

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790273

研究課題名(和文) 臓器特異的遺伝子改変マウスを用いたビタミンKの加齢性疾患に対する作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of vitamin K functions on age-related diseases using organ-specific gene knockout mice.

研究代表者

東 浩太郎 (Azuma, Kotaro)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：30401110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、神経細胞および骨芽細胞特異的  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)欠損マウス、骨芽細胞および破骨細胞特異的pregnane X receptor(PXR)欠損マウスの作製を行い、これまで未解明であった肝臓外におけるビタミンK作用に関する示唆に富む結果を得た。また、神経細胞株におけるGGCXの新規基質候補蛋白、骨芽細胞株におけるsteroid and xenobiotic receptor(ヒトにおけるPXR相同遺伝子)応答性long non-coding RNAを同定し得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we were able to obtain many insights concerning extra-hepatic function of vitamin K by generating neural cell- and osteoblast-specific gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) knockout mice and osteoblast- and osteoclast-specific pregnane X receptor (PXR) knockout mice. In addition, we discovered candidates of GGCX substrates in neural cells, and two long non-coding RNAs induced by agonists of steroid and xenobiotic receptor (human ortholog of PXR) in an osteoblastic cell line.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ビタミンK 老化 遺伝子 蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は、血液凝固に必要な因子として発見されたが、骨折予防効果が臨床試験によって示され、疫学的には動脈硬化や認知症など複数の加齢性疾患にも関わるなど多彩な作用が推測されている。ビタミン K の作用としては、 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) によるタンパク質の翻訳後修飾 ( $\gamma$ カルボキシル化; Gla 化) を介する作用が古くから知られるが、核内受容体 steroid and xenobiotic receptor (SXR) による遺伝子の転写調節を介する作用が存在することをこれまで我々は示してきた。GGCX および SXR は全身で発現していることが知られ、ビタミン K の多彩な作用を担っていることが推測される。しかし、GGCX 欠損マウスは出血傾向により生後まもなく死亡するため、生体内での機能を詳細に解析することは困難であった。また、SXR のマウスにおける相同遺伝子である pregnane X receptor (PXR) を全身で欠損するマウスが骨量減少を呈することを以前我々は報告したが、この表現型をどの細胞が担っているかに関しては *in vivo* モデルにおいて示されてはいなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、以上の背景を踏まえ、GGCX を介する作用、SXR を介する作用の両面から、凝固因子の影響で従来未解明であったビタミン K の肝臓外における作用を組織特異的遺伝子欠損動物モデルを用いて解析し、肝臓外でのビタミン K の役割を探り、さらにビタミン K シグナルの下流分子および転写産物が加齢性疾患における治療標的になりうるかについての検討材料を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経細胞特異的な GGCX 欠損マウスの作製および解析

臓器特異的 GGCX 欠損マウスの作成は、Cre/loxP を用いた臓器選択的な遺伝子欠損法 (conditional gene targeting) を用いた (Gu H et al. Science 265, 103, 1994)。これは、loxP と呼ばれる配列で欠失させたい遺伝子のエクソ

ンを挟み、特定の臓器で DNA のリコンビナーゼである Cre (loxP 配列を認識して組み換えを起こし、間の配列を欠損させる) を発現させることにより、特定の臓器で遺伝子を欠失させる方法である。我々の研究室では、loxP により GGCX が挟まれたコンディショナルノックアウトマウス (GGCX flox マウス) を既に開発しており、本研究に用いた。この際に、掛け合わせるマウスとして、神経細胞特異的プロモータである Nestin プロモータにより駆動される Cre が発現しているトランスジェニックマウス (Nestin-Cre マウス) を用いた。神経細胞における GGCX 欠損マウスに対しては、行動解析として握力試験、ロータロッド試験を行った。

### (2) 神経細胞における新規 $\gamma$ カルボキシル化蛋白の同定

ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞に Flag tag を付加した GGCX を過剰発現させ、Flag 抗体にて免疫沈降を行うことにより中枢神経における GGCX 結合蛋白の精製を行った。SDS-PAGE による泳動ゲルを銀染色し、GGCX と共沈する蛋白をゲルより切り出し、質量分析にて蛋白の同定および同定された蛋白における  $\gamma$  カルボキシル化の有無を解析した。

### (3) 骨芽細胞特異的な GGCX 欠損マウスの作製および解析

GGCX flox マウスと掛け合わせるマウスに、骨芽細胞特異的プロモータである  $\alpha 1(I)$  コラーゲンプロモータにより駆動される Cre が発現しているトランスジェニックマウス (Coll1-Cre マウス) を用い、骨芽細胞特異的 GGCX 欠損マウスを作製した。また、このマウスに卵巣摘除を行うことにより、低エストロゲン下における GGCX の作用を解析した。

### (4) 骨芽細胞および破骨細胞特異的 PXR 欠損マウスの作製

我々の研究室では、loxP により PXR が挟まれたコンディショナルノックアウトマウス (PXR flox マウス) を既に開発しており、Coll1-Cre マウスとかけ合わせることにより、

骨芽細胞特異的 PXR 欠損マウスを作製した。また、破骨細胞特異的なプロモータであるカテプシン (Cathepsin) プロモータにより Cre が駆動される Cathepsin-Cre マウスを用い、破骨細胞特異的に PXR を欠損するマウスを作製した。

#### (5) 骨芽細胞における SXR 応答性 long-noncoding RNA の探索

骨芽細胞における SXR を介する vitamin K の作用を解析するために、骨芽細胞株 MG63 に SXR を過剰発現させた細胞を SXR のアゴニストであるリファンピシンおよび vitamin K により刺激し、RNA-seqencing にて解析した。近年、蛋白に翻訳されないにもかかわらず機能を有する転写産物として注目されている long non-coding RNA に着目し、SXR アゴニストにおける誘導の有無を次世代シーケンサーを利用して解析した。次世代シーケンサーはイルミナ社 GAIIX を用い、転写産物の mapping には Top-Hat、assembly には Cufflinks を用い、新規転写産物も含めて解析を行った。最終的には IGV viewer にて視覚的に転写産物を選択した。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経特異的異な GGCX 欠損マウスの作製と解析

神経特異的な GGCX 欠損マウスは正常に誕生し、特に外見上目立った変化は認めなかった。行動解析においては、14 ヶ月齢のメスにおいてコントロールマウス (GGCX flox マウス) と比べ、握力の低下を認めた。ロータロッド試験においては、特に差を見出すことはできなかった。これらの結果より、神経組織における GGCX が機能していることが示唆された。

#### (2) 神経細胞における新規 $\gamma$ カルボキシル化蛋白の同定

神経芽細胞腫由来の細胞より精製した GGCX 結合蛋白を質量分析により解析したところ、5 種類の蛋白を同定し、そのいずれからもカルボキシル化グルタミン酸のシグナルを検出した。これらの蛋白は神経細胞に

おける GGCX の新規基質である可能性があり、上記の GGCX 欠損マウスの表現型を関連することが期待される。

#### (3) 骨芽細胞特異的な GGCX 欠損マウスの作製および解析

骨芽細胞特異的 GGCX 欠損マウスは正常に誕生し、特に外見上目立った変化は認めなかった。4 ヶ月齢のメスマウスの骨密度を測定すると GGCX 欠損マウスは、コントロールの Col1-Cre マウスに比較し、骨密度に有意な差があった。PXR 欠損マウスの表現型と比較解析した結果、骨芽細胞におけるビタミン K の作用は、GGCX を介する作用と PXR を介する作用の両方があることが示唆された。

#### (4) 骨芽細胞および破骨細胞特異的 PXR 欠損マウスの作製

骨芽細胞および破骨細胞特異的 PXR 欠損マウスは、正常に誕生し、特に外見上の変化は認めなかった。これらのマウスにおいては、引き続き解析を行っている。

#### (5) 骨芽細胞における SXR 応答性 long-noncoding RNA の探索

RNA-sequencing により、リファンピシン、ビタミン K という 2 種類の SXR アゴニストにより誘導される long non-coding RNA を同定し、誘導を定量的 RT-PCR 法にて確認した。このうちの片方は既知の non-coding RNA であったが、一つはデータベースには記載のない新規の転写産物であった。データベースに登録されていない転写産物の同定は、従来のマイクロアレイでは行うことができず、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing はこのような転写産物を同定するうえで有用な手法である。同定された転写産物は、骨芽細胞における SXR を介するビタミン K 作用を担う可能性があり、機能解析が期待される。

### 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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S: Liver-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-1 deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS ONE* 9, e88643, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0088643. 査読あり

Azuma K, Ouchi Y, Inoue S: Vitamin K: novel molecular mechanisms of action and its roles in osteoporosis. *Geriatric Gerontol Int* 14, 1-7, 2014. DOI: 10.1111/ggi.12060. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

堀江公仁子、東浩太郎、大石貴史、池田和博、井上聡：次世代シーケンサーによるヒト骨芽細胞系におけるステロイド X 受容体標的遺伝子の解析 (2013.11.22-23) 第11回RCGMフロンティアシンポジウム(埼玉)

東浩太郎、大内尉義、井上聡：[シンポジウム] ビタミン K の骨関節に対するアンチエイジング効果 (2013.6.28-30) 第13回日本抗加齢医学会総会(横浜)

Azuma K, Urano T, Ouchi Y, Inoue S: Comprehensive Analysis of Transcriptional Regulation by Steroid and Xenobiotic Receptor in Osteoblastic Cells Using RNA-Sequencing. (2013.6.15-18) The Endocrine Society's 95<sup>th</sup> annual meeting, San Francisco, CA, USA.

東浩太郎：加齢性疾患におけるビタミン K の新しい作用メカニズムとその臨床応用 (2013.6.4-6) 第55回日本老年医学会学術集会(大阪)

東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、大内尉義、Bruce Blumberg、井上聡：核内受容体 SXR/PXR を介するビタミン K の関節軟骨に対する作用 (2013.6.4-6) 第55回日本老年医学会学術集会(大阪)  
東浩太郎、大内尉義、井上聡：[シンポジウム] ビタミン K による骨代謝調節 (2012.12.15-16) 第10回日本機能性食品

医用学会総会(東京)

東浩太郎、浦野友彦、大内尉義、井上聡：[カレントコンセプト] 核内受容体 SXR/PXR を介するビタミン K の骨関節保護作用 (2012.7.19-21) 第30回日本骨代謝学会学術集会(東京)

東浩太郎、大内尉義、井上聡：ビタミン K がリガンドとなる SXR/PXR の骨軟骨代謝における役割 (2012.7.14) 第12回東京骨関節フォーラム(東京)

東浩太郎、柴祥子、池田和博、浦野友彦、堀江公仁子、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症薬ビタミン K の作用を担う  $\gamma$ カルボキシラーゼの骨芽細胞における役割 (2012.6.28-30) 第54回日本老年医学会学術集会(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

東浩太郎 (AZUMA, Kotaro)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：30401110

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし