

令和元年6月18日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04912

研究課題名(和文) ゲノム編集法により作製した遺伝子改変ラットを用いたビタミンD誘導体評価系の構築

研究課題名(英文) Construction of evaluation system for vitamin D analogs using genetically modified rats with genome editing

研究代表者

榊 利之 (SAKAKI, TOSHIYUKI)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：70293909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集法によりCYP27B1、CYP24A1、ビタミンD受容体VDRの遺伝子欠損ラットの作製に成功し、さらに、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(1,25D₃)に対する親和性が25D₃と同程度にまで低下した変異型VDR(R270L)を有するII型くる病モデルラットを作製した。野生型およびこれら遺伝子改変ラット間の性状比較および25D₃投与効果の比較により、骨形成、皮膚・毛包形成、血中Ca濃度の恒常性維持における1,25D₃および25D₃の役割に関する多くの知見を得た。また、ビタミンD代謝においてCYP24A1とCYP3A1/2が協調する新しい経路の存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではビタミンD受容体に低い親和性を示すリガンドが多量に存在すれば、親和性が高いリガンドが存在しなくてもビタミンD作用を補完できることを示した。これは生理的に意味があるビタミンDは親和性がきわめて高い1,25D₃であるというこれまでの常識を覆した結果であり、学術的価値が高い。また、25D₃がI型くる病(CYP27B1遺伝子欠損)だけでなく腎機能が低下した患者にも有効であり、II型くる病(VDR変異)にも高い治療効果を有することを示唆した。さらに、ビタミンD誘導体AH-1がII型くる病(VDR変異)に対し高い治療効果を示し、医薬品として有望であることを明らかにしたため、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The gene-deficient rats of CYP27B1, CYP24A1, or vitamin D receptor were successfully produced by the genome-editing method using the CRISPR/Cas9 system. In addition, the type II rickets model rats with the mutant VDR (R270L) whose affinity for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃) was reduced to the same extent as 25-hydroxyvitamin D₃ (25D₃) were produced. Comparison of physiological properties among the wild-type and these genetically modified rats and comparison of the effects of 25-hydroxyvitamin D₃ administration provided much knowledge on the role of 1,25D₃ and 25D₃ in osteogenesis, skin and hair follicle formation, and homeostasis of blood Ca levels. Furthermore, the novel metabolic pathways of 1,25D₃ and 25D₃ by CYP24A1 and CYP3A1/2 were revealed.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ビタミンD ゲノム編集 ビタミンD受容体 シトクロムP450 遺伝子改変 ビタミンD代謝酵素 作用メカニズム 疾患モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は CYP27B1 遺伝子欠損マウスに 25-ヒドロキシビタミン D₃ (25D3) を投与することに血中 Ca 濃度の上昇と骨形成の正常化が起こることを明らかにした(生化学, 87, 438-444 (2015))。また、血中に CYP24A1 による複数の代謝物が高濃度で存在することを明らかにした。これは、マウスの体内で 25D3 がビタミン D 受容体(VDR)に結合して CYP24A1 を誘導した可能性が高い。活性型ビタミン D₃ と称される 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ に(1,25D3)比べると 25D3 は VDR 結合能が低く(100 分の 1 以下)、K_d 値は数 10nM である。一方、血中濃度は 20-100 nM と、1,25D3 の血中濃度(40-120 pM)の 500 倍程度である。これらの事実は 25D3 自身の生理作用の存在を示唆している。申請者が現在、用いているマウスでは、採取できる血液量、回数に制限があり、血中の 25OH₂D₃ の代謝物の経時変化の十分な解析ができない。Ca, P, 副甲状腺ホルモン(PTH), 種々の骨代謝マーカー, 性ホルモンなど測定に必要な血液量が確保できない。また、前立腺など小さい臓器の解析が、きわめて困難である。しかし、マウスの 10 倍以上、身体の大きなラットを用いることにより、採取できる血液量、臓器重量も 10 倍以上になることから、詳細な解析が可能になる。また、本申請で作製する遺伝子改変ラットは、25D3 など天然型だけでなく、骨粗鬆症や癌の治療薬として期待される種々のビタミン D 誘導体の評価系としても大きな力を発揮すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法によりビタミン D 受容体(VDR)およびビタミン D 代謝に関わる酵素(CYP27B1 および CYP24A1)の遺伝子欠損あるいは遺伝子改変ラットを作製し、ビタミン D 作用メカニズムの全貌を明らかにするとともに、種々のビタミン D 誘導体の代謝様式と作用メカニズムを解明することにより骨粗鬆症や癌などの治療薬を開発することである。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法により以下の 4 種の遺伝子改変ラットを作製した。

CYP27B1 遺伝子欠損ラット (CYP27B1 KO)

CYP24A1 遺伝子欠損ラット (CYP24A1 KO)

VDR 遺伝子欠損ラット (VDR KO)

変異型 VDR (VDR-R270L) 発現ラット

(2) 骨、皮膚の性状および血中の生体物質の測定

μ CT 装置を用いた骨の形態、骨密度、骨強度の測定、血中のカルシウム、リン、副甲状腺ホルモン(PTH)濃度の測定を実施した。DNA マイクロアレイを用いた腎臓、肝臓、小腸など各臓器における遺伝子発現の網羅的に解析した。また、血中のビタミン D 代謝物の濃度を経時的に測定した。

(3) 25D3 の混餌投与

通常の餌 (F2) に 25D3 を 1.5mg/kg の添加した 25D-F2 を生後 5 週から与え、(2)に示した解析を行った。F2 を与えた個体との比較により 25D3 の投与効果を判定した。

4. 研究成果

ビタミン D の作用には(1) 1,25D3 の VDR 依存性作用、(2) 1,25D3 の VDR 非依存性作用、(3) 25D3 の VDR 依存性作用、(4) 25D3 の VDR 非依存性作用、(5) VDR のリガンド非依存性作用の 5 種類存在することが示唆された。申請者はゲノム編集法により、CYP27B1、CYP24A1、VDR の遺伝子欠損ラットの作製に成功し、さらに、1,25D3 に対する親和性が 25D3 と同程度にまで低下した変異型 VDR(R270L)を有する II 型くる病モデルラットを作製した。CYP27B1 KO、VDR KO、および VDR (R270L)ラットは、発育遅延および骨形成異常を含む「くる病」症状を示した。これらのうち、CYP27B1 KO ラットは血中 Ca 濃度が顕著に低く、重度の発育遅延を示し、VDR KO ラットは皮膚の異常と脱毛を示した。野生型(WT)ラットと VDR (R270L)ラットの差は、前述の(1) 1,25D3 の VDR 依存性作用に基づくと考えられる。また、VDR (R270L)よりも CYP27B1 KO の方がくる病症状が顕著で、(2) 血中 Ca 濃度維持に対する 1,25D3 の VDR 非依存性作用の喪失に基づくと考えられる。さらに、VDR (R270L)ラットと VDR KO ラットの比較から、皮膚および毛包形成に対する(3) 25D3 の VDR 依存性作用または(5) VDR のリガンド非依存性作用の存在が明らかになった。一方、25D3 の代謝について WT と CYP24A1 KO ラットを比較した結果、ラクトン体を最終代謝物とする代謝経路において、CYP3A4 が重要な役割を果たしていることがわかった。研究分担者の橋高が合成したビタミン D 誘導体 AH-1 は VDR(R270L)ラットに対し、高い治療効

果を示したことから、II型くる病の治療薬として有望である。また、側鎖にフッ素置換基を有する新規ビタミンD誘導体を多く合成したが、この中には医薬品として有望なものが含まれることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Sakaki T, Kittaka A (他 5 名)

Synthesis, metabolism, and biological activity of 2-[3-(tetrazolyl)propyl]-1 α ,25-dihydroxy-19-norvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 164, 40-44 (2016)

Sakaki T, Nakagawa K, (他 8 名)

Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on cartilage formation deduced from comparisons between Cyp27b1 and Vdr knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 483, 359-365 (2017)

Sakaki T, Kittaka A (他 8 名)

Novel screening system for high-affinity ligand of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutant R274L using bioluminescent sensor.

J Steroid Biochem Mol Biol. 167, 61-66 (2017)

Sakaki T (他 10 名) Production of an active form of vitamin D₂ by genetically engineered

CYP105A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 486, 336-341(2017)

Sakaki T, Kittaka A (他 4 名) Synthesis of the CYP24A1 major metabolite of 2 α -[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 173, 75-78 (2017)

Sakaki T (他 4 名) 25-hydroxyvitamin D₃ may function via genomic and non-genomic actions. *Anatomy & Physiology* 7, Issue 4 (2017)

Sakaki T (他 9 名)

Protein engineering of CYP105s for their industrial uses. *Biochim Biophys Acta.* 1866, 23-31 (2018)

Sakaki T, Kittaka A (他 3 名) Development of a highly sensitive in vitro system to detect and discriminate between vitamin D receptor agonists and antagonists based on split-luciferase technique.

J Steroid Biochem Mol Biol. 178, 55-59 (2018)

Sakaki T, Kittaka A (他 5 名)

Metabolism of 2 α -[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by CYP24A1 and biological activity of its 24R-hydroxylated metabolite. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 178, 333-339 (2018)

Sakaki T (他 2 名)

Novel split luciferase-based biosensors for evaluation of vitamin D receptor ligands and their application to estimate CYP27B1 activity in living cells.

J Steroid Biochem Mol Biol. 183, 221-227 (2018)

Sakaki T, Kittaka A (他 3 名)

Novel biosensor using split-luciferase for detecting vitamin D receptor ligands based on the interaction between vitamin D receptor and coactivator *Biochem Biophys Res Commun.* 505, 460-465 (2018)

Sakaki T, Nakagawa K, (他 8 名) Elucidation of the Osteogenic Effect of Eldecalcitol in Cyp27b1-knockout Mice. *PLoS ONE*, 13(10): e0199856 (2018)

神利之 (他 1 名) ビタミンD生成と代謝 食と医療 Vol.5 13-18 (2018)

Sakaki T, Nakagawa K, (他 11 名)

Generation of 1,25-dihydroxycholecalciferol in Cyp27b1 knockout mice by treatment with 25-hydroxycholecalciferol ameliorated their rachitic phenotypes

Sakaki T, Kittaka A (他 4 名) Concise Synthesis of 23-Hydroxylated Vitamin D3 Metabolites

[学会発表](計 48 件)

榊利之, 中川公恵 (他 7 名) CYP27B1 遺伝子欠損マウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用の検証 日本ビタミン学会第 68 回大会 2016.6.17-18

榊利之, 中川公恵 (他 6 名) CYP27B1 遺伝子欠損マウスにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の代謝解析 同上

榊利之 (他 6 名) ゲノム編集法を用いた CYP27B1 遺伝子欠損ラットの創製 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 5 名) 分割型ルシフェラーゼを用いたビタミン D 受容体リガンド検出バイオセンサーの応用 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 7 名) 2 位にアゾール基を有するビタミン D 誘導体の代謝および骨密度上昇作用メカニズムの解明 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 3 名) 2-[2-(テトラゾール-2-イル)エチル]-1,24,25-トリヒドロキシビタミン D3 の合成 同上

榊利之, 中川公恵 (他 7 名) CYP27B1 遺伝子欠損マウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 生理作用の検証平成 28 年度内外環境応答・代謝酵素研究会 2016.9.17-18

榊利之, 中川公恵 (他 6 名) CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D の生理作用の検討 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 7 名) 骨粗鬆症治療薬への応用を目指したビタミン D 誘導体の CYP24A1 による代謝 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 7 名) 骨粗鬆症あるいは癌治療薬への応用を目指したビタミン D 誘導体の代謝様式の解明 第 89 回日本生化学会大会 2016.9.25-27

榊利之, 中川公恵 (他 7 名) CYP27B1 ノックアウトマウスへの 25-ヒドロキシビタミン D3 投与による骨形成および雌性生殖機能への影響 同上

榊利之 (他 6 名) 強い骨密度上昇作用を有するビタミン D 誘導体の代謝様式の解明 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15

榊利之, 中川公恵 (他 7 名) CYP27B1 遺伝子欠損マウスおよびラットにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 投与の影響 日本薬学会第 137 年会 2017.3.27-30

榊利之, 橘高敦史 (他 4 名) (24S)-2-[2-(テトラゾール-2-イル)エチル]-1,24,25-トリヒドロキシビタミン D3 の合成 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 7 名) アゾール基を有するビタミン D 誘導体の CYP24A1 による代謝 同上

榊利之, 中川公恵 (他 8 名) CYP27B1 遺伝子欠損ラットにおける 25(OH)ビタミン D3 の代謝と生理作用 日本ビタミン学会第 69 回大会 2017.6.8-9

榊利之, 中川公恵 (他 8 名) ゲノム編集法で作成した VDR 改変ラットにおける 25(OH)ビタミン 同上

榊利之, 中川公恵 (他 6 名)

VDR, CYP27B1, CYP24A1 改変ラットにおける血中ビタミン D 代謝物分析 同上

榊利之, 橘高敦史 (他 4 名) ビタミン D 誘導体 AH-1 の CYP24A1 代謝物 24 位エピマーの合成 同上

榊利之, 中川公恵 (他 9 名) ゲノム編集法を用いた VDR, CYP27B1, CYP24A1 遺伝子改変ラットの創製 同上

④ **Sakaki T, Nakagawa K,** (他 9 名) CYP27B1 independent 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin

D3 in CYP27B1 deficient animals. *20th International Conference on Cytochrome P450 2017.8.27-31*

② Sakaki T, Nakagawa K, (他 6 名) Comparison of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism between wild-type and CYP24A1-knockout rat 同上

③ Sakaki T Characterization of CYP27B1 or CYP24A1 knockout rats generated by CRISPR/Cas9 system 同上

④ 榊利之, 中川公恵 (他 9 名) CYP24A1 遺伝子欠損ラットを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 代謝様式の解明 日本薬物動態学会 第 32 回年会 2017.11.29

⑤ 榊利之, 中川公恵 (他 10 名) ゲノム編集法で作出した CYP27B1 遺伝子欠損およびビタミン D 受容体遺伝子改変ラットを用いたビタミン D 作用メカニズムの解明 分子生物学会・生化学会合同年会 2018 2017.12.6-9

⑥ 榊利之, 中川公恵 (他 10 名) ゲノム編集法で作出した CYP27B1K0 および変異型 VDR 導入ラットの比較による 25D3 の生理作用機序解明 同上

⑦ 榊利之, 中川公恵 (他 9 名) LC/MS/MS を利用した血中ビタミン D 代謝物の一斉分析法の確立 同上

⑧ 榊利之, 中川公恵 (他 9 名) CYP24A1 遺伝子欠損ラットへの 25-ヒドロキシビタミン D3 代謝様式解明 同上

⑨ 榊利之, 中川公恵 (他 9 名) CYP24A1 遺伝子欠損ラットへの 25-ヒドロキシビタミン D3 代謝様式解明 日本薬学会日本薬学会第 138 年会 2018.3.25-28

⑩ 榊利之, 中川公恵 (他 10 名) ゲノム編集法で作出した CYP27B1 遺伝子欠損およびビタミン D 受容体遺伝子改変ラットを用いたビタミン D 作用メカニズムの解明 同上

⑪ Sakaki T, Kittaka A (他 3 名) SYNTHESIS OF 2-[2-(TETRAZOL-2-YL)ETHYL]-1 α ,25-DIHYDROXY-19-NORVITAMIN D3 AND ITS METABOLISM. 21th Vitamin D Workshop May 16 - 19 2018.5.16

⑫ 榊利之, 中川公恵 (他 8 名) ゲノム編集法で作製した VDR 遺伝子改変ラットの表現型解析による新規ビタミン D 作用メカニズムの解明. 日本ビタミン学会第 70 回大会 2018.6.22-23

⑬ 榊利之, 橋高敦史, 中川公恵 (他 8 名) ゲノム編集法で作製した変異型 VDR 導入ラットにおける 25(OH)ビタミン D3 およびビタミン D 誘導体の活性評価. 同上

⑭ 榊利之, 橋高敦史, 中川公恵 (他 8 名) ゲノム編集法で作製したビタミン D 関連遺伝子改変ラットを用いた新規ビタミン D 作用機序の解明. 同上

⑮ 榊利之, 橋高敦史 (他 6 名) 23 位置換基付加型 25-ヒドロキシビタミン D3 の代謝と生理作用 同上

⑯ 榊利之, 橋高敦史 (他 3 名) ビタミン D バイオセンサーを用いた CYP27B1 活性の新規評価方法 同上

⑰ Sakaki T Generation of genetically modified rats in CYP27B1, CYP24A1 or vitamin D receptor gene by CRISPR/Cas9 system to reveal molecular mechanism of vitamin D

14th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology 2018.7.18

⑱ 榊利之 ゲノム編集法により作製した遺伝子改変ラットを用いたビタミン D の代謝および作用メカニズムの解明 第 4 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会 2018.8.24-25

⑲ 榊利之 ゲノム編集法により作製した遺伝子改変ラットを用いたビタミン D 作用メカニズムの解明 第 3 5 9 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 2018.9.14

⑳ 榊利之, 橋高敦史 (他 4 名) 代謝酵素に高い抵抗性を持つビタミン D 誘導体の合成研究 第 62 回薬学会関東支部会 2018.9.15

㉑ 榊利之, 橋高敦史 (他 3 名) 25-ヒドロキシビタミン D3 代謝物とその誘導体の合成研究 同上

㉒ 榊利之, 中川公恵 (他 9 名) 変異型 VDR 導入くる病モデルラットにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の骨形成作用. 第 91 回日本生化学会大会 2018.9.24-26

㉓ 榊利之, 中川公恵 (他 10 名) ビタミン D 関連遺伝子改変ラットを用いた新規ビタミン D 作用機序の解明. 同上

④ **榊利之、橋高敦史** (他 6 名) CYP24A1 遺伝子改変ラットを用いた 25-ヒドロキシビタミン D₃ の代謝解明 同上

⑤ **榊利之、中川公恵** (他 9 名) 遺伝子改変ラットを用いたビタミン D の代謝および作用メカニズムの解明 同上

⑥ **榊利之、橋高敦史** (他 3 名) 含フッ素ビタミン D 誘導體群の合成

第 44 回 反応と合成の進歩シンポジウム 2018.11.5-6

⑦ **榊利之、中川公恵** (他 6 名) CYP24A1 遺伝子欠損ラットへの 25-ヒドロキシビタミン D₃ 代謝様式解明. 日本薬学会第 139 回年会 2019.3.20-23

⑧ **榊利之、橋高敦史** (他 3 名)

2-[2-(テトラゾール-2-イル)エチル]活性型ビタミン D₃ の 19-ノル体合成と代謝 同上

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 変異型ビタミン受容体遺伝子を有する 2 型くる病モデル動物及びその製造方法

発明者: 榊 利之、真野寛生、西川美宇、生城真一

権利者: 富山県立大学・ファンケル(株)

種類: 特許

番号: 2017-40836

出願年: 2017 年

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 橋高 敦史

ローマ字氏名: **KITTAKA ATSUSHI**

所属研究機関名: 帝京大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): **00214833**

研究分担者氏名: 中川 公恵

ローマ字氏名: **NAKAGAWA KIMIE**

所属研究機関名: 神戸薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): **90309435**

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 生城 真一

ローマ字氏名: **IKUSHIRO SHINICHI**

研究協力者氏名: 安田 佳織

ローマ字氏名: **YAUSDA KAORI**

研究協力者氏名: 西川 美宇

ローマ字氏名: **NISHIKAWA MIYU**