

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

骨・カルシウム代謝異常症の病因、病態の解明

分担研究者 福本誠二 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

A. 研究の目的

近年、骨・カルシウム代謝に関与する因子が次々に明らかにされてきた。特にカルシウム代謝に関しては、副甲状腺ホルモン分泌調節に必須の役割を果たすG蛋白共役受容体としてカルシウム感知受容体が同定された。またこのカルシウム感知受容体遺伝子異常などにより、実際に血中カルシウム濃度異常が惹起されることも明らかにされてきた。一方ビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症の一種である腫瘍性骨軟化症の惹起因子として、fibroblast growth factor(FGF)-23が同定された。このFGF-23は、従来不明な点が多く残されていたリン代謝調節に重要な役割を果たす因子である可能性がある。そこで本研究では、カルシウム感知受容体遺伝子異常により惹起される疾患の病態の検討と共に、FGF-23測定系の開発、FGF-23の作用を解明することを目的とした。

B. 研究方法

副甲状腺機能低下症患者のカルシウム感知受容体遺伝子変異の有無と共に、変異受容体のin vitroでの作用を検討した。モノクローナル抗体を用いてFGF-23測定系を開発し、各種疾患におけるFGF-23濃度を検討すると共に、FGF-23ノックアウトマウスを用い、FGF-23の生理作用を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体の採取にあたっては、インフォームドコンセントを取得し、結果の発表に際しては個人を特定できないように配慮した。

C. 研究結果及び考察

2例の副甲状腺ホルモン分泌不全による副甲状腺機能低下症患者に、低カリウム血症や高レニン血症など、バーター症候群様病態の合併を認めた。バーター症候群は、腎尿細管に発現するチャネルやトランスポーターの異常により惹起される症候群で、従来1型から4型に四型に分類されてきた。これら2例のカルシウム感知受容体遺伝子の検討から、カルシウム感知受容体の強い活性型変異は、ヘンレ上行脚のカリウムチャネルを抑制することにより、バーター症候群の原因となることが明らかとなった。このことは、従来報告されていなかったカルシウム代謝とナトリウムや体液調節系の関係を示している。一方FGF-23測定系の開発により、腫瘍性くる病/骨軟化症患者では血中FGF-23は高値を示し、原因腫瘍の摘除によりFGF-23は速やかに低下すること、腫瘍性くる病/骨軟化症に加え、ビタミンD抵抗性くる病/骨軟化症の最も頻度の高い原因であるX染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症においても血中FGF-23濃度の上昇が認められることが示された。さらにMcCune-Albright症候群に伴う低リン血症にお

いても、FGF-23の高値が認められることが報告されており、FGF-23の高値は複数の低リン血症性疾患の病因となっていることが明らかとなった。またFGF-23ノックアウトマウスは、腫瘍性くる病/骨軟化症などとは逆に、高リン血症、高1,25-水酸化ビタミンD血症を示したことから、FGF-23は生理的にもリンやビタミンD代謝に必須の液性因子であることが示された。

#### D. 評価

##### 1) 達成度について

カルシウム感知受容体遺伝子変異による新たな病態の記載と共に、低リン血症性疾患の病因鑑別に有用な測定法を開発しており、達成度は高い。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

カルシウム感知受容体活性型変異による本病態は、既にBartter症候群5型と分類され、海外誌にも記載されている。また慢性腎不全に伴う高リン血症では、著明なFGF-23の高値が認められることから、FGF-23は骨代謝領域のみならず、腎臓領域でも国内外で大きな研究対象となりつつある。

##### 3) 今後の展望について

FGF-23作用の検討は、低リン血症性疾患に加え、慢性腎不全を始めとする高リン血症性疾患の、病態の把握と治療法の開発に結びつくものと期待される。

##### 4) 研究内容の効率性について

Complementary DNAなど、研究に必要な資料が整ったことから、今後はさらなる研究の効

率化がはかれるものと考えられる。

#### E. 結論

カルシウム感知受容体遺伝子異常による新たな病態を記載すると共に、FGF-23の生理的および病因的意義を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表 6件

##### 2) 海外

口頭発表 6件

原著論文による発表 12件

それ以外の発表 2件

##### そのうち主なもの

###### 論文発表

Watanabe S et al: Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet* 360:692, 2002

Yamazaki Y et al: Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4957, 2002

Shimada T et al: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF-23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561, 2004

Takeuchi Y et al: Venous sampling for fibroblast growth factor (FGF)-23 confirms preoperative diagnosis of tumor-induced osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3979, 2004

G. 知的所有権の出願・取得状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ビタミンDの骨に対する直接作用に関する研究

分担研究者 田中 弘之 岡山大学大学院医歯学総合研究科 助教授

研究要旨

1,25dihydroxyvitamin D3 (1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考え、VDRKO骨を用い細胞外のカルシウムリンを正常化した状態での種々の実験を行った。その結果、1,25の骨に対する直接作用は骨幹部の皮質骨形成の抑制と膜性骨化の抑制であることを示してきた。さらにこの過程には1,25によるrunx2の転写抑制が関与していることも明らかにし、runx2遺伝子の負の転写抑制領域についても領域を絞り込むことができた。

A. 研究目的

1,25dihydroxyvitamin D3 (1,25) のビタミンD受容体 (VDR) を介した骨への直接作用は不明確なことが多い。即ち、VDRKOマウスは出生直後に骨になんら異常を示さないこと、離乳以降重症のくる病を発症するが、これは食餌中のCaやPiを調節することによって、血清Ca, Piの正常化とともに正常化することなどから、骨病変はVDRKOによって生じたミネラル調節の異常が原因であると考えられるからである。骨に直接ビタミンDは大きな作用を果たしていないかを明らかにすることは今後の治療薬開発に重大な意味を持つものと考えられる。そこで、体液環境が正常である状況下でVDRKO骨に如何なる変化が生じるかを検討し、ビタミンDの骨に対する直接作用を明らかにすることを目的として研究を行った。この結論をさらに裏付ける目的で今年度は、①体液中のミネラル異常の影響を未だ受けていないと考えられる新生仔頭

蓋冠の器官培養②胎仔期の骨発生について骨格標本の検討③runx2遺伝子の5'プロモーター領域の解析を行った。

B. 研究方法

移植実験：生後2週のVDRKO及び野生型から大腿骨、頭蓋冠を採取し、生後8週のマウスの筋膜下に移植した。

当施設で系統維持を行っているヘテロのVDRKO同士の交配を行いvaginal plug 確認日をday 0として、20dpcの新生仔より頭蓋冠を摘出し、アガロースゲルを用いた三次元器官培養をKasentyらの方法に準じおこなった。また、13.5から17.5の各dpcで妊娠マウスより同腹のKO及びWildの胎仔骨格標本を作製し、骨形成の比較を行った。遺伝子型は肝組織より抽出したDNAを鋳型に既報の方法でタイピングした。pGL3 basic vectorにマウスrunx2遺伝子の上流の約4.6kbを組み込んだレポーターベクターを

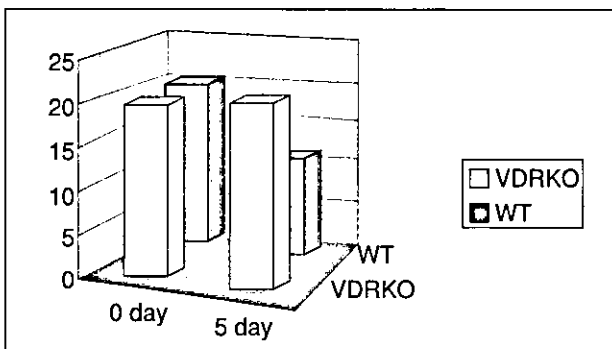
作製した (-4579~8: pGL3 4.6)。これをもとに5'側から様々な長さの塩基を削除したTruncation mutantを作製した。また、転写開始コドンの近傍に位置するDR3配列(AGTACTGTGAGGTCA: -98~-84)に変異を加えたmutant(DR3 mutant)を作製した。これらのコンストラクトを用いビタミンDの転写活性に対する効果をluciferase活性で検討した。

## C. 研究結果

### ①移植実験の結果

VDRKO骨の野生型マウスへの移植実験を行った。この結果、組織学的に異常を示さない生後2週のVDRKO骨を野生型に移植すると、VDRKO骨は野生型の骨を野生型マウスに移植した場合よりも著しい骨量の増加を示した。この間一貫してKO骨と野生型骨で差を認めた遺伝子はrunx2遺伝子であり、これらのことより1,25は骨においてrunx2を負に制御することによって、骨形成を負に調節していることが示唆された。

### ②出生直後の頭蓋冠の定量的解析と器官培養



培養後の頭頂骨はK. 0では厚さに変化が認められなかった ( $20 \pm 1 \rightarrow 21 \pm 2 \mu\text{m}$ ) 一方、Wildでは培養前より厚さが減少していた ( $20 \pm 2 \rightarrow 12 \pm 2 \mu\text{m}$ ) また、破骨細胞数は両者間で有意な差はなかった。

### ②骨格標本における検討

ここの頭頂骨厚の減少がD<sub>3</sub>の膜性骨形成抑制効果によるものか否か検討するため胎児骨格標本作製した。その結果、13.5 dpcでKOの頭頂骨及び上、下顎骨のアリザリンレッドによる染色域はWTより広く、ヘテロではその中間型を示した。

### ③runx2のプロモーター活性の検討

Runx2遺伝子の転写活性は転写開始点近傍に位置するDR3配列を削除することで失われた。

転写開始点からプロモーター領域約1.8kbまでをサブクローニングしたコンストラクトではVD<sub>3</sub>により転写活性の抑制は認められなかったが、1.9kbをサブクローニングしたコンストラクトで初めて転写活性の抑制が認められるようになった。またこれらのコンストラクトのDR3mutantでは抑制作用の増強を認めた。

次に、-1.8kbから-1.9kbの間100bpの塩基配列をモチーフサーチしたところ転写制御に関わると考えられる2つのinterferon regulatory factor 1 responsive elementと1つのTCF responsive elementが発見された。そこでさらに10bpごとにtruncationコンストラクトを作成したところ、負の転写制御にはTCFサイトが存在する-1.84kbから-1.8kbの40bpが必要最小限の配列であることが明らかとなった。

## D. 考 察

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>のVDRを介した骨に対する作用は体液中のCa、リン濃度の影響を受けるため、通常のKOマウスの骨所見からは断定的なことはいいがたい。この欠点を克服するために、①VDR欠損骨の正常個体への移植②器官培養③胎仔骨の検討を行った。1,25は少なくとも骨芽細胞の初期分化を直接抑制する

ものであることが明らかとなった。また、その作用にはrunx2の1,25による転写抑制が介在することも明らかとなってきた。Runx2の1,25による転写抑制は非常に複雑であり、プロモーター上には正負の調節領域が存在することが示唆された。さらに負の調節領域は既にビタミンD1 $\alpha$ 水酸化酵素遺伝子において報告されているエレメントと構造は異なっており、この部に結合する調節因子もまたVDIRとは異なるものであることが推測された。

## E. 結 論

1,25-dihydroxyvitamin D3のVDRを介した骨に対する直接作用は骨芽細胞の分化の抑制である。その作用の少なくとも一部は1,25によるrunx2の負の転写制御機構が関与しており、runx2遺伝子の5'上流-1.84から-1.8kbの間に負の転写制御に必須のエレメントが存在すると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamanaka Y, Tanaka H, Koike M, Nishimura R, Seino Y. PTHrP Rescues ATDC5 Cells from Apoptosis Induced by FGF Receptor 3 Mutation. *J Bone Miner Res* 18:1395-1403, 2003
2. Yamashita N, Tanaka H, Moriwake T, Nishiuchi R, Oda M, Seino Y. Analysis of linear growth in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Bone Miner Metab* 21: 172-178, 2003

3. Kanazawa H, Tanaka H, Inoue M, Yamanaka Y, Namba N, Seino Y. Efficacy of growth hormone therapy on patients with skeletal dysplasia. *J Bone Miner Metab* 21:307-310, 2003
4. H. Tanaka. Growth hormone treatment in achondroplasia. *Clin Pediatr Endocrinol* 12 (Suppl 20): 19-22, 2003
5. Koike M, Yamanaka Y, Inoue M, Tanaka H, Nishimura R, Seino Y. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) rescues the mutated FGF receptor 3 (G380R)expressing ATDC5 cells from apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *J Bone Miner Res* 18: 2043-51, 2003
6. Ogawa M, Moriya N, Ikeda H, Tanae A, Tanaka T, Ohyama K, Mori O, Yazawa T, Fujita K, Seino Y, Kubo T, Tanaka H, Nishi Y, Yoshimoto M. Clinical evaluation of recombinant human growth hormone in Noonan syndrome. *Endocrine J* 51: 61-68, 2004
7. Tanaka H, Seino Y. Direct action of 1,25-dihydroxyvitamin D on bone; VDRKO bone shows excessive bone formation in normal mineral condition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:343-345, 2004
8. Y. Ichinose, H. Tanaka, M. Inoue, S. Mochizuki, E. Tsuda, Y. Seino. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin Reduced Bone Loss Induced By Mechanical Unloading. *Calcif Tissue Int.* 75: 338-343, 2004
9. Kaga M, Takahashi K, Ishihara T, Suzuki H, Tanaka H, Seino Y, Makino H. Bone assessment of female long-distance runners. *J Bone*

Miner Metab 22(5):509-513, 2004

10. D Harada, Y Yamanaka, K Ueda, J Shimizu, M Inoue, Y Seino, H Tanaka. An effective case of Growth hormone Treatment on Cartilage-hair hypoplasia. Bone (in press)

## 2.学会発表

H. Tanaka, N. Inoue, K. Kinuta, S. Kato, Y. Seino VITAMIN D SUPPRESSES PERIOSTEAL BONE FORMATION THROUGH SUPPRESSING RUNX2 GENE EXPRESSION. the 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR)

N. Inoue, H. Tanaka, K. Hasegawa, M. inoue, S. Kato, Y. Seino VITAMIN D RECEPTOR NULL BONE SHOWS HIGHER PERIOSTEAL BONE FORMATION. the 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR)

H. Tanaka, Y. Seino DIRECT ACTION OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ON BONE; VDRKO BONE SHOWS EXCESSIVE BONE FORMATION IN NORMAL MINERAL CONDITION. 12th Workshop on Vitamin D Maastricht, Netherland. July/2003

K. Hasegawa, H. Tokumaru, H. Tanaka, Y. Seino 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D3 SUPPRESSES RUNX2/ CBFA1 GENE PROMOTOR ACTIVITY, BUT NOT VIA VDRE. 12th Workshop on Vitamin D Maastricht, Netherland. July/2003

K. Ueda, Y. Yamanaka, E. Yamagami, D. Harada, Y. Seino, H. Tanaka Parathyroid Hormone

Rescues Disturbed Bone Growth Induced by Mutated FGFR3. 25th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research Minneapolis, MN, USA 2003

M. Takaiwa, K. Aya, Y. Yamanaka, Y. Seino, H. Tanaka The stimulatory G protein signaling indirectly increases FGF-23 mRNA level. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Hasegawa, Y. Seino, S. Kato, H. Tanaka. 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> is an important regulator in organogenesis of bone. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Hasegawa, Y. Seino, S. H. Tanaka. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> suppresses cbfal gene expression transcriptionally: Identification of regulatory elements. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

N. Namba, E. Ogura, K. Ozono, Y. Seino, H. Tanaka SHP-2 Mutations in Noonan Syndrome Lead to Increased MAPK Activation: A Possible Mechanism of Short Stature. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

K. Ueda, Y. Yamanaka, D. Harada, R. Nishimura, D. M. Ornitz, Y. Seino, H. Tanaka PTH can improve the disturbed bone growth in achondroplastic mice. ASBMR 26th Annual Meeting in Seattle, Washington, USA

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



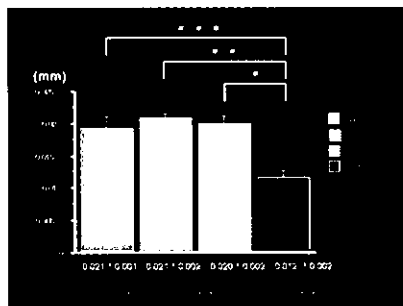
## VDRの骨に対する直接作用—VDRKOマウスでの検討

•出生直後のマウス頭蓋冠の器官培養を行い、体液環境を一定にした状態でのKOマウスと野生型の違いを検討したところ、培養終了時には野生型で頭蓋冠のひはく化が生じた(上図)。

•マウスの胎齢を順次遡り、骨格標本作製しKOマウスと野生型で比較した。KOマウスでは骨発生が著しく促進していることが明らかとなった(下図)。

•各種環境下でmRNAを抽出、骨代謝関連遺伝子発現をリアルタイムPCRで比較したところrunx2遺伝子発現が再現性良くKOで亢進していた。

•Runx2プロモーターを4.6KbまでクローニングしビタミンDによる負の転写制御にかかわる領域を絞り込んだ。



ヘテロのVDRKO同士の交配を行いvaginal plug 確認日をday 0として、20dpcの新生仔より頭蓋冠を摘出し、アガロースゲルを用いた三次元器官培養をKasentyらの方法に準じおこなった。また、13.5から17.5の各dpcで妊娠マウスより同腹のKO及びWildの胎仔骨格標本作製し、骨形成の比較を行った。遺伝子型は肝組織より抽出したDNAを鋳型に既報の方法でタイピングした。

pGL3 basic vectorにマウスrunx2遺伝子の上流の約4.6kbを組み込んだレポーターベクターを作製した(-4579~-8;pGL3 4.6)。これをもとに5'側から様々な長さの塩基を削除したTruncation mutantを作製した。また、転写開始コドンの近傍に位置するDR3配列) AGTACTGTGAGGTC A:-98~-84)に変異を加えたmutant (DR3 mutant)を作製した。これらのコンストラクトを用いビタミンDの転写活性に対する効果をluciferase活性で検討した。

### 結果

#### ①出生直後の頭蓋冠の定量的解析と器官培養

培養後の頭頂骨はK. Oでは厚さに変化が認められなかった( $20 \pm 1 \rightarrow 21 \pm 2 \mu\text{m}$ )一方、Wildでは培養前より厚さが減少していた。 $(20 \pm 2 \rightarrow 12 \pm 2 \mu\text{m})$ また、破骨細胞数は両者間で有意な差はなかった。

#### ②骨格標本における検討

この頭頂骨厚の減少がD3の膜性骨形成抑制効果によるものか否か検討するため胎児骨格標本作製した。その結果、13.5 dpcでKOの頭頂骨及び上、下顎骨のアリザリンレッドによる染色域はWTより広く、ヘテロではその中間型を示した。WildVDR K.O.

#### ③runx2のプロモーター活性の検討

Runx2遺伝子の転写活性は転写開始点近傍に位置するDR3配列を削除することで失われた。

転写開始点からプロモーター領域約1.8kbまでをサブクローニングしたコンストラクトではVD3により転写活性の抑制は認められなかったが、1.9kbをサブクローニングしたコンストラクトで初めて転写活性の抑制が認められるようになった。またこれらのコンストラクトのDR3mutantでは抑制作用の増強を認めた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ビタミンD受容体を介した活性型ビタミンD依存的な  
転写抑制因子群同定の試み

分担研究者 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所

A. 研究目的

カルシウム代謝調節に必須な栄養素である脂溶性ビタミンDは細胞の増殖抑制、分化誘導、免疫応答などを司る幅広い生理作用を有することが知られている。このようなビタミンDの多彩な生理作用はステロイドホルモン核内受容体群に属し、リガンド依存性転写調節因子であるビタミンD受容体（VDR）を介した遺伝子発現により調節される。この際、活性型ビタミンDはビタミンDレセプター（VDR）を介して標的遺伝子の発現を正負に制御することが知られている。

ビタミンDのVDRを介した標的遺伝子の発現制御については、正の制御メカニズムに関しては既に詳細な解析がなされているが、負の制御メカニズムに関しては不明点が多い。これまでに我々はビタミンDのVDRを介した負の転写制御メカニズムに興味を持ち、以前当研究室で単離したビタミンD生合成の鍵酵素であるビタミンD<sub>3</sub>1 $\alpha$ 水酸化酵素（1 $\alpha$ (OH)ase）遺伝子のプロモーター上に負の応答領域（1 $\alpha$ -nVDRE）を同定した。1 $\alpha$ (OH)ase 遺伝子発現における転写抑制遺伝子として働く bHLH転写因子VDIRを単離した。また、更なる解析により、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>非存在、PKA存在下にはVDIRがリン酸化を受け、更にco-activatorであるp300と複合体を形成するととり、1 $\alpha$ (OH)ase遺伝

子の転写活性を上昇することを明らかにした（Murayama et al., *EMBO J.*, in press）。我々はVDIRがVDRを介する1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>依存的な転写抑制機構において鍵分子であると推定し、その分子メカニズムの解明を試みた（研究1）。

一方、当研究室では転写共役因子複合体の一つとして、VDRにリガンド非依存的に結合する新規ATP依存性クロマチンリモデリング複合体WINACを精製・同定した。さらに、この複合体がビタミンDによる1 $\alpha$ (OH)ase遺伝子の発現抑制に対して、NCoRタンパクを含むHDAC複合体と協調的に働いていることを報告した（Kitagawa et al., *Cell*, 113, 905-917, 2003）。一方、1 $\alpha$ (OH)ase遺伝子は主に腎臓で発現すると知られており、体内のCaや活性型ビタミンDに反応し、その発現が精巧に制御されている。特に腎臓の近位尿細管においては活性型ビタミンDによりフィードバック反応により発現が抑制される。酵素の基質特異性やプロモーター機能解析から、腎臓特異的な転写制御機構解明が期待される。

そこで、我々はWINAC複合体とVDIRの複合体の更なる詳細な解析を行い、1 $\alpha$ (OH)ase遺伝子のプロモーターの特異性の解明を試みる（研究2）。

また、これまでに吉澤らはVDRの生体内での高次機能を解明するため、VDR遺伝子欠損（KO）マウス（VDR<sup>-/-</sup>：Conventional-VDRKO）

を作製した。Conventional-VDRKOマウスは成長障害、低カルシウム・低リン血症、高PTH血症、血清 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の著しい増加、骨量減少および脱毛といった家族性くる病Ⅱ型に典型的な症状を離乳後に示した。しかしConventional-VDRKOマウスの骨で観察された骨量減少は低カルシウム・低リン血症を伴うPTH過剰産生状態（二次性副甲状腺機能亢進症）によって間接的に引き起こされた可能性が否定できなかった。このようにビタミンDが血中カルシウム代謝を介し少なくとも間接的に骨代謝を制御することは明らかにすることができたが、ビタミンDの骨細胞の増殖分化への直接作用の可能性は証明することができなかった。そこで本研究では、カルシウムの間接的作用のない骨芽細胞特異的にVDR遺伝子を欠損するマウスを作出することでビタミンDの骨芽細胞を介した骨へのビタミンD直接作用の検証を試みた（研究3）。

## B. 研究方法

### （研究1）

VDIRの $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制における機能解析のため、以下の検討を行った。全ての解析は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による抑制が見られるマウス腎臓近位尿細管細胞であるMCT細胞を用いた。

- 1) ルシフェラーゼ（LUC）法で、VDIRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制に及ぼす影響を検討した。また、この際ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）が関与しているかをHDAC阻害剤（TSA）投与実験により検討した。
- 2) 免疫沈降法を用いて、VDIRとVDRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下で複合体を形成するかを検討した。また、HDACおよび、Co-repressor（NCoR）が同じ複合体に含まれるかを検討した。

- 3) クロマチン免疫沈降法（CHIP）を用いて、VDIR、VDR、HDAC、NCoRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下において $1\alpha$ -nVDRE上で複合体を形成するのかを検討した。
- 4) PTHやPTHrP遺伝子にも $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子と同様な転写抑制メカニズムが存在するかをLUC assay、gel mobility shift assay、ABCD assay法を用いて検討した。
- 5) MCT細胞から核タンパクを抽出し、GST-VDIRをbaitとして、結合する因子を同定する。具体的にはVDRとVDIRを含む複合体をグリセロールグラジエントにて分離し、その構成因子群をMALDI TOF-MSにて同定する。

### （研究2）

WINAC複合体とVDIRの複合体の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 依存的な転写抑制における機能解析のため、以下の検討を行った。全ての解析は $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による抑制が見られるヒト乳ガン細胞であるMCF7細胞を用いる。

- 1) ルシフェラーゼ（LUC）法で、VDIRやWINAC複合体の主要因子であるWSTFがそれぞれ存在する時、両方存在する時に $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写抑制に及ぼす影響を検討する。
- 2) 免疫沈降法により、WINAC複合体の主要構成因子WSTFタンパクとVDIRのリガンド依存的な複合体形成能について検討する。
- 3) GST pull-down法から、WSTFタンパクとVDIRと直接結合能について検討する。
- 4) クロマチン免疫沈降法（ChIP）を用いて、WSTF、VDIR、VDR、HDAC、NCoRが $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下において $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ 遺伝子プロモーター上への複合体形成能を調べる。
- 5) DNA結合アッセイより、in vitroにおいて、

1  $\alpha$ (OH)ase遺伝子プロモーター領域におけるWINAC複合体がE-box上でリクルートされるか否かを検討する。

(研究3)

P1ファージ由来のCreリコンビナーゼ (Cre) がloxP配列で挟まれた領域を切り出す性質を利用したCre-loxPシステムによる骨芽細胞特異的VDRKOマウスの作出を試みた。

1) VDR遺伝子座の翻訳開始点及びDNA結合領域の存在するexon 2の両側にloxP配列を挿入したVDRfloxedマウス (VDR<sup>L2/L2</sup>) の作出を試みた。

2) 骨芽細胞特異的にCreを発現するCollagen  $\alpha_1$ (I)-Cre TgマウスとVDRfloxedマウスとの交配により骨芽細胞特異的VDRKO (Ob-VDRKO) マウスの作出を試みた。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

### C. 研究結果及び考察

(研究1)ではVDIRを強発現することにより、1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>依存的な転写抑制が顕著に認められたことから、1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による転写抑制においてVDRと共に必須であることを確認した。また、TSA添加により、1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による転写抑制が阻害されることから、HDAC2の関与の可能性が示唆された。免疫沈降の結果より、1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の存在時、HDAC2およびNCoRがVDIRとVDRを含む複合体に含まれていることが明らかになった。更に、この複合体が実際に1  $\alpha$ -nVDRE上で形成されていることをCHIP assayにて確認した。

転写抑制メカニズムを解明するために行ったGST-VDIRをbaitとして行ったタンパク精製

によりVDIRとVDRが1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>依存的に形成する巨大複合体を形成していることが明らかになり、さらにその複合体の中にHDAC2およびNcoRがやはり含まれていることが確認できた。

以上の検討から1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>依存的な転写抑制機構において、1  $\alpha$ -nVDREに結合したVDIRが、1  $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>依存的にVDRおよび、HDAC、NCoRを含むco-repressorと複合体を形成することを明らかにした。更に、我々は他に活性型ビタミンDにより負に制御されることが知られているPTH及びPTHrP遺伝子にも同様な転写抑制分子メカニズムが存在することを示し、VDIRを介する転写抑制メカニズムは活性型ビタミンDにより発現が抑制される標的遺伝子において共通する転写抑制メカニズムである可能性を提示した。

(研究2)では1  $\alpha$ -nVDREを用いたレポーターアッセイの結果、WINAC複合体主要構成因子であるWSTFは、ビタミンDによる転写抑制に対してVDIRと協調的に働くことが明らかとなった。これは免疫沈降法、およびGST pull-down法を用いてVDIRとWSTFが、VDRを介することによって、リガンド依存的に結合することからも支持される。しかしながら、ChIP法による解析の結果では、HDACコリプレッサー複合体の1  $\alpha$ (OH)ase遺伝子プロモーター上への結合はビタミンD依存的であるにもかかわらず、VDR、WSTFはプロモーター上にリガンド非依存的に結合することが明らかとなった。この矛盾を解明するため、DNA結合アッセイによって、リガンド非存在下におけるVDR/WSTFのプロモーター上への結合を検討した。その結果、この複合体の結合はDNA配列を認識したものでなく、WSTFを介したクロマチン結合能によるものであることが判明した。さらに、

WSTFクロマチン結合能欠失変異体を用いた解析によって、このWSTFのクロマチン結合能は、 $1\alpha$ (OH)ase遺伝子のリガンド依存的な転写抑制に対して必須であることが明らかとなった。

(研究3)ではVDR<sup>flox</sup>マウス (VDR<sup>L2/L2</sup>)の作出およびOb-VDRKOの作出に成功した。Ob-VDRKOマウスの成長曲線は野生型と有意な差異は見出されず、正常であった。またConventional-VDRKOでは供に低カルシウム血症、低リン血症、高PTH血症、更に血清 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の著しい増加が観察された。しかしながら骨芽細胞特異的VDRKOマウスにおいてはいずれも正常値を示した。さらに骨量が最大となる16週齢のマウスの大腿骨のX線解析を行ったところ、Conventional-VDRKOマウスでは著しい骨量の減少が観察されたが、Ob-VDRKOマウスは予想に反し野生型と比較し骨量および骨密度が増加することを見出した。次に骨組織を詳細に解析したところ、Ob-VDRKOマウスは野生型に比べ海綿骨の骨形成および骨吸収が抑制され、皮質骨の骨形成が促進されていることが明らかになった。このことから、骨芽細胞のVDRが骨量および骨代謝の制御、骨芽細胞分化制御に直接関与していることが明らかになった。つまり、VDRは骨組織では負に、他の標的臓器ではカルシウム代謝を調節することにより正に機能し、骨代謝を正常に保つと考えられた。

## D. 評価

達成度について

VDRに結合する転写共役因子群を検索する過程で、新規の染色体構造調節因子複合体(WINAC)を発見することができた。また、骨芽細胞特異的VDR遺伝子欠損マウスを作成す

ることで、これまで予想されなかった機能について明らかにすることができた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

WINACの発見により、今まで明らかでなかった染色体構造調節とVDRを介した遺伝子発現調節の関連を明らかにし、またウィリアムス症候群の責任遺伝子を含んでいたことから、この複合体は予期せぬ遺伝病との関連を明らかにできた (Kitagawa et al., Cell, 2003)。また、骨芽細胞特異的VDR遺伝子欠損マウス作成により、VDRの負の骨代謝調節因子としての側面を見出すことができ、この成果により主著者である山本陽子博士は、米国ならびに日本骨代謝学会奨励賞を受賞した。

今後の展望について

我々はVDIRを介する転写抑制メカニズムは活性型ビタミンDにより発現が抑制される標的遺伝子において共通する転写抑制メカニズムである可能性を提示した。しかし、その詳細な転写抑制メカニズムは依然として不明であり、さらにそれが組織特異的に生じる理由は明らかではない。近年、転写抑制のメカニズムにも様々な因子が関与していることが明らかになっている。しかもそれらは結合するプロモーター配列特異的な複合体を形成していると考えられている。従って、我々が用いているビタミンD依存的に転写抑制が生じるプロモーター上にもこれまで知られていない未知の複合体が形成されている可能性が高いと考えられる。既に我々の同様の検討からATP依存性クロマチンリモデリング複合体がこの転写抑制に関与していることがわかっており、複数の複合体の関与も予想される。

現在までの検討より、我々はこれら遺伝子の転写抑制に組織特異的な転写因子が関与していると考えている。そこで、我々はこの因子を同定することがこれら遺伝子のビタミンD依存的な発現抑制機構の組織特異性を証明するための第一の課題であると考え、生化学的な手法を用いて複合体の全構成因子の同定に着手している。今後はDNAカラムなどの様々手法を用いてこの因子の同定と共に転写抑制複合体構成因子全ての同定を行うことによりその詳細な転写抑制メカニズムが明らかになると思われる。

さらに我々の同定したWSTF、VDIRを介した、 $1\alpha$ (OH)ase遺伝子のリガンド依存的な転写抑制分子機構に関して詳細な解析を行ったが、今後、今回報告した*in vitro*および細胞内での結果がどのように組織特異性を生み出していくのか、遺伝子欠損動物を用いた研究などによって明らかにされていくものと期待される。

またOb-VDRKOの解析により、Ob-VDRKOマウスは骨量および骨密度が増加することを見出した。さらにOb-VDRKOマウスは野生型に比べ海綿骨の骨形成および骨吸収が抑制され、皮質骨の骨形成が促進されていることが明らかになった。このことから、骨芽細胞のVDRが骨量および骨代謝の制御、骨芽細胞分化制御に直接関与していることが明らかになった。しかしながらこれらの制御メカニズムの詳細については明らかになっていないため、今後これらの制御メカニズムの解明を行いたいと考えている。またOb-VDRKOマウスの作出に用いたVDRfloxマウスと各標的組織特異的Cre発現マウスとの交配により、各標的組織特異的VDRKOマウスの作出が可能であり、これらのマウスの詳細な解析により各標的組織におけるVDRの高次機能が明らかになると思われる。

研究内容の効率性について

複合体の精製は、大量の培養細胞核抽出液を必要とするため、経費労力ともに膨大である。そのため、研究の効率性は必ずしも高いとは言えないが、新規の因子や分子機構を見出すには必須なアプローチと言える。同様に、骨芽細胞特異的遺伝子欠損マウスの作出は、既に5年を要しており、効率が高いとは言えないが、知見は極めて貴重であると考えられる。

## E. 結 論

- 1) ビタミンD受容体 (VDR) はリガンド依存的に標的遺伝子の転写を活性化することは良く知られているが、転写の抑制分子機構については不明である。そこで、ビタミンD生合成鍵酵素である一位水酸化酵素遺伝子プロモーターを解析したところ、VDRを介したリガンド依存的な転写抑制は、VDIRとHDAC複合体を伴うことを証明した。この結果から、ビタミンDによる標的遺伝子群による発現制御機構の一分子機構が明らかになった。
- 2) 我々はビタミンD受容体 (VDR) 遺伝子を全身に欠損したマウスを作成し (Yoshizawa et al., Nature Genetics, 1997)、家族性くる病II型のモデル動物であることを証明するとともに、ビタミンDの生理作用におけるVDRの必須性を確立した。しかしながら、このマウスでの骨変異が血中PTHの上昇による可能性があったため、今回骨芽細胞特異的VDR遺伝子欠損マウスを作出したところ、予想外なことに骨量の増加を認めた (Yamamoto et al., 未公表データ)。このことから、VDRは骨組織では負に、他の標的臓器では正に機能し、骨代謝を正常に保つと考えられた。

## F. 研究発表

研究発表（本研究に関するもの）

### 【国外】

論文発表

Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.

Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular genetics of vitamin D-dependent hereditary rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002.

Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: The chromatin remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams Syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.

Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nature Cell Biol.*, 5, 224-230, 2003.

Kato, S., Takeyama, K.: Expression cloning of

ligand biosynthetic enzymes. In *Methods in enzymology*, Vol. 364, Nuclear Receptors, ed. by D. W. Russel and D. J. Mangelsdorf, Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp. 361-375, 2003

Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 287-291, 2003.

Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D3: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003.

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1217-1226, 2003.

Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 144,

5138-5144, 2003.

Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, 23, 1598-1608, 2004.

Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90, 173-178, 2004.

Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *British J. Dermatology*, 2004 (in press).

Aihara, K. I., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Yoshida, T., Yamaguchi, H., Hashizume, S., Kato, M., Yoshimura, K., Yamamoto, Y., Kato, S., Matsumoto, T.: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, 279, 35798-35802, 2004.

Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahata, M., Inoue, Y., Kato, S., Miyamoto K.: Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 287, F39-F47, 2004.

Capuano, P., Wagner, C.A., Radanovic, T., Bacic, D., Kato, S., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1  $\alpha$ -OHase deficient mice. *AJP/Cell*, 2004 (in press).

Peters, J. M., Kato, S., Gonzalez, F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcinogenesis*, 41, 77-84, 2004.

学会発表

NUS-IMCB-IMSUT Joint Symposium on Integrative Biotechnology

Function of steroid hormone receptors in gene regulations

S. Kato (2002)

ASBMR 26<sup>th</sup> Annual Meeting

Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts: Generation and characterization of osteoclast-specific androgen Receptor knockout mice. T. Nakamura, T. Watanabe, Y. Nakamichi, T. Fukuda, T. Matsumoto, K. Yoshimura, J. Miyamoto, Y. Yamamoto, H. Shiina, S. Tanaka, M. Sakari, T. Sato, D. Metzger, P. Chambon, S. Kato (2004)

A genetic evidence of direct VDR function in osteoblasts: generation and analysis of osteoblast-specific VDRKO mice. Y. Yamamoto, T. Yoshizawa, T. Fukuda, H. Kawano, T. Nakamura, T. Yamada, G. Karsenty, S. Kato (2004)



Modulation of VDR function by a novel vitamin D analogue, ED-71, is mediated through a novel serum protein. Y. Shirode, K. Takeyama, S. Kato (2004)

#### Keystone Symposia

Co-regulator complexes for nuclear receptors and genetic analyses of AR function. S. Kato (2004)

TRAP240, as a component of the mediator complex, represses transactivation function of androgen receptor. K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubash, Y. Shirode, E. Suzuki, A. Maki, Y. Zhao, K. Yamagata, A. Kouzmenko, T. Tabata, S. Kato (2004)

ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society

Classes of nuclear receptor coregulatory complexes. S. Kato (2004)

#### UT Forum 2004 in Sweden

Transcriptional controls by nuclear receptors. S. Kato (2004)

#### Vitamin D Workshop Working Group

The Williams Syndrome and the Vitamin D Receptor. S. Kato (2004)

#### 【国内】

学会発表

#### 2002年度日本農芸化学会

Vitamin D receptor(VDR)の新規転写修飾因子複合体としてのWSTF complexの機能解析 北

川浩史、柳沢 純、藤木亮次、小川智子、畔野清恵、時田章史、中川武弥、伊藤 敬、松本俊夫、加藤茂明

活性型ビタミンDによる遺伝子発現抑制機構の解析 金 美善、村山明子、武山健一、加藤茂明

#### 2002年度日本分子生物学会

VDR機能と共役する新規染色体構造変換因子複合体WINACの同定・性状解析 北川浩史、藤木亮次、植松良勝、松井大輔、時田章史、伊藤 敬、石見幸男、松本俊夫、柳澤 純、加藤茂明

ビタミンA・Dレセプター (RAR・VDR) の骨組織における協調作用の解析 吉村公宏、栗飯原賢一、山田高嗣、佐藤隆史、Daniel Metzger、Pierre Chambon、加藤茂明

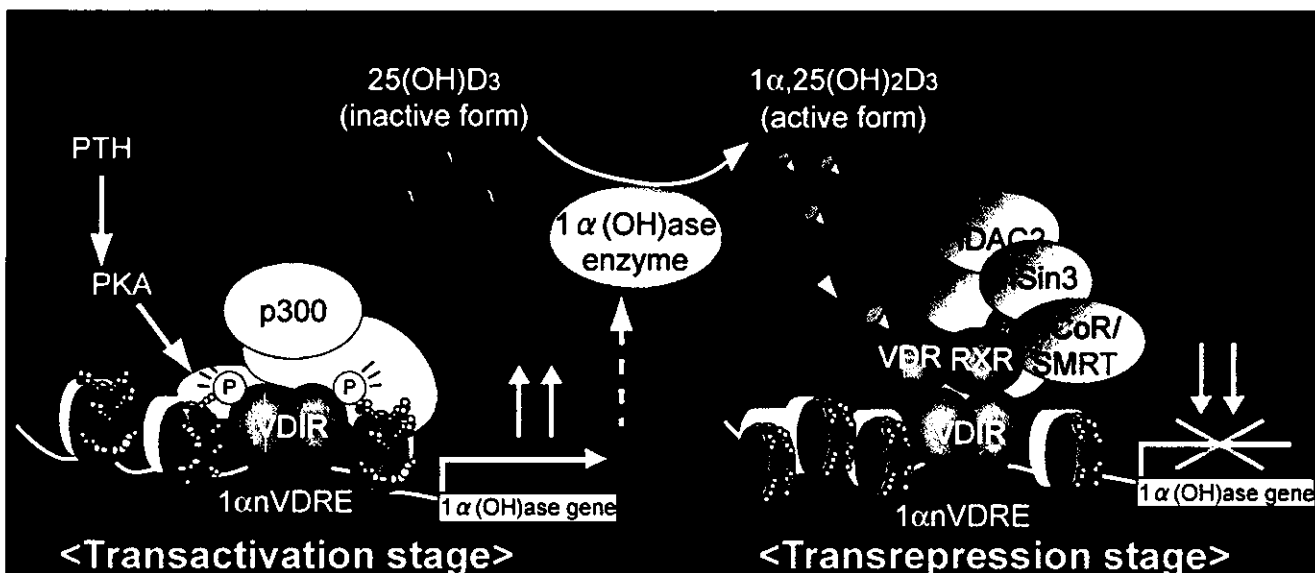
#### 2004年度日本農芸化学会

1alpha-水酸化酵素遺伝子発現調節機構の研究 藤木亮次、金 美善、佐々木康匡、北川浩史、加藤茂明

ビタミンDの骨芽細胞への直接作用の分子機構 山本陽子、吉澤達也、福田 亨、加藤茂明

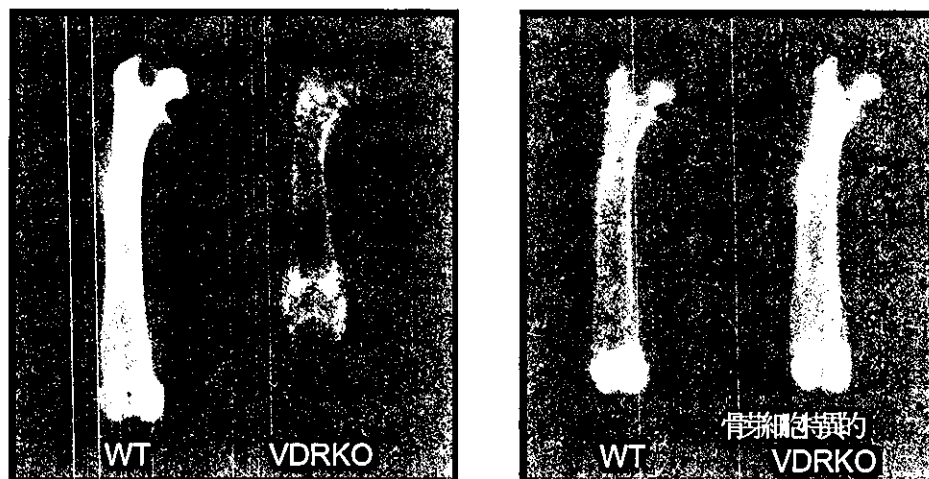
#### G. 知的所有権の出願・取得状況

特になし



### ビタミンD受容体によるリガンド依存的な転写抑制機構

ビタミンD受容体(VDR)は、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を活性化することは良く知られているが、転写の抑制分子機構については、不明である。そこで、ビタミンD生合成鍵酵素である一位水酸化酵素遺伝子プロモーターを解析したところ、VDRを介したリガンド依存的な転写抑制は、VDIRとHDAC複合体を伴うことを証明した。この結果から、ビタミンDによる標的遺伝子群による発現制御機構の一分子機構が明らかになった(Murayama A., Kim M., et al., EMBO J., 2004)。



### ビタミンD受容体の骨組織での機能

我々はビタミンD受容体(VDR)遺伝子を全身に欠損したマウスを作成し(Yoshizawa et al., Nature Genetics, 1997)、家族性くる病II型のモデル動物であることを証明するとともに、ビタミンDの生理作用におけるVDRの必須性を確立した。しかしながら、このマウスでの骨変異が血中PTHの上昇による可能性があったため、今回骨芽細胞特異的VDR遺伝子欠損マウスを作出したところ、予想外なことに骨量の増加を認めた(Yamamoto et al., 未公表データ)。このことから、VDRは骨組織では負に、他の標的臓器では正に機能し、骨代謝を正常に保つと考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

## ビタミンD受容機構異常症の分子生物学的病態解析と治療法の開発

分担研究者 横島 誠 日本大学医学部生化学 教授

### A. 研究目的

ビタミンD受容体（VDR）の機能障害は、ビタミンD受容機構異常症の原因として重要である。本研究は、ビタミンD受容機構異常症の分子生物学的病態解明と病態メカニズムに基づいた治療法の開発を目的とする。我々の研究によって、活性型ビタミンD3の受容体として知られていたVDRが、胆汁酸であるリトコール酸にも反応し胆汁酸代謝酵素の発現を誘導することが明らかになった。胆汁酸代謝調節因子としてのVDRの活性化機構を明らかにすることは、VDRの生理機能及び関連する疾患の病態メカニズムを解明する上で重要である。平成14年度ではVDRに対する活性型型ビタミンD3及びリトコール酸のVDRに対する結合様式の相違を解析し、平成15年度ではリトコール酸の誘導体を用いてリトコール酸とVDRの構造活性相関をさらに検討し、平成16年度では胆汁酸誘導体によるVDR作用薬の開発を目指して検討を行った。

### B. 研究方法

1) VDRに対する活性型ビタミンD3とリトコール酸との構造活性相関を明らかにするために、VDRと最も類似のアミノ酸構造を持つ核内レセプターであるプレグナンXレセプター（PXR）とVDRとのアミノ酸配列及び立体構造を比較した。活性型ビタミンD3の結合に重要

なVDRのリガンド結合ポケットのアミノ酸を、相当するPXRのものに変化させたヒトVDR変異体及び遺伝性くる病患者で報告されているリガンド結合ポケットのVDR変異体を作成した。全長VDR、GAL4キメラVDR、VD16キメラVDRの変異体をそれぞれ作成し、全長VDRはCYP3A4のVDR結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと共に、GAL4キメラVDRはGAL4結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと共に、VD16キメラVDRはGAL4キメラコファクター及びGAL4反応性ルシフェラーゼレポーターと共に、HEK293細胞へトランスフェクションし、活性型ビタミンD3及びリトコール酸に対する反応性を比較・評価した。

2) 得られた結果及び報告されているVDRの結晶構造解析のデータをもとに、VDRとリトコール酸との結合様式をコンピューターを用いてモデリングした。

3) VDR-リトコール酸ドッキングモデルに基づき、より活性の強いリトコール酸誘導体を探索した。リトコール酸誘導体のVDR及びそのリガンド結合ポケット変異体に対する活性を評価した。さらにリコトール酸誘導体の細胞及びマウスへの作用を検討した。

（倫理面への配慮）

組換えDNA実験に関して、平成14年度及び15年度は「組換えDNA実験指針」に基づいて

大阪大学組換えDNA実験安全委員会による承認を得て、平成16年度は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて日本大学組換えDNA実験安全委員会の承認を得た。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」及び「実験動物の飼養及び保護等に関する基準」を遵守した。

### C. 結果および考察

1) アミノ酸配列のアラインメント及び立体C $\alpha$ 構造の比較において、VDRとPXRは極めて類似の構造であった。しかし、リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の側鎖の相違から、リガンド結合ポケットの立体構造に大きな相違があった。リガンド結合ポケットを構成するアミノ酸の変異体の検討の結果、VDR-S278Vは活性型ビタミンD<sub>3</sub>に反応するがリトコール酸には反応せず、VDR-S237Mはリトコール酸に反応するが活性型ビタミンD<sub>3</sub>には反応しないことが明らかになった。

2) 各種VDR変異体に対する活性型ビタミンD<sub>3</sub>とリトコール酸との作用の相違を詳細に検討した。リガンド結合ポケットを構成するヘリックス3に位置するS237は活性型ビタミンD<sub>3</sub>の結合に重要であるがリトコール酸の結合にはあまり関わっていないことなど、活性型ビタミンD<sub>3</sub>とリトコール酸とはVDRに対する結合様式が異なることが明らかになった。また、リトコール酸は活性型ビタミンD<sub>3</sub>と同様に側鎖がヘリックス12の方向でドッキングするが、リコトール酸の代謝産物でVDRリガンドでもある3-ケトコラン酸は側鎖が $\beta$ -シート側とリトコール酸とは反対方向に入り込んでいることが明らかになった。

3) リトコール酸誘導体のVDRに対する効果を検討した。リトコール酸の3位の修飾が活性に大きく影響を与えた。リトコール酸フォーマット、リトコール酸アセテートなどの3位修飾体はVDRを強く活性化した。リトコール酸イソブチレートやリトコール酸ヘキサクシネートなど修飾基の分子量がさらに大きいものでは活性はむしろ減少した。リトコール酸アセテートは、少なくともリトコール酸よりも30倍以上強力なVDRアゴニストであった。リコトール酸アセテートは、他の胆汁酸受容体Farnesoid X receptorやPXRをほとんど活性化せず、VDR選択的な胆汁酸誘導体であった。

4) リトコール酸アセテートは、腸管粘膜細胞や単球におけるVDR標的遺伝子をリトコール酸よりも効果的に誘導した。リトコール酸は骨髄性白血病細胞株THP-1細胞を分化させなかったが、リトコール酸アセテートは活性型ビタミンD<sub>3</sub>と同様にTHP-1細胞の単球系への分化を誘導した。

5) 考察：カルシウム代謝調節性のビタミンである活性型ビタミンD<sub>3</sub>と腸内細菌が産生する二次胆汁酸であるリトコール酸とでは、VDRに対する結合様式が異なることが明らかになった。VDR-RXRヘテロ二量体としての活性化機構、リクルートされるコファクターの選択性、genomic action とnon-genomic actionにおける作用の相違などを今後解析する必要があるが、本研究で得られた結果は、リトコール酸が作用したVDRが選択的な生理作用を及ぼしている可能性を示唆している。リトコール酸やその誘導体を利用することによって、VDRの新たな機能及び疾患との関連性の解析が可能となる。

リトコール酸とVDRのドッキングモデルは