

令和元年6月14日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15261

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Elucidation of Vitamin D Metabolism and Mechanism of Action using Genetically Modified Rats

研究代表者

安田 佳織 (Yasuda, Kaori)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：70707231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CYP27B1機能不全は、体内の25-ヒドロキシビタミンD3 (25D3) を活性型ビタミンD3 (1,25-ヒドロキシビタミンD3)へ代謝できず骨疾患を伴う。活性型ビタミンD3製剤の投与で回復するが、より副作用の少ない治療薬が望まれている。本研究では、CYP27B1遺伝子欠損マウス・ラットに25D3を連日投与することで、くる病様表現型が回復すること、その原因として肝臓中のCYP27A1が補完的に25D3の1位水酸化を行い、正常レベルの活性型ビタミンD3を生成していることを明らかにした。I型くる病の治療に25D3投与が、副作用の少ない新しい治療法となり得る可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

I型くる病は活性型ビタミンDの低下により引き起こされる骨疾患であることから、活性型ビタミンD3製剤がその治療薬として使用されているが、より副作用の少ない治療薬が求められている。今回見出した25D3の連日投与では、副作用がみられておらず、25D3がI型くる病の新たな治療薬として有効である可能性を示している。詳細な代謝物解析からその作用メカニズムも明らかにしており、ビタミンDの作用メカニズム解明を行う上で、詳細な代謝解析が重要であることも提案している。

研究成果の概要(英文)：It is known that CYP27B1 dysfunction caused bone disease, because 25-hydroxyvitamin D3 (25D3) in the body could not be metabolized to active vitamin D3 (1,25-hydroxyvitamin D3). Although administration of an active vitamin D3 recovers the bone disease such as rickets, the better compounds which have fewer side effects are desired. In this study, we clarified that daily administration of 25D3 to CYP27B1 gene-deficient mice and rats restores the rickets-like phenotype. As a result of further studies, it is demonstrated that CYP27A1 in the liver complementarily performs 1-hydroxylation of 25D3 and produced the normal amount of active vitamin D3 in CYP27B1-KO mice and rats. Our results demonstrated that administration of 25D3 may be a new treatment with few side effects for the treatment of type I rickets.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミンD 代謝 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D は骨に対して重要な役割を果たすが、実際に生理作用を示すには、体内で水酸化を受け $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D₃ (1,25D₃, 活性型ビタミン D₃) へと代謝され、ビタミン D レセプター (VDR) に結合することが重要である。CYP27B1 は 25-ヒドロキシビタミン D₃ (25D₃) の 1α 位水酸化を担う酵素であり、CYP27B1 機能不全は活性型ビタミン D₃ を生成できず、くる病等の骨疾患を引き起こす。CYP27B1 遺伝子欠損マウス (CYP27B1 KO マウス) においても、活性型ビタミン D₃ は検出されず、くる病様所見を示す。これらの症状が活性型ビタミン D 製剤で治療されることは既知であるが、血中カルシウム濃度上昇やそれに伴う腎石灰化などの副作用が起こることから、厳密な投与量コントロールが必要となる。より副作用の少ない治療薬が求められている中、我々は、近年、CYP27B1 KO マウスに活性型ビタミン D₃ の前駆体である 25D₃ を連日投与することで、副作用を引き起こさずに、骨密度や成育が野生型と同程度に回復することを明らかにした。当初、25D₃ が直接 VDR に結合し作用していると考えていたが、ELISA 法を用いた血中の活性型ビタミン D の定量を試みたところ、25D₃ 投与 KO マウスでは、野生型マウス非投与群の血中よりもやや高いシグナルが検出された。一般的に血中には 25D₃ が活性型ビタミン D₃ の 500-1000 倍量存在することが知られており、投与によって血中濃度が上昇した 25D₃ との交差性が原因である可能性があるが、より詳細に代謝物解析をすることが必要である。また、体内に微量しか存在しない活性型ビタミン D₃ の有無を調べるためには、マウスに比べて採血量の多いラットが有利であり、近年、ゲノム編集法を利用し CYP27B1 KO ラットの作出に成功した。

2. 研究の目的

上述したとおり、我々は近年、CYP27B1 KO マウスに 25D₃ を連日投与することで、くる病様表現型が回復することを見出した。本研究は、その作用メカニズムを明らかにすることを目的としたものであり、遺伝子変異もしくは腎疾患が原因で CYP27B1 機能不全が起こった場合の治療・予防法の新たな提案するものである。これまでの培養細胞を用いた試験結果から、今回の投与効果が、25D₃ 自身の VDR を介した生理作用によるものと考えているが、これを明らかにするためには、25D₃ 投与 KO マウスの血中に、活性型ビタミン D₃ が存在しないこと、また、他の代謝物やその生理作用を明らかにすることが必要である。そこで、25D₃ 投与 KO マウスの血中代謝物を HPLC や LC/MS/MS を用いて詳細に解析した。マウスでは十分な血液量が得られず検出が困難な可能性も考えら得られたことから、近年 CYP27B1 KO ラットを作出しており、本ラットを用いた解析も併せて行った。

3. 研究の方法

CYP27B1 KO マウスに 25D₃ を連日投与し、5 週間後の血漿を代謝物解析に利用した。代謝物は酢酸エチルにて抽出し、逆相 HPLC にて代謝物を解析するとともに、順相 HPLC と LC/MS/MS を組み合わせて、活性型ビタミン D₃ の有無を調べた。活性型ビタミン D₃ は、野生型マウスの場合でも血中に pM レベルでしか存在せず、検出感度を考慮し、数匹分の血漿をプールし 3 mL を解析に用いた。

上記実験にて、25D₃ 投与 CYP27B1 KO マウスの血中に活性型ビタミン D₃ が検出されたことから、25D₃ の 1α 位水酸化反応を担う酵素の特定を行った。KO マウスより調製した各肝臓組織画分に電子伝達系と 25D₃ を添加し、活性型ビタミン D₃ 生成を評価した。

活性型ビタミン D₃ 以外の複数の代謝物については、一斉定量系の確立を目指し、まず、標準品が市販されていない 24-オキソ-25D₃ の取得を行った。CYP24A1 発現大腸菌膜画分に電子伝達系を添加した再構成系に 25D₃ を添加し代謝物を得た。得られた代謝物は、有機溶媒にて抽出後、HPLC にて目的部分を分取し、分析用標準品とした。25D₃、24,25-ジヒドロキシビタミン D₃ および 24-オキソ-25D₃ 標準品もしくは血漿抽出物を DMEQ-TAD にて誘導体化し、LC/MS/MS 分析を行った。

4. 研究成果

25D₃ 投与 CYP27B1 KO マウスの血中代謝物を HPLC にて分析した。逆相および順相 HPLC における代謝物標品との検出時間一致および LC/MS 分析結果から、これらが、24,25D₃、24-オキソ-25D₃ および 26,23-ラクトン-25D₃ であることが示唆された。一方で、活性型ビタミン D₃ (1,25D₃) については検出限界以下であったことから、野生型および CYP27B1 KO マウスの 3 mL の血漿を用いて、HPLC と LC/MS/MS 両方を用いた詳細な解析を行った。3 mL の血漿抽出物を順相 HPLC にアプライした。今回の分析条件における各 25D₃ 水酸化体の検出時間は以下のとおりであり、1,25D₃ のみ他のジヒドロキシビタミン D₃ と大きく検出時間が離れた。

(23S,25D₃: 7.4 分、24R,25D₃: 9.3 分、25,26D₃: 9.3 分、4,25D₃: 9.1 分、1,25D₃: 22.9 分) 血漿代謝物から得られたフラクションのうち、1,25D₃ の検出時間に相当する 21-24 分のフラクションを回収し、LC/MS/MS 分析を行った (図 1)。その結果、本マウスは 25D₃ の 1α 位水酸化酵素が存在しないにもかかわらず、1,25D₃ が検出され、その濃度を定量したところ、233 pM であった。一方で、野生型マウス非投与群の血中濃度を同様に測定したところ、60 pM であり、25D₃ 投与 KO マウスでは、野生型マウス通常時よりも高い濃度で活性型ビタミン D₃ が存在していることがわかった。

CYP27B1KOマウスの血漿

-順相HPLCチャート-

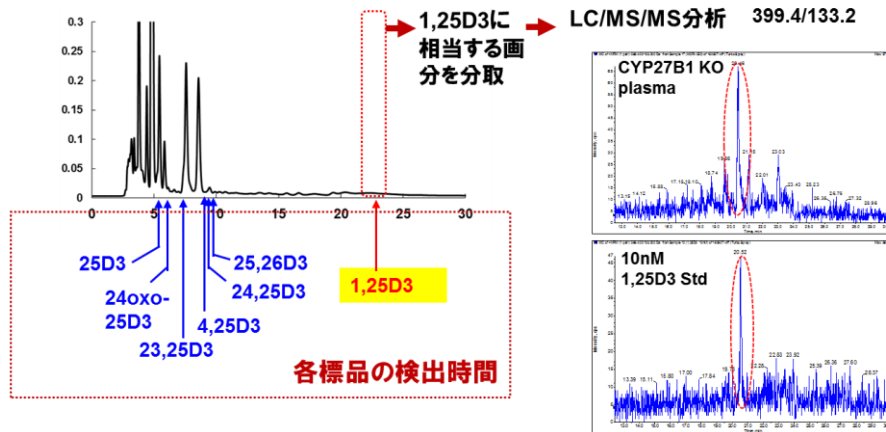


図1 25D3投与CYP27B1 KOマウス血中における活性型ビタミンD3(1,25D3)有無の確認

上記結果より、腎臓に存在する CYP27B1 以外に 25D3 の 1 α 位水酸化酵素が存在することが明らかになったことから、その酵素の同定を試みた。CYP27B1 KO マウスより肝臓の各画分を調製し、電子伝達系を添加した再構成系を用いて、25D3 の 1 α 位水酸化活性を調べた。その結果、肝臓ミトコンドリア画分にアドレノドキシシン (ADX)、アドレノドキシシン還元酵素 (ADR) および NADPH を添加した際に、活性がみられた。肝臓ミトコンドリア画分に存在する CYP27A1 はビタミン D3 の 25 位水酸化酵素として知られているが、発現系を用いた実験から、CYP27A1 は低いながらも 25D3 の 1 α 位水酸化活性を有したことで、また KO マウス肝臓ミトコンドリア画分における同活性が CYP27A1 阻害剤である fadrozole 添加時には著しく低下したことから、CYP27B1 遺伝子欠損時には肝臓中の CYP27A1 によって 25D3 から活性型ビタミン D3 が生成されていることが示唆された。

上述したとおり、25D3 投与時には、活性型ビタミン D3 以外に、24,25D3、24-オキソ-25D3 および 26,23-ラクトン-25D3 が検出され、それらについても、生理作用や血中濃度の解析が必要となる。今後、代謝物経時変化等の詳細解析を行うにあたり、HPLC よりも高感度に分析を行うため、LC/MS/MS による分析系を確立した。市販されていない 24-オキソ-25D3 は、CYP24A1 発現大腸菌膜画分に ADX, ADR, NADPH および 25D3 を添加し、得られた代謝物を逆相 HPLC 分析、目的画分を分取することで、標準品とした。25D3、24,25D3、24-オキソ-25D3 および 26,23-ラクトン-25D3 を DMEQ-TAD にて誘導体化した後、LC/MS/MS 分析条件を検討し、得られた分析条件をもとに、全標準品を混合させた状態で一斉定量分析が可能であることを確認した。本方法にて、HPLC 分析法よりも少ない血漿量で 25D3 投与マウス血中代謝物を分析することが可能となった。

ここまでで、CYP27B1 KO マウスにおける 25D3 投与時の代謝に関する結果を示したが、ビタミン D 関連代謝物は微量であることから、今後、体内動態等の詳細な解析を行う上で、採血量の少ないマウスでは解析が困難であると判断し、近年作出した CYP27B1 KO ラットでも同様の解析を試みた。その結果、KO マウスの場合と同様、KO ラットはくる病様表現型を示し、25D3 連日投与によって回復することが分かった。25D3 投与 KO ラットの血中には、マウスと同様、活性型ビタミン D3 が正常レベル存在すること、また、その代謝に肝臓ミトコンドリア画分に存在する CYP27A1 が関与していることが明らかになり、今後、詳細な微量代謝物解析を行うことが可能となった。

今回、代謝解析を詳細に行うことで、腎臓に存在する CYP27B1 が機能不全の場合でも、25D3 を投与した場合には、肝臓中の CYP27A1 で活性型ビタミン D3 が生成可能であるという新しい事実が明らかになった。すなわち、遺伝子変異や腎疾患による CYP27B1 機能不全が原因の骨疾患に対して、25D3 投与が新しい予防・治療法になる可能性を示すとともに、ビタミン D の作用メカニズム解明を行う上で、詳細な代謝解析が重要であることも示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nishikawa M, Yasuda K, Takamatsu M, Abe K, Nakagawa K, Tsugawa N, Hirota Y, Tanaka K, Yamashita S, Ikushiro S, Suda T, Okano T, Sakaki T. Generation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in Cyp27b1 knockout mice by treatment with 25-hydroxyvitamin D3 rescued their rachitic phenotypes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **185**:71-79 (2018)

- ② Yasuda K, Tohyama E, Takano M, Kittaka A, Ohta M, Ikushiro S, Sakaki T. 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)
- ③ Yasuda K, Sugimoto H, Hayashi K, Takita T, Yasukawa K, Ohta M, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y, Sakaki T. Protein engineering of CYP105s for their industrial uses. *Biochim Biophys Acta.* 1866(1):23-31 (2018)
- ④ Yasuda K, Yogo Y, Sugimoto H, Mano H, Takita T, Ohta M, Kamakura M, Ikushiro S, Yasukawa K, Shiro Y, Sakaki T; Production of an active form of vitamin D₂ by genetically engineered CYP105A1. *Biochem Biophys Res Commun.* **486**:336-341. (2017)

[学会発表] (計 23 件)

- ① 安田佳織, 岡本海利, 西川美宇, 阿部圭祐, 生城真一, 高野真史, 橘高敦史, 榑利之. 生体内における CYP24A1 および CYP3A 依存性ビタミン D 代謝解析. 日本薬学会第 139 年会 千葉 (2019.3.21-23 千葉)
- ② 西川美宇, 阿部圭祐, 安田佳織, 真野寛生, 生城真一, 高野真史, 橘高敦史, 榑利之; 変異型 VDR 導入ラットを用いた新規ビタミン D 誘導体の評価. 日本薬学会第 139 年会 千葉 (2019.3.21-23 千葉)
- ③ 安田佳織, 西川美宇, 阿部圭祐, 岡本海利, 堀部恭平, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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 91 回日本生化学会大会 (2018.9.24-26 京都)
- ④ 岡本海利, 安田佳織, 西川美宇, 阿部圭祐, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 川越文裕, 橘高敦史, 生城真一, 榑利之; 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. 第 91 回日本生化学会大会 (2018.9.24-26 京都)
- ⑤ 西川美宇, 阿部圭祐, 安田佳織, 高松将士, 堀部恭平, 真野寛生, 中川公恵, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 第 91 回日本生化学会大会 (2018.9.24-26 京都)
- ⑥ 阿部圭祐, 西川美宇, 安田佳織, 高松将士, 堀部恭平, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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 京都)
- ⑦ 安田佳織, 岡本海利, 西川美宇, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 川越文裕, 橘高敦史, 生城真一, 榑利之; 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. 日本ビタミン会第 70 回大会 (2018.6.22-23 大阪)
- ⑧ 岡本海利, 安田佳織, 真野寛生, 西川美宇, 川越文裕, 橘高敦史, 生城真一, 榑利之; 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. 日本ビタミン会第 70 回大会 (2018.6.22-23 大阪)
- ⑨ 西川美宇, 安田佳織, 高松将士, 阿部圭祐, 堀部恭平, 真野寛生, 橘高敦史, 高野真史, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 日本ビタミン会第 70 回大会 (2018.6.22-23 大阪)
- ⑩ 阿部圭祐, 西川美宇, 堀部恭平, 安田佳織, 真野寛生, 橘高敦史, 高野真史, 中川公恵, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 日本ビタミン会第 70 回大会 (2018.6.22-23 大阪)
- ⑪ 堀部恭平, 西川美宇, 安田佳織, 阿部圭祐, 真野寛生, 中川公恵, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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 作用機序の解明. 日本ビタミン会第 70 回大会 (2018.6.22-23 大阪)
- ⑫ 安田佳織, 西川美宇, 岡本海利, 高松将士, 阿部圭祐, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 日本薬学会第 138 年会 (2017.3.25-28 金沢)
- ⑬ 西川美宇, 安田佳織, 高松将士, 阿部圭祐, 堀部恭平, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 日本薬学会第 138 年会 (2017.3.25-28 金沢)
- ⑭ 安田佳織, 西川美宇, 岡本海利, 高松将士, 阿部圭祐, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; LC/MS/MS を利用した血中ビタミン D₃ 代謝物の一斉分析法の確立. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9 神戸)
- ⑮ 岡本海利, 安田佳織, 西川美宇, 高松将士, 阿部圭祐, 真野寛生, 中川公恵, 津川尚子, 岡野登志夫, 生城真一, 榑利之; 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. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
(2017.12.6-9 神戸)

- ⑬ 西川美宇、安田佳織、高松将士、阿部圭祐、堀部恭平、岡本海利、真野寛生、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之;
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. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9 神戸)
- ⑭ 阿部圭祐、西川美宇、安田佳織、堀部恭平、高松将士、真野寛生、岡本海利、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; ゲノム編集法で作出した CYP27B1KO 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. 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9 神戸)
- ⑮ 堀部恭平、西川美宇、安田佳織、高松将士、阿部圭祐、岡本海利、真野寛生、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; ゲノム編集法で作出した I 型くる病モデル CYP27B1 遺伝子欠損ラットへの 25-ヒドロキシビタミン D3 の投与効果 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9 神戸)
- ⑯ 安田佳織、西川美宇、岡本海利、高松将士、阿部圭祐、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; 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 (2017.11.29-12.1 東京)
- ⑰ 安田佳織、西川美宇、岡本海利、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; VDR、CYP27B1、CYP24A1 改変ラットにおける血中ビタミン D 代謝物分析. 日本ビタミン第 69 回大会 (2017.6.8-9 横浜)
- ⑱ 阿部圭祐、西川美宇、安田佳織、真野寛生、高松将士、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; ゲノム編集法で作製した VDR 改変ラットにおける 25(OH)ビタミン D3 の生理作用. 日本ビタミン第 69 回大会 (2017.6.8-9 横浜)
- ⑲ 高松将士、西川美宇、安田佳織、阿部圭祐、真野寛生、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; 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. 日本ビタミン第 69 回大会 (2017.6.8-9 横浜)
- ⑳ 西川美宇、安田佳織、高松将士、阿部圭祐、岡本海利、真野寛生、中川公恵、津川尚子、岡野登志夫、生城真一、榊利之; ゲノム編集法を用いた VDR、CYP27B1、CYP24A1 遺伝子改変ラットの創製 日本ビタミン第 69 回大会 (2017.6.8-9 横浜)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 榊 利之

ローマ字氏名： (Toshiyuki Sakaki)

研究協力者氏名： 生城 真一

ローマ字氏名： (Shinichi Ikushiro)

研究協力者氏名： 西川 美宇

ローマ字氏名： (Miyu Nishikawa)

※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、研究者個人に帰属されます。