

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06644

研究課題名(和文) 心血管疾患予防・治療への応用を目指した新たなビタミンK機能の解明

研究課題名(英文) Research on new vitamin K functions aimed at application to prevention and treatment of cardiovascular diseases

研究代表者

中川 公恵 (Nakagawa, Kimie)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：90309435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンKは、血液凝固や骨形成に働く脂溶性ビタミンである。我々が日常摂取しているビタミンKは、主に緑色野菜に含まれるビタミンK1や納豆などの発酵食品に含まれるメナキノン類であり、これらは体内で各組織に発現するビタミンK変換酵素(UBIAD1)によりビタミンK2(menaquinone-4: MK-4)に変換される。本研究では、UBIAD1を心血管で特異的に欠損させたマウスを作製し、心血管におけるビタミンKの機能を解析した。その結果、UBIAD1の欠損(MK-4の欠乏)により心不全による致死が生じること、心臓や血管において、UBIAD1及びMK-4が構造機能維持に必須であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、わが国の主要な死因である心疾患に対し、ビタミンKという栄養素から予防・治療戦略を提供するという新たな知見を得ることを目的に、ビタミンKの心血管における機能を解析したものである。その結果、ビタミンK変換酵素UBIAD1とその生成物であるビタミンK2(MK-4)が、心血管において細胞・組織レベルで重要であることが明らかとなった。本研究により得られた成果は、栄養素として摂取するビタミンKが、生体内変換を介して心血管機能に重要な役割を担うことを実証したものである。これは、ビタミンKの栄養学的な新しい知見であり、今後ビタミンKは、心血管疾患の予防や治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Vitamin K is a fat-soluble vitamin that works on blood coagulation and bone formation. The vitamin K we take on a daily basis is mainly vitamin K1 contained in green vegetables and menaquinones contained in fermented foods such as natto. Vitamin K1 and menaquinones are converted to vitamin K2 (menaquinone-4: MK-4) by the vitamin K converting enzyme (UBIAD1) expressed in each tissue in the body. In this study, we generated mice in which UBIAD1 was specifically deficient in cardiovascular disease and analyzed the function of vitamin K in cardiovascular disease. As a result, it was clarified that UBIAD1 deficiency (MK-4 deficiency) causes lethality due to heart failure, and that UBIAD1 and MK-4 are essential for maintaining structural function in the heart and blood vessels.

研究分野：衛生薬学

キーワード：ビタミンK 生体内変換 MK-4 UBIAD1 心血管 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は脂溶性ビタミンであり、天然に存在するビタミン K は、植物に含まれるビタミン K1 (フィロキノ:PK) と細菌が合成するメナキノ類 (MK-n) がある。両者は、2-メチル-1,4-ナフトキノ環を共通構造とし、3 位炭素に PK ではフィチル側鎖が、MK-n ではイソプレニル単位の繰り返し構造 (n=1~14) からなるイソプレニル側鎖が結合した構造を持つ。ビタミン K は、血液凝固因子や骨基質タンパク質を活性化する γ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子として必須の役割を担っており、血液凝固や骨形成に重要な役割を担っている。ヒトのビタミン K の摂取源は、主に緑黄色野菜に由来する PK や納豆などの発酵食品に含まれる MK-7 であり、動物性食品に含まれる MK-4 の摂取量は極めて微量である。また、ラットやマウスのビタミン K 供給源は、植物由来の PK の他、飼料に添加されているメナジオン (MD) である。ヒトやマウス・ラットは MK-4 をほとんど摂取していないにも拘らず、組織中には MK-4 が最も高濃度に存在する。摂取していない MK-4 が組織内になぜ多く存在するのか、これまで全く解明されていなかったが、申請者らの研究により、経口摂取した PK や MK-n が、生体内で MK-4 へ変換されていることが明らかとなった (Nakagawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2008)。さらに、この変換を担う鍵酵素が UbiA prenyltransferase containing 1 (UBIAD1) であることを世界に先駆けて初めて同定することに成功した (Nakagawa *et al.*, *Nature*, 2010)。

MK-4 合成酵素である UBIAD1 は、338 個のアミノ酸からなる 36.8kDa の小胞体およびゴルジ体膜上に局在する膜タンパク質で、この酵素をコードする遺伝子は、ヒト 1 番染色体 1p36.22 に存在する。これまでに、UBIAD1 はヒトのシュナイダー角膜ジストロフィー (Schnyder crystalline corneal dystrophy : SCD) の原因遺伝子であること、その点変異により角膜実質にコレステロールが沈着して白く濁り、視力障害が発生することが報告されている。ヒトでは UBIAD1 遺伝子の点変異による眼の病態以外、他の臓器における機能異常に関する報告はない。しかし、UBIAD1 は種を超えて高度に保存されている遺伝子であり、菌類では、MK-n が膜における電子キャリアとして機能するため、UBIAD1 ホモログである MenA が欠如すると菌は生育不能となる。また、ショウジョウバエでは、UBIAD1 のホモログである Heix が変異することで、パーキンソン病関連遺伝子である Pink1 を変異させた場合と全く同様にミトコンドリアの電子伝達が破綻する (Vos M. *et al.*, *Science* 2012)。また、この Heix 変異体と Pink1 変異体で認められるミトコンドリア破綻は、MK-4 を供給することで完全に抑制されることも報告されている。これは、MK-4 がミトコンドリアにおける電子伝達系の維持に重要な役割を担っていることを示すものである。Heix (UBIAD1 ホモログ) と相互作用する Pink1 は、心血管機能の維持にも重要な因子であり、Pink1 欠損マウスでは心不全が起こる (Billa F. *et al.*, *PNAS* 2010)。また、Pink1 や Pink1 と相互作用するパーキンソン病原因遺伝子 Parkin は、共にオートファジー制御に関与する (Mouton-Liger F. *et al.*, *Front. Mol. Neurosci.* 2017)。これらのことから、UBIAD1 もオートファジー制御に関与している可能性があり、UBIAD1 及び MK-4 が心血管機能維持に関与すると予想される。従来より、ビタミン K が、血管石灰化の抑制に働く Matrix Gla Protein (MGP) を活性化することにより、血管石灰化を抑制する働きを担っていること、疫学研究において、ビタミン K 摂取量の多いヒトの方では動脈硬化による死亡率が低いことが報告されており (Geleijnse J. *J. Nutr.* 2004) 臨床的にも MK-4 の動脈硬化・心臓疾患予防効果が期待されている。しかし、心血管におけるビタミン K の役割は明らかでなく、UBIAD1 の組織特異的な機能についても解明されていない。

2. 研究の目的

ビタミン K の MK-4 への変換を担う酵素である UBIAD1 は、個体発生に必須因子であり、ビタミン K は、血液凝固因子や骨形成因子の活性化を担うだけでなく、神経細胞の生存維持や分化、血管石灰化抑制、抗がん作用など幅広い生理活性を持つ。UBIAD1 及び MK-4 は全身の全ての組織に存在するが、各組織で MK-4 が生合成される意義は未だ十分に解明されていない。MK-4 は他のビタミン K 同族体にはない生理活性 (核内受容体 SXR のリガンドとしての作用、PKA 活性化、NF- κ B の活性阻害など) を有することから、生体内で変換生成されることは、必須の生命現象であるといえる。ゼブラフィッシュの UBIAD1 変異体では、心肥大及び血管形成不全により致死に至ることが明らかにされており、ショウジョウバエでは UBIAD1 の変異によりミトコンドリア電子伝達系が破綻する。これらの異常は MK-4 投与で回復することから、UBIAD1 及び MK-4 にはまだ明らかになっていない重要な生理作用があると推測される。

MK-4 が血管石灰化抑制に働くこと、ゼブラフィッシュ UBIAD1 変異体が心血管形成異常となることから、哺乳動物において UBIAD1 及び MK-4 が、心血管系の機能維持に必須の役割を持つと予想した。そこで本研究では、心血管平滑筋特異的 UBIAD1 欠損マウスを作出し、UBIAD1 及び MK-4 の心血管系における機能解明を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 心血管系特異的 UBIAD1-コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作出

CKO マウスは、Cre/loxP システムにより、平滑筋特異的に発現する SM22 α 依存的 Cre リコンビナーゼ発現マウス (SM22 α -cre マウス) を Ubiad1 の exon1 の上流と下流に loxP 配列を挿入した Ubiad1(flox/flox) マウスと交配することにより作出した。作出した CKO マウスは、出生後より体重・体長を計測すると共に、生存期間を調査した。

(2) 心血管機能の解析

心血管機能については、離乳後より週に 1 回、Softron ラット・マウス非観血血圧測定装置を用いて血圧・脈圧・心拍数を計測した。また、造影剤投与下で、実験動物用 X 線 CT Latheta LCT-200 により、心臓の画像解析を行なった。

(3) 心血管の組織学的解析

心臓及び血管の組織標本を作製し、HE 染色により組織像を観察した。血管については、エラスチン染色及びマッソントリクローム染色を行った。また、各組織特異的な構成タンパク質の発現については、特異抗体を用いた免疫組織染色により評価した。

(4) ビタミン K 濃度及び MK-4 生合成能の評価

各組織よりビタミン K 画分を抽出し、LC-APCI-MS/MS によりビタミン K 濃度を測定した。また、MK-4 生合成能については、重水素標識ビタミン K1 (PK-d7) あるいは重水素標識メナジオン (MD-d8) 経口投与後における組織中重水素標識 MK-4 (MK-4-d7) 濃度を、LC-APCI-MS/MS により測定した。

(5) 心臓における遺伝子発現の解析

生後 1~6 週齢までの CKO マウスについて、週齢ごとに心臓及び血管を摘出し、各組織における UBIAD1 mRNA 発現、心臓及び血管における種々の遺伝子発現変化について、リアルタイム RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

SM22 プロモーター依存的に UBIAD1 を欠損させた CKO マウスは、問題なく出生したが雄性 CKO マウスでは 5~7 週齢、雌性 CKO マウスでは 6~8 週齢の間ですべての個体が死亡した。離乳後以降の体重は、死亡する 1 週間前までは Control (Ubiad1^{flox/flox}) マウスとの間に差異は見られなかったが、死亡直前の数日の間には有意な差が認められた。摂餌量を調査した結果、死亡直前の体重減少は、摂餌量の低下によることが示唆された。血圧測定においては、雌雄ともに 5~8 週齢の間で、Control マウスに比べて有意な血圧の低下が認められた。そこで、6 週齢の雌雄 CKO マウスについて、心臓の CT 解析を行なったところ、収縮期・拡張期ともに左心室体積が有意に拡張しており、心拡大を起こしていることがわかった。

6 週齢の雄 CKO マウスについて、心臓の組織標本を作製し、組織像の解析を行なった結果、心筋線維の断裂像が認められ、心筋細胞の伸展異常並びに細胞内空胞形成が観察された。心臓の MK-4 濃度及び PK-d7 や MD-d8 投与後の MK-4-d7 生成量は、Control マウスに比べて有意に著しく低下しており、UBIAD1 欠損による MK-4 欠乏と MK-4 生合成能の欠失が認められた。他の臓器では MK-4 欠乏や MK-4 生合成能に変化は認められないことから、心臓における UBIAD1 欠損により、心臓組織の著しい異常が生じていることがわかった。また、血管に関しても同様に血管平滑筋特異的に UBIAD1 欠損が誘導されており、血管においても MK-4 欠乏と MK-4 生合成能は有意に低下していた。血管の組織標本の解析では、HE 染色、エラスチン染色及びマッソントリクローム染色を行なった結果、CKO マウスの大動脈では、血管平滑筋細胞は存在しているが、エラスチン線維の特徴的な波打った構造が伸展しており、コラーゲン線維の減少が観察された。以上のことから、心筋細胞及び血管平滑筋細胞における UBIAD1 の欠損は、心臓や血管の MK-4 欠乏を起こし、さらに細胞及び組織構造の異常を起こすことが明らかとなった。

そこで、心臓や血管、体液量の恒常性維持に重要な役割を担うナトリウム利尿ペプチドの発現について、1~6 週齢の雄性 CKO マウスの心臓を用いて mRNA 発現量を解析した。主に心房で合成される ANP (心房性ナトリウム利尿ペプチド) と、主に心室で合成される BNP (脳性ナトリウム利尿ペプチド) の発現を調べた結果、生後 3 週齢以降の CKO マウスでは、BNP 及び ANP の mRNA 発現量が、Control マウスに比べて有意に増加しており、6 週齢ではその発現は著しく増加していた。ANP は主として心房で、BNP は主として心室で産生され、心不全などの心臓に何らかの負荷がかかった際に、ANP や BNP の発現が上昇することから、CKO マウスでは、UBIAD1 の欠損によって心不全を起こし、死亡していると推察された。血管については、各種コラーゲンの mRNA 発現量の低下が認められ、UBIAD1 欠損により血管平滑筋細胞においてコラーゲン合成能の低下が生じていると推察された。

以上の結果より、心筋細胞及び血管平滑筋細胞における UBIAD1 の欠損とそれに伴う MK-4 の欠乏は、これら細胞の機能異常を引き起こし、組織構造と機能の低下を起こすことが明らかとなった。このことから、心血管において UBIAD1 及び MK-4 は、組織機能維持に必須の役割を担っており、ビタミン K は心血管機能を正常に保つ上で必要な栄養素であると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakagawa K, Fujiwara K, Nishimura A, Murakami C, Kawamoto K, Ichinose C, Kunitou Y, Suhara Y, Okano T, Hasegawa H.	4. 巻 20(8)
2. 論文標題 UBIAD1 Plays an Essential Role in the Survival of Pancreatic Acinar Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E1971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20081971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa K	4. 巻 2021
2. 論文標題 Elucidation of new vitamin K function aiming at application to cardiovascular disease prevention and treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 37-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21820/23987073.2021.5.37	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 中川公恵	4. 巻 93(3)
2. 論文標題 ビタミン Kが生体内でメナキノン-4 に変換される機構とその生理的意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 93-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20632/vso.93.3_93	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中川公恵	4. 巻 141(5)
2. 論文標題 ビタミンKの生体内変換機構の消失により起こる疾患とその予防	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 669-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00243-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 定元拓也、御田ゆりえ、岡田亮輔、園田絵観子、中川公恵、長谷川潤
2. 発表標題 心血管特異的ビタミンK変換酵素（UBIAD1）欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川公恵
2. 発表標題 ビタミンKの摂取とその効果
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川公恵
2. 発表標題 ビタミンK変換酵素が担う生体機能
3. 学会等名 京都健康長寿医療センター研究所 第9回 システム加齢医学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 定元拓也、御田ゆりえ、岡田亮輔、園田絵観子、中川公恵、長谷川潤
2. 発表標題 心血管特異的ビタミンK変換酵素（UBIAD1）欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川公恵
2. 発表標題 ビタミンKの生体内変換から見える新たなビタミンKの役割
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川公恵、平島俊亮、森くるみ、定元拓也、御田ゆりえ、長谷川潤
2. 発表標題 心血管特異的ビタミンK変換酵素（UBIAD1）欠損マウスにおける心臓機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関