

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590078

研究課題名(和文) 遺伝子改変細胞・動物を用いた動脈硬化モデル評価系の構築と創薬研究

研究課題名(英文) Construction of an arteriosclerosis assessment system using genetically modified cells and animals, and drug development

研究代表者

岡野 登志夫 (OKANO TOSHIO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20131542

研究成果の概要(和文)：動脈硬化予防・治療に果たすビタミン D の役割を明らかにするため、ビタミン D 受容体あるいはビタミン D 代謝活性化酵素(CYP27B1)の遺伝子を欠失した細胞・動物を作出し、ビタミン D とその誘導体の活性評価系を構築した。ビタミン K 生合成酵素をヒトで初めて発見し、この酵素の血管中膜石灰化予防に果たす役割を解明するための細胞レベルでの評価系を構築した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of vitamin D in the prevention and treatment of arteriosclerosis, we have generated vitamin D receptor(VDR) gene knockout mice or vitamin D metabolically activating enzyme, CYP27B1 gene knockout mice together with the cells possessing genetically modified VDR or CYP27B1 gene, and have constructed an assessment system using the above cells and animals. We have found a novel human vitamin K biosynthesis enzyme, UBIAD1 and have constructed an assessment system at cellular level for the elucidation of the role of vitamin K in the prevention and treatment of arteriosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学, 遺伝子改変細胞, 遺伝子改変動物, 動脈硬化モデル, ビタミン D, ビタミン K, 生合成酵素, 活性評価

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症で見られる血管中膜の石灰化は、血管平滑筋細胞(Vascular Smooth Muscle Cells:

VSMCs) が何らかの刺激によって石灰化能を有する軟骨様細胞へ分化し、骨髄由来の破骨細胞様細胞とともに中膜で骨と類似のヒドロキシアパ

タイト構造(石灰化層)を形成することが特徴である。この現象は、文字通り「血管に骨ができる」という能動的プロセスであり、「骨-血管相関」のパラダイム提示の根拠となっている。中膜石灰化の誘導・阻止因子として、ホルモン、栄養因子、薬物などが報告されているが、本研究では生活習慣病の予防・治療の観点から、ビタミン D とビタミン K に焦点を当てて石灰化を誘導する作用メカニズムを解明する。ビタミン D のカルシウム代謝調節作用は、「肝臓と腎臓での連続的な代謝活性化」および「核内受容体を介する遺伝子発現」の両段階で厳密な調節を受ける。各々の段階で中心的な役割を果たすのが、前者ではビタミン D -1 α 水酸化酵素(CYP27B1)であり、後者ではビタミン D 受容体 (Vitamin D Receptor: VDR)である。ビタミン D の代謝異常あるいは活性発現異常によって惹起される動脈石灰化の発症機序を解明する上で、CYP27B1 遺伝子あるいは VDR 遺伝子が欠失した遺伝子改変細胞・動物を用いることは有効な手段となる。我々の研究室では、国内で唯一、前者のマウスを独自に作出することに成功し、表現型解析もほぼ終了し、継代飼育が続いている。また、後者のマウスについても継代飼育が続いており、既に長年の使用実績がある。一方、ビタミン K は血液凝固因子の活性化に必要な γ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子として知られてきたが、近年、骨の基質蛋白質オステオカルシンおよび血管平滑筋細胞の matrix Gla protein (MGP)の活性化にも重要な役割を果たすことが明らかになってきた。ところで、ビタミン K の生体内での活性型は MK-4 であり、哺乳類の組織・細胞でも他の多くのビタミン K 同族体から優先的に MK-4 が生合成されるとこれまで考えられてきた。この生合成に関わる酵素の存在は未知であり、動脈硬化予防におけるビタミン K の役割を明らかにする上でこの酵素の同定は不可欠な問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、主に以下の(1)~(3)の課題解決を目標に研究を行なう。

(1) ビタミン D 代謝異常, ビタミン D 受容体機能異常, ビタミン D 活性発現障害の動脈硬化への関与の有無を, 野生型および遺伝子改変型 (CYP27B1^{-/-}と VDR^{-/-})細胞・動物を用いて分子, 細胞, 動物レベルで検討する。

(2) ビタミン D およびビタミン K の動脈硬化との関連性を探る生体指標として血中 MGP に焦点を当て, 動物およびヒトのリコンビナント MGP 抗体を作成するとともに, 血中濃度測定法を開発する。

(3) ヒトゲノムデータベースサーチにより, ビタミン K 生合成酵素の候補遺伝子を探索するとともに, 特定された酵素の発現ベクター導入法および siRNA knockdown 法によりビタミン K 生合成活性を評価する。また, この酵素の構造・機能解析を行うとともに, 酵素遺伝子欠失動物を作出し, 動脈硬化評価系を構築する。

3. 研究の方法

(1) 予備実験として, 野生型マウスを用いてビタミン D の投与量と投与期間の至適条件を検討し, 血管中膜平滑筋細胞層で石灰化が確実に起こる条件を求める。条件が設定できたら, 野生型および遺伝子改変型 (CYP27B1^{-/-}と VDR^{-/-})マウスで動脈石灰化誘発実験を実施する。ビタミン D 誘発性血管石灰化病変の特徴と特異性を明らかにするため, 上記3種の動物に対して①リン誘発性, ②ワルファリン誘発性, ③高脂肪飼料誘発性の3種の血管石灰化誘発実験を行なう。平滑筋細胞において, ビタミン D 刺激にตอบสนองして血管石灰化を誘導するタンパク質の存在が想定された場合, DNA microarray で探索し, MALDI-TOF-MS で同定する。また, 野生型および遺伝子改変型マウスから血管平滑筋細胞を単離し, その培養細胞を用いて活性型ビタミン D による平滑筋細胞の軟骨様細胞への分化, アポトーシス細胞の誘導, アポトーシス小胞の形成など初期石灰化のメカニズムにつき検討する。更

に、初期石灰化に引き続いて起こる軟骨様細胞による血管石灰化のメカニズムについても研究する。

(2) 野生型および遺伝子改変型(CYP27B1^{-/-}とVDR^{-/-})マウスを用いて各種血管石灰化誘発実験を行うとともに、ラットおよびヒトMGPのモノクローナル抗体を作成し、血管石灰化の発症・進展と血管平滑筋細胞によるMGP発現量の変化をリアルタイムで検討する。また、ビタミンK投与による血管石灰化抑制効果と血中MGP濃度の関連性について詳細に検討する。また、これらの血管石灰化誘発実験によって、活性型ビタミンDが平滑筋細胞内のMGP発現量を調節し石灰化抑制効果を現すことが確認された場合、次のステップとして、血管平滑筋初代培養細胞を用いてMGPの石灰化抑制の作用メカニズムとビタミンDの関与について検討する。

(3) 大腸菌ビタミンK合成酵素遺伝子 *MenA* のプレニル化ドメインを用いてヒトゲノムデータベースのホモロジー検索を行い、ヒトでのビタミンK合成酵素候補遺伝子を特定する。候補遺伝子の発現ベクターを構築し、これをヒト骨芽細胞様細胞MG-63へ導入して活性の有無を確認する。また、昆虫細胞 Sf9 へ遺伝子導入し、発現してくる酵素蛋白質の構造と機能の解析を行う。

4. 研究成果

(1) CYP27B1^{-/-}マウスとVDR^{-/-}マウスの交配により両遺伝子のdouble knockoutマウスの作出に成功し、これらのマウスから血管平滑筋細胞の初代培養系を確立した。また、上記の遺伝子改変マウス血管組織における石灰化の有無を解析した。

(2) ヒト骨芽細胞様細胞MG-63にビタミンD受容体、ビタミンD活性化酵素、γ-グルタミルカルボキシラーゼ、ビタミンKエポキシドレダクターゼ、カルメニン、ビタミンK還元酵素(NQO1, NQO2)のsiRNA導入による各遺伝子のknockdown細胞の作出に成功した。ま

た、VDRおよびビタミンK受容体(SXR)の結合能評価に用いるためのルシフェラーゼ・レポーターアッセイシステムを構築した。

(3) 血管石灰化の細胞モデル系を構築するために、血管平滑筋細胞を用いたMGP発現ベクターを作成した。

(4) マウス血管において、MGPの活性化を担うビタミンKのうちMK-4が高濃度に存在することを確認した。また、血管平滑筋細胞がMK-4合成能をもつことを明らかにした。

(5) ラットおよびヒトのMGPに対するモノクローナル抗体を作成し、血中MGPのELISA定量法を確立した。

(6) ビタミンKの重水素同位体標識化合物を合成し、天然のビタミンK同族体はマウス体内でMK-4へ変換されることを科学的に証明した。

(7) 天然のビタミンK同族体の中でMK-4が最もγ-グルタミルカルボキシラーゼに対する補因子活性が高いことや核内受容体SXRの強力なアゴニスト活性を有すること、さらに前記(6)の結果からMK-4がビタミンKの活性体であることが明らかになった。

(8) ヒト体内でMK-4を合成する酵素UBIAD1を世界で初めて発見し、その構造・機能を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

- ① Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. Okano T(1), Nakagawa K(7) 他 5 人 *J Biol Chem*. 2008;283(17):11270-9 査読有
- ② Low Plasma Phylloquinone Concentration Is Associated with High Incidence of Vertebral Fracture in Japanese Woman. N Tsugawa, T Okano(7) 他 5 人 *J Bone Miner*

Metab, 2008, 26(1), 79-85 査読有

- ③ Design and synthesis of biologically active analogues of vitamin K₂: evaluation of their biological activities with cultured human cell lines. Y Suhara, K Nakagawa(3), T Okano(6) 他 3 人 *Bioorg Med Chem*. 2008 Mar 15;16(6):3108-17. 査読有
- ④ Synthesis and development of biologically active fluorescent-labeled vitamin K analogues and monitoring of their subcellular distribution. Y Suhara, K Nakagawa(5), T Okano(8) 他 5 人 *Tetrahedron* 2008 Volume 64, Issue 37, 8789-8796 査読有
- ⑤ Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese woman. Yokogoshi Study. K. Nakagawa(2), T. Okano(14) 他 12 人 *Bone*, 2008, 42, 271-277 査読有
- ⑥ High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. A Kuwabara, T Okano(7) 他 6 人 *Osteoporos Int*. 2009 Jun;20(6):935-42. 査読有
- ⑦ The impact of lifestyle factors on serum 25-hydroxyvitamin D levels: a cross-sectional study in Japanese women aged 19-25 years. H Ohta, T Okano(9) 他 8 人 *J Bone Miner Metab*. 2009;27(6):682-8 査読有
- ⑧ Effect of vitamin D supplementation in the institutionalized elderly. M Himeno, T Okano(13) 他 12 人 *J Bone Miner Metab*. 2009;27(6):733-7 査読有
- ⑨ Improvement of vitamin D status in Japanese institutionalized elderly by supplementation with 800 IU of vitamin D(3). A Kuwabara, T Okano(15) 他 13 人 *J Nutr Sci Vitaminol*. 2009 Dec;55(6):453-8 査読有
- ⑩ Hypovitaminosis D and K are highly prevalent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly. A Kuwabara, T Okano(10) 他 9 人 *Asia Pac J Clin Nutr*.19(1)2010

49-56 査読有

- ⑪ Structure-activity relationships in the conversion of vitamin K analogues into menaquinone-4. Substrates essential to the synthesis of menaquinone-4 in cultured human cell lines. Y Suhara, K Nakagawa(6), T Okano(7) 他 4 人 *Bioorg Med Chem*. 2010 May 1;18(9):3116-24. 査読有
- ⑫ Effects of ED-71, a novel vitamin D analog, on bone formation of CYP27B1 knockout mice. 中川 公恵(1) 他 4 人 *Osteoporosis Japan* 18(2) [2010] 236~239 査読無
- ⑬ Role for vitamin D receptor in the neuronal control of the hematopoietic stem cell niche. Y Kawamori, K Nakagawa(8), T Okano(9) 他 9 人 *Blood*, 2010 116: 5528-5535 査読有
- ⑭ Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. K Nakagawa(1), T Okano(10) 他 8 人 *Nature*. 468,117-121, 2010 査読有
- ⑮ Structure-activity relationships in the conversion of vitamin K analogues into menaquinone-4. Substrates essential to the synthesis of menaquinone-4 in cultured human cell lines. Y Suhara, K Nakagawa(6), T Okano(7) 他 4 人 *Bioorg Med Chem*. 2010 18(9):3116-24. 査読有
- ⑯ New developments in research on vitamin K biosynthesis. K Nakagawa *Health Sci.*, 56, 623-31 査読有
- ⑰ Hypovitaminosis D and K are highly prevalent and independent of overall malnutrition in the institutionalized elderly. Kuwabara, T Okano(10) 他 9 人 *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(1):49-56. 査読有
- ⑱ High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment. M Shiraki, T Okano(6) 他 4 人 *J Bone Miner Metab*. 2010;28(5):578-84. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Conversion of vitamin K analogues to menaquinone-4 in osteoblastic cells. Suhara Y, et al. 30th American Society for Bone and Mineral Research 2008 9.15 Montreal Canada
- ② Menaquinone-4 derived from phylloquinone regulates osteoblast function. Nakagawa. K, et al. 30th American Society for Bone and Mineral Research 2008 9.14 Montreal Canada
- ③ Biological and nutritional significance of menaquinone-4 (Vitamin K1) that exists in animal tissues. Okano T, et al. 4th China-Japan International Conference on Vitamins 2008.10.15 Xi'an China
- ④ ビタミン K 同族体の骨における Menaquinone-4 への変換 中川公恵 日本薬学会第 129 年会 2009.3.28 京都
- ⑤ ヒトビタミン D 依存性クル病 I 型モデルマウス (CYP27B1-KO) における骨形成異常の改善に対するカルシウム (Ca) 補給効果について 中川公恵 日本薬学会第 129 年会 2009.3.28 京都
- ⑥ 「CYP27B1 遺伝子欠損マウスを用いたビタミン D 誘導体の骨形成作用の解析」ビタミン学会第 61 回大会 磯元啓吾, 中川公恵 (2), 岡野登志夫 (5) 他 2 人 2009 年 5 月 30 日 京都
- ⑦ A Novel Active Vitamin D Analogue, ED-71, Increases Bone Mass and Bone Strength more Efficiently than Alfacalcidol in CYP27B1 Knockout Mice. 岡野登志夫 The 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2009.9.11,12 米国 Denver
- ⑧ メナキノン-4 は軟骨細胞の分化に伴い生合成され軟骨細胞機能を制御する 中川公恵 第 27 回日本骨代謝学会 2009.7.23 大阪
- ⑨ ビタミン K 生合成研究の新たな展開 中川公恵 第 13 回 Vitamin K & Aging 研究会 2010 年 2 月 20 日 経団連会館 (東京都)
- ⑩ 骨芽細胞における Menaquinone-4 (MK-4) 生合成に対する Bisphosphonate および Statin の相互作用の解析 中川公恵 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30

日 桃太郎アリーナ (岡山県)

- ⑪ ビタミン D 誘導体の軟骨細胞分化に対する作用～CYP27B1 knockout マウスを用いた解析～ 中川公恵 日本ビタミン学会第 62 回大会 2010 年 6 月 11 日 アリーナ (岩手県)
- ⑫ 骨におけるビタミン K の生合成とその意義 中川 公恵 日本骨粗鬆症学会 学術講演会 2010 年 7 月 8 日 マリオットアソシアホテル (愛知県)
- ⑬ CYP27B1 および VDR 遺伝子欠損マウスを用いた軟骨細胞分化におけるビタミン D の作用解析 中川公恵 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 年 7 月 21 日 京王プラザホテル (東京都)

[図書] (計 4 件)

- ① 「骨折予防からみたビタミン K の栄養状態」 岡野 登志夫, 津川 尚子, 須原 義智 他 ライフサイエンス社 Osteoporosis Japan 16(2) 2008 6 ページ
- ② 「骨粗鬆症診療における VD, VK の測定の意義」 岡野 登志夫 ライフサイエンス社 Geriatric Medicine 2008, 46(8) 5 ページ
- ③ 「ビタミンと腎」 岡野登志夫 医薬ジャーナル社 2010 20 ページ
- ④ 「骨代謝マーカー」 岡野登志夫 医薬ジャーナル社 2010 5 ページ

[その他]

ホームページ等
 神戸薬科大学ホームページ 2010/10/18
[プレスリリース 「ヒトにビタミン K2 \(メナキノン-4\) を特異的に作る酵素が存在した。メナキノン-4 生合成酵素が骨粗鬆症治療や脳神経変性疾患治療の鍵を握る」 衛生化学研究室の研究成果がイギリス科学雑誌 Nature に掲載されます。\(PDF\)](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 登志夫 (OKANO TOSHIO)
 神戸薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：20131542

(2) 研究分担者

中川 公恵 (NAKAGAWA KIMIE)
 神戸薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：90309435