

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 6日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659166

研究課題名（和文） 25(OH)vitamin Dによる lipid raft 機能調節機構の検討

研究課題名（英文） Regulatory roles of 25(OH)vitamin D on lipid raft

研究代表者

松井 功 (MATSUI ISAO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60456986

研究成果の概要（和文）：我々は本研究で 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]が、1, 25-dihydroxy vitamin D [1, 25(OH)₂D]に変換されることなく、直接的生理作用を発揮することを明らかにした。その機序として、25(OH)D のビタミン D 受容体 (VDR) への直接作用だけではなく、25(OH)D による lipid raft 機能調節が関与していることを示し、その治療応用への可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we showed that 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] itself has biological effects. The effects of 25(OH)D did not require its activation to 1, 25-dihydroxyvitamin D [1, 25(OH)₂D]. Our results suggested that 25(OH)D directly activates vitamin D receptor (VDR). Moreover, 25(OH)D modulated the functions of lipid raft.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	330,000	3,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード vitamin D、25(OH)vitamin D、lipid raft、腎保護、血管保護、レニン

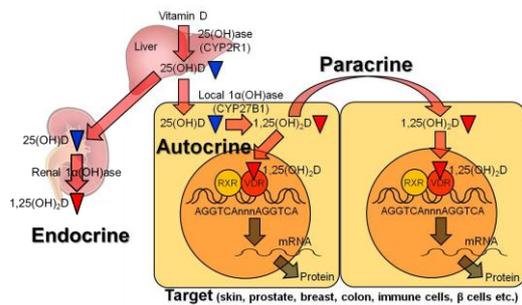
1. 研究開始当初の背景

(1) Vitamin D (VD)は生体の機能維持に必須である。食餌より摂取された VD はまず肝臓で 25-hydroxylase [25(OH)ase]により 25位が水酸化され 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]に変換される。次に腎近位尿細管において 25(OH)D-1-alpha-hydroxylase [1 alpha(OH)ase, CYP27B1]により 1位が水酸化され、活性型 VD すなわち 1, 25-dihydroxy vitamin D [1, 25(OH)₂D]となる。活性型 VD は核内受容体[vitamin D 受容体(VDR)]に結合し、

ターゲット遺伝子の発現を調節する事でその作用を発揮するが、25(OH)D の VDR への affinityは1, 25(OH)₂Dの1/100以下であり、VDR を介した転写調節に 25(OH)D の関与はほとんど無いと考えられていた(J Biol Chem. 1974;249:1251-57)。

(2) VDがCa, P代謝調節といった古典的な作用に加え、心血管障害の発症等に関与する事を示す疫学データが研究開始当初蓄積されつつあった(Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4:1508-39)。すなわち、VD 欠乏状態で

は、VD 充足状態と比べ心血管イベント発症が多く、死亡率も高いことが明らかにされつつあった。VD の活性型は $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ であり、 $25(\text{OH})\text{D}$ はその前駆体であることから、VD の臓器保護作用が血清 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度と相関することが想像されたが、多くの疫学研究の結果において、VD の臓器保護作用は血清 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度ではなく血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度と相関することが示されていた。研究開始当初、 $25(\text{OH})\text{D}$ 自体には生理活性が無いと考えられていたため、血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度がこれらイベント発症と関連するメカニズムとして、心臓や血管局所に発現する CYP27B1 が、血中 $25(\text{OH})\text{D}$ を局所において $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ に変換し、autocrine/paracrine として VDR を介して作用する機序 (下図参照) が提唱されていたが、詳細については全く分かっていなかった。



(3) 我々は血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度が副甲状腺機能に関連する事を、本研究開始時すでに疫学研究で明らかにしていた (Bone, 2009; 44:678-83)。また、血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度は心血管イベントのみならず、腎予後、糖代謝、骨格筋の機能維持等にも関与することが示唆されていた (J Bone Miner Res. 2008;23:974-9)。これらの結果から $25(\text{OH})\text{D}$ 自体が生理機能を発揮する場合、その機序は様々な細胞に普遍的に存在しうるものである事が示唆された。また VD はステロール骨格を持った分子であるため、コレステロール等との関連も示唆された。

2. 研究の目的

活性型 VD の前駆体である $25(\text{OH})\text{D}$ の充足状態において、腎不全進行/心血管イベント発症/死亡が抑制される機序について検討する。特に研究開始当初は、特段の根拠もなく、心血管などに発現する局所の CYP27B1 により局所において $25(\text{OH})\text{D}$ が $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ に変換され autocrine/paracrine 作用を発揮すると一般に考えられていたため、この仮説が正しいのかを検証する。また、これまで $25(\text{OH})\text{D}$ 自体が生理活性を持つとの概念が存在しなかったが、この考え方が正しいのか検証する。

3. 研究の方法

(1) $25(\text{OH})\text{D}$ 充足状態が腎不全進行に与える影響の検討・・・研究開始時に既に発表されていた論文において、血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 充足状態が腎不全進行に影響を与えることが報告されていた。しかし、体内の骨ミネラル代謝バランスは $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 、 $25(\text{OH})\text{D}$ 以外にも副甲状腺ホルモン (PTH)、線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23)、血清 Ca 値、血清 P 値など様々な要因によりコントロールされており、これらの各因子は互いに密接に関連しているため、本当に $25(\text{OH})\text{D}$ の充足状態が腎不全の進行に影響を与えるのか不明であった。このため、Osaka Vitamin D Study in Patients with CKD (OVIDS-CKD) コホートの腎不全進行スピードと各骨ミネラル代謝パラメーターの関連を調べ、 $25(\text{OH})\text{D}$ が本当に腎予後に影響を与えるのか調査した。

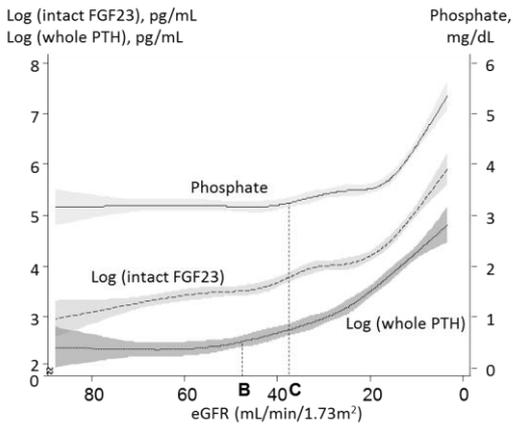
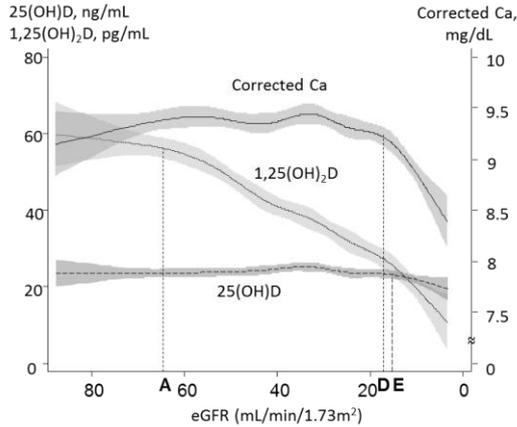
(2) CYP27B1 ノックアウト (KO) 動物を用いた検討・・・本研究開始当初は、心血管局所でビタミン D が活性化されることが $25(\text{OH})\text{D}$ 充足による臓器保護作用に重要であると考えられていたので、CYP27B1KO マウスを用いることで全身のビタミン D 活性化を阻害し、 $25(\text{OH})\text{D}$ に直接的な臓器保護作用があるか否かを検討した。

(3) $25(\text{OH})\text{D}$ が lipid raft に与える影響の検討・・・Lipid raft はコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜マイクロドメインであり、様々なシグナルを伝達する受容体などが同領域に集積し、細胞の正常なシグナル伝達に重要な役割を果たす。 $25(\text{OH})\text{D}$ はステロール骨格をもった分子であり、ショ糖密度勾配超遠心法などを用いて、 $25(\text{OH})\text{D}$ が lipid raft に与える影響を評価した。

4. 研究成果

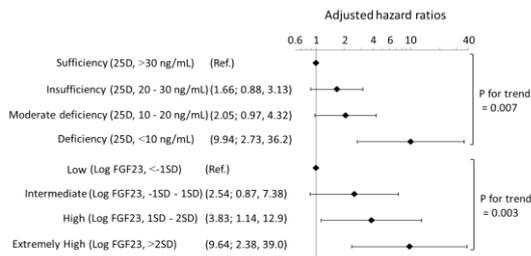
(1) $25(\text{OH})\text{D}$ の充足状態と腎不全の進行

① 腎機能障害と骨ミネラル代謝因子 OVIDS-CKD コホートエントリー時の腎機能と各骨代謝ミネラル因子との関係を示す (次ページ図)。腎機能低下に伴い、FGF23 上昇、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 低下、PTH 上昇、P 上昇、Ca 低下、 $25(\text{OH})\text{D}$ 低下の順で変化することが明らかとなった。他の因子と比較し、血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度は腎機能にかかわらず、比較的一定に保たれる傾向があった。一方、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ は腎機能低下とともにほぼ直線的に低下した。

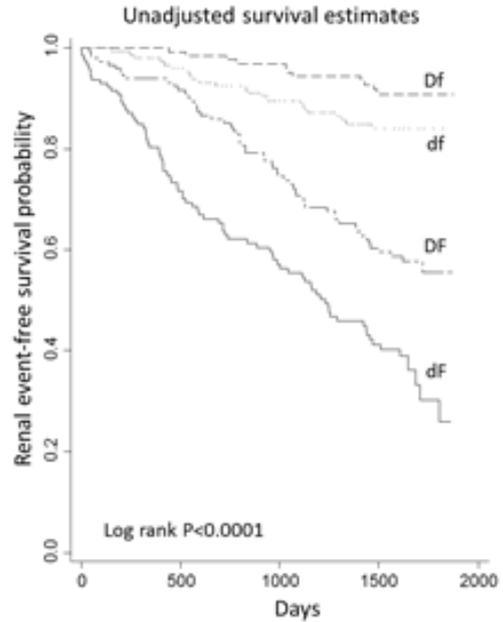


② 25(OH)D 充足状態と腎予後

各骨代謝ミネラル因子と腎予後の関係を検討したところ、血清 25(OH)D 濃度と FGF23 濃度のみが独立して腎予後に影響を与える因子であることが判明した (下図)。



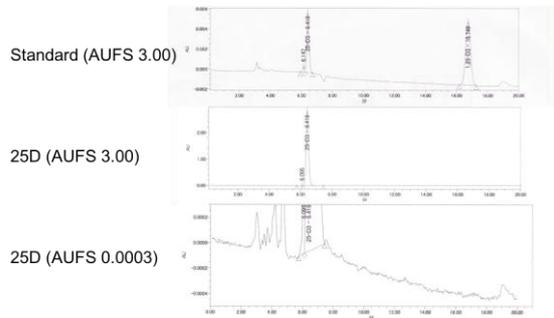
また、25(OH)D、FGF23 とも中央値でそれぞれ 2 群にわけ、25(OH)D 高値群(D)、低値群(d)、FGF23 高値群(F)、低値群(f)で表し描いた腎予後についての Kaplan-Meier 曲線を、右上段に示す。FGF23 高値の状態であっても、低値の状態であっても、25D 充足状態の群において、腎予後が良好であることが判明し、血清 25(OH)D が他の因子と独立して腎予後と関連することが明らかとなった。



(2) CYP27B1KO マウスを用いた検討

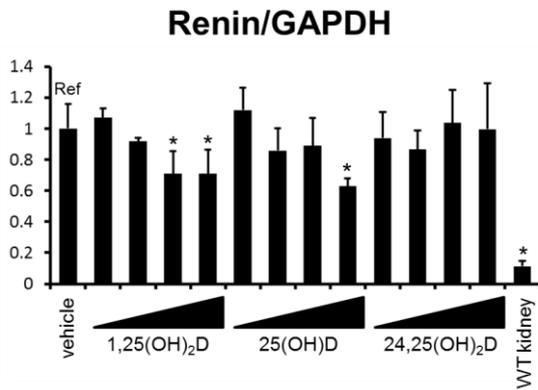
① 実験に使用する 25(OH)D の純度検定

通常、血清 25(OH)D 濃度は血清 1, 25(OH)₂D 濃度の約 1,000 倍あり、実験に用いる 25(OH)D に 1, 25(OH)₂D が混入していると、25(OH)D の作用を見ているのか 1, 25(OH)₂D の作用を見ているのか全く分からなくなってしまうため、まず試薬の純度を検定した。

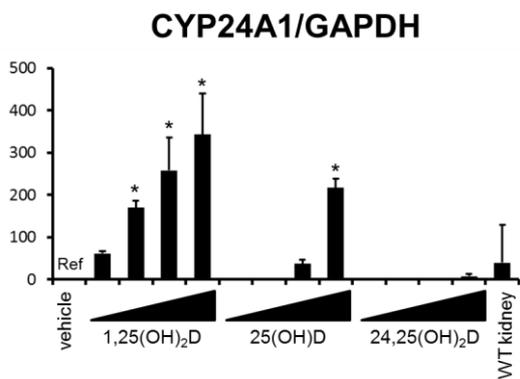


HPLC で標準サンプルを展開したところ保持時間は 25(OH)D: 6.418 min、1, 25(OH)₂D: 16.749 min であった (上図上段)。検体 10 μg では、6.419 min の 25(OH)D に一致する単一ピークを認めた以外、265 nm に紫外吸収を持つ化合物は検出されなかった (上図中央)。さらに 1, 25(OH)₂D の溶出位置 16.749 min 付近を 10,000 倍の高感度 (AUFS 0.0003) で解析したが、この位置に全くピークは認められず (上図下段)、本実験に用いた 25(OH)D が純品であることを確認した。

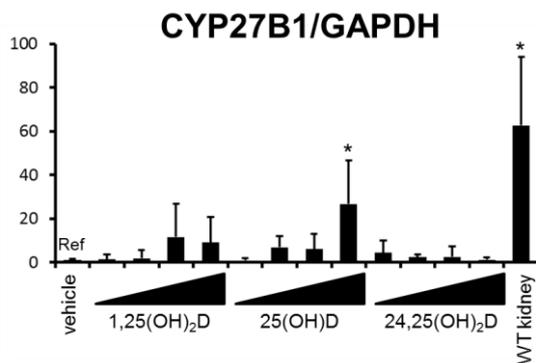
② As4.1 細胞を用いた検討
腎疾患を含め、心血管イベントの発症にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化が関与していることが知られている。As4.1 は CYP27B1KO マウス由来の細胞ではないが、レニンを恒常的に発現している唯一の細胞であり、まず本細胞を用いて、25(OH)D 投与がレニン転写に与える影響を評価した(下図)。



その結果、1, 25(OH)₂D 同様、25(OH)D も濃度依存性にレニン mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。また、代表的な vitamin D シグナルターゲット遺伝子である CYP24A1 の発現も 25(OH)D で誘導された(下図)。

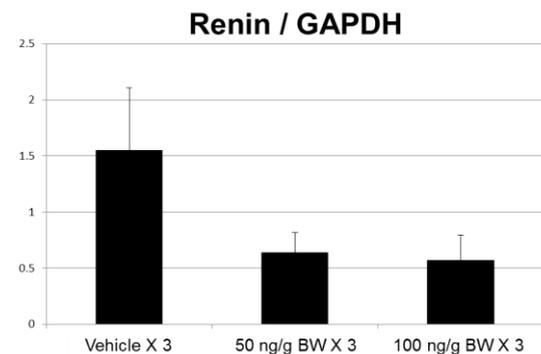


しかしながら、下図に示すように



As4.1 細胞には CYP27B1 が発現しており、その発現が 25(OH)D により誘導されていたため、本実験系では 25(OH)D が直接レニン転写を抑制したのか否かについて、断定的なことは言えなかった。

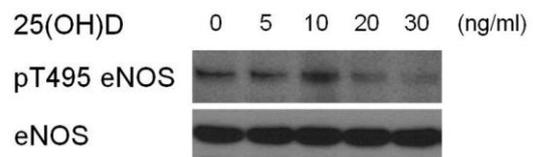
③ CYP27B1KO マウスを用いた検討
体内での 25(OH)D → 1, 25(OH)₂D 変換はすべて CYP27B1 に依存しているため、CYP27B1KO マウスを用いて、25(OH)D の直接作用についてさらに検討を進めた。
8 週齢の CYP27B1KO マウスに 25(OH)D を -5 日、-3 日、-1 日の 3 回皮下注射し腎レニン mRNA の発現を調べた(下図)。



その結果、CYP27B1KO マウスにおいても、25(OH)D 投与によりレニン mRNA 発現が抑制されており、25(OH)D が 1, 25(OH)₂D に変換されなくても生理作用を発揮しうることが明らかとなった。我々は本研究で、コホート研究にて血清 25(OH)D 濃度と腎予後に関係があることを明らかにしており、上記動物モデルを用いて 25(OH)D が腎傷害に対して保護的に作用することを明らかにしつつある。また、上記 25(OH)D の作用に VDR が必要か否かを検討するため、VDR と CYP27B1 のダブルノックアウトマウスを作成し、さらなる検討を進めている。

(3) 25(OH)D が lipid raft に与える影響

我々は、25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) の培養血管内皮細胞に対する作用を検討した。同細胞に 25(OH)D を投与すると、10 分以内に eNOS の Thr 495 リン酸化が低下した(下図)。

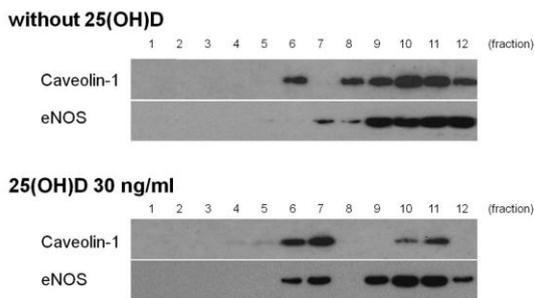


同細胞にはビタミン D の活性化酵素

(CYP27B1)や、不活性化酵素(CYP24)は発現しておらず、投与した 25(OH)D が 1, 25(OH)2D に変換されることなく、直接的に作用した事が示唆された。eNOS の Thr 495 の脱リン酸化は eNOS による NO 産生を促進する変化であり、25(OH)D により eNOS の活性化が生じていることが示された。

eNOS の活性調節には様々な因子が関与しており、oxidized LDL コレステロールが eNOS を細胞表面の lipid raft から細胞内に移動させることで、その活性を抑制することが知られている(J Biol Chem. 1999;274:32512-9)。このため、我々は 25(OH)D による eNOS 制御が lipid raft を介しているのではないかと考え、シヨ糖密度勾配超遠心を用いて lipid raft を分画し eNOS の分布を検討した。下図上段は培地に 25(OH)D が含まれない状態、下段は 30 ng/ml の 25(OH)D が含まれた状態での検討である。

Flotation sucrose density gradient centrifugation



上図に示すように、25(OH)D 投与により eNOS の分布様式に変化が生じており、25(OH)D が lipid raft の機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。

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 1 件)

Nakano C, Hamano, T, Fujii N, Matsui I, Tomida K, Mikami S, Inoue K, Obi Y, Okada N, Tsubakihara Y, Isaka Y, Rakugi H. Combined Use of Vitamin D Status and FGF23 for Risk Stratification of Renal Outcome. Clin J Am Soc Nephrol. 査読有、Vol. 7(2012)、810-819.

[学会発表] (計 5 件)

① 井上 和則、松井 功

Maxacalcitol はレニン抑制非依存的に UUO モデルラットの腎尿細管間質病変を改善する。The 5th Kidney Frontier、2011/12/17、東京

② Kazunori Inoue, Isao Matsui.

Maxacalcitol ameliorates tubulointerstitial fibrosis in the obstructed kidney. The 44th Meeting of the American society of Nephrology, 2011/11/11, Philadelphia, USA.

③ Chikako Nakano, Takayuki Hamano, Naohiko Fujii, Isao Matsui, Kodo Tomida, Kazunori Inoue, Akihiro Shimomura, Yoshitsugu Obi, Hiromi Rakugi, Yoshitaka Isaka.

Combination Usage of Vitamin D Status and the Earliest Marker Fibroblast Growth Factor 23 Improves Risk Stratification for Renal Outcome.

The 44th Meeting of the American society of Nephrology, 2011/11/11, Philadelphia, USA.

④ 井上 和則、松井 功

Maxacalcitol はレニン抑制非依存的に UUO モデルラットの腎尿細管間質病変を改善する。Bone Research Joint Meeting、2011/11/08、大阪

⑤ Chikako Nakano, Takayuki Hamano, Naohiko Fujii, Isao Matsui, Kodo Tomida, Yoshitsugu Obi, Hiromi Rakugi, Yoshitaka Isaka.

A Comprehensive Approach for Predicting Renal Outcome by Laboratory Factors in CKD-MBD.

XLVIII European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress, 2011/06/26, Prague, Czech Republic

[図書] (計 1 件)

松井 功

医学のあゆみ 「ビタミンDの腎保護作用」

2010年 256頁～256頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 功 (MATSUI ISAO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60456986

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし