

## 論文審査報告書

氏名	かまお 鎌尾 まや
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	論博生第8号
学位授与日	平成28年6月29日
論文題目	Studies on Vitamin D Levels in Biological Samples and Novel Metabolites of Vitamin D (生体試料中ビタミンD濃度と新規ビタミンD代謝物に関する研究)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 榑 利之 教授 加藤 康夫 教授 中島 範行 准教授 生城 真一 帝京大学 教授 橘高 敦史

### 内容の要旨

ビタミンDはカルシウム恒常性や骨代謝に重要な栄養素であることはよく知られているが、近年、免疫系や生殖、がん予防など、カルシウム代謝調節以外の生理作用についても関心が集まっている。ビタミンD<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) は皮膚において7-dehydrocholesterolの紫外線照射により生成し、肝臓で25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>] に代謝された後、腎臓で活性型である1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] あるいは不活性型である24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] に代謝される。これらのうち25(OH)D<sub>3</sub>は血中に最も多く存在するビタミンD代謝物であり、D<sub>3</sub>の紫外線照射による生成量や食事からの摂取量を最もよく反映する栄養学的な指標となる。ビタミンD<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>) はきのこ類に多く含まれる植物性のビタミンDであるが、D<sub>3</sub>と同様に25位が水酸化された後、1 $\alpha$ 位あるいは24位が水酸化され、活性化あるいは不活性化される。現在までにこれら以外にも多くの代謝物の構造が決定されているが、さらに多くの未同定代謝物も存在するものと考えられている。

近年の疫学研究において、血清(あるいは血漿)中25-hydroxyvitamin D [25(OH)D, 25(OH)D<sub>3</sub>と25(OH)D<sub>2</sub>の総量を示す]濃度が低値であることが、骨折に加え、アルツハイマー、2型糖尿

病および新生児の急性上気道感染などのリスクを高めることが報告されている。これらの結果は、乳児から老年期に至る全てのライフステージでビタミン D が健康維持や疾患予防に重要な栄養素であることを示唆している。従って、血清や母乳などの生体試料中におけるビタミン D 代謝物濃度を測定し、その標準的な値を把握することは極めて有用である。また、多岐にわたるビタミン D の生理作用やその調節機構を明らかにする上で、ビタミン D の未知代謝物を同定しその生理活性を明らかにすることは重要である。これらの背景から、本研究では母乳および血清中ビタミン D 代謝物濃度を測定し、関連因子との相関性を解析した（第 1 部）。また、培養細胞を用いて天然型ビタミン D および合成誘導体の新規代謝物を同定し、その生理活性を評価すると共に、新規代謝物産生活活性の測定系を構築した（第 2 部）。以下に本論文の構成を示す。

## 第 1 部 生体試料中ビタミン D 濃度の分析

### 第 1 章 母乳中ビタミン D および他の脂溶性ビタミンの定量

母乳中に含まれるビタミン D 量は少ないため、専ら母乳で哺育され、かつ日照不足の乳児はビタミン D 欠乏に陥るリスクが高い。また、その含有量の少なさから、母乳中ビタミン D を正確に定量することは困難であった。筆者らは、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた高感度で特異性に優れた脂溶性ビタミンの定量法を確立し、比較的少量の母乳よりビタミン D および他の脂溶性ビタミン含量を測定することに成功した。そこで、日本人授乳婦 (82 名、18–39 歳) を対象として母乳中ビタミン D 含量を調査したところ、平均濃度は  $D_3$  0.088 ng/mL、 $D_2$  0.078 ng/mL、 $25(OH)D_3$  0.081 ng/mL、 $25(OH)D_2$  0.003 ng/mL といずれも低値であった。また、他の脂溶性ビタミン濃度は、レチノール 0.455  $\mu$ g/mL、 $\beta$ -カロテン 0.062  $\mu$ g/mL、 $\alpha$ -トコフェロール 5.087  $\mu$ g/mL、フィロキノン 3.771 ng/mL、メナキノン-4 1.795 ng/mL、メナキノン-7 1.540 ng/mL であった。母乳中ビタミン D 濃度より Reeve の換算係数 [ $25(OH)D$  は D の 5 倍とする] を用いて総ビタミン濃度を算出し、乳児の平均哺乳量 780 mL/day を乗じて乳児のビタミン D 摂取量を推定したところ約 0.5  $\mu$ g/day であり、本邦の食事摂取基準における目安量 5  $\mu$ g/day に比べて極めて低い値であった。従って、日照不足が懸念される冬季には特に、授乳婦や乳児を対象としたビタミン D 補充が必要であると考えられた。

### 第 2 章 日本人の思春期男女を対象とした血清中 $25(OH)D$ の測定

超高齢社会を迎えた我が国では骨粗鬆症の増加が懸念されており、その予防として思春期における最大骨量を高めることが重要である。思春期は骨代謝の変化が大きく、ビタミン D 栄養が極めて重要な時期であるが、思春期の日本人を対象とした研究は乏しいのが現状である。そこで筆者らは、日本人の健常思春期男女 1,380 名 (男子 662 名、女子 718 名、12–18 歳) を対象として血清中  $25(OH)D$  濃度を化学発光免疫測定法 (CLIA) で自動測定した。その結果、血清中  $25(OH)D$  濃度の平均値は男子で 60.8 nmol/L (24.3 ng/mL)、女子で 52.8 nmol/L (21.1 ng/mL) となり、女子の方が有意に低いことが明らかになった。また、血清中  $25(OH)D$  濃度は男子では 30%、女子では 48% が 50 nmol/L (20 ng/mL) 以下であり、多くの対象者がビタミン D 不足境

界領域であった。諸外国において血清中 25(OH)D 濃度と副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度が逆相関を示すと報告されている。本集団において 25(OH)D 濃度と PTH 濃度は全学年の男子で逆相関を示したが、女子では逆相関を示したのは高校 3 年生のみであった。一方、男女共に踵骨骨密度は血清中 25(OH)D 濃度と有意な正相関を示したが、その相関性は女子の方が強かった。また、男女共にカルシウム摂取より血清中 25(OH)D 濃度が踵骨骨密度に強く影響を及ぼしたが、その傾向は女子の方が強かった。以上より、男女共に思春期における骨密度増加にはカルシウムに加え、ビタミン D のサプリメントが有益であると判断された。

## 第 2 部 ビタミン D の新規代謝物の同定

### 第 1 章 天然型ビタミン D の 3 位水酸基異性体の同定

天然型ビタミン D 代謝物のうち、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  および  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は 3 位の水酸基が  $\beta$  位から  $\alpha$  位に異性化した代謝物に代謝されることが *in vitro* および *in vivo* で明らかにされている。この 3 位水酸基の異性化は代謝部位が A 環部である点が 24 位あるいは 23 位水酸化経路とは異なっており、多様な代謝物の産生という観点から大変興味深い代謝経路である。そこで筆者らは、生体内で最も多く存在している  $25(\text{OH})\text{D}_3$  を基質として、その 3 位水酸基異性体  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  が培養細胞により産生されるかを検討した。その結果、用いた 5 種類の細胞全てにおいて  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  に相当する代謝物の産生が確認され、精製画分の NMR および LC-MS 解析により  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の 3 位水酸基異性体であると同定した。 $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  は骨、腸あるいは肝臓由来の細胞で主代謝物であったが、腎臓由来の細胞では  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が主代謝物であった。 $25(\text{OH})\text{D}_3$  からの 3 位水酸基異性体の産生量は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  や  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を基質とした場合に比べて多く、細胞内で  $25(\text{OH})\text{D}_3$  は他の天然型ビタミン D 代謝物に比べて 3 位水酸基異性体に代謝されやすいと判断された。続いて、培養細胞における  $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  および  $3\text{-epi-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の代謝を検討したところ、それぞれの 24 位水酸化体が生成したが、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  あるいは  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の生成は認められなかった。さらに、ビタミン D の  $1\alpha$  位水酸化酵素 (CYP27B1) あるいは 24 位水酸化酵素 (CYP24A1) の大腸菌発現系を用いて、 $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$  が  $25(\text{OH})\text{D}_3$  と同様に、CYP27B1 により  $3\text{-epi-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  に、CYP24A1 により  $3\text{-epi-}24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  に代謝されることを明らかにした。 $3\text{-epi-}25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $3\text{-epi-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  および  $3\text{-epi-}24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の VDR 結合能をはじめとする生理活性はそれぞれの  $3\beta$  体に比べて弱かったが、 $3\text{-epi-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の 30% 程度のヒト前骨髄性白血病細胞増殖抑制能を保持していた。以上より、3 位水酸基の異性化はビタミン D 代謝物に普遍的な代謝経路であると判断された。

### 第 2 章 ビタミン D 誘導体 22-oxa-calcitriol (OCT、maxacalcitriol) の 3 位水酸基異性体および 25 位脱水体の同定

OCT は  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の 22 位の炭素原子を酸素原子に置換した合成誘導体であり、カルシウム作用が弱く細胞の増殖抑制作用や分化誘導能が強い特徴を有している。日本において OCT は二

次性副甲状腺機能亢進症や乾癬の治療薬として臨床応用されており、その代謝を詳細に検討することは重要である。筆者らは、培養細胞により OCT からいくつかの低極性代謝物が産生されることに着目し、NMR および LC-MS 解析により構造を決定した。OCT から産生した 3 種類の低極性代謝物のうち一つは 3 位水酸基異性体であり、他の二つは側鎖 25 位の水酸基の脱水により産生する 25-ene-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> および 24-ene-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> であった。骨、腸および腎臓由来の細胞でこれら 3 種の代謝物の生成量を比較したところ、各代謝物の生成比は細胞により全く異なっており、骨由来細胞では 25-ene 体と 24-ene 体の生成比は 2 : 1 であったのに対し、腸および腎臓由来の細胞では 1 : 4 および 1 : 11 であった。さらに、3-epi-OCT は 25 位水酸基の脱水体 25-ene-3-epi-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> および 24-ene-3-epi-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> に代謝された。3-epi-OCT、25-ene-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> および 24-ene-22-oxa-1 $\alpha$ (OH)D<sub>3</sub> の生物活性はいずれも極めて弱く、OCT において 3 位水酸基の異性化あるいは 25 位水酸基の脱水による代謝は、標的細胞内での活性を弱める役割を担うと考えられた。

### 第 3 章 3 位水酸基異性化活性の測定

第 2 部第 1 章、第 2 章により、天然型ビタミン D 代謝物や合成誘導体が 3 位水酸基の異性化により代謝されることが明らかとなった。筆者らは、ビタミン D の 3 位水酸基異性化反応を触媒する酵素の基本的性質を明らかにする目的で、まず、活性測定法の至適条件を確立した。その条件を用いて、各細胞画分における 3 位水酸基異性化活性を測定したところ、ミクロソーム画分で最も高い活性が認められた。また、UMR-106 細胞のミクロソーム画分を酵素源とし、25(OH)D<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> および OCT を基質として V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> を比較したところ、25(OH)D<sub>3</sub> が最も大きく、良い基質になると判断された。さらに各種シトクロム P450 酵素阻害剤および NADPH P450 レダクターゼ抗血清による阻害試験をおこなったが、いずれにおいても 3 位水酸基異性化活性の有意な阻害は認められなかった。また、既知の 3 種のビタミン D 代謝酵素 (CYP27A1、CYP27B1 および CYP24A1) を大腸菌に発現させて得られた膜タンパクおよびステロイドの 3 位水酸基異性化酵素である 3( $\alpha$ → $\beta$ )hydroxysteroid epimerase (HSE) を過剰発現させた培養細胞を用いて 25(OH)D<sub>3</sub> からの 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> 産生量を比較したが、いずれも有意な変化はみられなかった。よって、ビタミン D の 3 位水酸基異性化反応に関与する酵素は既知のビタミン D 代謝酵素などのシトクロム P450 系の酵素や HSE ではないと判断された。

以上、本論文において、高感度で特異性に優れた LC-MS/MS や自動測定に適した CLIA を用いることにより、母乳中脂溶性ビタミン濃度や思春期男女の血清中 25(OH)D を測定し、食事摂取基準の策定や疫学調査に有用な日本人の標準的な値を示すことができた。また、主要なビタミン D 代謝物や代表的なビタミン D 合成誘導体である OCT が 3 位水酸基異性体に代謝されることを明らかにし、3 位水酸基異性化がビタミン D に普遍的な代謝経路であることを示した。さらに、OCT の新規代謝物として生物活性が著しく減弱された側鎖末端部の脱水体 25-ene 体および 24-ene 体を同定し、OCT が治療薬として使用される上で有用な知見を提供することができた。

## 審査結果の要旨

申請者は、LC-MS/MSにより母乳中脂溶性ビタミン濃度を、CLIAにより思春期男女の血清中25(OH)Dを測定した。また、培養細胞を用いた実験系により、主要なビタミンD代謝物および代表的なビタミンD合成誘導体OCTが3位水酸基異性体に代謝されること、OCTが側鎖末端部の2種類の脱水体に代謝されることを示した。これらの研究は食事摂取基準の策定や疫学研究を行う上で有用な日本人における標準値を示すとともに、ビタミンDの多様な代謝様式および生理作用を理解し、生物工学的手法を用いた機能性食品・医薬品の開発に有用な情報を提供するものである。主な内容は以下のとおりである。

第1部第1章 LC-MS/MSによる高感度で特異性に優れた母乳中脂溶性ビタミン定量法を確立し、日本人授乳婦を対象とした栄養調査を実施した。母乳中のビタミンDおよびビタミンD代謝物濃度は総じて低く、平均哺乳量および換算係数から推定される母乳栄養児のビタミンD相当摂取量は日本人の食事摂取基準で制定された目安量より著しく低いことが明らかとなった。

第1部第2章 CLIA法による自動測定装置を用いて、日本人思春期男女の大規模集団における血清中25(OH)D濃度を測定した。血清中25(OH)D濃度の平均値は女子より男子で高く、男子では約30%、女子では約48%がビタミンD不足境界濃度以下であった。カルシウム摂取量より血清中25(OH)D濃度が踵骨骨密度に強く影響したことから、思春期における骨密度の増加にはカルシウムに加え、ビタミンDのサプリメントが有益であると判断された。

第2部第1章 主要なビタミンD代謝物である25(OH)D<sub>3</sub>が3位水酸基異性体3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>に代謝されることを明らかにした。また、3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>は25(OH)D<sub>3</sub>と同様に、CYP27B1により1位水酸化体へ、CYP24A1により24位水酸化体へ代謝された。3位水酸基異性体の受容体結合能は親化合物に比べて弱かったが、3-epi-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の約30%程度のヒト前骨髄性白血病細胞増殖抑制能を示し、ある程度の活性を保持するものと考えられた。

第2部第2章 代表的なビタミンD誘導体であるOCTが25位水酸基の脱水体(25-ene体、24-ene体)および3-epi体に代謝されることを明らかにした。さらに、3-epi-OCTも25-ene体、24-ene体に代謝されることを明らかにした。低極性代謝物のVDR結合能は極めて弱く、側鎖の脱水や3位水酸基の異性化による代謝はOCTの活性を速やかに弱める役割を担うと考えられた。

第2部第3章 ビタミンDの3位水酸基異性化活性測定の至適条件を確立し、マイクロソーム画分が高い活性を有することを明らかにした。検討したビタミンD化合物のうち、25(OH)D<sub>3</sub>が3位水酸基異性化反応の最も良い基質になると判断された。各種阻害実験や酵素発現系を用いた検討により、既知のビタミンD代謝酵素やステロイドの3位水酸基異性化酵素がビタミンDの3位水酸基異性化反応に関与する可能性は低いと判断された。

平成28年4月18日に博士論文の審査および最終試験を行った。学力の確認については、専門分野(有機化学、生化学、分子生物学、微生物学)について口頭試験を行い、本学大学院博士後期課程を修了した者と同等以上の学力を有すると認めた。また、申請者は学術研究にふさわしい発表、討論ができ、本研究で用いられた研究手法と得られた結果を十分に理解していること、当該

分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有していると判定されたことにより、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。