

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11644

研究課題名(和文)サルコペニア予防を目指したビタミンDの骨格筋維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel molecular mechanisms of vitamin D involved in skeletal muscle functions for prevention of sarcopenia.

研究代表者

西川 美宇(Nishikawa, Miyu)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：90749805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、栄養介入によるサルコペニア予防を目指して骨格筋の機能維持に関わるビタミンDの新規作用機序を解明することを目的とした。異なるビタミンDシグナルを欠損した3種の遺伝子改変ラットの骨格筋における表現型を比較することで、骨格筋の機能維持に重要なビタミンDシグナルの同定を試みた。その結果、従来のビタミンD受容体(VDR)を介したシグナルだけでなく、近年報告が相次いでいるVDR非依存的なビタミンDシグナルも骨格筋の機能維持に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンDの代表的な生理作用として腸におけるカルシウム吸収促進を介した骨形成作用が挙げられる。そのため活性型ビタミンDは骨粗しょう症治療薬として応用される一方、強すぎるカルシウム作用の為、骨疾患以外への応用は難しい。本研究では、強力なカルシウム作用が知られる既存のビタミンDシグナルとは別のシグナルもまた、骨格筋機能維持に関わる可能性を示した。本研究で得られた知見は作用分離型のビタミンDおよびその製剤の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate novel molecular mechanisms of vitamin D for skeletal muscle function to prevent sarcopenia. In order to identify the novel vitamin D signals that is involved in the maintenance of skeletal muscle function, we compared the muscle phenotypes of three types of genetically modified rat strains deficient in different vitamin D signals. The results indicated that not only conventional vitamin D receptor (VDR)-mediated signals but also VDR-independent vitamin D signals, which have been reported recently, may be involved in the maintenance of skeletal muscle function.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミンD サルコペニア VDR CYP27B1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国が迎える超高齢化社会において、健康寿命の延伸による医療費削減は急務の課題である。要介護状態を招く要因の一つが転倒などの骨折によるものであり、骨粗鬆症やサルコペニアなどの運動器疾患を予防することは健康寿命の延伸に直結する。

ビタミン D は主としてカルシウム吸収促進を介した骨形成作用を有する。ビタミン D は紫外線照射により体内で合成することが可能であるが、紫外線のリスクを考慮すると食品からの摂取が重要となる。一般的に、ビタミン D が生理作用を示すためには 2 段階の水酸化反応で活性型に変換される必要がある。動物由来ビタミン D では主に腎臓の CYP27B1 によって生成された  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  ( $1,25\text{D}_3$ ) が、ビタミン D レセプター (VDR) に高親和性の活性型代謝物である (図 1)。そのため  $1,25\text{D}_3$  およびその誘導体は、骨粗鬆症治療薬として応用されている。

近年、ビタミン D の新たな生理作用として骨格筋機能維持作用が報告されており、関連疾患への応用も期待される。しかし  $1,25\text{D}_3$  はカルシウム作用が非常に強く、副作用 (高カルシウム血症) 予防の観点から厳密な投与量コントロールが要求されるため、骨粗鬆症以外への適応は難しい。またビタミン D の骨格筋に対する直接作用の分子メカニズムは未だ不明な部分が多い (Olsson et al., *Endocrinology*.157(1):98-111. (2016), Dawson-Hughes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 173:313-316 (2017))。すなわち骨格筋におけるビタミン D の分子基盤はサルコペニア等の筋疾患の予防戦略への展開が期待される。

### 2. 研究の目的

本課題は、食品因子でありながら医薬品としてのポテンシャルを持つビタミン D に着目し、運動機能維持に関わるビタミン D の新規作用機序を解明することを目的として研究を実施した。近年、骨形成作用を有するビタミン D の新規生理作用として「骨格筋機能維持作用」が報告されているが、その分子メカニズムは不明な部分が多い。一般的に、ビタミン D の作用機序としては VDR を介した  $1,25\text{D}_3$  の転写調節作用が挙げられる。しかし近年、VDR 非依存的な  $1,25\text{D}_3$  の生理作用や、 $1,25\text{D}_3$  の前駆物質である  $25\text{-hydroxyvitamin D}_3$  ( $25\text{D}_3$ ) の直接的な作用、またリガンド非依存的な VDR の生理作用などが報告されており、これらの新規作用機序が骨格筋の機能維持に関わっている可能性も排除できない。代表者らはこれまでに、ゲノム編集法を用いて異なるビタミン D シグナルを欠損した 3 系統の遺伝子改変ラットを作出した。本研究では、

変異型 VDR 導入 (mVDR)、CYP27B1 遺伝子欠損 (CYP27B1-KO)、VDR 遺伝子欠損 (VDR-KO) ラットの骨格筋における表現型およびビタミン D 応答性を比較解析することで、運動機能維持に重要な新規ビタミン D シグナルを同定する (図 1)。

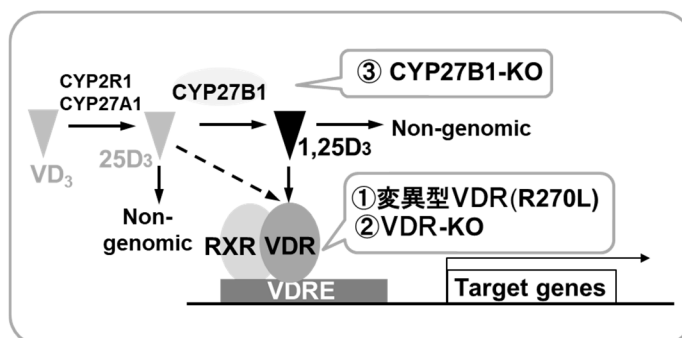


図1: ビタミンDの作用機序と遺伝子改変動物のターゲット

### 3. 研究の方法

ビタミン D シグナルの欠損が骨格筋の表現型に及ぼす影響を解析するために、以下の実験を行った。

#### (1) トレッドミルおよび握力測定による運動機能評価

トレッドミルおよび握力測定装置を用いて、野生型および遺伝子改変ラットの運動能を比較した。

#### (2) CT 撮影による骨格筋量測定

運動機能に重要な役割を果たす下肢骨格筋およびスキャン時の横断軸による誤差が出にくい大腰筋に着目し、CT 撮影による筋量測定を行った。

#### (3) 下肢骨格筋の組織学的解析

運動機能に重要な役割を果たす下肢骨格筋のうち、遅筋であるヒラメ筋と、速筋である腓腹筋を採取して表現型解析を行った。また塩酸プピカインの腓腹筋への注射により化学的筋損傷を誘発し、損傷誘導後 1 週間 ~ 3 週間で 1 週ごとにエンドポイントを設定した。組織学的解析および筋衛星細胞マーカーである Pax7 および MyoD の mRNA 発現解析により、筋損傷からの回復過程

を系統間で比較した。

#### 4. 研究成果

血中 1,25D3 が検出限界以下である CYP27B1-KO ラットにおいて握力の低下傾向が認められたが、VDR-KO および変異型 mVDR 導入ラットでは野生型と比較して有意な差は認められなかった(各群 N=3-6)。トレッドミルによる運動持続性に関しては個体差が大きく、系統間で有意な差を見出すことはできなかったため、十分な N 数を確保した上で再解析が必要である。

CT スキャンにて測定した筋量を体重で補正し、系統間における筋量を比較したところ、CYP27B1-KO ラットにおいて下肢骨格筋および大腰筋量は著しく低下していた。VDR-KO では個体によって筋量の著しい低下が認められた。腓腹筋の組織学的解析においては、CYP27B1-KO において筋線維径の低下が認められた。塩酸プピパカインにより腓腹筋に化学的筋損傷を誘導し、CYP27B1 および VDR-KO において回復の遅延傾向が認められたが、筋衛星細胞の分化マーカーである Pax7 や MyoD の mRNA 発現量に有意差は認められなかった(各群 N=3-4)。筋

3 系統の遺伝子改変ラット間におけるビタミン D シグナルの相違点として、CYP27B1-KO ラットは唯一 VDR 非依存的な 1,25D3 シグナルを欠損している。これらの結果より、従来のビタミン D シグナルである活性型ビタミン D の VDR 依存的な作用だけでなく、近年報告が相次いでいる新規ビタミン D シグナルも骨格筋の機能維持に関与している可能性が示された。一方で CYP27B1-KO ラットは VDR 変異系統と比較して骨形成異常が顕著であり、系統間における骨の表現型差が骨格筋の発達や運動能に影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後は骨格筋特異的ビタミン D シグナル欠損動物を用いた表現型解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kento Hibi, Miyu Nishikawa, Shinich Ikushiro, Toshiyuki Sakaki
2. 発表標題 Effects of vitamin D on development of bone and skeletal muscle in Cyp27b1-KO and Vdr-KO rickets rat models
3. 学会等名 ICoFF 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------