

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659126

研究課題名(和文) ビタミンKの新規発見受容体活性化経路と蛋白修飾作用の統合的解明

研究課題名(英文) Roles of vitamin K action through the protein modification and transcriptional activation via the nuclear receptor

研究代表者

井上 聡 (Inoue, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：40251251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンKの作用メカニズムについて、古典的な蛋白質修飾を介する系と、我々が発見した核内受容体SXRを介する系に関して検討した。GGCXの臓器特異的欠損マウスを作製したところ、肝臓での欠損は出血による短命を示し、学会ならびに論文発表に進んだ。また、骨と精巣における機能についても表現型を得て、学会発表では研究員がその内容でアンドロロジー学会学会賞を受賞した。一方でSXR/PXRを介する骨の系では、骨量減少と関節の変化が示された。これらを総合して、ビタミンKの骨への作用に関して新しい知見が蓄積している。

研究成果の概要(英文)：Vitamin K is a fat-soluble vitamin that has multiple roles in blood coagulation, bone, joint, brain and so on. Vitamin K is a cofactor of gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) that modulates substrates such as hepatic blood coagulation factors by carboxylation. Moreover, vitamin K also activates nuclear receptor SXR/PXR as a ligand. We generated conditional GG CX and PXR knockout mice to study the physiological and pathophysiological roles of vitamin K. PXR knockout mice displayed osteopenia. Liver-specific Gg cx knockout mice display short life span due to hemorrhage. Using these animal models we can study differential roles and mechanisms of vitamin K action.

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 カルボキシラーゼ ステロイドX受容体 プレグナンX受容体 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K2 は、凝固線溶系とのかかわりが従来知られてきたが、近年、骨折予防効果が明らかとなり、骨粗鬆症の治療薬として用いられるようになった。すなわち、ビタミン K2 は肝臓以外の臓器・組織においても作用していることが次第に明らかとなってきた。骨組織でビタミン K2 が骨折予防効果を有することが示され、ビタミン K2 の不足が変形性関節症や冠動脈疾患と関連するとも報告されている。さらに、ビタミン K2 は、肝臓癌、乳癌、白血病など多臓器にわたる腫瘍に対する抗腫瘍効果が示唆されている。ビタミン K2 は従来 γ グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX)の補酵素としての古典的作用のみが知られていたが、最近申請者らは、核内受容体 SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor)、もしくはそのマウスオルソログである PXR と結合し、特定遺伝子の転写を活性化するメカニズムを新たに発見した。GGCX を介するビタミン K2 の作用は、肝臓における凝固因子の γ カルボキシ化(Gla化)を中心に解析されているが、他臓器における作用の多くは未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、GGCX を介する作用、SXR を介する作用の両面から、従来不明であったビタミン K2 の肝臓外における作用機構を適切な動物モデルを用いて解明することを目的とする。

GGCX を介するメカニズムに関しては、臓器特異的な遺伝子欠損動物の作製を行う。Cre/loxP システムを用い、肝臓に加え、骨組織や精巣特異的に GGCX を欠損するマウスを作製する。臓器特異的なノックアウトにより、肝臓における凝固線溶系因子の異常や発生初期の異常は最小限となり、胎生致死を回避できる。その上で、それぞれの臓器の表現型と作用機構を解析する。新しく見出したビタミン K の SXR を介するメカニズムに関しては、SXR のマウスのオルソログである PXR (Pregnane X receptor)の臓器特異的な、骨、軟骨などでのマウスの表現型を解析する。

3. 研究の方法

本研究においては、ビタミン K2 の肝臓外の作用を、GGCX 依存性の作用、SXR/PXR 依存性の作用に分けて動物モデルとそれ由来する初代培養細胞を用いて解析し、標的分子、シグナル経路の同定と機能解析を行い、その両者を総合して解析する。

1) GGCX の臓器特異的欠損マウスの作製と解析

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。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。本研究においては、肝臓に加え、骨格系と精巣において特異的に GGCX の発現が欠損するマウスを作製し表現型を解析するとともに、基質となる Gla 化蛋白を同定する。

2) SXR/PXR の欠損細胞の機能解析ならびに臓器特異的欠損マウスの作成と解析

PXR 欠損マウスでは、骨量減少、軟骨の変化を主とするメカニズムを解析する。PXR 欠損マウスの骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞などの初代培養細胞を用いて、野生型との差異をマイクロアレイ法、ならびに定量的 Real-Time PCR 法にて比較解析する。また、上記の 1) の GGCX 欠損マウスの表現型、メカニズムと比較した解析を進める。

4. 研究成果

1) GGCX の臓器特異的欠損マウスの作製と解析

本研究においては、肝臓に加え骨格系と精巣において特異的に GGCX の発現が欠損するマウスを作製した。これらのマウスの解析を、出血に加え骨格系、精巣、精子機能に着目して行った。肝臓で欠損させたマウスは出血傾向により短命であり、興味深いことにこれはオスで顕著であった。骨格系と、精巣での変化も確認できた。

2) SXR/PXR の欠損細胞の機能解析ならび

に臓器特異的欠損マウスの作成と解析

PXR 欠損マウスにおいて、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞由来の mRNA を抽出し、分化や活性化に関連する遺伝子の発現を解析した。複数の標的遺伝子の変化から、骨格系での SXR/PXR の標的遺伝子が単離できた。骨格系をはじめとする表現型、特に関節の異常を明らかにした。PXR 臓器特異的欠陥マウスも作製し、GGCX の遺伝子欠損マウスの解析と併せ、ビタミン K シグナルが介する経路を比較できた。

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)

[雑誌論文](計 6 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 γ -glutamyl carboxylase-1 deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS ONE* 9, e88643, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0088643.

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.

Urano T, Shiraki M, Yagi H, Ito M, Sasaki N, Sato M, Ouchi Y, Inoue S: GPR98/Gpr98 gene is involved in the regulation of human and mouse bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E565-E574, 2012. DOI: 10.1210/jc.2011-2393.

Ikeda K, Tsukui T, Tanaka D, Maruyama Y, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of human bone Gla protein in osteoblasts causes skeletal abnormality in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 164-169, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.098.

Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of circulating sclerostin levels with fat mass and metabolic disease-related markers in Japanese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 97,

E1473-1477, 2012. DOI: 10.1210/jc.2012-1218.

Ikeda K, Tsukui T, Imazawa Y, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of constitutively active estrogen receptor α in chondrocytes impairs longitudinal bone growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 912-917, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.170

[学会発表](計 8 件)

柴祥子、池田和博、堀江公仁子、津久井通、近藤志穂、小路武彦、井上聡: [学会賞(基礎部門)] ビタミン K 依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼをセルトリ細胞特異的に欠損したマウスは雄性不妊を呈する (2013.7.26-27) 日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会ならびに総会(大阪)

東浩太郎、大内尉義、井上聡: [シンポジウム] ビタミン K 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)

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) 井上聡: [シンポジウム] ビタミン K と骨代謝 - 臨床とビタミン Up-Date - (2013.5.17-18) 第 65 回日本ビタミン学会大会(東京)

Inoue S: [Symposium] Vitamin K and bone metabolism. (2012.11.23-24) Asian Aging 2012: Korea- Japan Joint Conference on Aging, Metabolism and Neurobiology, AACL-2012 Seoul Symposium, Seoul, South Korea.

Inoue S: Conditional Expression of Constitutively Active Estrogen Receptor α in Transgenic Mice. (2012.11.15-17) 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Ishikawa, Japan.

井上聡: [特別講演] ビタミン K の新し

い作用メカニズム (2012.6.29) 第 15 回
ビタミン K フォーラム、第 22 回日本産
婦人科・新生児血液学会 (三重)
井上聡:[シンポジウム] 骨関節疾患のゲ
ノムバイオマーカー (2012.6.22-24) 第
12 回日本抗加齢医学会総会 (横浜)

〔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

井上 聡 (INOUE, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号 : 4 0 2 5 1 2 5 1

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし