

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 B
研究期間：2008～2009
課題番号：20790082
研究課題名（和文） 遺伝子改変細胞・動物を用いたビタミンDとビタミンKの分子栄養学的骨形成作用の解析
研究課題名（英文） Analysis of molecular nutritional function of vitamin D and vitamin K using targeted gene knockout cells and mice.
研究代表者
中川公恵（NAKAGAWA KIMIE）
神戸薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：90309435

研究成果の概要（和文）：ヒトでは、ビタミン D 栄養状態の指標である血中 25-Hydroxyvitamin D 濃度が低値である程、骨粗鬆症の発症率が高くなることが疫学研究により明らかにされている。また、骨基質タンパク質の Gla 化を担い、骨質改善効果が報告されているビタミン K には、血中ビタミン K 濃度と骨折率に負の相関性が認められている。しかし、ビタミン D とビタミン K の相互の影響に関しては不明な点も多い。本研究では、遺伝子欠損あるいは改変細胞・動物を用い、骨形成におけるビタミン D とビタミン K の相互作用の解析を行った。

ビタミン K の作用については、骨芽細胞に対する作用を解析した。まず重水素標識ビタミン K 同族体を合成し、これらが細胞内でメナキノン-4（MK-4）に変換されることを明らかにした。次いで、MK-4 の側鎖構造に修飾を加えた誘導体を合成し、MK-4 への変換活性および steroid and xenobiotic receptor（SXR）のリガンドとしての活性を評価した。その結果、側鎖の不飽和度やメチル基の有無により、MK-4 への変換効率や SXR を介した作用が異なることが明らかとなった。また、骨芽細胞において MK-4 を生合成する酵素の探索を行い、ビタミン K 同族体を MK-4 へ変換する活性を有する酵素と予想される候補因子を見いだすことに成功した。

ビタミン D の作用については、先天的に $1\alpha,25\text{-D}_3$ 欠乏となり、くる病症状を呈するビタミン D 1 位水酸化酵素（CYP27B1）遺伝子欠損マウス（CYP27B1-KO）を独自に作出し、これを用いてビタミン D 誘導体による作用を解析した。CYP27B1-KO マウスを離乳後、すぐにビタミン D 誘導体を投与し、6 週間飼育後における骨の状態を解析した。その結果、ビタミン D 誘導体を投与することにより、CYP27B1-KO マウスに出現する低 Ca 血症、骨形成異常や成長不全は完全に回復した。このことから、今回初めて内因的な $1\alpha,25\text{-D}_3$ の影響なく、ビタミン D 誘導体のみによる骨形成作用を解析することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Vitamin D plays an important role in regulation of calcium homeostasis and bone metabolism. Among vitamin D metabolites, 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) can be used for the evaluation of vitamin D nutritional status. Vitamin D insufficiency is one of the risk factors of osteoporosis. Secondary hyperparathyroidism induced by low serum concentration of 25-hydroxyvitamin D (25-D), which is a most important nutritional marker to evaluate vitamin D status, results in bone loss and increase of fracture risk. Vitamin K is well known for its role in the synthesis of a number of blood coagulation factors. Vitamin K is also an important factor for bone metabolism via γ -carboxylation of vitamin K-dependent proteins such as osteocalcin (OC) and matrix Gla protein. Low dietary phylloquinone (PK) intake has been shown to be associated with increased hip fracture risk, notably among postmenopausal women. Low dietary PK intake is also associated with low bone mineral density (BMD) at the hip and spine in pre- and postmenopausal women, and circulating levels of vitamin K1 or K2 were reported to be decreased in patients with hip fracture. However, interaction of vitamin D and vitamin K is

not made clear in bone metabolism. In the present study, we analyzed the relationship of vitamin D and vitamin K in bone metabolism by targeted gene knockout cells and mice.

To identify the conversion of vitamin Ks to menaquinone-4 (MK-4) on osteoblasts, we synthesized the deuterium-labeled vitamin K compound. We made clear that vitamin Ks derivatives are converted to MK-4 in osteoblasts. Moreover, we synthesized the side-chain modified vitamin K compounds and measured these SXR-dependent transcriptional activities on SXR-target gene promoter. As a result, SXR-dependent transcriptional activity of these compounds were affected by side-chain modification (demethylation and saturation). Further, we investigated the conversion enzyme of vitamin Ks to MK-4 and identified the candidate gene for MK-4 biosynthesis in osteoblasts.

For the research of vitamin D, we created the CYP27B1 gene knockout mice (CYP27B1-KO) which were inherently $1\alpha,25\text{-D}_3$ deficient and rickets. $1\alpha,25\text{-D}_3$ appears to have a superior efficacy in reducing incidence of fractures in osteoporotic patients compared to its efficacy in maintaining/increasing bone mass. It would be probable that the incidence of fractures may be further reduced if an active vitamin D analogue possessing potent bone mass-increasing activity were to become available. Based on this idea, a unique analogue of $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ of bearing a hydroxypropoxy substituent at the 2β -position of A-ring has been developed in Japan. In this study, the efficacy of this analog in increasing bone mineralization and bone strength was evaluated in CYP27B1-KO. CYP27B1-KO and wild-type mice (WT), after weaning, were orally administered either MCT-vehicle, vitamin D analog ($0.25\ \mu\text{g/kg}$) three times per week for 6 weeks. At 6 weeks after the initiation of administration, the animals were sacrificed and lumbar spines, and femoral bones were excised for immunostaining, taking soft X-ray photographs, microcomputed tomography, mechanical testing, contact microradiography, and histomorphometrical measurements. CYP27B1-KO treated with MCT-vehicle had no serum $1\alpha,25\text{-D}_3$ and moderate levels of serum 25-hydroxyvitamin D3. They were growth retarded, hypocalcemic, and had poor bone mineralization and strength compared to WT treated with MCT-vehicle during the experimental period. Treatment with vitamin D analog restored completely at 6 weeks after the initiation of administration compared to WT treated with vitamin D analog. These results suggest that vitamin D analog acts on bone independent of endogenous $1\alpha,25\text{-D}_3$.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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： (1) ビタミンD (2) ビタミンD受容体 (3) CYP27B1 (4) $1\alpha,25\text{-D}_3$

(5) ノックアウトマウス (6) ビタミンK (7) MK-4 (8) SXR

1. 研究開始当初の背景
ヒトでは、ビタミンD栄養状態の指標である
血中 25-OH-D 濃度が低値である程、骨粗鬆

症の発症率が高くなることが疫学研究により明らかにされている。また、骨基質タンパク質の Gla 化を担い、骨質改善効果が報告さ

れているビタミン K にも、血中ビタミン K 濃度と骨折率に負の相関性が認められている。しかし、ビタミン D とビタミン K の相互の影響に関しては不明な点も多い。国内では、ビタミン D の骨形成および骨吸収に対する作用は様々に研究されており、カルシウム代謝調節、骨芽細胞の分化や破骨細胞の形成など、骨リモデリングに重要な役割を担うことが明らかとなっている。ビタミン K については、骨質を改善する効果がある他、破骨細胞のアポトーシスを誘導するなど、骨形成に働くことが報告されている。しかし、ビタミン D とビタミン K の骨形成・骨吸収における相互作用は十分に解析されておらず、動物個体レベルでの研究では、両者の併用が骨形成に効果的に働くという報告もあれば、逆に各々単独の場合と差異がないといった報告もあり統一されていない。

ビタミン D は、骨基質タンパク質のオステオカルシン (OC) やマトリックス Gla タンパク質 (MGP) の産生を促進する働きを担い、ビタミン K は γ -glutamylcarboxylase (GGCX) を活性化することにより OC や MGP を Gla 化する。臨床では、ビタミン D とビタミン K は共に骨粗鬆症予防や治療において医療現場で中心的役割を担っている。疫学研究では、ビタミン D 栄養の指標である 25-OH-D 濃度が低いほど骨折率は高く、またビタミン K 濃度も低いほど骨折率しやすいことが明らかにされており、骨形成および骨粗鬆症予防・治療における両ビタミンの生理的役割は、極めて重要であると考えられている。しかし、骨形成におけるビタミン D とビタミン K の相互の影響に関して解析している報告は少なく、特に骨形成や骨吸収のどのポイントで両者が相加的あるいは相乗的に有効性を示すのかという点の分子レベルでの解析は行われていない。

また、申請者は最近、ビタミン K (フィロキノン: PK, メナキノン-4: MK-4, メナジオン: K3) のうち、MK-4 がヒトやマウスの組織中に高濃度に存在し、PK や K3 から生体内で MK-4 が生合成される事実を明らかにしている (J.Biol.Chem. に 2008 年掲載予定)。この事実は、栄養素として摂取する PK (植物由来) が生体内で MK-4 となり、生理機能を発揮することを意味し、栄養学的観点において、ビタミン K のうち MK-4 が生理作用を發揮しているといえる。

申請者は、東京大学加藤茂明教授よりビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子欠損マウスを恵与いただき保有維持しているがこれに加え、昨年独自に活性型ビタミン D 生合成の鍵酵素である CYP27B1 の遺伝子欠損マウスを作出することに国内で初めて成功し、活性型ビタミン D が先天的に欠失した動物も保有している。したがって、VDR 欠損と CYP27B1

欠損という活性型ビタミン D の作用が受容体レベルあるいは生合成酵素レベルで欠損した動物を用いた骨解析およびビタミン K の生理的役割の解析が可能な環境にある。世界的には VDRKO や CYP27B1-KO マウスを保有する研究機関はあるが、国内では、CYP27B1-KO マウスを作製したのは申請者の研究室が初めてで、ビタミン D とビタミン K の相互作用の解析に適用した例はない。これらの動物を用いることで、骨形成におけるビタミン D のリガンドおよび受容体レベルでの重要性の解析、ビタミン D 作用が現れない動物におけるビタミン K 単独の骨形成作用の解明が可能となる。

2. 研究の目的

遺伝子欠損あるいは改変細胞・動物を用いて、骨形成におけるビタミン D とビタミン K の相互作用を解析する。遺伝子欠損マウスとしては、VDR 遺伝子欠損マウス (VDRKO) と CYP27B1 遺伝子欠損マウス (CYP27B1-KO) を用い、さらに両マウスのヘテロ接合体を交配することにより VDR と CYP27B1 のダブルノックアウトマウス (W-KO) を作出する。W-KO は、究極的なビタミン D 作用不全状態となるため、これら KO マウスの骨を解析することによりビタミン D の骨形成作用におけるリガンドおよび VDR 各々の役割を解析する。細胞レベルでは、siRNA により VDR や CYP27B1 遺伝子をノックダウンした骨芽細胞を樹立し、VDR や 25-OH-D および $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、ビタミン K による骨基質タンパク質の Gla 化について、骨芽細胞機能における重要性を明らかにする。また、VDR および CYP27B1 遺伝子ノックアウト (KO) マウスから骨芽細胞および破骨細胞を培養し、骨形成・骨吸収機能における VDR や 25-OH-D の代謝の影響を検討する。さらにビタミン D 作用の現れない動物 (VDRKO, CYP27B1-KO, W-KO マウス) におけるビタミン K の作用を解析する。

また、ビタミン K は、骨基質タンパク質の活性化を担う GGCX の補酵素として働くが、ビタミン K のうち、ビタミン K2 (menaquinone-4: MK-4) のみが、核内受容体 steroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとして働き、骨形成における細胞外マトリックスの生合成を誘導する作用を持つ。申請者は、安定同位体標識した PK や K3 (重水素標識 PK および K3) を基質分子として用いることにより、マウス生体内 (特に脳) で MK-4 重水素標識体が生合成される事実をすでに明らかにしている。そこで、同手法により、MK-4 の生合成が骨においても行われていることを明らかにする。さらに MK-4 の生合成に関与する酵素を同定するとともに、骨芽細胞においてその酵素のノック

ダウンを行い、MK-4 生合成の有無が骨形成に与える影響を解析する。また、ビタミン K 依存的に活性化される GGCX に加え、ビタミン K 還元酵素 VKOR や核内受容体 SXR の強制発現およびノックダウンを行い、骨芽細胞における MK-4 生合成や骨形成に与える影響を検討する。このように、ビタミン D およびビタミン K 各々の骨における生理作用を遺伝子欠損動物および細胞を用いて解析し、さらに両者の組み合わせによる起こる骨形成作用を評価する。

本研究は、骨形成におけるビタミン D とビタミン K の相互作用の解明に重要な治験を与えるものであり、両ビタミンの有効性を分子栄養学的観点から立証することで、骨粗鬆症治療・予防戦略に有益な情報を提供できるものと確信する。

ビタミン D とビタミン K の骨形成・骨吸収に対する作用に関しては、各々単独で解析されているものが多く、細胞・動物レベルでの総合的な解析はほとんどない。ビタミン D とビタミン K の併用による相互の影響は、骨芽細胞や破骨細胞機能の制御には非常に重要である。VDR 欠損マウスのみならず、CYP27B1 欠損マウスを保有する研究機関は国内では申請者の所属する研究室のみであり、ビタミン D の骨芽細胞や破骨細胞機能制御を受容体欠損とリガンド欠損の両面からアプローチできる研究は他に例がない。また、細胞内や組織中ビタミン D および K 濃度の LC-APCI-MS/MS による定量法、ビタミン K 依存性 GGCX 活性の測定系もすでに確立済みである。特に、安定同位体標識したビタミン D およびビタミン K 化合物を独自に合成して所有しているため、高精度な分析が可能である。ビタミン K については、生体内で MK-4 が生合成される事実を科学的に立証したのは申請者が初めてであり、これは骨形成においても分子栄養学的に非常に重要な発見である。以上のように、ビタミン D とビタミン K 両方の研究を詳細に遂行している研究室は国内外を通して類はない。栄養素の枠を超え、生体内でホルモンとしての役割を担うビタミン D と K の骨に対する相互作用を細胞レベルから動物レベルまで統一的に解析することは、骨の健康維持および骨粗鬆症予防・治療において有益な情報を提供することになる。

3. 研究の方法

平成 20 年度ではビタミン D およびビタミン K 各々の骨形成に対する作用を詳細に解析し、平成 21 年度にはビタミン D とビタミン K の相互の利点を最大限に活用する応用性を見だし、分子栄養学的有効性を明らかにすることを目的に研究を遂行する。
<平成 20 年度>

○細胞レベルにおけるビタミン D およびビタミン K の作用の解析

ビタミン D 受容体 (VDR) や 25-OH-D を活性型である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}$ に代謝するビタミン D1 位水酸化酵素 (CYP27B1)、ビタミン K 依存性 γ -glutamyl carboxylase (GGCX) や核内受容体 SXR などの遺伝子発現をノックダウンした骨芽細胞を樹立する。申請者は、すでに siRNA により VDR をノックダウンした骨芽細胞を樹立し、VDR 発現の低下した細胞では骨形成能が亢進し、破骨細胞形成能が低下していることを明らかにしている。そこでこれに加え CYP27B1 の発現低下が、骨芽細胞機能に与える影響を解析するため、siRNA 法によりノックダウン細胞を樹立し、VDR と CYP27B1 などのダブルノックダウン細胞の樹立も行う。また、ビタミン K は GGCX の補酵素として働き骨基質タンパク質の機能を制御することから、VDR や CYP27B1 ノックダウン骨芽細胞の GGCX 活性を測定し、ビタミン K の利用性を明らかにする。さらに、GGCX や MK-4 の核内受容体である SXR をノックダウンすることに伴う骨芽細胞の分化・石灰化能、その関連因子の発現変化について解析する。現在申請者は MK-4 が PK や K3 から生体内で生合成されることを世界で初めて科学的に立証した (J. Biol. Chem. に掲載予定) ことから、骨形成におけるビタミン K の作用が MK-4 への変換を介して、すべて MK-4 によって担われていることが強く示唆される。そこで、骨においても MK-4 が生合成されることを明らかにするため、株化骨芽細胞や初代培養骨芽細胞を用いて、PK および K3 からの MK-4 の生合成を証明する。この際、内因的に含まれるビタミン K と MK-4 の生合成基質となる化合物ならびに生合成される MK-4 を完全に分離して解析するため、PK, K3, MK-4 の安定同位体標識化合物を用いる。この安定同位体はビタミン K 化合物に共通に存在するナフトキノン環の水素を重水素で置換しているため、天然の化合物よりも質量が各々 7 分子大きい。このため LC-APCI-MS/MS にて測定することで、基質化合物および生合成される MK-4 重水素標識体を特異的に検出することができる。この手法は申請者の所属する研究室のみでしか行われていない非常に高精度な方法である。また、骨を構成する細胞における MK-4 の生合成は、骨形成に強い影響を与えている可能性が極めて高いと予想される。そこで生合成された MK-4 の骨形成に対する作用について、骨芽細胞をビタミン K 存在下で長期培養し、コラーゲン沈着や石灰化に与える影響を検討する。また、SXR を介した転写調節作用については、標的遺伝子である Matrilin-2 や Tushki などの発現を RT-PCR により定量し、さらに SXR 応答配列 (SXRE) を組み込んだレポーターベ

クターを用いて転写活性を評価する。以上のように、平成 20 年度はビタミン D とビタミン K の各々による骨芽細胞機能への影響を詳細に解析し、その成果をもとに次年度では両ビタミンによる共通の制御機構および独自の制御機構を包括して、骨形成に最も有効な両ビタミンの応用性の探索を目指す。○動物レベルにおけるビタミン D およびビタミン K の作用の解析

申請者の所属する研究室では、VDRKO マウスを東大分生研 加藤茂明教授より御恵与いただいております。CYP27B1-KO マウスは 2005 年末に申請者の所属する研究室にて作出に成功している。CYP27B1-KO マウスは平成 19 年度内で Backcross を終了している。

VDRKO マウスおよび CYP27B1-KO マウスは共にクル病症状となるが、VDRKO マウスに比べ CYP27B1-KO マウスの方が軟骨の異常な過形成が起こっている。その原因は不明であり、これまでに報告はない。したがって、この両マウスの表現型の詳細な解析を行うことにより、リガンドと結合していない VDR の効果やリガンドである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の VDR を介さない作用を明らかにすることができる。これらマウスについては、骨標本を作製し von Kossa 染色により石灰化状態を、アルカリフォスファターゼ染色により骨芽細胞を酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色により破骨細胞の分布や数を評価する。骨密度を測定する他、骨質評価解析として、最新の分析手法であるラマン顕微システムを用い、骨を構成する原子の組成分析および構造解析を行い、両マウス間における分子レベルでの骨構造の違いを解明する。

また、マウスをビタミン K 欠乏飼料でマウスを飼育することにより、ビタミン K の組織内濃度は著しく低下することから、野生型マウスあるいは VDRKO や CYP27B1-KO マウスをビタミン K 欠乏飼料にて飼育し、骨強度・骨質・骨構造解析への影響を検討する。同時にビタミン K の重水素標識体の持続投与を行い、ビタミン K による骨形成促進作用を動物レベルで評価する。この際、組織中（特に骨中）のビタミン K 濃度を測定し、MK-4 の生合成と骨形成促進作用との関連性を調べる。

< 平成 21 年度 >

細胞レベルでは、野生型マウス、VDRKO および CYP27B1-KO マウスを用いて、新生児頭頂骨から骨芽細胞を初代培養し、骨髄細胞からは破骨細胞形成誘導因子により破骨細胞を形成させ、これらの細胞を用いて VDR 欠損と CYP27B1 欠損が細胞機能に与える影響を解析する。基本的な細胞機能としては、骨芽細胞に関しては、増殖能、コラーゲン合成能や石灰化能、骨形成関連遺伝子（オステオカルシン、BMP-2、Cbfa1 など）の発現を評価する。

破骨細胞については、TRAP 活性を染色により評価し、骨吸収活性を dentin slice を用いた pit assay により評価する。さらに DNA チップによりこれらの細胞の遺伝子発現の違いを網羅的に解析し、各遺伝子欠損マウス間で異なる発現レベルの遺伝子を見いだす。見いだした遺伝子については、その発現レベルを RNA およびタンパクレベルで確認すると共に、制御因子の探索を行う。また、これらの細胞に対してビタミン D やビタミン K を添加することによる骨芽細胞や破骨細胞の増殖・分化への影響を解析し、さらに発現変化が著しく起こる遺伝子について、DNA チップ解析を行う。これにより、ビタミン D とビタミン K 各々単独で制御する因子と両ビタミンが共に制御する因子が明らかにすることができる。

骨における MK-4 の生合成については、これら KO マウスより単離培養した骨芽細胞を用い、MK-4 の生合成機構に対してビタミン D が制御能を有するのかを検証する。また、骨芽細胞のタンパク抽出物につき、MK-4 の Biotin 標識化合物を用いて、Avidin beads による pull down assay を行い、得られたタンパクを MALDI-TOF-MS にて解析することにより、MK-4 生合成を担う酵素の特定を目指す。

動物レベルでは、VDRKO と CYP27B1-KO マウスのヘテロマウス同士を交配することにより、両遺伝子のダブルノックアウトマウスの作出を行う。ビタミン D やビタミン K の組織中濃度の測定系は完備済みであることから、これら遺伝子欠損動物におけるビタミン D およびビタミン K 濃度や代謝についても解析を行う。また、これらのマウスを高 Ca 飼料にて飼育することにより、低 Ca 血症に伴う表現型は改善される。そこで、高 Ca 飼料飼育した各 KO マウスの表現型の際を比較することにより、ビタミン D による骨形成作用における VDR の果たす役割と $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の果たす役割の違いを解明する。さらに、ビタミン K 欠乏飼育を組み合わせることで、ビタミン D 作用が現れない環境下におけるビタミン K のみによる骨形成効果を明らかにすることができる。また、重水素標識ビタミン K (PK, MK-4 または K3) を補給することにより、投与化合物または生合成される MK-4 の骨への移行性や蓄積性を評価し、ビタミン K の骨形成に果たす効果を明らかにする。

以上のように、細胞・個体レベルで骨形成におけるビタミン D 作用とビタミン K 作用を総合的視野で解析し両ビタミンの利点・欠点を総合的に解明することで、利点のみを活かした分子栄養学的応用性を見いだす。

4. 研究成果

(1) 平成20年度

ヒトでは、ビタミン D 栄養状態の指標である

血中25-Hydroxyvitamin D濃度が低値である程、骨粗鬆症の発症率が高くなることが疫学研究により明らかにされている。また、骨基質タンパク質のG1a化を担い、骨質改善効果が報告されているビタミンKには、血中ビタミンK濃度と骨折率に負の相関性が認められている。しかし、ビタミンDとビタミンKの相互の影響に関しては不明な点も多い。本研究では、遺伝子欠損あるいは改変細胞・動物を用い、骨形成におけるビタミンDとビタミンKの相互作用の解析を行っている。

ビタミンKの作用については、骨芽細胞に対する作用を解析した。まず、ビタミンKの種々の同族体を用いて、それらが細胞内で活性リガンドとしての作用を有するメナキノ-4 (MK-4) に変換されるのかを検討した。その結果、すべての同族体が骨芽細胞内でMK-4に変換された。この変換は、マウスに安定同位体標識した各ビタミンK同族体を投与した場合にも認められ、骨中MK-4濃度が増加した。また、MK-4がsteroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとして細胞外基質タンパクの発現を促進することから、MK-4および新規ビタミンK誘導体のSXRを介した活性の評価系として、SXR応答配列 (SXRE) を組み込んだ luciferase reporter assayおよびSXR-GAL4 hybrid luciferase assayを構築した。

ビタミンDの作用については、骨芽細胞に対する石灰化促進作用を検討した。その結果、ビタミンDである $1\alpha, 25\text{-D}_3$ の添加により石灰化が亢進すること、骨芽細胞においてビタミンD受容体 (VDR) を欠損させるとさらに石灰化が亢進することがわかった。また、ビタミンD1位水酸化酵素 (CYP27B1) を欠損させたマウス (CYP27B1-KO) を作出した。このマウスは、先天的に $1\alpha, 25\text{-D}_3$ 欠乏となり、くる病症状を呈した。このCYP27B1-KOに、骨粗鬆症治療薬として臨床応用の可能性があるビタミンD誘導体の投与を行うことにより、今後内因的な $1\alpha, 25\text{-D}_3$ の影響なく、ビタミンD誘導体のみによる骨形成作用が解析可能となる。

(2) 平成21年度

ビタミンKの作用について、骨芽細胞に対する作用を解析した。平成20年度にビタミンK同族体が細胞内でメナキノ-4 (MK-4) に変換されることを明らかにしたことから、MK-4の側鎖構造に修飾を加えた誘導体を合成し、MK-4への変換活性およびsteroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとしての活性を評価した。その結果、側鎖の不飽和度やメチル基の有無により、MK-4への変換効率やSXRを介した作用が異なることが明らかとなった。また、骨芽細胞においてMK-4を生合成する酵素の探索を行い、ビタミンK同族体をMK-4へ変換する活性を有する酵素と予想される候補因子を見いだすことに成

功した。

ビタミンDの作用については、平成20年度に作出した先天的に $1\alpha, 25\text{-D}_3$ 欠乏となり、くる病症状を呈するビタミンD1位水酸化酵素 (CYP27B1) 遺伝子欠損マウス (CYP27B1-KO) を用いて、ビタミンD誘導体による作用を解析した。CYP27B1-KOマウスを離乳後、すぐにビタミンD誘導体を投与し、6週間飼育後における骨の状態を解析した。その結果、ビタミンD誘導体を投与することにより、CYP27B1-KOマウスに出現する低Ca血症、骨形成異常や成長不全は完全に回復した。このことから、今回初めて内因的な $1\alpha, 25\text{-D}_3$ の影響なく、ビタミンD誘導体のみによる骨形成作用を解析することに成功した。

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6件)

① Toshio Okano, Yuka Shimomura, Makiko Yamane, Yoshitomo Suhara, Maya Kamao, Makiko Sugiura, Kimie Nakagawa. Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J. Biol. Chem.* 査読有 283(17), 11270-9 (2008).

② Yoshitomo Suahara, Shinya Abe, Aya Murakami, Yuka Shimomura, Kimie Nakagawa, Maya Kamao, Naoko Tsugawa, Toshio Okano. Synthesis and development of biologically active fluorescent-labeled vitamin K analogues and monitoring of their subcellular distribution. *Tetrahedron* 査読有 64, 8789-8796 (2008).

③ Yoshitomo Suhara, Yoshihisa Hirota, Kimie Nakagawa, Maya Kamao, Naoko Tsugawa, Toshio Okano. Design and synthesis of biologically active analogues of vitamin K2: evaluation of their biological activities with cultured human cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 16(6), 3108-17 (2008).

④ Yoshitomo Suhara, Akimori Wada, Yoji Tachibana, Masato Watanabe, Kanae Nakamura, Kimie Nakagawa, Toshio Okano. 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. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有 18, 3116-3124 (2010).

⑤ Kimie Nakagawa, Keigo Isomoto, Toshiyuki Sakaki, Shigeaki Kato, Toshio

Okano. Effects of ED-71, a novel vitamin D analog, on bone formation of CYP27B1 knockout mice. Osteoporosis Japan, 査読無 18 (2010) in press.

⑥ Kimie Nakagawa, In vivo metabolism of vitamin K: in relation to the conversion of vitamin K1 to MK-4. Clin Calcium. 査読無 19, 1779-1787 (2010).

[学会発表] (計 10 件)

① 中川公恵, 下村祐加, 廣田佳久, 須原義智, 岡野登志夫

日本ビタミン学会第 60 回大会 (2008. 6. 13 仙台) 「骨における Menaquinone-4 の生合成」

② Kimie Nakagawa, Natsumi Sawada, Yoshitomo Suhara, Toshio Okano. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2008. 9. 14 Montreal) Menaquinone-4 Derived from Phylloquinone Regulates Osteoblast Function.

③ 中川公恵, 内野由理, 澤田夏美, 須原義智, 岡野登志夫. 第 58 回日本薬学会近畿支部大会 (2008. 10. 26 神戸) 「骨芽細胞におけるビタミン K の生合成と細胞機能」

④ 磯元啓吾, 中川公恵, 榊 利之, 加藤茂明, 岡野登志夫. 第 58 回日本薬学会近畿支部大会 (2008. 10. 26 神戸) 「高カルシウム飼料で飼育した 25-Hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase 遺伝子欠損マウス (CYP27B1-KO) の表現型解析」

⑤ 中川公恵, 下村祐加, 廣田佳久, 須原義智, 岡野登志夫. 第 26 回日本骨代謝学会 (2008. 10. 31 大阪) 「脳および骨は Menaquinone-4 を生合成する」

⑥ 磯元啓吾, 中川公恵, 榊 利之, 加藤茂明, 岡野登志夫. ビタミン学会第 61 回大会 (2009 年 5 月 30 日) 「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」

⑦ Toshio Okano, Kimie Nakagawa, Keigo Isomoto, Naoko Okuda, Natsumi Sawada, Toshiyuki Sakaki, Shigeaki Kato. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2009. 9. 11-12 Denver) A Novel Active Vitamin D Analogue, ED-71, Increases Bone Mass and Bone Strength more Efficiently than Alfacalcidol in CYP27B1 Knockout Mice.

⑧ 中川公恵, 奥田直子, 澤田夏美, 内野由理, 岡野登志夫. 第 27 回日本骨代謝学会 (2009 年 7 月 23 日 大阪) 「メナキノ-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」

⑨ 中川公恵, 磯元啓吾, 澤田夏美, 榊 利之, 加藤茂明, 岡野登志夫. 第 11 回日本骨粗鬆症学会 (2009 年 10 月 15 日 名古屋)

「新規活性型ビタミン D 誘導体 ED-71 の骨形成作用に関する CYP27B1 遺伝子欠損マウスを用いた解析」

⑩ 中川公恵, 第 11 回日本骨粗鬆症学会イブニングセミナー (2009 年 10 月 14 日 名古屋) 「ビタミン K 生合成機構の新たな展開」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当無し

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)

該当無し

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

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川公恵 (NAKAGAWA KIMIE)

研究者番号: 90309435

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当なし