

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292063

研究課題名(和文) 組織内活性型ビタミンKの内分泌調節作用とその機構解析

研究課題名(英文) Effect of activated vitamin K analogue on endocrine function

研究代表者

白川 仁 (SHIRAKAWA, Hitoshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40206280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンKは肝臓における血液凝固因子の産生や骨代謝に必須の微量栄養素である。ビタミンKの生体内分布を見ると、肝臓や骨以外にも、膵臓、脳、生殖線に大量に存在する。しかし、それらの臓器でのビタミンKの役割については未だ不明な点が多い。本研究では、膵臓からのインスリン分泌に及ぼすビタミンKの影響について解析を行い、ビタミンKが膵細胞からのグルコースに依存したインスリン分泌の増強作用を有していることを見出した。また、その作用機序について細胞内cAMP量の増加、EPACの活性化によることを示した。

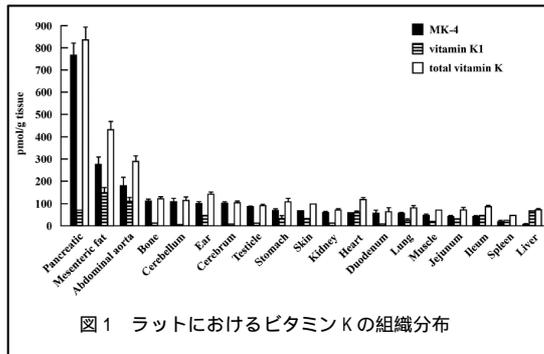
研究成果の概要(英文)：Vitamin K is the micronutrient which is essential for blood coagulation system and bone metabolism in animals. The distribution of vitamin K is not only restricted in liver and bone, but also other organs including brain, gonadal tissues and pancreas. However, the functions of vitamin K in those tissues are remaining to be clarified. In this study, we analyzed the effect of vitamin K on insulin secretion from pancreatic beta cells. Vitamin K enhanced glucose dependent insulin secretion via the up-regulation of intracellular cAMP. Our results suggested that vitamin K regulates insulin secretion in pancreas.

研究分野：栄養化学

キーワード：栄養学 ビタミンK

1. 研究開始当初の背景

ビタミンKは、高等動物において血液凝固や骨代謝に關する必須の微量栄養素である。天然にはフィロキノン(ビタミンK1)とメナキノン類(ビタミンK2)が存在する。ほ乳類におけるビタミンKの組織分布を見ると、血液凝固因子を産生する肝臓や骨組織以外に、脳、膵臓、生殖腺などに多量に含まれている(図1)。しかし、肝、骨組織以外でのビタミンKの役割については未だ不明な点が多い。



2. 研究の目的

膵臓におけるビタミンKの作用、特にインスリン分泌制御における役割を解析する。これまでに、糖尿病モデル動物にビタミンK欠乏食を与えるとインスリン分泌能が低下することを見出している。一方、ビタミンKによる糖代謝改善作用が少数の臨床試験、疫学調査で示唆されている。しかし、その作用機序については不明である。本研究では、膵臓由来分離ランゲルハンス島、株化膵細胞を用いて、ビタミンKがインスリン分泌に与える影響とその作用機序について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵ランゲルハンス島、株化細胞からのグルコース依存性インスリン分泌に与えるビタミンKの影響

ラット膵臓より、コラゲナーゼ灌流法により、膵ランゲルハンス島を調製した。バッチインキュベーションで、グルコース刺激後に培地中へ分泌されるインスリン量をELISA法により測定した。また、ラット膵臓由来 INS-1細胞においても同様に解析した。

(2) ビタミンKによる細胞内cAMP量の変化

ビタミンKで細胞を処理した場合の細胞内cAMP量の変化をビタミンKによりステロイド産生が変化する精巢由来細胞(I-10)を用いて解析した。

(3) グルコース依存性インスリン分泌増強における作用点の解析

ビタミンKによるグルコース依存性インスリン分泌の増強効果が観察されたことから、INS-1細胞にCREBレポーター遺伝子を導入し、

Aキナーゼ(PKA)の関与を解析した。また、EPAC阻害剤で処理した場合の影響を解析した。

4. 研究成果

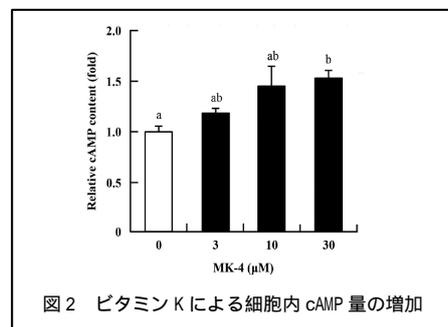
(1) グルコース依存性インスリン分泌に及ぼす影響

分離ランゲルハンス島をグルコースとビタミンKで処理し、一定時間内に培地中へ分泌されるインスリン量を測定した。その結果、ビタミンKは比較的低濃度のグルコースで刺激した場合のインスリン分泌量を上昇させた。一方、高濃度のグルコースの刺激では分泌量に変化は見られなかった。また、用いたビタミンK(メナキノン-4)の側鎖類縁体であるゲラニルゲラニオールやファルネソールで処理した場合、インスリン分泌量の上昇が観察された。このことから、ビタミンKによるインスリン分泌量の上昇には、側鎖であるイソプレノイド構造が重要であると推定された。

また、INS-1細胞を用いて同様の解析を行ったところ、ビタミンKは低濃度のグルコース刺激によるインスリン分泌を増強させ、高濃度のグルコースでは影響が見られなかった。ゲラニルゲラニオールで処理した場合、インスリン分泌量の上昇が観察されなかった。以上のことから、ビタミンKは低濃度のグルコース刺激によるインスリン分泌を増強させること、また、その側鎖構造体については細胞により影響が異なることが示唆された。

(2) 細胞内cAMP量の変化

精巢由来細胞において、ビタミンKはアデニル酸シクラーゼを活性化させ、cAMP-PKA経路を活性化させることが明らかになっている。cAMP-PKA経路は膵細胞において、インクレチンによって活性化され、グルコース応答性インスリン分泌量を増加させる。そこで、ビタミンK処理による細胞内cAMP量の変化を測定した。まず、精巢由来I-10細胞において、ビタミンKは細胞内cAMP量を濃度依存的に増加させた(図2)



また、INS-1細胞においても同様の変化が観察された。以上のことから、ビタミンKは細胞内cAMP量を増加させ、インスリン分泌量を上昇させると推定された。

### (3) 作用点の解析

インクレチンは、膵細胞内で、cAMP 量を増加させ、PKA や EPAC を活性化させ、インスリン分泌量を増加させる。まず、PKA の活性化について、PKA の下流因子である CREB の活性化をレポーター遺伝子を用いて解析した。cAMP 応答配列をもつレポーター遺伝子を INS-1 細胞にトランスフェクションし、グルコース、ビタミン K で処理後のレポーター活性を測定した。その結果、ビタミン K 処理によるレポーター活性の変化は見られなかった。続いて EAPC の経路についてその阻害剤を用いて解析した。EPAC 阻害剤は、ビタミン K によるインスリン分泌上昇を阻害した。以上のことから、ビタミン K によるグルコース依存性インスリン分泌の上昇作用は cAMP-EPAC 経路を活性化することにより起こると推定された。ビタミン K により細胞内 cAMP 量の増加が見られる精巣由来細胞においては、PKA の活性化が見られることから、細胞腫によって cAMP の下流経路の活性化が異なることが示唆された。また、マクロファージ、肝臓由来細胞において、cAMP 量、PKA の活性化が見られなかったことから、ビタミン K の作用は、アデニル酸シクラーゼを直接活性化させるのではなく、細胞表面に存在する受容体を介している可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Ho H-J, Shirakawa H, Komai M. Menquinone-4 enhances steroidogenesis in testis derived tumor cells via the elevation of cAMP level. *Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing*, 査読有、1 巻、2017 年、189-198. DOI: 10.5772/63982.

Toyama H, Sato S, Shirakawa H, Komai M, Hashimoto Y, Fujii, S. Altered activity profile of a tertiary silanol analog of multi-targeting nuclear receptor modulator T0901317. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、26 巻、2016 年、1817-1820. DOI:10.1016/j.bcm.2016.02.031.

藤井晋也、清水章貴、桂井朋子、小口一起、秦成陽、白川仁、駒井三千夫、小嶋聡一、影近弘之、メナキノンカルボン酸誘導体の系統的合成と抗炎症および肝癌細胞増殖抑制作用、*ビタミン*、査読有、90 巻、2016 年、253-260.

白川仁、何欣蓉、駒井三千夫、*ビタミン K による性ホルモン産生促進、ビタミン*、査読有、90 巻、2016 年、3-8.

Ho H-J, Shirakawa H, Yoshida R, Ito A, Maeda M, Goto T, Komai M. Geranylgeraniol enhances testosterone production via cAMP/protein kinase A pathway in testis-derived tumor I-10 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、80 巻、2016 年、791-797.

DOI:10.1080/09168451.1123612.

Fujii S, Shimizu A, Oguchi K, Katsurai T, Shirakawa H, Komai M, Kagechika H. Systematic synthesis and anti-inflammatory activity of  $\alpha$ -carboxylated menaquinone derivatives - Investigations on identified and putative vitamin K2 metabolites -, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、23 巻、2015 年、2344-2352. DOI:10.1016/j.bmc.2015.03.070.

白川仁、桂井朋子、駒井三千夫、*ビタミン K の生体内変換と生成したメナキノン-4 の機能、オレオサイエンス*、査読有、14 巻、2014 年、547-553. <http://doi.org/10.5650/oleoscience.14.547>

〔学会発表〕(計 21 件)

青山奈央、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、培養ミクログリア細胞におけるビタミン K2 の抗炎症効果、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 20 日、京都女子大学(京都市)

Ayaka Kato, Sultana Halima, Tomoko Goto, Michio Komai, Hitoshi Shirakawa, Analysis of drug-metabolizing gene expression regulated by vitamin K through PXR, 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(横浜市)

白川仁、何欣蓉、平原啓甫、後藤知子、駒井三千夫、*ビタミン K によるグルコース応答性インスリン分泌の増強作用*、日本脂質栄養学会第 25 回大会、2016 年 9 月 16 日、秋田市にぎわい交流会館 AU (秋田市)

Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Keisuke Hirahara, Tomoko Goto, Michio Komai, Effect of menaquinone-4 on glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic derived cells, 日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日、富山国際会議場(富山市)

青山奈央、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、マウスミクログリア細胞においてメナキノン-4 が炎症関連遺伝子の発現に及ぼす影響、日本ビタミン学会第 68 回大会、2016 年 6 月 17 日、富山国際会議場(富山市)

Hitoshi Shirakawa, Nutraceuticals for the prevention of lifestyle-related diseases, The 42nd Annual Meeting and Conference of Nutrition Society of Taiwan, 2016 年 5 月 20 日、Taipei Medical University, 台北(台湾)

白川仁、駒井三千夫、食品成分によるテストステロン産生の増強、第 70 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム「健康寿命延伸のための性差を意識した栄養学」、2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大学中央キャンパス(西宮市)

加藤綾華、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、LS180 細胞を用いた PXR を介した栄養素 - 医薬品間相互作用の解析、日本農芸化学会

2016年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

Hsin-Jun Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai, Menaquinone-4 and geranylgeraniol regulate testosterone production and insulin secretion、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター（札幌市）

加藤綾華、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、ヒト結腸腺がん由来LS180細胞を用いたビタミンKによるPXRを介した薬物代謝酵素遺伝子発現調節機構の解析、日本農芸化学会東北支部第150回大会、2015年10月3日、東北大学農学部（仙台市）

Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai, Menaquinone-4 and geranylgeraniol regulate cAMP/ protein kinase A pathway activation and steroidogenesis in I-10 Leydig cells、日本ビタミン学会第67回大会、2015年6月6日、奈良県新公会堂（奈良市）

加藤綾華、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、ビタミンK2によるPXRを介した薬物代謝酵素遺伝子発現調節機構の解析、日本ビタミン学会第67回大会、2015年6月6日、奈良県新公会堂（奈良市）

白川仁、ビタミンKによる性ホルモン産生促進、日本ビタミン学会第67回大会シンポジウム「ビタミン・バイオフィクターの男女間での栄養学」、2015年6月6日、奈良県新公会堂（奈良市）

Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai, Effects of menaquinone-4 and geranylgeraniol on testosterone production in testis-derived tumor I-10 cells、12th Asian Congress of Nutrition、2015年5月14-18日、パシフィコ横浜（横浜市）

Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月28日、岡山大学（岡山市）

加藤綾華、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、核内受容体PXRを介したビタミンK2による遺伝子発現調節機構の解析、第48回日本栄養・食糧学会東北支部大会、2014年11月1日、東北大学農学部（仙台市）

駒井三千夫、血液凝固や骨形成以外にも重要なビタミンKのはたらき、日本油化学関東支部・日本ビタミン学会共催 市民公開セミナー2014、2014年10月25日、アスティ45（札幌市）

加藤綾華、前田美里、白川仁、後藤知子、駒井三千夫、LS180細胞を用いたビタミンK2によるPXRを介した遺伝子発現調節機構の解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月

17日、京都国際会議場（京都市）

平原啓甫、白川仁、曾根英行、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫、ビタミンK欠乏食が、KK-Ayマウスのインスリン分泌能および耐糖能に及ぼす影響、日本ビタミン学会第66回大会、2014年6月13日、姫路商工会議所（姫路市）

何欣蓉、吉田理紗、前田美里、白川仁、駒井三千夫、Clarifying the mechanism of enhanced testosterone production by menaquinone-4 and geranylgeraniol、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日、酪農学園大学（江別市）

② 平原啓甫、白川仁、曾根英行、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫、ビタミンK欠乏食給餌が遺伝的糖尿病モデルマウスの膵臓および肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日、酪農学園大学（江別市）

〔図書〕（計 3件）

白川仁（池田郁男、遠藤泰至編）アイ・ケイコーポレーション、「基礎食品学」、2015年、65-76

白川仁（岡野登志夫編）医薬ジャーナル社、「ビタミンKと疾患 - 基礎の理解と臨床への応用 - 」、2014年、120-127

駒井三千夫（岡野登志夫編）医薬ジャーナル社、「ビタミンKと疾患 - 基礎の理解と臨床への応用 - 」、2014年、48-58

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
白川 仁（SHIRAKAWA, HITOSHI）  
東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40206280

(2)研究分担者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：80143022

後藤 知子 (GOTO, TOMOKO)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：00342783

豊水 正昭 (TOYOMIZU, MASAAKI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：80180199