

受賞者

井上 聡

東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座

研究テーマ

骨粗鬆症におけるビタミンKの新しい作用メカニズムの解明

1. 緒言

骨粗鬆症は、骨代謝の変化により引き起こされ、進行すると骨折に至る骨変性疾患であり、今日では高齢者の QOL を低下させる疾患として社会的問題となっている。骨代謝は、骨形成と骨吸収のバランスによりなりたっており、骨形成の低下、ないし骨吸収の促進により、骨粗鬆症は発症する。本研究では、骨形成を担う骨芽細胞系の機能に注目し、骨形成促進的に作用し骨粗鬆症治療薬として用いられるビタミン K の作用メカニズムについて、遺伝子レベルで解析を行い、疾患遺伝子の同定・機能解析を通じて、さらにその診断・治療への応用を目指す目的で行った。

ビタミン K の作用としては、ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼ(GGCX)の酵素作用における補助因子としての働きが古くから知られている。GGCX への作用に加え、近年、研究者らと共同研究者のグループは、ビタミン K が GGCX 経路とは独立して核内受容体の1つであるステロイド X 受容体 (SXR) を活性化し、骨関連遺伝子の発現調節を転写レベルで行うメカニズムの存在を明らかにした [1]。

さらに、我々は、骨芽細胞系においてビタミン K が SXR を介して発現調節を行うマイクロアレイ解析により網羅的に探索することにより、転写調節機構を介するビタミン K の新しい骨形成・骨代謝調節作用の同定を行った [2]。ヒト骨芽細胞系細胞株 MG63 細胞に SXR を安定発現させた細胞を用いて、ビタミン K₂(メナキノン4: MK-4)と代表的 SXR 作動薬であるリファンピシン (RIF) で刺激し、マイクロアレイ解析を行った。MK-4 と RIF で共通に上昇した遺伝子のうち、small leucine-rich repeat プロテオグリカン (SLRP) ファミリーの1つである Tsukushi (TSK)は、骨芽細胞のコラーゲン蓄積作用に促進的に機能する遺伝子であることを明らかにした。

本研究では、これまで明らかになっているビタミン K 作用をふまえ、骨芽細胞系におけるビタミン K の新しい作用メカニズムについて、分子生物学的検討を行った。ビタミン K の新しい作用点のひとつである SXR については、そのオルソログである PXR (pregnane X receptor)遺伝子を欠損したマウスにおける骨について解析を行い、生体における骨代謝への作用を検討した。

2. 方法

骨芽細胞系における SXR を介するビタミン K の標的遺伝子を解析する際に、ヒト骨芽細胞系細胞株 MG63 細胞を用いて、SXR 安定発現細胞 (VP16 活性化ドメインのカルボキシル末端を結合した Flag タグ標識の SXR: Flag-VP16C-SXR) と、コントロール発現ベクターのみを安定発現させた細胞を作製した。本研究では、これら細胞をビタミン K₂(MK-4)で刺激し、MK-4 にて発現が誘導され、SXR 応答遺伝子には含まれない遺伝子をマイクロアレイ解析により探索し、新たなビタミン K 標的遺伝子の同定と解析を行った。

PXR 欠損マウスの骨形態計測については、共同研究機関である米国カリフォルニア大学アーバイン校の Blumberg 博士とともに、13 月齢メス由来の大腿骨・脛骨の骨密度測定等による解析を行った。

3. 結果

MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞とコントロールベクター発現 MG63 細胞を、MK-4 と溶媒コントロールで刺激し、マイクロアレイ解析を行い、溶媒コントロールに対して MK-4 により 2 倍以上の発現上昇を認める遺伝子を同定した。このうち、MG63/Flag-VP16C-SXR 細胞とベクター発現 MG63 細胞における発現量が 1.5 倍以上の差がある遺伝子については、SXR 依存性遺伝子として除外し、それ以外の 14 遺伝子をビタミン K 応答遺伝子として同定した。このうち、骨代謝への関与が予想される growth differentiation factor 15 (GDF15) と stanniocalcin 2 (STC2) について解析を行い、どちらの遺伝子も MG63 細胞において MK-4 刺激後 48 時間における mRNA の発現誘導が強く認められた。興味深いことに、MG63 細胞における GDF15 および STC2 mRNA の発現誘導は、MK-4 の側鎖構造であるゲラニルゲラニオールだけでは起こらず、他のビタミン K 構造であるビタミン K₁ とビタミン K₂ のうちで側鎖のイソプレン鎖の長さが異なる MK-7 でも起こらなかった。GDF15 と STC2 の MK-4 による遺伝子発現誘導は、GGCX あるいは SXR 非依存性であった。

MK-4 による新しいビタミン K 作用の 1 つの可能性として、骨芽細胞系の転写調節機構として重要なプロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化に注目した。MG63 細胞において、MK-4 (10 μM) の 2-24 時間刺激により、PKA のリン酸化が経時的に誘導されることが示された。フォルスコリン (FSK) によりアデニル酸シクラーゼを直接活性化することによっても、GDF15 と STC2 mRNA の発現上昇は有意に起こることが示された。また、MK-4 による GDF15 と STC2 mRNA の発現誘導は、PKA 阻害薬の H89 と PKA 特異的 siRNA によっても有意に抑制され、PKA の関与が示された。

PXR 欠損マウスは、13 月齢のメスにおいては、コントロールマウスに比較して、骨密度低下、骨量減少をきたしており、いわゆる骨粗鬆症の病態を示していた。

4. 考察

ビタミン K₂ は古典的 GGCX を介する経路としての作用の他に、我々は、骨芽細胞系でビタミン K₂ が核内受容体 SXR を介して、細胞外マトリクス蛋白質をコードする TSK と MATN2 の発現誘導を行い、コラーゲン蓄積の増加に結びつく作用を明らかにし、さらに GGCX と SXR の経路に依存しない、PKA の作用を介する遺伝子発現調節機構に関与することを明らかにした (図 1)。SXR のオルソログである PXR 欠損マウスにおいて、骨粗鬆症の病態を呈することから、SXR が生体内において骨代謝作用の調節に重要である可能性が示唆された。

結論として、ビタミン K が GGCX による翻訳後 Gla 化蛋白修飾に関与する作用だけでなく、ビタミン K₂ が核内受容体 SXR および PKA 活性

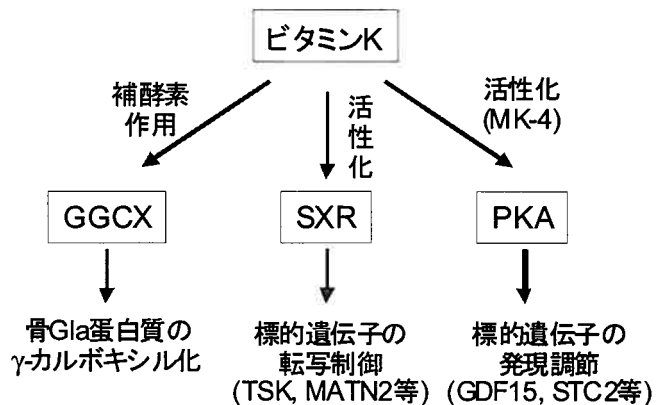


図1 骨芽細胞系におけるビタミン K の骨代謝調節作用

化により遺伝子発現調節を行う作用メカニズムを明らかにした。ビタミン K の骨代謝作用は、従来知られている GGCX 経路のみでなく、SXR 経路および PKA 経路が複合的に作用してもたらされるものと考えられる。骨芽細胞系および周辺細胞におけるビタミン K 標的因子のネットワークをさらに解明することにより、骨粗鬆症の診断・治療への応用が期待される。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

1. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K₂ induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39, 239-247 (2007)
2. Horie-Inoue K, Inoue S: Steroid and xenobiotic receptor mediates a novel vitamin K₂ signaling pathway in osteoblastic cells. *J Bone Miner Metab* 26, 9-12 (2008)

学会発表

1. 井上聡：[Workshop] 脂溶性ビタミンの分子生物学 – ビタミン K の骨における新しい作用メカニズム (2007.12.11-15) BMB2007 (第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会) (横浜)
2. 東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、堀江公仁子、大内尉義、Bruce Blumberg、井上聡：核内受容体 PXR ノックアウトマウスは海綿骨および皮質骨の骨量減少を呈する (2008.10.29-31) 第 26 回日本骨代謝学会 (大阪)

参考 (引用) 文献

1. Tabb MM, Sun A, Zhou C et al. Vitamin K₂ regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 278, 43919-43927 (2003)
2. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K₂-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934 (2006)