒中易発症ラットの肝臓におけるステロール-14-ジメチラーゼの発現低下機構 [6G-10-20]
3. 学会等名 第61回 日本薬学会中国四国支部学術大会（広島）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡浩史
2. 発表標題 動脈硬化抑制に關与するレチノイド関連オーファン受容体の標的遺伝子群の探索【奨励賞受賞講演】
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会（愛媛）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山岡愛主、志摩亜季保、松岡浩史、濱島崇寛、小迫舞鈴、田原佑馬、道原明宏
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子CLDN1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会（愛媛）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重藤真佑、松岡浩史、大石亜美、深坂日向子、田原佑馬、道原明宏
2. 発表標題 LXR 核内受容体を介した24S-ヒドロキシコレステロールの代謝誘導系の解析
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会（愛媛）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 動脈硬化抑制に関わるROR 核内受容体の標的遺伝子の探索
3. 学会等名 第60回日本薬学会中国四国支部学術大会（愛媛）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 動脈硬化抑制に関わるROR 核内受容体の標的遺伝子の探索
3. 学会等名 第12回川崎医科大学学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡浩史、道原明宏
2. 発表標題 動脈硬化抑制に関わる核内受容体の標的遺伝子の探索と創薬応用
3. 学会等名 2021年度福山大学研究成果発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【福山大学薬学部 病態生理・ゲノム機能学研究室ホームページ】  
<https://www.fukuyama-u.ac.jp/course/pharm/pharmacy/labo-list/genome/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	道原 明宏  (Michihara Akihiro)  (10309635)	福山大学・薬学部・教授    (35409)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	志摩 亜季保  (Shima Akiho)  (10910151)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------