

## 骨損失モデルマウス研究から分かったこと

### ——ビタミンD 神話と実際——

増山 律子

#### 要約

「栄養過不足による代謝障害には食事介入が有効である。」栄養指導の基本であり、過剰なものは減らし、足りないものは補う、という、誰でも理解できる極めてシンプルな考え方に基づいている。今や、食材に含まれる栄養素の情報も簡単に調べられる。今晚のメニューで悩む必要は無く、家にある食材で検索するとインターネットが手軽でヘルシーな提案をしてくれる。食品売り場にはレシピが紹介され、地域のフリーペーパーには旬の食材を使った調理法が丁寧に記載されている。至れり尽くせり。しかも、管理栄養士による監修と付け加えられている。このように、健康のための食の在り方に関する情報は十分すぎる程あふれている。ところが、生活習慣病をはじめとした疾患の発症や病態形成には、未だ摂取栄養バランスの偏りが原因となるものが多い。健康的な食を実践することは容易ではないのである。何故だろうか。一般向けの情報は、専門的な知識が無くても理解できるものが求められるため、“小難しい”作用機序の説明は省略されてしまう。この省略された説明こそが、生物学的な根拠として明確化された研究成果であり、実際の体内の変化を説明するための要点なのである。本項では、健康寿命の延伸と直結する運動器発達に欠かせないビタミンD作用について、我々が作出した様々な遺伝子組換えマウスモデル研究成果から紡ぎ出した理解を概説する。

キーワード：1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、VDR、カルシウム吸収、腸上皮

#### 小腸におけるカルシウム吸収のしくみとビタミンD作用

食事で摂取した成分の多くは小腸で吸収される。食べ物は口腔内で咀嚼され、物理的に細かな形状にされると、唾液と共に分泌される消化酵素の作用をうけて、最初の消化が開始する。その後の消化管内でも更なる消化を経ながら、食事由来成分はより小さなサイズに消化され、吸収に適した構造に変えられる。炭水化物の場合は単糖類、タンパク質はアミノ酸、脂質は脂肪酸とグリセロール、ミネラル類は、遊離のイオンとなり吸収される。カルシウムは、消化管内の酸により結合型から遊離型のカルシウムイオンとなると、小腸上皮の輸送機構にて体内に吸収される<sup>1)</sup>。ここでの輸送にはATPを必要とする輸送する能動的経路と、消化管内腔と体液のカルシウム濃度差を利用して、濃度の高い方から低い方へと受動的に輸送される経路の二つが存在する。能動的なカルシウム吸収は、一旦、腸上皮細胞にカルシウムが取り込まれる経細胞的な輸送であり、活性型ビタミンD [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] の作用により強く促進される。

能動カルシウム吸収の仕組みは3つのステップにより構成されている。細胞のapical側（管腔側）細胞膜上に局在するカルシウムチャンネルを介した細胞内へのカルシウムイオン流入に始まり、細胞内ではカルシウム結合タンパク質にカルシウムイオンは捕捉され、最後に基底膜側細胞膜に局在するATPase型カルシウムポンプにより腸上皮細胞から生体内へと汲み上げられる<sup>8)</sup>。それぞれのステップで活躍する分子として、カルシウムチャンネルのTRPV (transient receptor potential vanilloid)<sup>6)</sup>、細胞内カルシウム結合タンパクのcalbindinD9kやカルシウムポンプPMCA (plasma membrane calcium pump) が既に同定されている。これらは1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>作用により発現量が増加するため、その結果カルシウムの輸送効率が高まる (図1)。

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は細胞内の受容体に結合してその作用を発現するため、ビタミンD受容体 (vitamin D receptor : VDR) の機能を欠いたVDR欠損 (KO) マウスや、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を生成する水酸化酵素機能を欠損したCyp27b1KO

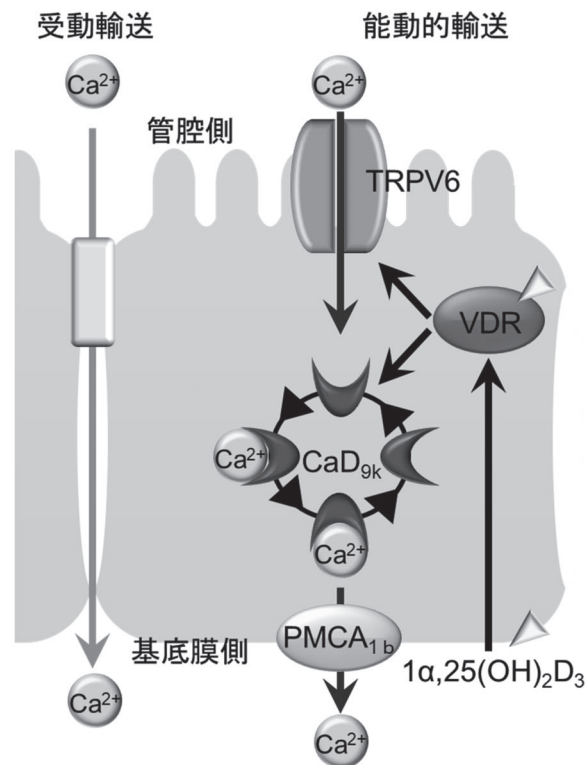


図1 小腸カルシウム吸収のしくみ

食事から摂取したカルシウムは、腸上皮細胞に局在するカルシウムチャネル（TRPV6）により消化管内腔から上皮細胞に取り込まれる。細胞内ではカルシウム結合タンパク質（CaD9k）に捕捉され、基底膜側に局在するカルシウムポンプ（PMCA1b）へとカルシウムが受け渡される。カルシウムポンプの働きによりカルシウムは血液中に組み上げられ、能動的吸収が完了する。受動的吸収は、濃度勾配を利用して細胞間隙を通過する吸収機構である。

マウスがビタミンD作用低下モデルとして作出され、生体機能における  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  作用の重要性の解明に至った<sup>26)</sup>。これらのマウスに共通する表現型は、カルシウム吸収量効率の低下、低カルシウム血症、骨量の減少である。カルシウムの血中濃度は、小腸での吸収と、骨からの動員、さらに、腎臓尿細管での再吸収により極めて狭い範囲に調整されている。食事カルシウム量の増加や<sup>7)</sup>、VDRKOマウスの小腸のみVDR発現を回復し<sup>8)</sup>カルシウム吸収増加を促すことで、低カルシウム血症を正常化し、骨量は増加する。カルシウムや骨の恒常性における  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の最大の作用標的は小腸カルシウム吸収だということを示す研究結果である。

### 生体要求量に応じたカルシウム輸送調節

ビタミンD依存的カルシウム吸収機構の重要性は、カルシウムの摂取状態によっても大きく変化する。能動的カルシウム吸収機構の第一関門は、主に腸上皮細胞膜上のTRPV6カルシウムチャネルを通過する上皮細胞内へのカルシウム流入である。マウスの食事中カルシウム量を増加すると、小腸上皮のTRPV6発現量は減少する<sup>9)</sup>。つまり、カルシウム摂取量が充足されていると、消化管内腔のカルシウム量が増加し、受動拡散的に細胞間隙から輸送されるため、能動的なカルシウム吸収の仕組みの必要性は下がると考えられる。

一方、カルシウム摂取量が少ない時や、妊娠時、授乳期など、カルシウム要求量が高まるタイミングでは、カルシウム吸収効率が高まる。マウスの腸上皮に発現するTRPV6量を比較したところ、非妊娠時に対して妊娠時や授乳時の母体で発現量が増加することを観察している<sup>10)</sup>。この変化はVDRKOマウスでも現れることから、ビタミンD作用に依存しない能動的なカルシウム吸収が機能すると示唆される。



## リンとカルシウムのバランス関係

カルシウム吸収能が著しく低下し、カルシウムや骨の恒常性が破綻した VDRKO マウスの特徴的な表現系を改善する食事として高カルシウム食の効果が報告されているが、カルシウムとの摂取比を（カルシウムの割合を）上げるために食事のリン量を制限することでも効果が認められる<sup>11)</sup>。正常飼料中のカルシウム量を 0.5% として、リン量はその半量の 0.25% に調整したリン制限食を VDRKO マウスに投与したところ、カルシウムの吸収量は増加し、VDRKO マウスの血中カルシウム濃度を正常化することができる。食品栄養学分野では、生体内でのカルシウムの利用効率を高めるためには、リン摂取量とのバランスに配慮すべきであることが古くから研究されており、VDRKO マウスが作出された当時から栄養実験が実施され、望ましいカルシウム：リン比が検討されてきた。

生体内では、カルシウムは無機リンと結合しやすく、特に硬組織では難溶性のリン酸カルシウム塩が形成されることで、組織が造り上げられる。この化学反応は、それぞれのイオン濃度の増加が契機となるため、どのような生体内の環境でも進行可能と考えられる。つまり、消化管内でカルシウムとリンの量が増加すると、互いに結合してリン酸カルシウム塩となり、遊離型で存在するそれぞれのイオン濃度は低下することになる。したがって、摂取リン量を増加すると、リン酸カルシウム塩が生成されるため、イオン化カルシウム量は減少し、カルシウム吸収は低下する。実験ではリン制限食によりカルシウム吸収は増加したが、リン制限によりイオン化カルシウム量が増加したのであれば、通常の飼料摂取では、既に消化管内で不溶性塩が多く形成されていることになる。しかしながら、実験で用いた 0.5% というカルシウムとリンの飼料中含有量は、消化管内で難溶性塩を析出させる程の過剰量ではなく、むしろ、効率的な吸収が得られる適正な配合量である。リン制限により、難溶性塩の形成量が減少し、イオン化カルシウムが増加したとは考えにくい。

リン制限時の様な消化管内環境の変化に应答して導かれるカルシウム吸収が、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  や性ホルモンとは独立して機能する経細胞カルシウム輸送である可能性は否定できない。これを実証するために、消化管上皮細胞を多孔膜（トランスウェル）プレートに培養し、細胞を分化させて管腔側と基底膜側の極性が現れた段階でカルシウム輸送試験を実施したところ、管腔側培養液中のリン濃度の低下により管腔側から基底膜側培養液へのカルシウム輸送量の増加を確認した<sup>12)</sup>。この評価系を用いてリン濃度変化に应答する細胞内外の環境を調べたところ、培養腸上皮細胞から管腔側培養液への ATP 放出量が増加し、同時に、細胞膜上で外液の ATP を分化する ENPP1 の局在量が減少していた。このような ATP 代謝分子動態の変化はリン制限食を投与したマウスの腸上皮組織でも同様に観察され（図 2）、さらに、管腔側の細胞膜上の ATP 受容体である P2X が、カルシウム流入に関与することも見出した<sup>12)</sup>。これより、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  作用から独立したリン量に应答する経細胞的カルシウム吸収機構が機能していると考えられる。

すると、カルシウムの吸収効率を高めるためには、リン摂取量を抑えることが合理的といえる。しかしながら、カルシウムは生体内ではリン酸カルシウムとして骨の構成成分となっており、小魚などにはカルシウムだけでなく、リンも多く含まれる。カルシウムを多く含む食品のリン含量は高いため、食品の選択によりバランスを維持することは容易ではない。むしろ、リンを過剰に摂取しないよう、食品添加物としてのリン酸塩を多く含む食品を避けるなど、食の選択を工夫すべきであろう。

## 骨組織における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の骨吸収・石灰化調節作用

骨はカルシウムやリンの最大の貯蔵庫であり、血中カルシウム濃度低下時には破骨細胞による骨吸収が高まり骨から血中にカルシウムを動員する。小腸カルシウム輸送が減少すると、PTH の分泌量が増加し、腎臓での  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の産生を促進する。PTH や  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  はそれぞれ骨芽細胞での RANKL (receptor activator of NF  $\kappa$  B ligand) 発現を直接促進し、破骨細胞分化を誘導する<sup>13, 14)</sup>。したがって、骨組織で  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が正常に作用する小腸 VDR 欠損マウスでは、カルシウム吸収が著しく減少しているにもかかわらず、活発な骨吸収により血中カルシウム濃度は正常範囲に維持されている。このように、破骨細胞の骨吸収によるカルシウム動員機構は、カルシウム恒常性を維持

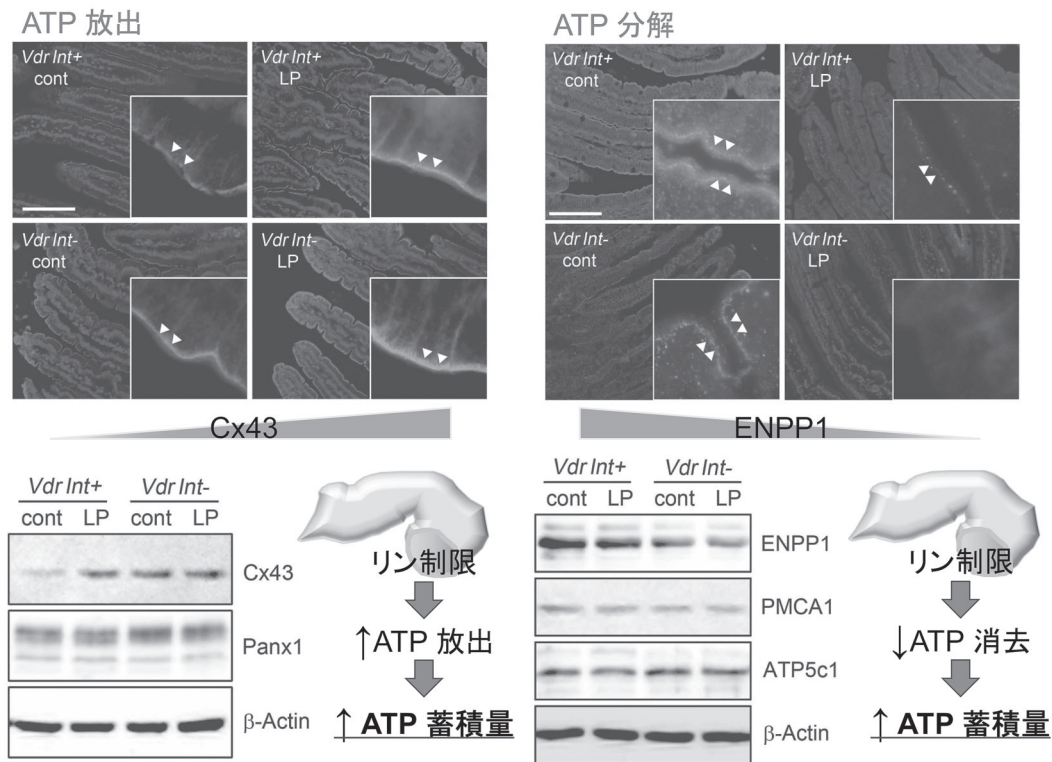


図2 リン制限食摂取時のATP代謝分子動態の変化

リン制限食の摂取により細胞内のATPを消化管腔内へ放出する分子(Cx43)の発現量は増加し、逆に、消化管腔内のATPを消去する分子(ENPP1)の発現量は減少した。この両者の変化はいずれも消化管腔内のATP量を増加する。

するための重要なしくみである。

一方、骨芽細胞も $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 作用の下で骨カルシウム沈着を調節しながら、カルシウム恒常性維持にはたらく。生体内の石灰化は、基室小胞へカルシウムやリンが取り込まれてリン酸カルシウムの(ヒドロキシアパタイト)結晶が形成されることから始まる。リン酸カルシウムの材料となるリンは、無機リンやATP等のリン化合物の分解により供給される。ATPの分解過程ではピロリン酸が生成し、ピロリン酸はアルカリフォスファターゼの作用によって無機リン酸となって石灰化の材料として利用されるのだが、中間代謝物のピロリン酸はカルシウムと結合して石灰化を抑制する。このように、ATPの代謝過程で生成する化合物によっては、石灰化生成に対して相反する作用を示す。培養細胞による実験では、野生型マウス由来の骨芽細胞前駆細胞への $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与により、石灰化が抑制された<sup>15, 16)</sup>。この結果は、骨芽細胞において $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がピロリン酸を輸送するAnk (progressive ankylosis) や、ATPを分解しピロリン酸へと代謝する酵素Enpp (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase)<sup>13</sup>の発現量を増加させる作用に基づいており、AnkやEnppが増加した結果、細胞周囲に蓄積したピロリン酸により石灰化が抑制されるためである<sup>15)</sup>。骨芽細胞はアルカリフォスファターゼを発現してEnppにより生成したピロリン酸を分解しモノリン酸へと代謝するのだが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用によるピロリン酸生成がモノリン酸への代謝を上回るとピロリン酸が蓄積するアンバランスが生じ、骨石灰化に抑制的に作用すると考えられる(図3)。

骨芽細胞でビタミンDは骨石灰化を抑制して細胞外液中のカルシウムを「節約」する。小腸カルシウム吸収が減少すると、PTH分泌の上昇によりビタミンDの合成は促進され、破骨細胞側での骨吸収による骨からのカルシウムの動員作用と、骨芽細胞側での石灰化阻害作用による細胞外液カルシウムの節約作用が同時にはたらくことになる(図3)。

この研究結果は、ビタミンDの強力なカルシウム恒常性維持機能を説明するとともに、改めて単純なカルシウム摂取不足が重篤な骨破壊を引き起こす危険性を指摘している。ビタミンDの標的は血中カルシウム濃度の維持であるため、食事からのカルシウム摂取量が適正に確保さえすれば、血中カルシウム濃度は正常に維持される。そして、

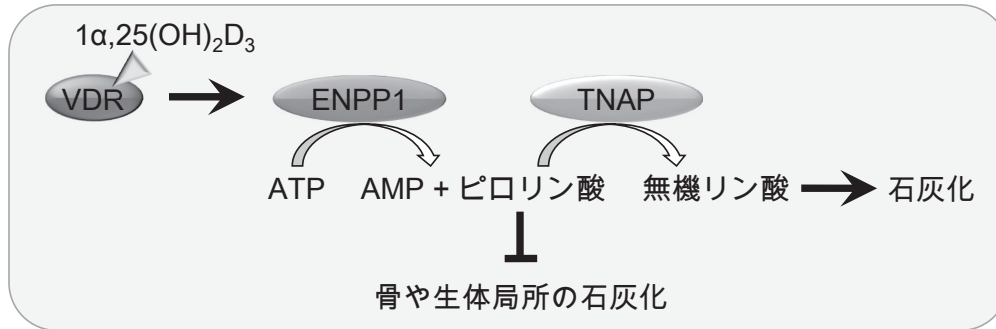


図3 ビタミンD作用による生体局所での石灰化調節のしくみ

活性型ビタミンD [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] は、ATPをピロリン酸に代謝するENPP1の発現量を増加する。ピロリン酸はリン酸カルシウムの結合を阻害するため、石灰化に対して抑制的に働くが、脱リン酸酵素の働きを受けるとピロリン酸から無機リン酸が生成する。無機リン酸は石灰化の材料となるため、生体局所ではこれらの作用が雑妙なバランスで調整されている。

骨の成長や骨量の維持のために、カルシウムは骨に沈着し貯蔵される。しかしながら、カルシウムの摂取量が不足した状態で、仮に、ビタミンD作用のみを高めると、骨から血中へカルシウムが動員されてしまう。つまり、ビタミンDの摂取を増加すると同時にカルシウムを適正な量で摂取しなければ、期待する骨量維持の作用が得られないだけでなく、骨の破壊を引き起こすことになるのである。

### おわりに

カルシウム恒常性におけるビタミンD作用の最大の標的は、小腸カルシウム吸収促進作用であり、ダイナミックなカルシウム動員を実現する局所組織では、ビタミンDは常に血液中のカルシウム濃度を上昇する役割を果たしている。ただし、ビタミンDに応答する細胞機能は、細胞外のミネラル環境やビタミンD以外の内分泌的な作用により代償されることから、ライフステージ毎にその機能は変化する。

骨の成長や健康維持のために、カルシウムやビタミンDの摂取が推奨されると、単一の成分の摂取量にとらわれ、目的の成分を豊富に含む食品を選択することでさも解決できるような理解に陥りやすい。食品栄養学分野の研究者は、栄養素が利用される過程での成分間の相互作用について、ヒトの生体生理を反映するメカニズムを理解せねばならない。それと同時に、科学的な根拠を消費者が正しく捉えるための発信方法も今一度見直すべきなのであろう。本来、栄養素の過不足による代謝異常は健康な食の実践により改善できるという考えに立ち返り、合理的な食選択を導く刷新的な提案が求められている。

### 文献

- 1) Lieben L, Carmeliet G, Masuyama R: Calcemic actions of vitamin D: effects on the intestine, kidney and bone. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25, 561-572, 2011
- 2) Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, et al.: Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet*, 16, 391-396, 1997
- 3) Li YC, Pirro AE, Amling M, et al.: Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9831-9835, 1997
- 4) Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, et al.: Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13324-13329, 2001
- 5) Panda DK, Miao D, Tremblay ML, et al.: Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7498-7503, 2001
- 6) Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, et al.: Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology*, 142, 3135-3141, 2001

- 7) Masuyama R, Nakaya Y, Katsumata S, et al. : Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J Bone Miner Res*, 18, 1217-1226, 2003
- 8) Lieben L, Verlinden L, Masuyama R, Torrekens S, Moermans K, Schoonjans L, Carmeliet P, Carmeliet G. Extra-intestinal calcium handling contributes to normal serum calcium levels when intestinal calcium absorption is suboptimal. *Bone*. 2015; 81: 502-512.
- 9) Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, et al: Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the *Trpv6* calcium channel gene. *J Bone Miner Res* 22: 274-85. 2007
- 10) Van Cromphaut SJ, Rummens K, Stockmans I, et al : Intestinal calcium transporter genes are upregulated by estrogens and the reproductive cycle through vitamin D receptor-independent mechanisms. *J Bone Miner Res* 18 (10): 1725-36. 2003
- 11) Masuyama R, Nakaya Y, Tanaka S, Tsurukami H, Nakamura T, Watanabe S, Yoshizawa T, Kato S, Suzuki K. Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*. 2001; 142 (1): 494-497.
- 12) Uekawa A, Yamanaka H, Lieben L, et al : Phosphate-dependent luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in intestinal epithelial cells. *FASEB J*.32 (4): 1903-1915. 2018
- 13) Kim S, Yamazaki M, Zella LA, et al: Activation of receptor activator of NF-kappaB ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated through multiple long-range enhancers. *Mol Cell Biol* 26: 6469-6486. 2006
- 14) Fu Q, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid Hormone Controls Receptor Activator of NF-|kappa|B Ligand Gene Expression via a Distant Transcriptional Enhancer. *Mol Cell Biol* 26: 6453-6468. 2006
- 15) Lieben L, Masuyama R, Torrekens S, et al: Normocalcemia is maintained in mice under conditions of calcium malabsorption by vitamin D-induced inhibition of bone mineralization. *J Clin Invest* 122 (5): 1803-1815. 2012
- 16) Yamaguchi M, Weitzmann MN. High dose 1,25 (OH) 2D3 inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Int J Mol Med* 29: 934-938. 2012

(ますやま りつこ 立命館大学食マネジメント学部・教授)