

様式(7)

## 論文内容要旨

|  |  |    |       |
|--|--|----|-------|
| 報告番号   | 甲 栄 第 268 号  | 氏名 | 田尻 真梨 |
| 題 目  | Association of increased renal <i>Cyp24a1</i> gene expression with low plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels in rats with streptozotocin-induced diabetes<br>(ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットにおける腎 <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現上昇と血漿1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度低下との関連) |    |       |
| <p>ビタミンD (VD) は、カルシウム・リンの恒常性および骨代謝調節において必須のビタミンである。食事摂取あるいは皮膚の日光暴露から供給されたVDは、肝臓で25-ヒドロキシビタミンD (25OHD) に、腎臓で25OHD-1<math>\alpha</math>-ヒドロキシラーゼ (<i>CYP27B1</i>遺伝子) により活性型VDである1,25-ジヒドロキシビタミンD (1,25(OH)<math>_2</math>D) に代謝される。また、腎臓で25OHD-24-ヒドロキシラーゼ (<i>CYP24A1</i>遺伝子) により不活性型VDに異化代謝される。副甲状腺ホルモン (PTH) や線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) は、<i>CYP27B1</i>および<i>CYP24A1</i>遺伝子の代表的な発現調節因子である。また、<i>CYP27B1</i>や<i>CYP24A1</i>を含む一部のシトクロムP450酵素は、ミトコンドリアにおいて活性を持つと考えられている。Ren氏らは、イントロン2から転写されエクソン1および2が欠損した<i>CYP24A1</i>-splicing variant (<i>CYP24A1</i>-SV) の存在を報告した。<i>CYP24A1</i>-SVは、ミトコンドリア標的領域が欠損しているため活性はないが、基質結合領域は保持しており、細胞質に存在すると考えられている。一方、糖尿病とVDに関する報告は多数あり、糖尿病患者および糖尿病モデルにおいて血中25(OH)D濃度あるいは血中1,25(OH)<math>_2</math>D濃度の減少が報告されている。2型糖尿病モデル <i>db/db</i> マウスを用いた研究では、腎 <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現上昇がVD代謝異常に影響している、という報告がある。また、1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン (STZ) 誘導性糖尿病ラットにおいても、Vuica氏らが肝臓における <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現上昇を報告している。しかし、肝臓の <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現は非常に少なく、その主な発現組織は腎近位尿細管である。Vuica氏らとは対照的に、Zhang氏らはSTZ誘導性糖尿病ラットの腎臓において <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現の低下を報告した。このように、糖尿病状態にみられるVD代謝異常の詳細な機序は未だ明らかになっていない。本研究では、STZ誘導性糖尿病ラットを用いて、糖尿病状態におけるVD代謝異常と <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現の関連を解析した。</p> <p>5週齢オスのSDラットにSTZ (65 mg/kg B.W.) (STZ群) または同量のCitrate Buffer (Control群) を腹腔内注射し、9日間飼育した。血漿1,25(OH)<math>_2</math>D濃度は、Control群と比しSTZ群において著しく減少した。また、STZ群において血漿カルシウム濃度の有意な低下と、血漿リン濃度、血漿PTH濃度および血漿コルチコステロン濃度の有意な上昇を認めたが、血漿FGF23濃度に変化はなかった。腎 <i>Cyp27b1</i> mRNA発現は、Control群とSTZ群間において変化がなかったが、腎 <i>Cyp24a1</i> mRNA発現はSTZ群において有意に上昇した。次に、腎 <i>Cyp24a1</i> タンパク質発現を解</p> |  |    |       |

析したところ、40kDa付近にSTZ群においてCyp24a1抗体特異的な強いシグナルを見出した。興味深いことに、このシグナルは全長Cyp24a1タンパク質の分子量とされている50-55kDaよりも小さく、細胞質分画でのみ観察されたことから、Cyp24a1-SVタンパク質ではないかと考えられた。Cyp24a1遺伝子のイントロン2およびエクソン4に特異的なプライマーを用いて解析したところ、腎臓においてCyp24a1-SV mRNA発現を認め、その発現量はControl群と比してSTZ群において有意に上昇した。次に我々は、STZ群における腎Cyp24a1遺伝子発現上昇を誘導する因子として、STZ群で血漿濃度の上昇を認めたコルチコステロンに着目した。フクロネズミ由来腎近位尿細管上皮細胞株を用いて、デキサメタゾン (DEX) がCyp24a1遺伝子発現に及ぼす影響を解析したところ、DEXはグルココルチコイド受容体を介して転写レベルで、内因性Cyp24a1 mRNA発現を上昇させることが示唆された。

これらの結果より、STZ誘導性糖尿病ラットにおける血漿1,25(OH)<sub>2</sub>D濃度減少は、腎Cyp27b1遺伝子発現よりもむしろ腎Cyp24a1遺伝子発現の上昇によって引き起こされるのではないかと考えられた。さらに、本研究は糖尿病ラットの腎臓にCyp24a1-SVが高発現する可能性を見出した最初の報告である。また、糖尿病状態における血漿コルチコステロン濃度の上昇が、Cyp24a1遺伝子発現を誘導する1つの因子となる可能性が示唆された。

|      |  |    |       |
|------|--|----|-------|
| 報告番号 | 甲 栄 第 268 号  | 氏名 | 田尻 真梨 |
| 審査委員 | 主査 宮本 賢一<br>副査 高橋 章<br>副査 首藤 恵泉  |    |       |
| 題目   | <p>Association of increased renal <i>Cyp24a1</i> gene expression with low plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels in rats with streptozotocin-induced diabetes<br/>         (ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットにおける腎 <i>Cyp24a1</i> 遺伝子発現上昇と血漿1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度低下との関連)</p> <p>著者 Mari Tajiri, Otoki Nakahashi, Tomohiro Kagawa, Masashi Masuda, Hirokazu Ohminami, Masayuki Iwano, Eiji Takeda, Yutaka Taketani, Hironori Yamamoto</p> <p>令和 元年 9月 5日 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 受理済</p>  |    |       |
| 要旨   | <p>本研究は、糖尿病状態でみられる血中ビタミンD代謝異常のメカニズムについて検討したものである。ビタミンDは、コレステロールから皮膚で合成されるか食事で摂取された後、肝臓で25位が水酸化され25-ヒドロキシビタミンDとなり、さらに腎臓で1<math>\alpha</math>水酸化酵素(Cyp27b1)により1<math>\alpha</math>位が水酸化され活性型である1,25-ジヒドロキシビタミンDとなり生理作用を発揮する。一方、1,25-ジヒドロキシビタミンDは、24水酸化酵素(Cyp24a1)により24位の水酸化を受けると不活性型となり体外へ排泄される。糖尿病患者や糖尿病モデル動物では、血中25-ヒドロキシビタミンDあるいは活性型の1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度が低下することが報告されている。本研究では、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラット(STZラット)を用いて、糖尿病状態におけるビタミンD代謝異常とビタミンDの不活性化に関わるCyp24a1遺伝子発現との関連について検討した。その結果、STZラットでは、コントロールラットに比べて、血漿1,25-ジヒドロキシビタミンD濃度が著しく低下した。そこで、ビタミンD活性化に関わるCyp27b1遺伝子発現および不活性化に関わるCyp24a1遺伝子発現について検討したところ、STZラットの腎臓において、Cyp27b1 mRNA発現に変化は見られなかったが、Cyp24a1 mRNAおよびタンパク質発現量の有意な上昇を認めた。また、Cyp24a1には従来知られているミトコンドリア型に加えて、近年、細胞質存在型のスプライシングバリエント(CYP24A1-SV)の存在が知られている。本研究で見られたCyp24a1タンパク質は、野生型よりもサイズが小さく、細胞質分画でのみ発現の増加が確認されたこと、CYP24A1-SV特異的なプライマーにより解析したところSTZラットでは、CYP24A1-SVが増加することを明らかにした。さらに、STZラットの血漿において上昇するグルココルチコイドがCyp24a1遺伝子発現誘導に関わることを示唆する結果を得ている。以上のことから、STZラットでは、グルココルチコイドが上昇することにより、Cyp24a1遺伝子の発現誘導が生じ、血中活性型ビタミンDを低下させることが示唆された。</p> <p>本研究は、糖尿病病態において見られる血中活性型ビタミンD濃度低下のメカニズムの一端を明らかにした研究であり、今後、糖尿病の治療や栄養管理に貢献できる知見が得られたことから、博士(栄養学)の授与に値すると判定した。</p> |    |       |