

活性型ビタミンDの輸送形態と抗動脈硬化作用

帝京大学内科学教室 研究代表者 寺 本 民 生
共同研究者 木 下 誠
坂 井 一 恵

はじめに

食事や薬剤からの摂取や、皮膚で生成されたビタミンD(VD)は、肝臓に運ばれ25位の水酸化反応を受け25(OH)₂D₃になり、さらに腎臓に運ばれ1 α 位の水酸化反応を受けることにより活性型の1,25(OH)₂D₃となる。この1,25(OH)₂D₃は、骨・小腸・腎臓に作用する¹⁾。

VDの機能研究はこれまで、Ca代謝調節作用を中心に行われてきたのに対し、1981年にAbe, Sudaら²⁾、Miyaura, Sudaら³⁾は1,25(OH)₂D₃がマウスあるいはヒト骨髄性白血病細胞を正常マクロファージに分化誘導することを報告した。これを契機として、1,25(OH)₂D₃のParathyroid hormone (PTH)分泌抑制作用^{4,5)}、抗腫瘍作用³⁾、免疫調節作用⁶⁾あるいは皮膚ケラチノサイトの異常増殖の抑制⁷⁾など様々な作用が相次いで発見され、VDは単にCa代謝調節のみならず細胞の分化やホルモン分泌にも深く関与することが明らかになった。特にVDが各種癌細胞の骨転移に関わるとされるPTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)の発現にも影響を与えることが明らかにされるにおよび、骨転移頻度の高い癌細胞に特異的に有効な治療薬として期待されている。

先にも触れたように、活性型ビタミンDである1,25(OH)₂D₃は、腸管からのCa吸収、破骨細胞による骨吸収さらに腎臓からのCa再吸収を促進することによって生体内のCaホメオスターシスの維持に重要な役割を果たしている^{8,9)}。その特異的な細胞内受容体であるビタミンD受容体(Vitamin D Receptor, VDR)は、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属し、標的遺伝子の調節領域に存在するVitamin D Responsive Element (VDRE)と結合することによってその遺伝子発現を制御し生物学的作用を発揮するのに重要な役割を演じている¹⁰⁾。

VDRはCa代謝に関わる古典的な臓器以外にも数多くの悪性腫瘍細胞にも存在し、1,25(OH)₂D₃はVDRとの特異的結合を介して悪性腫瘍細胞の増殖を抑制し、分化を誘導することが示されている¹¹⁾。したがってVDRは癌に対する治療のターゲットの一つと考えられる。

しかし1,25(OH)₂D₃を薬剤として用いるには、カルシウム代謝の作用により高カルシウム血症を起こす危険性があるため臨床応用には適さない。そこで、1,25(OH)₂D₃のCa調節作用と悪性腫瘍細胞に対する増殖抑制作用を弁別する目的でVD誘導体の開発が進められた¹²⁾。中でも、22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃ (22-oxacalcitriol, OCT)は側鎖22位のCをOに置換したアナログで、1,25(OH)₂D₃に比べ、Ca代謝作用ははるかに弱く、逆に細胞増殖抑制、分化誘導能は5~10倍強力であることが知られている¹³⁾。実際OCTはin vitroで1,25(OH)₂D₃よりも強力に乳癌細胞の増殖を抑制し¹³⁾、さらにin

vivoにおいても血清Caに影響することなく癌の発育を強力に抑制することが示されている¹⁴⁾。一方、OCTの作用とは逆で、カルシウム代謝に対する作用が強く、骨粗鬆症治療薬に、より有効と考えられているアナログの 2β -(3-hydroxypropoxy)- 1α , 25-dihydroxyvitaminD₃ (ED-71)が開発された。これはA環の 2β 位に3-ヒドロキシプロポキシ基を導入した化合物である¹⁵⁾。

通常、VDとこれらアナログは、血中で特異的にvitamin D binding protein (DBP)と結合し、運搬される。しかしOCTのDBP親和性は、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の $1/580\sim 1/780$ と極めて低い¹⁶⁾。そのためと考えられるが血中からの消失速度が極めて速いことが確認されている。一方、ED-71のDBP親和性は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の約2倍と強いことが知られており、このようなDBPとの結合性がアナログのkineticsの差に影響を与えている可能性が示唆された。

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はDBP以外にもリポ蛋白質、アルブミン、グロブリンなどにも結合している。またOCTにはDBP以外の血中輸送形態が存在し、かつ効率のよい異化過程が推定された。VDは脂溶性ビタミンであることから、リポ蛋白と結合し、輸送される可能性が考えられた。その可能性について検討した結果、結合リポ蛋白はLDL (低比重リポ蛋白) と同定された¹⁷⁾。LDLはLDL受容体を介して速やかに取り込まれ、異化されることからOCTもLDL-LDL受容体を介して取り込まれ作用する可能性が考えられた。またOCTは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に比較すると、生物学的作用の持続時間が長いことが知られている。これら細胞内動態の差が取り込まれる経路の違いによる可能性も考えている。更に、LDL受容体はあらゆる細胞表面に存在し、特に癌細胞には多く存在することより癌細胞には効率良く取り込まれる可能性が考えられる。

以上の背景から、本研究ではVDアナログの細胞内取り込みに対するLDL受容体の関与を検討する目的で、LDL受容体を発現しているヒト線維芽細胞もしくはLDL受容体欠損線維芽細胞を用いて各種アナログの取り込みについて検討することとした。また、VDの作用点である核への取り込みについても検討を加えることとした。さらに、このような取り込みに対してDBPの役割についても検討を加えることとした。

【方 法】

実験材料

1α , 25Dihydroxy [$26,27\text{-methyl-}^3\text{H}$] cholecalciferolはAmershamから購入した。[$26\text{-}^3\text{H}122\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (OCT), [$26,27\text{-}^3\text{H}$] ED-71は中外製薬研究所より供与された。その他の試薬は全て特級試薬を使用した。

細 胞

1×10^5 個の正常ヒト由来線維芽細胞またはLDL受容体欠損症由来線維芽細胞を直径6 cmのCulture Dishにまき、10%Fetal Bovine Serum (FBS)含有MEM培地3 mlを用いて培養する。培養5日目に細胞をPhosphate Buffered Saline (PBS) 3 mlで2回洗浄後、8%LPDS (Lipoprotein deficient serum)を含有

するMEM培地を3 ml加え、さらに48時間培養する。培養7日目の細胞をすべての実験に用いる。

³H-VDアナログ標識LDLの作成

5 μ Ciの³H-VD含有エタノール液をN₂乾固し、そこへEtOH20 μ lを加えVortexした後PBS25 μ lを加え、よくVortexして再溶解する。次に超遠心法(14°C、40,000rpm、24時間)で正常ヒト血清からd:1.019~1.063g/mlの分画を回収し、これをPBS with 0.025%EDTAで透析した後、蛋白量として625 μ g相当量のLDLを加え、37°CでOvernight、静置する。遊離の³H-VDをG25セファデックスカラム(Pharmacia Biotech)にて除去し、標識LDLを精製した。標識LDLはマイクロダイアライザーを用い、PBS with 0.025%EDTAで3時間透析する。透析後回収し、0.45 μ mフィルター濾過し、滅菌チューブに入れ、5 μ lを蛋白測定(Lowry法)する。

実験では、蛋白量20 μ g相当量を1 dishに添加することとした。

1. ヒト線維芽細胞におけるOCTの取り込みに対するLDLの影響

ヒト皮膚線維芽細胞をリポ蛋白非存在下で培養し、LDL受容体活性を亢進させる。

培養細胞をPBS 3 mlで2回洗浄後、MEM培地とし、細胞への取り込みを検討する目的で0.3pmolesの³H-1,25(OH)₂D₃もしくは³H-OCTとともに0, 1.5, 12.5, 22, 125 (μ g/ml)のLDLを各Dishに添加し、37°Cで1時間静置する。静置後、細胞を氷冷下に移動し、0.2%アルブミン含有のPBS(Alb-PBS) 3 mlで3回洗浄する。さらにAlb-PBSを3 ml加え、10分間放置したのちAlb-PBSを回収する。同様の操作をもう一度行い、最後に氷冷したPBS 3 mlで2回細胞を洗浄し、細胞に結合していない1,25(OH)₂D₃もしくはOCTを除去する。1N NaOH 1 mlを分注し、20-30分以上放置後ピペッティングにより細胞回収を行う。

回収液500 μ lを用い放射活性を測定。

また100 μ lは蛋白測定を行った。

同様の操作をLPDSの存在下でも検討した。

2. ヒト線維芽細胞におけるLDL結合VDアナログの取り込みに対するDBPの影響

DBPが多く存在していると考えられるLPDSを添加しLDL結合VDアナログの取り込みに対する影響を観察することにした。

培養細胞をPBS 3 mlで2回洗浄後、LPDSを0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5mg/ml含有するMEM培地を3 ml加え、細胞への取り込みを検討する目的で各Dishに0.3pmolesの³H-1,25(OH)₂D₃もしくは³H-OCT, ³H-ED-71を添加し、37°Cで1時間静置する。静置後、1と同様に細胞を氷冷下に移動し、Alb-PBS 3 mlで5回洗浄する。最後に氷冷したPBS 3 mlで2回細胞を洗浄し、細胞に結合していない1,25(OH)₂D₃もしくはOCT, ED-71を除去する。1N NaOH 1 mlを分注し、20-30分以上放置後ピペッティングにより細胞回収を行う。8~9N HCl 100 μ lとともに500 μ lを放射活性の測定に用い、100 μ lを蛋白測定に用いた。またDBPを多く含む血清分画であるGC-proteinのVDアナログの取り込みに対する影響を観察するために以下の方法を行った。

培養細胞をPBS 3 mlで2回洗浄後、3 mlのMEM培地とし、各Dishに1または5 mg/mlのLPDSもし

くは10または50 $\mu\text{g/ml}$ のGC-proteinを添加、また何も添加しない、それぞれ5通りの方法で行った。このとき、各Dishに0.3pmolesの ^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 、もしくは ^3H -OCT, ^3H -ED-71を添加し、各種VDアナログの細胞への取り込みを検討した。

3. ヒト線維芽細胞におけるVDアナログの細胞内動態に関する検討

次に、これらアナログの細胞内作用時間の差が生じる原因を検討する目的で、これらアナログの細胞内動態について検討することとした。

1,25(OH) $_2\text{D}_3$ もOCTも遊離の状態でもLDLと結合した状態でも細胞に取り込まれることを確認した。そこで遊離状態とLDL結合状態のそれぞれの ^3H -VDアナログ0.3pmolesをヒト皮膚線維芽細胞に添加し1時間解置 (Pulse) した後PBS with BSA 3 mlで5回、PBS 3 mlで2回洗浄を行い、各種の放射活性VDアナログを除去 (chase) して再び2 ml MEM培地にし、その後経時的に細胞を1 N NaOH 1 mlを用いて回収した。8-9N HCl 100 μl とともに500 μl を放射活性の測定に用い、100 μl を蛋白測定に用い細胞内残存時間を検討した。

4. ヒト線維芽細胞におけるVDアナログの核内輸送に関する検討

放射活性VDアナログの遊離状態とLDL結合状態とでヒト皮膚線維芽細胞と1時間解置した後、放射活性VDアナログを除去して1時間後に細胞を回収した。細胞膜を溶解し、超遠心法で核の精製を行い、核内VDアナログの放射活性を検討することとした。

核の精製

8% LPDSを含有するMEM培地で48時間培養した7日後の細胞をPBS 3 mlで2回洗う。その後MEM培地 3 mlとし、各種の ^3H -VDを添加し1時間解置する。1時間解置した細胞をPBS with BSAで5回、PBSで2回洗った後これにPBSを1 ml/well加え、ラバーポリスマンを用いて2 dishの細胞を1本の15mlのチューブに回収する。1000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ で5分遠心。上清除去後、細胞膜溶解液 (10mM Tris.HCl pH7.4, 10mM NaCl, 3 mM MgCl $_2$, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5% ノニデット-P40) を2 ml加え注射器で吸引法を繰り返し細胞膜を破壊する。10分間放置。細胞膜破壊液のうち150 μl を放射活性、50 μl を蛋白測定に用いる。残りの細胞膜破壊液にSucrose 1.44g, Glycerol 90 μl を加えよく溶解混和する。10分間放置。スウイングバケットローターSW50 (BECKMAN) に超遠心比重液 (10mM K \cdot HEPES pH7.6, 15mM KCl, 0.15mM spermin, 0.5mM spermidin, 2 M sucrose, 5 % glycerol, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 1 % Aprotinin) を2 ml入れ、プールした溶解液を重層する。30000rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ で50分間超遠心する。ピペットを用い上清を除く。

核の沈殿に核浮遊液 (100mM K \cdot HEPES, pH7.9, 2 mM EDTA, 15mM MgCl $_2$, 25% glycerol, 1 mM DTT, 0.5mM PMSF) 50 μl を加えピペッティングして核を浮遊させ回収。浮遊液25 μl は放射活性を測定。残りの浮遊液はDNA測定 (Burton法) に用いる。

DNA測定法 (Burton法)

2×10^4 の細胞浮遊液を1.5mlマイクロチューブにとり、2500rpm、5分間遠心し、上清を除去する。管底を叩いて細胞ペレットを浮遊させてから、200 μl 細胞溶解Buffer (10mM Tris-HCl (pH7.4),

10mM EDTA (pH8.0), 0.5% Triton X-100) を加え、4℃、10分間、時々攪拌し、遊離DNAを抽出する。16000rpm、20分、遠心し、遊離DNAを含む上清を別の1.5mlマイクロチューブに取る。

遠心沈渣 (不溶性DNAを含む) に200 μ l細胞溶解Bufferを加え遊離させる。試料に200 μ lの1 N過塩素酸を加え、4℃で30分間静置する。その後、16000rpm、20分、遠心する。上清除去後、沈殿に50 μ lの1 N過塩素酸を加え浮遊させる。次に、70℃、20分加熱する。冷却後、ジフェニールアミン試薬 (酢酸10ml、ジフェニールアミン150mg、硫酸150 μ l、アセトアルデヒド溶液 (アセトアルデヒド20 μ l/10ml蒸留水) 50 μ l) を100 μ l加え、暗所で、28℃、一夜反応させる。600nmの吸収を測定する。

【実験結果と考察】

1. ヒト皮膚線維芽細胞におけるVDの取り込みに対するLDLの影響

^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ またそのアナログである ^3H -OCT を遊離型で培養液に添加し、LDL受容体が高発現したヒト皮膚線維芽細胞への取り込みに対するLDLの影響を観察した。その結果をそれぞれFig 1、Fig 2に示した。

また、本実験においてDBPの影響も見つかるためDBPが含まれているLPDSの添加効果も観察した。

その結果、 ^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ は細胞への取り込み量が多いもののLDLの添加効果は全く見られなかった。一方、またそのアナログである ^3H -OCT ではLPDSの存在、非存在にかかわらずLDLを添加すると用量依存的に取り込み増加が観察された。また、LPDSの存在はこれらの取り込みを有意に抑制し、その効果は ^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ においてより顕著であった。

従って、 ^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ に比較すると ^3H -OCT ではLDL/LDL受容体経路に依存するところが大きいこと、ならびにその取り込みにはLPDSすなわち、DBPが抑制的に作用する可能性が示唆された。

2. ヒト皮膚線維芽細胞におけるVDアナログの取り込みに対するDBPの影響

上記1の結果からLPDSの添加効果を確認することとした。また、DBPへの親和性の強いED71も比較のため検討した。

Fig 3に示したようにED71と ^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$ はLPDSの添加効果は顕著であり、0.05mg/mlの添加でほぼ完全抑制されていた。一方、 ^3H -OCTではLPDSによる抑制傾向はあるもののその効果は有意なものではなかった。

この影響がDBPであると考えられたので、DBPを多く含む血清分画であるGC-proteinを、LPDSと同様に添加して各種VDアナログの取り込みに対する影響を観察した。その結果をFig 4に示した。

結果は、LPDSと同様1,25(OH) $_2\text{D}_3$ とED-71では抑制がみられたが、OCTの場合はほぼ変わらずGC-proteinの影響はみられなかった。

以上の結果から、DBP親和性のあるVDの取り込みの調節にはDBPが大きく影響を持っているものと推定された。

その一方、DBP親和性の低いOCTでは細胞への取り込みはLDLが強い影響を有しているものと考えられた。

この結果はOCTの血中半減期が極めて短いこととよく一致すると思われる。

3. ヒト皮膚線維芽細胞におけるVDアナログの細胞内動態に関する検討

次に、細胞内でのVDアナログの動態を観察するため、それぞれ遊離型とLDL結合型で比較した。1,25(OH)₂D₃での結果をFig 5に示したが、遊離状態でもLDL結合状態でも同様に急速な減少を示し、細胞内の残存時間が短いことがわかった。

一方OCTでの結果をFig 6に示したが、遊離型のOCTは、1,25(OH)₂D₃と同様に急速な減少を示したのに対し、LDL結合型では、30分以降はほとんど減少せず細胞内に残存しており、LDL結合OCTだけが有意に細胞内残存時間が長いことが判明した。

また、LDL受容体欠損細胞で比較すると、LDL結合OCTでも遊離型と同様の減少パターンを示した。すなわち、この細胞内動態の差はLDL-LDL受容体経路が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

4. ヒト皮膚線維芽細胞におけるVDアナログの核内輸送に関する検討

このような、細胞内動態の差が核への移行、すなわち細胞生物学的な作用に影響をもたらしているのか検討する目的で、VDアナログの遊離型とLDL結合型とで核内移行速度について検討することとした。

その結果をFig 7に示した。

LDL結合OCTの核内残存時間が1,25(OH)₂D₃に比較して長い可能性が推定された。このような核内輸送が異なることがOCTと1,25(OH)₂D₃の作用時間が異なることの理由の一つと考えられる。

dpm/μg protein

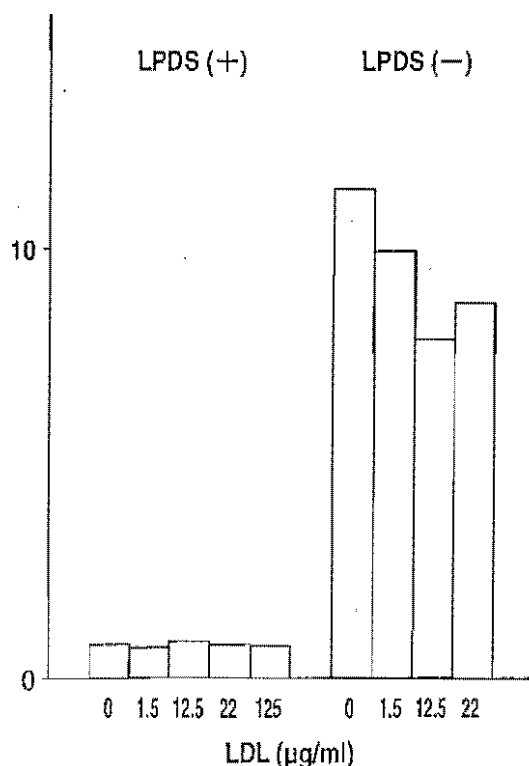


Fig.1 Effect of LDL on uptake of ³H-1,25(OH)₂D₃ by fibroblasts

dpm/μg protein

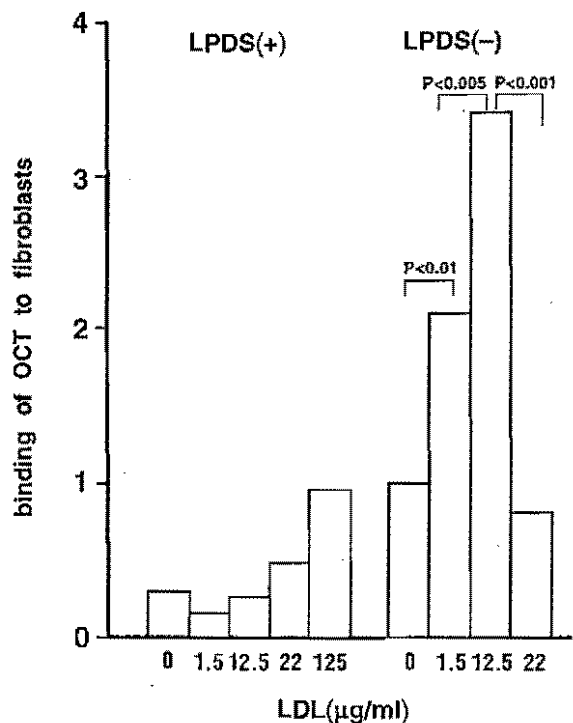


Fig.2 Effect of LDL on uptake of ³H-OCT by fibroblasts

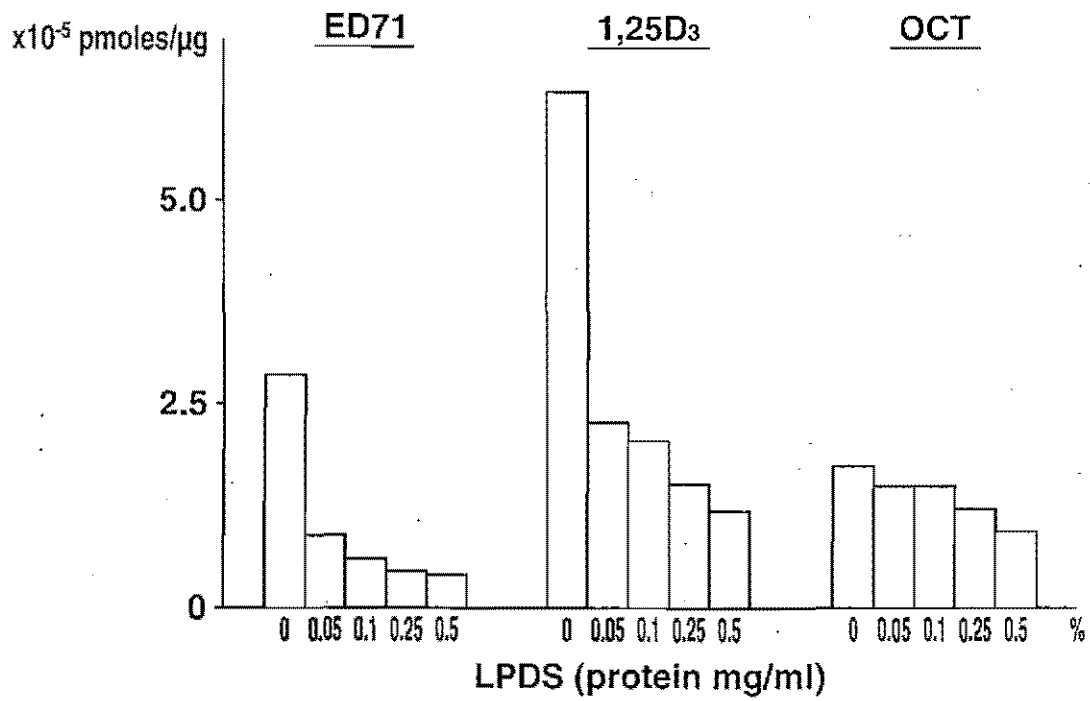


Fig.3 Effect of LPDS on uptake of Effect of Vit D analogs by fibroblasts

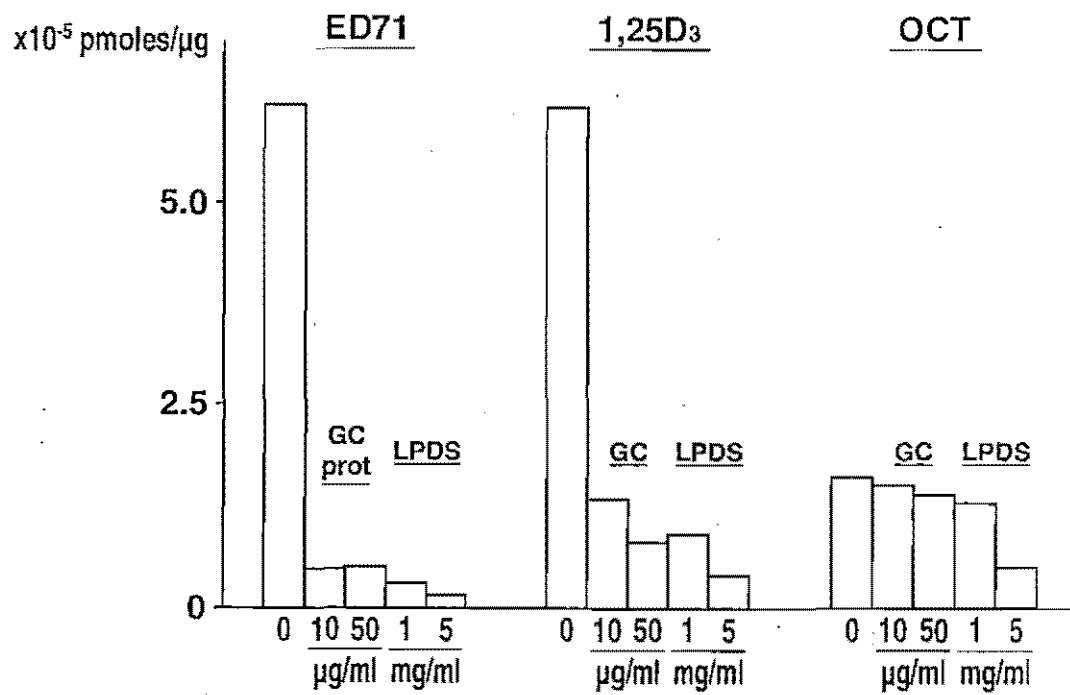


Fig.4 Effect of GC protein on uptake of Effect of Vit D analogs by fibroblasts

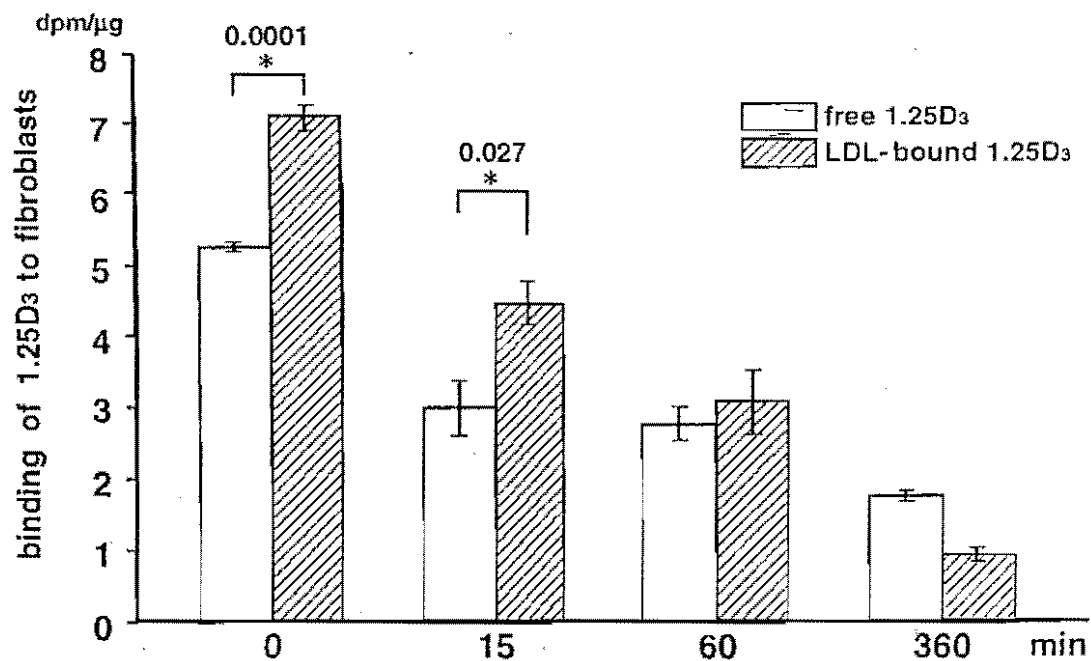


Fig.5 Intracellular decay of LDL-bound and free $1.25D_3$

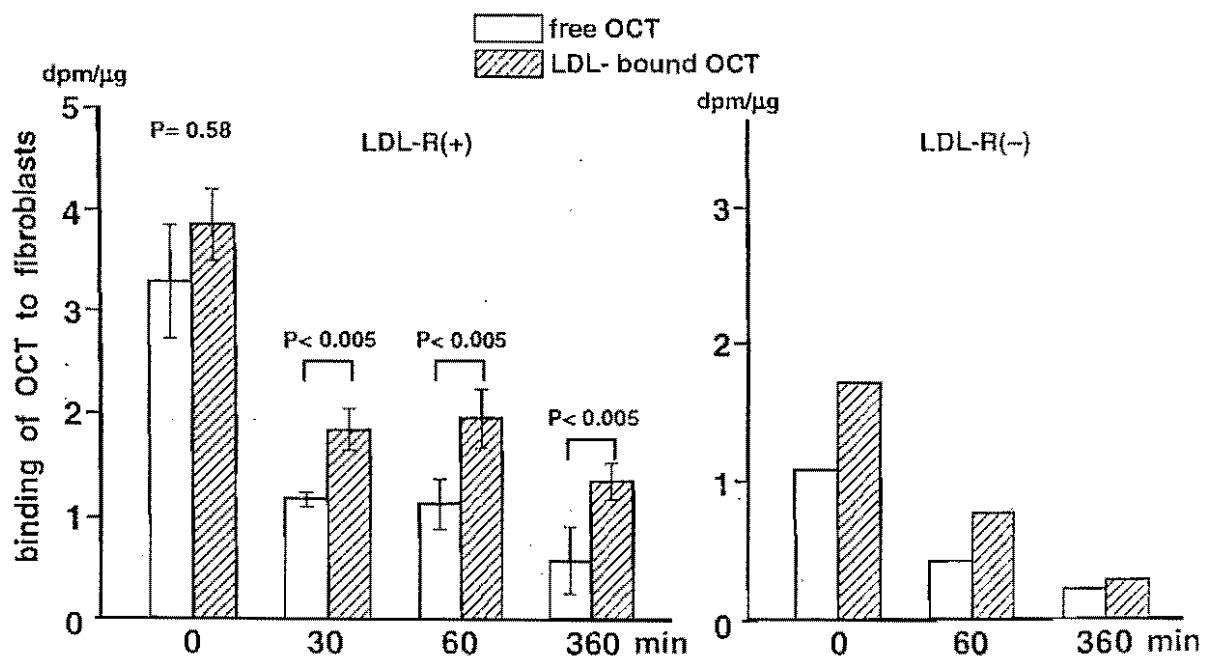


Fig.6 Intracellular decay of LDL-bound OCT and free OCT

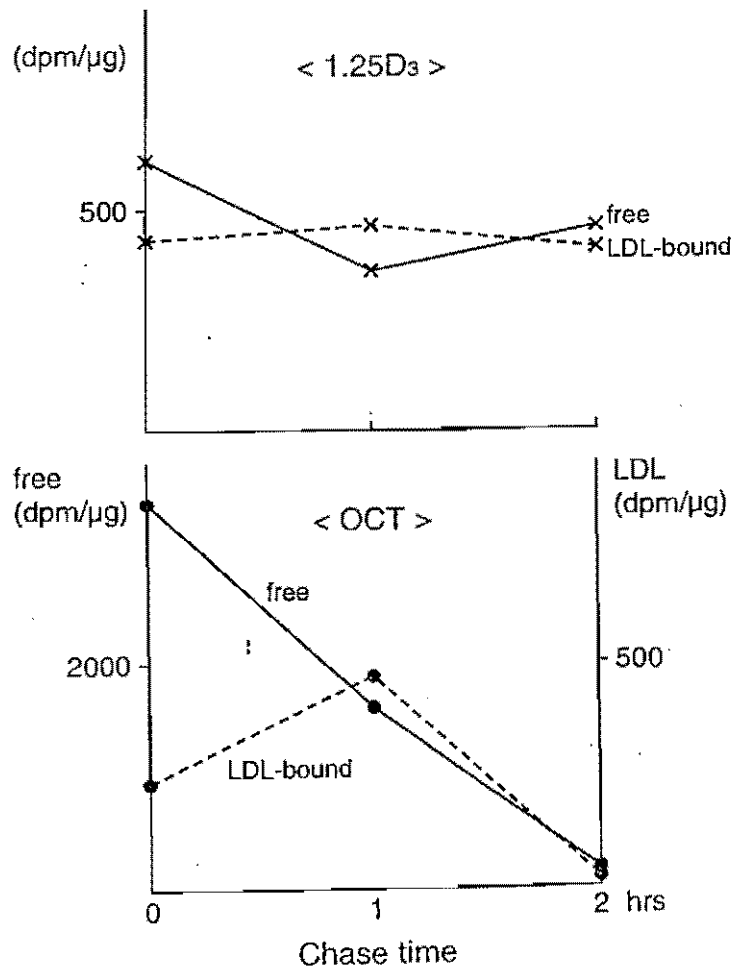


Fig.7 Binding of free or LDL-bound VD to nucleus.

参考論文

- 1) 須田立雄 ビタミン学 (1) ビタミンDの代謝とその調節: 135-137 (1980)
- 2) Abe E, Myaura C, Sakagami H, Takeda M; Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S. and Suda T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 4990-4994 (1981)
- 3) Myaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, Nishii Y, and Suda T, Biochem. Biophys. Res. Commun., 102: 937-943 (1981)
- 4) a) Cantley L.K., Russell J, Leitteri D. and Sherwood L.M., Endocrinology, 117: 2114-2119 (1985)
 b) Silver J, Russel J. and Sherwood L.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4270-4273 (1985)
 c) Russel J, Lettieri D. and Sherwood L.M., Endocrinology, 119: 2864-2866 (1986)
 d) Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Shemelzer J. and Popovtzer M.M., J. Clin. Invest., 78: 1296-1301 (1986)
- 5) Eisman, J.A., Barkla, D.H. and Tutton, P.J.M., Cancer Res., 47: 21-25 (1987)

- 6) Ohsugi Y, Nakano T, Komori T, Ueno K, Sugawara Y, Fukushima M, Yamamoto T, Nishii Y, Matsumoto T, and Matsuno M, Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical update. 209-218 (1985), Walter de Gruyter, Berlin.
- 7) a) Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T. and Kuroki T.; *Endocrinology*, 113: 1950-1957 (1983)
 b) Morimoto S, Yosikawa K, Kozuka T, Kitano Y, Imanaka S, Fukuo K, Koh, E. and Kumahara Y.; *Br.J.Dermatol.*, 115: 421-429 (1986)
- 8) DeLuca H F
 The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEBJ* 2 :224-236 (1988)
- 9) Reichel H, Koeffler H P, Norman A
 The role of the vitamin D endocrine system in health and diseases. *N Engl J Med* 320 :980-991 (1989)
- 10) Evans R M
 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895 (1988)
- 11) Walters M R
 Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 13 : 719-764 (1992)
- 12) Murayama E, Miyamoto K, Kubodera N, Mori T, Matsunaga I
 Synthetic studies of vitamin D₃ analogues. VIII Synthesis of 22-Oxavitamin D₃ analogues. *Chem Pharmacol Bull* 34 : 4410-4413 (1986)
- 13) Abe J, Nakano T, Nishii Y, Matsumoto T, Ogata E, Ikeda K
 A novel vitamin D₃ analog, 22-Oxa-1,25 dihydroxyvitamin D₃, inhibits the growth of human breast cancer in vitro and in vivo without causing hypocalcemia. *Endocrinology* 129 : 832-837 (1991)
- 14) Abe-Hashimoto J, Kikuchi T, Matsumoto T, Nishii Y, Ogata E, Ikeda K
 Antitumor effect of 22-Oxa-calcitriol, a noncalcemic analogue of calcitriol, in athymic mice implanted with human breast carcinoma and its synergism with tamoxifen. *Cancer Res* 53:2534-2537 (1993)
- 15) Miyamoto K, Murayama E, Ochi K, Watanabe H, Kubodera N *Pharm. Bull.* 41:1111-1113 (1993)
- 16) 津川尚子
 22-Oxa-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ および 2 β (3-Hydroxypropoxy)-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ の生理活性に関する研究:69-70 (1994)
- 17) Teramoto T, Endo K, Ikeda K, Kubodera N, Kinoshita M, Yamanaka M, Ogata E.
 Binding of vitamin D to low-density-lipoprotein (LDL) and LDL receptor mediated pathway into cells. *Biochemical and Biophysical research communications.* 215:199-204 (1995)