

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09078

研究課題名(和文) 25(OH)D3は神経系を介して平衡感覚機能を向上させるか

研究課題名(英文) Does 25(OH)D3 improve equilibrium sensory function through the nervous system.

研究代表者

榎木 祐一郎 (Enoki, Yuichiro)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30734199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンD3あるいは25(OH)D3投与によりビタミンD欠乏マウスの体重は経時的に上昇した。25(OH)D3およびビタミンD3共に、用量依存的にRotarod試験においてビタミンD欠乏マウスのretention timeを有意に延長させた。25(OH)D3投与はビタミンD3投与よりもretention timeを向上させた。Beam walking試験、握力試験ならびに大腿四頭筋の体積に有意な差は認められなかった。結論として、ビタミンD欠乏マウスに25(OH)D3およびビタミンD3を経口投与すると、運動学習機能を向上させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンD投与によって記憶を改善する分子メカニズムとして脳の運動野においてthe mechanistic target of rapamycin pathway (mTOR pathway) が活性化されることが知られている。運動によりmTOR pathwayが活性化するメカニズムとしてトレーニングを行ったマウスの運動野においてL5PRNの経路を辿ることでmTORを介した興奮性シナプスの伝導を見出し、これが運動による興奮伝達経路に欠かせないとしている。今後は25(OH)D3およびビタミンD3の経口投与により、脳の運動野におけるmTOR経路の活性化が認められるかどうかを検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of vitamin D3 or 25(OH)D3 increased the weight of vitamin D deficient mice in a time-dependent manner and extended the retention time of vitamin D deficient mice in a dose-dependent manner using Rotarod test. Moreover, the action of 25(OH)D3 was stronger than that of vitamin D concerning about the retention time. On the other hand, there were no significant difference about beam walking test, grip test and the volume of quadriceps. In conclusion, we demonstrated that oral administration of vitamin D3 or 25(OH)D3 improved motor learning function.

研究分野：顎顔面外科学分野

キーワード：ビタミンD3 25(OH)D3 運動学習機能

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において高齢者の寝たきりは社会問題であり、転倒を予防することは、寝たきりを防ぐための重要な戦略である。高齢者の転倒は、身体運動機能の低下・視覚機能の低下・認知機能の障害などの要因によって生じる。身体運動機能にはビタミン D が関与していると考えられてきた(Girgis CM, *Endocr Rev* 2013)。1992 年、約 3300 人の高齢者を対象にしたプラセボ対照二重盲検試験で、活性型ビタミン D3 製剤とカルシウム (Ca) 製剤を併用した人では、プラセボ服用者より骨密度の増加はわずかであるにもかかわらず骨折が減っていることが示された(Chapuy MC, *N Engl J Med* 1992)。この論文を皮切りに、ビタミン D と転倒による骨折の予防に関して多くの知見が得られてきたが、ビタミン D には転倒・骨折の予防効果はないとする報告が相次ぎ (Jackson RD, *N Engl J Med* 2006; Uusi-Rasi K, *JAMA Intern Med* 2015; Khaw KT, *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017)、最新の U.S. Preventive Services Task Force の recommendation では、ビタミン D が転倒予防に有効であるエビデンスはないとしている。ビタミン D は動物の体内でビタミン D3 として合成される。皮膚において B 型紫外線(UVB)の作用で 7-デヒドロコレステロールからプレビタミン D3 合成を介して熱でビタミン D3 に異性化される。その後ビタミン D3 は肝臓で CYP (Cytochrome P450) 2R1 と CYP27A1 によって 25(OH)D3 に変換された後、腎臓で CYP27B1 によって 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 [1 $\alpha$ ,25(OH)2D3]、いわゆる活性型ビタミン D3 に変換される。1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 はさまざまな細胞で発現するビタミン D 受容体 (VDR) に結合することによりカルシウム・骨代謝、細胞の増殖・分化、免疫応答制御、抗腫瘍効果など多彩な生理作用を示すことが知られており[Marino R, *Nutrients* 2019]、ビタミン D3 は筋力や筋線維の維持にも重要であると考えられている[Girgis CM, *Endocr Rev* 2013]。また、ビタミン D3 は運動機能の改善にも関係することが報告されている[Pirota S, *Osteoporos Int* 2015]。VDR (Vitamin D Receptor) ノックアウトマウスを用いた実験では、コントロール群 (WT マウス群) では見られた加速する回転棒上での歩行時間の延長が VDR ノックアウトマウスでは認められなかった[Sakai S, *J Bone Miner Res* 2015]。しかし、WT のマウスに Rotarod への順化と同時に 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 を経口投与すると、投与しないマウスに比べて加速する回転棒上での歩行時間の延長が見られている[Sakai S, *J Bone Miner Res* 2015]。VDR mRNA は海馬に多く発現する[Carlberg C, *Anticancer Res* 2006]ことから、この加速する回転棒上での歩行時間の延長は運動学習機能の向上の表現型ではないかとしている。Md. Mamun Al-Amin らは、ビタミン D3 欠乏食で飼育されたマウスを用いた実験で海馬に依存する学習および記憶の障害が生じることを指摘している[Al-Amin MM, *Brain Structure and Function* 2019]。近年、25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3]が注目を集めている。25(OH)D3 は、前述のとおりビタミン D3 が体内に取り込まれ肝臓で代謝されるときに産生される中間代謝産物である。25(OH)D3 投与はビタミン D3 を投与するよりも早く強力に血中 25(OH)D3 濃度を上昇させるのみならず、血圧調節や免疫機能に対しても有益な作用をもたらす(Cashman KD, *Am J Clin Nutr* 2012; Bischoff-Ferrari HA, *J Bone Miner Res* 2012)。血中 25(OH)D3 濃度を測定することで動物のビタミン D3 充足状態を知ることができる。また 25(OH)D3 を経口摂取するとビタミン D3 よりも強力に 25(OH)D3 の血中濃度を上昇させることが知られている[Stamp TC, *Lancet* 1977][Cashman KD, *Am J Clin Nutr* 2012]。25(OH)D3 とビタミン D3 をそれぞれ 10 人の女性 (平均年齢は 25(OH)D3 投与群で 59.5 歳とビタミン D3 投与群で 63.5 歳) に 4 カ月経口投与した研究では、4 カ月後に 25(OH)D3 経口投与群では血中 25(OH)D3 濃度が 12.3ng/mL から 69.5ng/mL へ上昇し、ビタミン D3 経口投与群では 14.2ng/mL から 31.0ng/mL へ上昇した。この時、25(OH)D3 経口投与群ではビタミン D3 経口投与群と比べて膝の伸展力が 17%高いという結果が示されている一方で、膝の屈伸力、up-and-go test (椅子に座り 3m 先の目標物を回って再び椅子に座るまでの時間)、Repeated sit-to-stand test (5 回座って立つことを繰り返す時間) には統計学的有意差が見いだせなかったとしている[Bischoff-Ferrari HA, *J Bone Miner Res* 2012]。また、ヒトにおいて 25(OH)D3 は筋力の向上を促進することが報告された (Meyer O, *Osteoporos Int* 2015)。さらに、25(OH)D3 が骨代謝に悪影響を与えずに安全に血中 25(OH)D3 濃度を上昇させることも示されている(Minisola S, *Osteoporos Int* 2017)。申請者はこの 25(OH)D3 の投与とビタミン D3 の投与では薬理作用が異なるという特徴に着目し、「25(OH)D3 投与が転倒予防に有効ではないか」と考えた。「25(OH)D3 が平衡感覚機能を向上させる」という作業仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

申請者はビタミン D 欠乏状態のマウスへ 25(OH)D3 およびビタミン D3 を経口投与することによって筋力あるいは筋量の向上が生じる、もしくは運動学習機能が向上することで加速する回転棒上での歩行時間の延長が生じるのではないかと想定した。ビタミン D 欠乏マウスを用いて、運動協調機能、運動学習機能、筋力と筋量にビタミン D 誘導体の経口投与がどのような影響を与えるかを検討するために本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

#### 1. 実験動物

10 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールズリバー社、東京）を購入し、環境的に制御された埼玉医科大学中央研究施設実験動物部門の研究施設内で飼育した。ビタミン D 欠乏食給餌群は研究施設内へ動物搬入直後よりビタミン D 欠乏食の給餌を開始した。いずれの群も 5 匹を 1 ケージに飼育し、餌と水は自由に摂餌可能とした。室温は 20 度～26 度の範囲内、湿度は 35%～75%の範囲内、12 時間電灯点灯、12 時間消灯の環境に維持された。実験は埼玉医科大学動物実験委員会による動物実験規定に従った(No.2482, 2751, 2989)。各実験群において食餌、投与物質、投与成分量、動物数の割り付けは表のように行った。

食餌	投与物質	1日投与量	1日投与成分量	動物数
ビタミンD欠乏食	MCT oil	200 $\mu$ L	0 nmol	10
	25(OH)D <sub>3</sub>		0.65 nmol	10
			6.5 nmol	10
			65 nmol	10
ビタミンD <sub>3</sub>		6.5 nmol	10	
			65 nmol	10
食餌	投与物質	1日投与量	1日投与成分量	動物数
ビタミンD含有通常食	MCT oil	200 $\mu$ L	0 nmol	5
	25(OH)D <sub>3</sub>		6.5 nmol	5

## 2. 食餌

通常食給餌群には固形のペレットタイプの EF 食®(オリエンタル酵母工業株式会社、東京)を給餌した。ビタミン D 欠乏食給餌群には EF 食をベースにビタミン D を取り除いたビタミン D 欠乏食 (EF 再現食(ビタミン D 欠乏食), オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) を食餌とし、この食餌で 4 週間飼育したマウスをビタミン D 欠乏マウスとした。給餌は全て実験者による管理とした。餌は動物実験施設へ搬入する前に 20 kGy の 線照射を行い、放射線滅菌を行った。

## 3. 薬剤と投与方法

25(OH)D<sub>3</sub> (calcifediol, DSM ニュートリションジャパン社, 東京) とビタミン D<sub>3</sub> (cholecalciferol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, 東京) を実験薬剤として用いた。ビタミン D<sub>3</sub> 並びに 25(OH)D<sub>3</sub> は 100% エタノールを溶媒として試験溶液を作成し、Nano Drop (DeNobix DS-11, DeNovix 社, 米国) にて溶解曲線を作成し、吸光度 228 nm に吸収極小を、265 nm に吸収極大を持つビタミン D 誘導体に特徴的な紫外線吸収があることを確認した。それぞれのエタノール原液の濃度を計算し、25(OH)D<sub>3</sub> は 0.65 nmol/day, 6.5 nmol/day, 65 nmol/day となるように MCT(Medium Chain Trilcerides) oil(日清 MCT oil HC, 日清オイログループ株式会社, 東京)を溶媒として希釈することで試薬を調製した。これは、マウスが 1 日当たり約 4g の餌を食べること、マウスの通常食である EF 食に含有される 4g 中のビタミン D<sub>3</sub> が約 5.5IU(0.34nmol)であることも考慮された (オリエンタル酵母工業、標準試料成分表)。ビタミン D<sub>3</sub> も同じく MCT oil を溶媒として 6.5 nmol (100 IU) /day、65 nmol (1,000 IU) /day の 2 種類の濃度の溶液を作成した。コントロール群への投与は溶媒である MCT oil を用いた。一匹当たりの MCT oil およびビタミン D 製剤溶液の投与量は 200  $\mu$ L/day とした。これは 20g のマウスとヒトを比較した場合、60kg のヒトでは 600mL に相当する量である。動物へのビタミン D 製剤の投与はマウス用ステンレススチール製ゾンデ (FTSS-20S-25, プライムテック社, 東京) を使用した。マウスを左手で保定し、ゾンデにより直接胃へ 1 回 200  $\mu$ L の溶液を経口投与した。経口投与の前後で摂餌を制限することはしなかった。経口投与は 1 日 1 回を 4 週間毎日継続した。

## 4. 実験のタイムスケジュール

実験は順化期間の 8 週間と経口投与および測定期間の 4 週間の合計 12 週間である。採血を 4 回行い、経時的な測定項目は Rotarod、Beam walking、握力、体重の 4 項目であり、安楽死後に下肢を採取し  $\mu$ CT による体積の測定を行った。

## 5. 採血方法

ビタミン D 欠乏食給餌から 8 週間後に採血開始とした。薬剤投与前 (0 w)、薬剤投与開始 1 週目 (1 w)、2 週目 (2 w)、4 週目 (4 w) において尾静脈を切断し、血液を 1.5mL tube へ滴下させることで 100 $\mu$ L の採血を行い、即座に 4 に設定された遠心分離機で 10 分間 1,800 rpm にて遠心を行い、上清を血清サンプルとして回収した。切断した尾静脈はガーゼにて 5 分から 10 分間圧迫止血した。血清サンプルはマイナス 30 度で保管した。大阪樟蔭女子大学への搬送は発泡スチロール箱にドライアイスを入れ、冷凍状態にて配送した。

## 6. 体重測定

薬剤投与前 (0 w)、薬剤投与開始 1 週目 (1 w)、2 週目 (2 w)、4 週目 (4 w) において体重を測定した。

## 7. 血清カルシウム濃度・血清 25(OH)D<sub>3</sub>・血清 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度測定

血清カルシウム濃度の測定にはカルシウム E-テストワコー (富士フィルム和光純薬株式会社、東京) を使用し、マイクロプレートリーダーとして Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific K.K., 東京) を使用した。吸光度測定は主波長 610 nm とした。血清 25(OH)D<sub>3</sub> および 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度測定は、神戸大学研究基盤センターに設置される高速液体クロマトグラフ用送液ユニット (LC-20AD、島津製作所、東京) を用いた LC-MS/MS 法により測定した。測定は大阪樟蔭女子大学大学院人間科学研究科人間栄養学津川研究室に依頼した。方法は、血清 20  $\mu$ L に内標準物質である d<sub>6</sub>-25(OH)D<sub>3</sub> を添加し、除タンパク後、25(OH)D<sub>3</sub> および 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を含む脂質画分を抽出した。その後、イオン化効率を上げる目的で DMEQ-

TAD による誘導体化を行い、LC-MS/MS で分析した。

#### 8. $\mu$ CT による筋量の解析

測定開始後第 4 週目 (4 w) において安楽死後、大腿四頭筋を採取し、東京医科歯科大学生体材料工学研究所に設置されるマイクロ CT (inspeXio SMX100CT, 島津製作所、京都) を用いて、大腿四頭筋の筋体積を測定した。X 線発生装置の出力は 70 kV とし、後肢付根部から膝関節までの間を 0.031 mm の間隔で撮影した。画像解析ソフトウェア (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, 154 Maryland, USA) を用いて大腿四頭筋を三次元形態マイニングツール TrakEM2 により、対象領域の設定を行い測定した。

#### 9. Rotarod 上でのマウスの順化と Retention time の測定

Rotarod は 30 mm 径の回転円柱棒 (MK-670、室町機械株式会社、東京) の上をマウスが歩行し、その歩行持続時間 (Retention time) を調べることで運動協調機能や運動学習機能を測定することができる実験機器である。マウスが回転棒の上を歩行するためには運動学習が必要であり、これを順化と呼ぶ。低速回転で 2 - 15 rpm を 1 回 5 分間、1 日 3 回、週に 4 日間走行させ、これを 8 週間継続する。その後、測定時にはマウスをそれぞれ回転棒の上に乗せ、回転速度を最初の 2 分間で 3 rpm から 30 rpm へ加速し、その後の 1 分間は 30 rpm で一定の回転速度とする加速度モードを使用する。測定は 2 回試験測定を行った後、3 回目の値を測定値とした。マウスが回転棒から落ちるまでの時間 (retention time) を測定し、180 秒以上歩行した場合はスコアを 180 として測定終了とした。それぞれの試験の間は 1 分間休憩させた。薬剤投与前 (0 w)、薬剤投与開始 1 週目 (1 w)、2 週目 (2 w)、4 週目 (4 w) において測定を行った。

#### 10. Beam walking 試験におけるマウスの順化と time to reach goal box の測定

Beam walking 装置は不安定な細い円柱の上をマウスが歩くことで平衡感覚機能や運動協調機能を測定することができる実験装置である。直径 12 mm で 1 メートルの長さの円柱を平面な床から高さ 50 cm の位置に床と平行に設置し、一端に暗箱を設置した。1 日 5 分、週に 4 日間、4 週間継続し順化とした。測定時は暗箱から 1 メートルの位置にマウスを置き、暗箱へ戻るまでの時間 (time to reach goal box) を測定した。2 回試験測定を行い、3 回目の値を測定値とした。それぞれの試験の間は 1 分間休憩とした。薬剤投与前 (0 w)、薬剤投与開始 1 週目 (1 w)、2 週目 (2 w)、4 週目 (4 w) に測定を行った。

#### 11. 握力測定

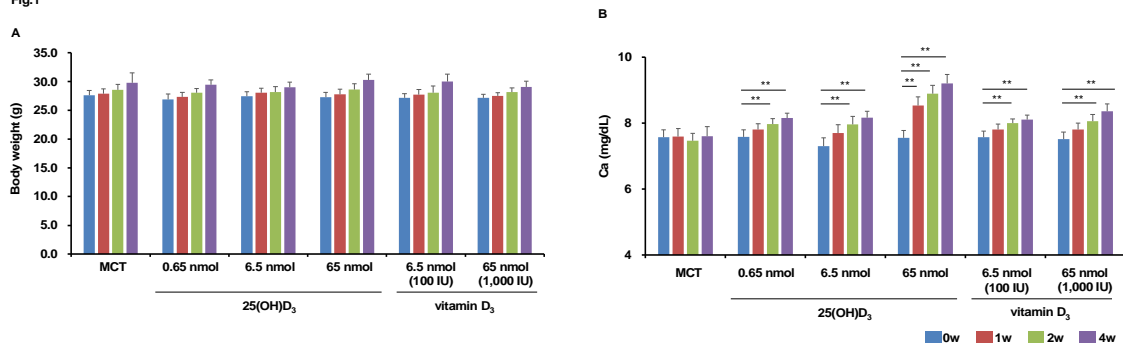
小動物用握力測定器 GPM-101B (有限会社メルクエスト、富山) を使用した。表示された gripping force (g) を測定値とし、3 回目の値を採用した。薬剤投与前 (0 w)、薬剤投与開始 1 週目 (1 w)、2 週目 (2 w)、4 週目 (4 w) に測定を行った。

## 4. 研究成果

### ビタミン D 欠乏マウスでは 25(OH)D3 およびビタミン D3 の経口投与は運動学習機能を向上させる

実験期間 (4 週間) のマウスの体重は成長に伴い増加する傾向が見られたが、ビタミン D 欠乏食飼育マウスにビタミン D 製剤を投与しても、投与・非投与群間で統計学的に有意な差は見られなかった (Fig.1A)。血清カルシウム濃度はビタミン D 欠乏食 4 週間飼育マウスでは 8.0 mg/dL 以下であった。血清カルシウム濃度はビタミン D 製剤投与後、用量依存的に上昇が認められ、薬剤投与前 (0w) と比較していずれの投与群においても薬剤投与 2 週間後および薬剤投与 4 週間後では有意差を持って上昇した (Fig.1B)。

Fig.1

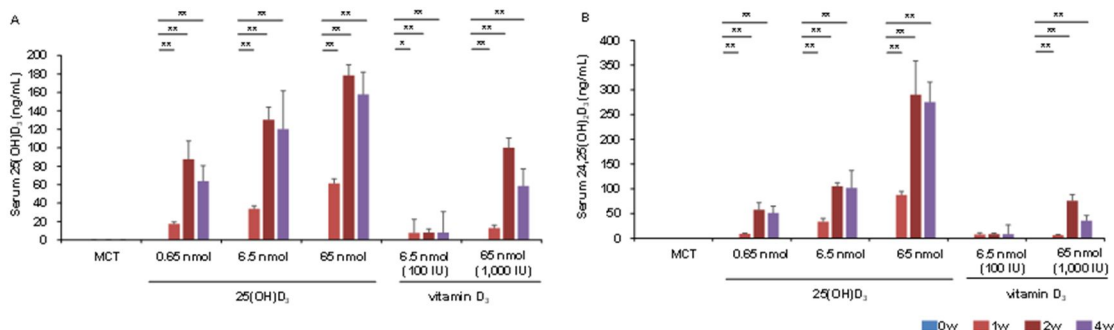


ビタミン D 欠乏食で 4 週間飼育したマウスの血清 25(OH)D3 濃度は、コントロール群である MCT 投与群 (および各群の実験開始時) の測定ではいずれも検出されず測定不能であった。一方、ビタミン D 製剤投与開始 1 週間後からいずれの群でも経時的に血清 25(OH)D3 濃度は有意に上昇を認めた (Fig.2A)。24,25(OH)2D3 は生理活性を有しない中間代謝物であり、そのすべてが体内で産生されたものである。25(OH)D3 は薬物としての取り扱いがあるため、実験操作により混入する可能性がある。測定で得られた 25(OH)D3 がすべて体内で産生されたものであることの確認のために血清 24,25(OH)2D3 濃度の測定も行った。血清 24,25(OH)2D3



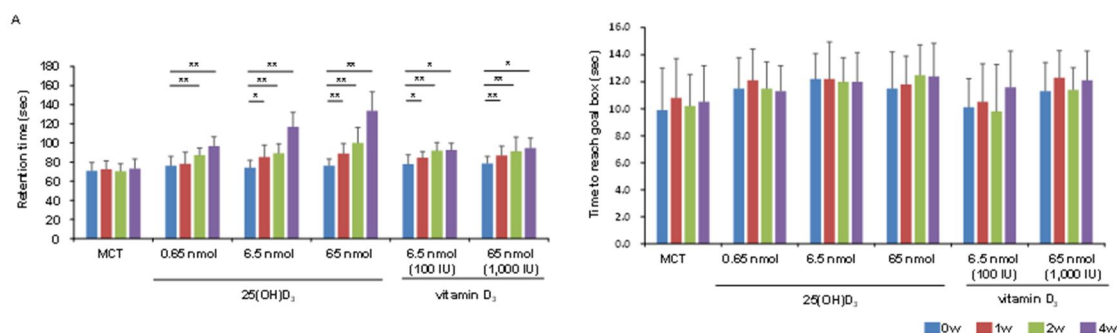
濃度について、コントロール群である MCT 投与群および各群の実験開始時の測定では検出されず測定不能であった。各検体で 25(OH)D3 と 24,25(OH)2D3 濃度の増減は一致しており、それぞれが体内で産生された 25(OH)D3 と 24,25(OH)2D3 の測定値と考えられた。6.5 nmol のビタミン D3 投与群を除き、投与開始から実験終了時まで血清 24,25(OH)2D3 濃度も有意に上昇した ( Fig.2B )

Fig.2



Rotarod 試験は運動協調機能、運動学習機能を反映するとされている。Sakai らは活性型ビタミン D 誘導体 Eldecalcitol [ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-}28\text{-}[\text{3-hydroxypropyloxy}]\text{-D}_3$ ] 投与によるビタミン D シグナルが運動協調機能、運動学習機能に重要であることを示した。そこで申請者は 25(OH)D3 およびビタミン D3 がこれらの機能を向上させるかどうか Rotarod 試験を用いて検討した。25(OH)D3 およびビタミン D3 共に、濃度依存的に retention time を延長させた ( Fig.3A ) 測定開始 4 週後の時点でビタミン D3 6.5nmol/day 投与群および 65nmol/day 投与群を 25(OH)D3 投与群の同量投与群と比較すると、いずれの場合でも 25(OH)D3 投与群の方が retention time の延長が有意であった。一日投与量 65nmol の群の retention time の平均値を比較すると、投与開始時と投与開始 4 週後では 25(OH)D3 投与群で Retention time に 176% の向上が見られ、ビタミン D3 投与群では 120% の向上が見られた。Beam walking 試験においては運動協調機能が評価できる (28)。Beam walking 試験を行ったところ、各群間で有意差はみられなかった ( Fig.3B ) これらの結果から、25(OH)D3 あるいはビタミン D3 の経口投与はビタミン D 欠乏状態のマウスにおいて運動協調機能でなく運動学習機能を向上させることが示唆された。

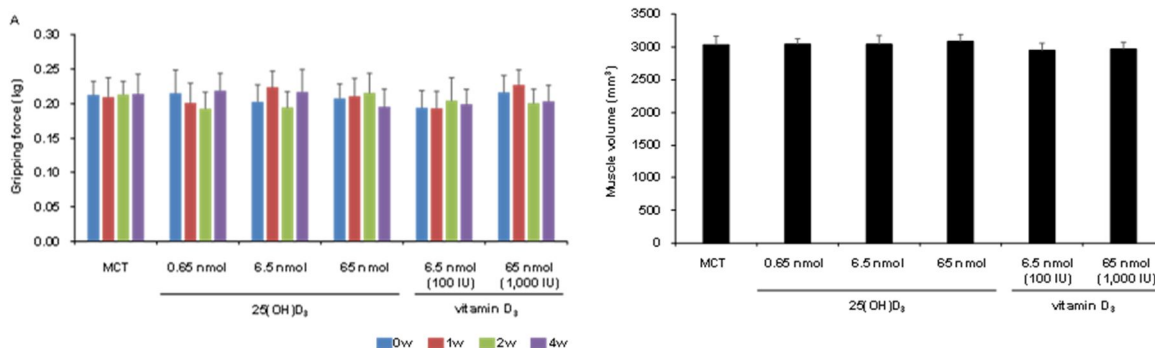
Fig.3



### 25(OH)D3 およびビタミン D3 は筋力あるいは筋量には影響を与えない

次に、25(OH)D3 およびビタミン D3 投与が筋力および筋量にどのような影響を与えるかを調べた。筋力の試験として握力測定試験を行ったところ、いずれの群間においても握力の変化は認められなかった ( Fig.4A )。筋量として大腿四頭筋の体積を  $\mu\text{CT}$  にて調べたところ、いずれの群間においても体積の変化は認められなかった ( Fig.4B )。以上のことから、25(OH)D3 およびビタミン D3 の経口投与は筋力あるいは筋量には影響しないことが示唆された。

Fig.4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	津川 尚子  (Tsugawa Naoko)  (30207352)	大阪樟蔭女子大学・健康栄養学部・教授    (34409)	
研究分担者	古株 彰一郎  (Kokabu Syoichiro)  (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授    (27102)	
研究分担者	佐藤 毅  (Sato Tsuyoshi)  (60406494)	埼玉医科大学・医学部・准教授    (32409)	

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