

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19518

研究課題名（和文）ビタミンD依存性くる病モデルマウスから切り拓く毛周期破綻による脱毛機序の解明

研究課題名（英文）Mechanistic insights of the pathogenesis of alopecia using a novel vitamin D-dependent rickets mouse model

研究代表者

沢津橋 俊（SAWATSUBASHI, Shun）

徳島大学・先端酵素学研究所・特任准教授

研究者番号：70535103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：毛包は動的に再生を繰り返す器官であり、再生研究の重要なモデルである。本研究ではビタミンD依存性くる病モデルマウスの脱毛病態に着目し、未解明の『退縮期』の制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

結果として、ヒト疾患における点変異を模倣したくる病モデルマウスを、世界に先駆けて作出した。さらに、ゲノム編集を用いてVDR分子表面の10カ所の変異導入に成功し、その病態を検討した。興味深いことに、それぞれの点変異VDRはその結合能を失う相互作用分子に違いが認められた。これは、VDRのヘテロダイマーであるRXRとの相互作用の喪失が主な原因とされてきた従来の疾患メカニズムを再考する重要な結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛を生み出す毛包は、成長期・退縮期・休止期を周期的に繰り返す動的に維持された器官であり、幹細胞研究に用いられてきた。従来は発毛の観点で、どのように成長期が制御されるか、に主眼をおいた研究が展開されており、退縮期の制御に焦点を当てた研究は驚くほど少ない。本研究は、将来的な脱毛の治療法の開発を指向し、指定難病であるビタミンD依存性くる病でみられる禿頭や、加齢とともに生じる脱毛の原因を解明することを試みた。結果として、毛産生細胞が不要となったステージで、正しく消去される機構の重要性が見出され、その破綻の結果として残存する『居残り細胞』が病態を引き起こすという新たなモデルを創出することができた。

研究成果の概要（英文）：The hair follicle is a dynamically regenerating organ, and the hair cycle is an important model for regeneration research. In this study, we focused on the pathogenesis of hair loss in a vitamin D-dependent rickets model mouse, and aimed to clarify the regulatory mechanism of the catagen, which has not yet been elucidated.

As a result, we established a novel mouse model of rickets that mimics point mutations in human disease. Furthermore, we succeeded in establishing 10 strains of the VDR mutations using genome editing, and investigated the pathophysiology. Interestingly, each point-mutated VDR showed differences in the interacting proteins that reduced their binding ability. This is an important result to reconsider the conventional disease mechanism, in which the loss of interaction with RXR, a heterodimer of VDR, has been considered as the main cause.

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 転写 くる病 脱毛 ゲノム編集 毛包 毛周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

全身性 VDR KO マウスは、ビタミン D 依存性くる病患者と同様に脱毛を呈する (Yoshizawa et al, Nat Genet, 1997)。そこで研究代表者は、表皮・毛包特異的 VDR KO (VDR cKO)マウスの作出を行ったところ、VDR cKO は骨異常を伴わず、脱毛の表現型のみを呈することを明らかにした。そこから毛包のビタミン D 受容体が毛周期の進行に必須の分子であると予想し、出生後の毛形成期から退縮期、休止期を経て成長期へ進行する過程を順に観察したところ、退縮期以降の毛包で形態的な異常を見出した。さらに二光子顕微鏡で 3 次元的に観察することで、本来であれば短く退縮していく epithelial strand と呼ばれる部位が長いまま残存していることを初めて見出した。また、これまで退縮期に形態異常を示す遺伝子欠損マウスの報告は非常に少なく研究が遅れていたが、VDR cKO マウスがこの分野を切り拓く有用なモデルマウスになると確信した。この結果から研究代表者は、毛包や乳腺など周期性を有する器官において、本来は周期的なプログラムによって消失すべき細胞が『居残り細胞』として残存することで疾患病態を引き起こす可能性と、この『居残り細胞』を除去または残存させないことが治療に繋がると考えるに至った。

本研究は世界に先駆け作出した VDR cKO マウスの形態異常を端緒に生じた上記の仮説を検証し、加えてその分子メカニズムを解明することで、将来的な脱毛の治療・予防に応用可能な基盤原理とする挑戦的な課題である。

## 2. 研究の目的

毛を生み出す毛包は、『成長期 (anagen)』・『退縮期 (catagen)』・『休止期 (telogen)』を周期的に繰り返す動的に維持された器官であり、これまで幹細胞-ニッチ研究の重要なモデルとして用いられてきた。しかしながらこれまでは特に発毛の観点で、いかにして『成長期』が制御されるか、に主眼をおいた研究が展開されてきたため、『退縮期』の制御に焦点を当てた研究は驚くほど少ない。そこで本研究では、これまでに解明の進んでいない『退縮期』の制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。

また本研究は、将来的な脱毛の治療法・予防法の開発を指向した毛周期の基礎研究を遂行することによって、指定難病であるビタミン D 依存性くる病でみとめられる禿頭や、加齢とともに生じる脱毛の原因を解明することを試みる。これにより、小児科学分野において治療法の無いビタミン D 依存性くる病患者の禿頭に対する治療や、加齢に伴った脱毛の予防のための基盤原理を明らかにすることで、多くの人の QOL の向上に貢献しうる研究課題であると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず毛包の退縮異常を呈する脱毛モデルとして、研究代表者らが樹立した表皮・毛包特異的ビタミン D 受容体ノックアウト (VDR cKO) マウスを主に用いる。またこれに加え、ゲ

ノム編集により新たにビタミン D 依存性くる病型の脱毛モデルマウスの樹立を試みる。この新規脱毛モデルマウスは、ビタミン D 依存性くる病で報告されるビタミン D 受容体遺伝子の変異部近傍のうちで、タンパク結合表面となりうる複数のアミノ酸残基に、変異置換を導入することで作出し、カルシウム・リン代謝に異常をきたさず、脱毛の病態のみを模倣することを特徴とする。上記のマウスを用いた個体レベルでの脱毛評価と同時に、器官レベルでの解析として、二光子顕微鏡を利用した『退縮期』のライブイメージングを検討する。

また、RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins)法と研究代表者らが開発した高効率なノックアウト培養細胞作製技術 VIKING (Versatile NHEJ-based knock-in module for genome editing)法を組み合わせることで、VDR タンパク質に毛周期に関連する新たな機能領域とその相互作用因子の探索を試みる。

#### 4 . 研究成果

本研究では、まず毛包の退縮異常を呈する脱毛モデルとして、研究代表者らが樹立した表皮・毛包特異的ビタミン D 受容体ノックアウト (VDR cKO) マウスを主に用いた。退縮期のイメージングには、体毛よりも尾部の毛包の方が、より疎であることから観察に適していた。ケラチン 14-Cre マウスを用いて H2B::mCherry を毛包・表皮で発現するトレーサーマウスを作出し、毛包構造をイメージングすることに成功した。また透明化と蛍光免疫染色によって、退縮過程の毛包の 3D 構造をスナップショットとして捉えることができ、VDR cKO で残存する細胞数がおおよそ 30 細胞程度に限定されることを見出した。一方で、ライブイメージングは毛包の光感受性が高く、光毒性が出ていると考えられたため、短時間もしくはスナップショットでの解析を主とした。また、尾部の退縮進行は頭尾軸に沿った時間差が存在しており、尾部の毛包を頭尾軸に沿って撮影することで、1 個体のマウスから解析の対象とする退縮過程を再構成できることが判明した。

VDR cKO に加え、ゲノム編集により新たにビタミン D 依存性くる病型の脱毛モデルマウスの樹立を試みた。その結果、連携研究者との共同研究としてゲノム編集技術を用い、候補の 10 カ所のアミノ酸残基すべてに置換変異を導入したマウスの作出に成功し、樹立したマウスの交配を行い、点変異ホモ系統として 10 系統すべてのマウス作出を行った。樹立した点変異ホモ系統、10 系統すべての表現型解析を行った。このホモ 10 系統系統のうち、ヒトくる病患者と同様の骨異常に由来する血液パラメータ (リン、カルシウム、アルカリフォスファターゼ) と脱毛を呈する 5 つの点変異系統を同定した。この変異部位のうち 2 カ所はヒト疾患でも変異の知られる既存のアミノ酸残基であったが、3 カ所は新規の変異部位であった。これまで、ヒト疾患における点変異を模倣したくる病モデルマウスは存在せず、世界に先駆けて、これの作出に成功し、その詳細な骨形態計測の結果、骨軟化症と同様の表現型であることが確認された。

一方で本研究では、これまでに報告例のない、脱毛のみの表現型を呈するモデルマウスの作出も期待されたが、くる病疾患と同様の表現型が得られた 5 系統のいずれも、骨病変と脱毛を伴っており、骨病変と脱毛を切り分ける変異系統の作出には至っていない。しかしながら、本研究で対

象とした分子表面の変異導入によって、新たな病態モデルがハイスループットに作成することは可能であり、本手法をより広い分子表面に展開することで、脱毛モデルマウスの作出も可能であると考えられる。点変異マウスによる、疾患の切り分けは達成できなかったものの、その疾患メカニズムについてはいくつかの新しい知見が得られた。特に、マウス個体で疾患病態の得られた疾患型点変異を導入した疾患モデル細胞(ヒトケラチノサイト)の作出にも成功し、疾患モデル細胞を用いることで、脱毛が VDR 相互作用分子の機能破綻による可能性が検討できた。そしてその原因となる中心的な相互作用分子を明らかにしつつある。興味深いことに、それぞれの点変異 VDR はその結合能を失う相互作用分子に違いが認められた。具体的には、ヘテロダイマーパートナーRXR 以外に複数の転写因子・転写共役因子の必要性が示唆された。これは従来、VDR のヘテロダイマーである RXR との相互作用の喪失が主な原因とされてきた本疾患メカニズムを再考する重要な結果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Seiji Fukumoto, Yuichi Takashi, Maria Tsoumpra, Shun Sawatsubashi, Toshio Matsumoto	4. 巻 38
2. 論文標題 How do we sense phosphate to regulate serum phosphate level?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-019-01066-0	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 Tsoumpra Maria K, Sawatsubashi Shun, Imamura Michihiro, Fukumoto Seiji, Takeda Shin'ichi, Matsumoto Toshio, Aoki Yoshitsugu	4. 巻 64
2. 論文標題 Dystrobrevin alpha gene is a direct target of the vitamin D receptor in muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 195 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-19-0229	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 Takashi Yuichi, Kosako Hidetaka, Sawatsubashi Shun, Kinoshita Yuka, Ito Nobuaki, Tsoumpra Maria K., Nangaku Masaomi, Abe Masahiro, Matsuhisa Munehide, Kato Shigeaki, Matsumoto Toshio, Fukumoto Seiji	4. 巻 116
2. 論文標題 Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11418 ~ 11427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1815166116	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 Sawatsubashi Shun, Nishimura Koichi, Mori Jinichi, Kouzmenko Alexander, Kato Shigeaki	4. 巻 26
2. 論文標題 The Function of the Vitamin D Receptor and a Possible Role of Enhancer RNA in Epigenomic Regulation of Target Genes: Implications for Bone Metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone Metabolism	6. 最初と最後の頁 3 ~ 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11005/jbm.2019.26.1.3	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 該当する

1. 著者名 Joko Yudai, Sugano Shigeo S., Fukumoto Seiji, Matsumoto Toshio, Sawatsubashi Shun	4. 巻 -
2. 論文標題 Protocol for CRISPR/Cas9-based knock-in using the VIKING method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protocol Exchange	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/protex.2019.010	査読の有無 無
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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 沢津橋俊、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 表皮・毛包の恒常性におけるビタミンD受容体の機能解析
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沢津橋俊、横山敦、上甲裕大、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 ゲノム編集を利用したくる病点変異導入ビタミンD受容体の機能解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沢津橋俊、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 栄養情報が調節するグルココルチコイド受容体の転写制御機構の解明
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沢津橋俊、上甲裕大、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 表皮・毛包の恒常性におけるビタミンD受容体の機能解析
3. 学会等名 第36回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沢津橋俊、横山敦、上甲裕大、菅野茂夫、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 VIKING法によるノックアウト/ノックイン細胞を用いた比較プロテオーム解析によるビタミンD受容体複合体の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kato S, Sawatsubashi S, Yokoyama A, Nakamura T, Kouzmenko A.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Oxford: Academic Press	5. 総ページ数 2374
3. 書名 Encyclopedia of Bone Biology	

1. 著者名 沢津橋俊、上甲裕大、菅野茂夫	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 145
3. 書名 実験医学2019年7月号 培養細胞における簡便なノックインを可能とするゲノム編集法：VIKING法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学 / 教育研究者総覧  
http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/278225/work-ja.html  
徳島大学藤井節郎記念医科学センター分子内分科学研究分野  
http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/nuclearreceptor/

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
連携研究者	竹本 龍也  (TAKEMOTO Tatsuya)  (30443899)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授    (16101)	

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
---------	---------