

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614004

研究課題名(和文)カルシウム代謝・骨代謝に関わるビタミンD非依存的なVDRの新機能の解明

研究課題名(英文)Biological functions and mechanisms of unliganded VDR on bone and calcium metabolism.

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではカルシウム(Ca)代謝・骨代謝に関わるビタミンD非依存的なVDRの新機能解明を目指した。VDRKOマウスとリガンド結合能のないVDR(VDR^{AF2})ノックインマウスを高Ca食で飼育すると、VDR^{AF2}マウスでは骨の石灰化は認められたものの、海綿骨の骨梁が繊維芽細胞様細胞で満たされ、骨髄腔の形態異常が認められた。腎臓および小腸におけるCa代謝に関わる既知VDR標的遺伝子発現量は両者で有意差は認められなかったが、マイクロアレイおよびリアルタイムRT-PCR解析により、両者で発現パターンが異なる6つの遺伝子が同定され、これらの遺伝子が骨代謝異常に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vitamin D is a primary regulator in many biological phenomena such as calcium homeostasis and bone formation. Such actions are thought to be mediated through transcriptional controls by the vitamin D receptor (VDR). Ligand-induced function of VDR have been well established, however, the physiological impact of unliganded VDR still remains unclear. Here we report that VDR helix 12 deletion (AF2) mutant mice fed with high calcium diet exhibited impaired bone formation unlike VDRKO mice. Trabeculae in VDR^{AF2} mice were filled with fibroblast-like cells instead of bone marrow. Microarray and real-time RT-PCR analyses of kidney in VDRKO and VDR^{AF2} mice reveal distinct gene expression profiles. Six putative target genes regulated by unliganded VDR and responsible for impaired bone formation were identified.

研究分野：分子生物学

キーワード：ビタミンD ビタミンD受容体 カルシウム代謝 骨代謝

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 は古くから骨増強作用を持つことが知られているが、そのメカニズムは小腸や腎臓におけるカルシウム代謝調節作用によるものであると考えられており、骨組織におけるビタミン D の生理作用は不明な点が多く残されている。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。

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、高カルシウム高リン食で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。しかしながら、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。よって VDRKO マウスで観察された骨形成不全の大部分はカルシウムを介した二次的な影響であることが示唆された。しかしながらなぜ VDRKO マウスの骨形成不全が高カルシウム高リン食にて正常化するのかについては未解明な部分が残されている。一般に PTH は間歇投与により骨量増加作用を持ち、連続投与により骨量減少作用を持つことが知られている。VDRKO マウスに高カルシウム食を与えても血中 PTH 濃度は高いままであり、連続投与に近い条件であると考えられるが骨量減少は認められない。また VDR は小腸、腎臓から

のカルシウム吸収に重要な役割をもつとされているが、なぜ VDR がなくても高カルシウム高リン食により血中カルシウムおよびリン濃度を正常化できるのかについては不明な点が多い。

上述のように VDRKO マウスでは脱毛が観察されるが、活性型ビタミン D 生合成の鍵酵素である $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素 (Cyp27b1) KO マウスでは脱毛は観察されないことから、研究代表者らは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、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写活性を示さない VDR AF-2 領域変異導入 (VDR Δ AF2) マウスを作出し解析を行った。VDR Δ AF2 マウスは皮膚以外 VDRKO マウス同様の表現型を示すが、それぞれの表現型は VDRKO マウスよりも重篤であり 11 週齢頃までに致死となる。生存時の VDR Δ AF2 マウスでは脱毛が観察されないが、長期間にわたり脱毛が起こらないかについては致死性の問題により不明であった。そこで研究代表者は、VDRKO マウスのように高カルシウム高リン食にて飼育すれば致死性を回避することができ、生涯長期間にわたり皮膚の解析ができるのではないかと考え、高カルシウム高リン食にて VDR Δ AF2 マウスを飼育し解析を行った。その結果致死性は回避され、VDR Δ AF2 マウスは生涯 2 年以上にわたり脱毛が観察されず、皮膚ではリガンド非依存的な VDR の高次機能があることを明らかにした。その一方で VDR Δ AF2 マウスは、高カルシウム高リン食で飼育しても、VDRKO マウスの場合と異なり、成長障害や骨形成不全が改善されなかった。よって VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスではカルシウム代謝および骨代謝メカニズムに大きな違いがあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウス

ウスの解析により、カルシウム代謝・骨代謝に関わるリガンド非依存的な VDR の新機能の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) VDRKO マウスおよび VDR Δ AF2 マウスの表現型の解析

VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスを高カルシウム高リン食で飼育し、骨の非脱灰切片を作製し、von kossa 染色を行った。また、母親の遺伝子型の違いによる影響等を排除した条件下で VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスの表現型の違いを詳細に解析するため、それぞれのヘテロマウスを交配させダブルヘテロマウスを作出し、高カルシウム高リン食で飼育したダブルヘテロマウス同士の交配により VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスを作出し、解析を行った。

(2) リガンド非依存的な VDR の標的遺伝子候補の同定

上記の交配により得られた VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスの腎臓および小腸から RNA を抽出し、カルシウム代謝に関わる既知の VDR 標的遺伝子の発現を検討した。また、これらのマウスの腎臓の遺伝子発現の違いをマイクロアレイおよびリアルタイム PCR により検討した。

次に、離乳後高カルシウム高リン食で飼育した WT マウス、VDRKO マウス、VDR Δ AF2 マウスの腎臓から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR をおこない、WT マウスと VDRKO マウスでは発現量に有意差はないが、WT マウスと VDR Δ AF2 マウスでは有意差が認められる遺伝子を探索することにより、リガンド非依存的な VDR の標的遺伝子候補を同定した。

4. 研究成果

(1) VDRKO マウスおよび VDR Δ AF2 マウスの表現型の解析

高カルシウム高リン食で飼育した VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスの骨の非脱灰切片を作製し、von kossa 染色を行ったところ、両マウスともに骨の石灰化は認められたものの、VDR Δ AF2 マウスでは肥大軟骨細胞周囲の石灰化層の幅の拡張が認められた。さらに VDR Δ AF2 マウスでは海綿骨の骨梁が繊維芽細胞様細胞で満たされており、骨髓腔の形態異常が認められた。しかしながら脾臓の肥大は観察されなかった。次に、VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスの表現型の違いをより詳細に解析するため、高カルシウム高リン食で飼育したそれぞれのヘテロマウスを交配させダブルヘテロマウスを作出し、ダブルヘテロマウス同士の交配により VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスを同腹で得る事を試みた。その結果高カルシウム高リン食で飼育したダブルヘテロマウスは雌雄ともに交配可能であったため、VDRKO マウスと VDR Δ AF2 マウスの母親の遺伝子型の違いによる影響等を排除した同腹解析が可能となった。高カルシウム高リン食で飼育したダブルヘテロマウス同士の交配により得られた VDRKO マウスおよび VDR Δ AF2 マウスの解析を行ったところ、この交配により得られた VDR Δ AF2 マウスでも骨形成不全が認められるものの、血中カルシウム、リン、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度については VDRKO マウスとの有意差は認められなかった。

(2) リガンド非依存的な VDR の標的遺伝子候補の同定

上記の交配によって得られた VDRKO マウス

スと VDR Δ AF2 マウスの腎臓および小腸から RNA を抽出し、カルシウム代謝に関わる既知の VDR 標的遺伝子の発現を検討したところ、小腸の *S100g* (Calbindin-D9k) および腎臓の *Cyp27b1*、*Trpv5*、*Calb1* (Calbindin-D28k)、*Slc34a1* (Npt2) についてはいずれも有意差は認められず、小腸の *Trpv5*、腎臓の *Cyp24a1* (1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ -24-水酸化酵素) はいずれも検出限界以下であった。次にこれらのマウスの腎臓の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、両方で発現パターンが異なる 15 の遺伝子および 7 つの lincRNA が同定できた。lincRNA を除く 15 の遺伝子について、追加検体も加えリアルタイム PCR により再検討したところ、6 つの遺伝子について再現性が確認された。

さらに離乳後高カルシウム高リン食で飼育した WT マウス、VDRKO マウス、VDR Δ AF2 マウスの腎臓から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR をおこない、WT マウスと VDRKO マウスでは発現量に有意差はないが、WT マウスと VDR Δ AF2 マウスでは有意差が認められる遺伝子を探索したところ 2 つの遺伝子 (*Smcp*、*Slc38a1*) を同定した。これらの遺伝子と VDR との関連についてはこれまでに報告がないが、本研究によりこれらがリガンド非依存的な VDR の標的遺伝子であり、骨代謝に関与する可能性があることが示唆された。

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・医学部附属病院・助教

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 :