

研究題目

VIKING 法を用いた皮膚細胞でのビタミン D 受容体転写制御メカニズムの解析

研究組織

研究代表者：横山 敦（東北大学大学院医学系研究科）

共同研究者：福本 誠二（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：沢津橋 俊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：野呂 英理香（東北大学大学院医学系研究科）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ビタミン D は表皮細胞の分化促進作用と増殖作用を担う脂溶性ビタミンであり、その作用は核内受容体であるビタミン D 受容体 (VDR) を介して発揮される。古くからビタミン D は炎症性皮膚疾患である乾癬の治療薬として広く用いられているが、ビタミン D の皮膚細胞への作用メカニズムには未だ不明な点が多く、その他の皮膚疾患への応用の道は開けていないのが現状である。

申請者のグループは最近ホルマリン固定した培養細胞から内在性の転写因子複合体を精製・同定する RIME (Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous Proteins) 法を導入し、いくつかの転写因子において良好な結果を得ている。この RIME 法では、細胞をホルマリン固定することで、相互作用の弱い因子や一過的に相互作用する因子群を感度よく同定することが可能であり、これまでに同定することができなかった新規の相互作用因子の同定が期待できる。申請者は既にこの RIME 法を用いて皮膚細胞における VDR 結合因子群を網羅的に同定し、候補因子群を得ることに成功している。しかしながら、これら候補因子群から創薬標的となるような VDR の機能に重要な因子を絞り込むことが課題として残っていた。

そこで本研究では、徳島大学藤井節郎記念医科学センタ分子内分泌学研究分野の沢津橋らが開発した新規ゲノム編集技術である VIKING 法 (Sawatsubashi et al., Sci Rep, 2018) を

導入して、候補因子群をそれぞれノックアウトした培養細胞株を迅速かつ高効率に樹立し VDR 転写活性への寄与評価を行う。本研究課題ではこれにより、ビタミン D の皮膚細胞への生理作用を説明する因子の絞り込みを行い皮膚疾患の新たな創薬・治療法開発のための分子基盤とすることを目的としている。さらに将来的には、この絞り込まれた因子についてゲノム編集技術によりノックアウトマウスを作出し、乾癬モデルを用いてビタミン D への応答能を解析することで、皮膚疾患の治療法・創薬標的の提案へとつなげていきたい。

[1-2] 研究の方法・経過

ヒト表皮角化細胞由来 HaCaT 細胞を用いて、内在性の VDR と相互作用する因子群を RIME 法により網羅的に同定する。すでに予備実験には成功しているため、精製条件等は決定済みである。精製サンプルの質量分析による測定は徳島大学にて行う。

得られた候補因子群の中から特に核内に局在し、クロマチン構造調節に関与する因子群を抽出する。これら因子について、沢津橋の協力の下 VIKING 法によるノックダウンのターゲットベクターをデザイン・構築し HaCaT 細胞に導入する。得られた細胞株は、実際に目的の遺伝子が破壊されていることを PCR 法にて確認し、VDR の転写活性を評価する。評価に用いる標的遺伝子としては CYP24A1、CAMP を用いることを計画している。このアッセイから、特に VDR の転写活性に重要な因子を 1 から 2 因子に絞

り込む。これら因子については、特異的な抗体を用いた相互作用の検証や、実際のマウス皮膚組織を用いた免疫染色を行いVDRとの相互作用を確認する。以上の評価から、得られた因子を皮膚細胞におけるVDR転写活性の鍵因子として同定する。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

複数種のHaCaT細胞（野生型、VDRノックアウト、Hairlessノックアウト）を用いた抗VDR抗体を用いたRIMEをそれぞれ3回以上行うことにより、VDRに特異的な結合因子の統計値による絞り込みを行った。ネガティブコントロールにはIgG抗体を用いた。その結果、HaCaT細胞におけるVDR結合因子であり、かつHairless依存的にVDRに結合している因子の候補として転写因子JUNBの同定に至った。実際にVDRとJUNBとの相互作用は免疫沈降により確認できている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後の展開としては、VDRとJUNBが標的遺伝子プロモーター上において共局在できているのかをChIPアッセイにて確認を行う。さらに、JUNBをVIKING法によりノックアウトしたHaCaT細胞を樹立し、VDR標的遺伝子発現レベルへの影響を検討することで、JUNBとVDRの機能的相互作用についての解析を行っていく予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

1. 沢津橋俊, 横山敦, 上甲裕大, 松本俊夫, 福本誠二、ゲノム編集を利用したくる病型点変異導入ビタミンD受容体の機能解析（ポスター）
第92回日本生化学会大会、横浜、9月19日、2019
2. 沢津橋俊, 横山敦, 上甲裕大, 松本俊夫, 福本誠二、ゲノム編集を利用したくる病型点変異導入ビタミンD受容体の機能解析（口頭）
第92回日本生化学会大会、9月19日、2019

[3-3]成果資料等

【4】今後の課題等

今後の課題としては、細胞内におけるVDRとJUNBの機能解析を終えたあとの*in vivo*解析の準備である。計画としてはJUNBについてゲノム編集により遺伝子欠損マウスを作成する。作成されたマウスに対し、イミキモドを塗布することにより人為的に乾癬を発症させることができる乾癬モデル系を用いて、乾癬に対するビタミンDの効果と遺伝子欠損の影響を検証する。具体的には病理組織学的検査所見、皮膚炎スコアにより評価を行うことを計画している。これらの実験からビタミンDの皮膚細胞への作用におけるJUNBの役割について詳細な解析を行うことが重要であると考えられる。