論文の内容の要旨

リポタンパク質による脂溶性ビタミンの体内動態制御とその異常による病態発症に関する研究

増尾　友佑

【背景・目的】

脂溶性ビタミン（ビタミン A、D、E、K）は生体の恒常性維持に必須な脂溶性化合物であり、栄養物としての必要摂取量や過剰症・欠乏症に関する研究はこれまでに数多く行われてきたが、生体内における体内動態制御機構に関しては不明の点が多い。吸収後の血液中での生体内輸送においては、その水への難溶性から何らかのキャリアー分子が必要となると考えられるが、系統立った解析はなされていないのが現状である。そこで、同じく親水性の低いコレステロールやトリグリセリドの血液中での生体内輸送を担うリポタンパク質に着目し、脂溶性ビタミンの体内動態がリポタンパク質依存的に制御されているという仮説を検証した。

つづいて、リポタンパク質による生体内輸送が示されたビタミン K に関して、さらなる研究を進めた。慢性腎障害時には、脂質代謝異常、末梢組織由来のビタミン K 欠乏マーカーの上昇、血管壁石灰化が合併していることが知られるが、これらの合併症の原因及び相互の関係性は不明であった。ビタミン K は血管壁石灰化抑制作用を有することが示唆されていることから、脂質代謝異常に伴うビタミン K の血管壁への移行不全が慢性腎障害時に生じる血管壁石灰化を誘発するという仮説のもと、以下の検討を行った。

【方法及び結果】

1　脂溶性ビタミンのリポタンパク質を介した末梢移行

脂溶性ビタミンのうち、ビタミン E 及びビタミン K に関してはリポタンパク質へ分布しうることが過去に報告されていたが、他の脂溶性ビタミンに関するリポタンパク質への分布及びリポタンパク質を介した体内動態制御の重要性は明らかでなく、まず脂溶性ビタミン全般についてリポタンパク質分布の検討を行った。

はじめに、定常状態における脂溶性ビタミンのリポタンパク質分布を調べた。絶食下ラット血漿のフラクショネーション後の各フラクション中の脂溶性ビタミンの定量を行い、各脂溶性ビタミンの溶出プロファイルを得た。その結果、ビタミン E 及びビタミン K は、リポタンパク質への分布が確認された一方で、ビタミン A 及びビタミン D は主に各特異的結合タンパク質である retinol binding protein 4 (RBP) 及び vitamin D binding protein (DBP) への分布が確認された。

この定常状態における脂溶性ビタミンのリポタンパク質への分布が、実際に脂溶性ビタミンの末梢への移行に寄与しているかを検討するために、リポタンパク質挙動変化を誘発し、さらなる検討を行った。

最初に、Triton WR-1339 投与による血液中への very low density lipoprotein (VLDL) 蓄積条件下での脂溶性ビタミンのリポタンパク質分布変化を検討するため、各フラクション中の脂溶性ビタミンの定量を行い、各脂溶性ビタミンの溶出プロファイルを得た。その結果、Triton-WR-1339 投与群では、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E、ビタミン K のいずれの脂溶性ビタミンも VLDL 分画への蓄積が確認された。VLDL は肝臓で合成された後に血漿中に分泌されるため、以上の結果より、脂溶性ビタミンの肝臓からの分泌には、VLDL とともに分泌される経路も存在すると考えられた。

さらに、LDLR (low density lipoprotein receptor) 変異型マウスにおける血漿中への LDL (low density lipoprotein) 蓄積条件下での脂溶性ビタミンの血漿中分布に関して検討するため、各フラクション中の脂溶性ビタミンの定量を行った。その結果、LDLR 変異型マウスにおいていずれの脂溶性ビタミンも LDL 分画に顕著に蓄積することが見出され、脂溶性ビタミンの末梢組織での取り込みには、LDLR を介して取り込まれる経路も存在することが示唆された。続いて、実際に脂溶性ビタミンが LDLR を介して取り込まれる

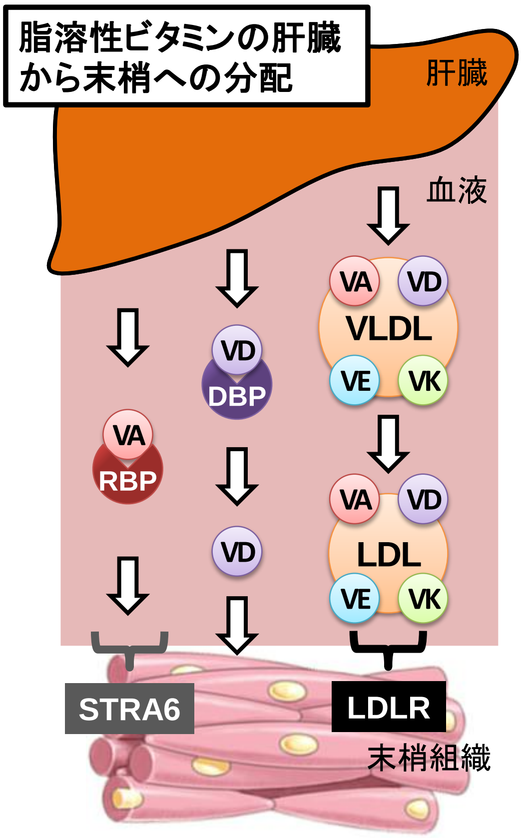

図1:脂溶性ビタミンの末梢への移行

かを検討するため、ラット血管平滑筋細胞由来 a7r5 細胞への LDLR 発現アデノウィルス感染条件下において脂溶性ビタミンの細胞内取り込みが増大するか検討を行った。その結果、いずれの脂溶性ビタミンも LDLR 発現ウィルスの感染によって細胞内への取り込みが増大したことから、脂溶性ビタミンは LDLR を介して細胞内に取り込まれうることが示された（図 1）。

２　慢性腎障害モデル動物における
ビタミンK挙動の変化

慢性腎障害時には、リポタンパク質挙動変化を伴う脂質代謝異常が生じることが知られており、リポタンパク質を介した輸送が示された脂溶性ビタミンの挙動変化が想定される。１の結果よりリポタンパク質への顕著な分布が示されたビタミン K について、まずは慢性腎障害に伴う脂質代謝異常時の血漿中濃度変化を調べた。雄性 Wistar ラットへのアデニンの混餌投与により慢性腎障害モデルを作成したところ、血漿中コレステロール・トリグリセリド濃度の上昇が見出された。lipoprotein lipase (LPL) は、VLDL から LDL への加水分解を担うが、LPL の活性抑制因子として apolipoprotein C3 (apoC3) が知られている。慢性腎障害時の脂質代謝異常は、apoC3 の発現量増加によって VLDL 蓄積が生じていることが一因と考えられる。また、脂質代謝異常が生じていることが確認されたこの条件下において、血漿中ビタミン K 濃度が顕著に上昇していることが明らかとなった。続いて、上述の方法でリポタンパク質分離を行ったところ、ビタミン K の VLDL 分画への顕著な蓄積が確認された。以上の結果から、慢性腎障害時の脂質代謝異常に伴いビタミン K の VLDL への蓄積が生じていることが明らかとなった。

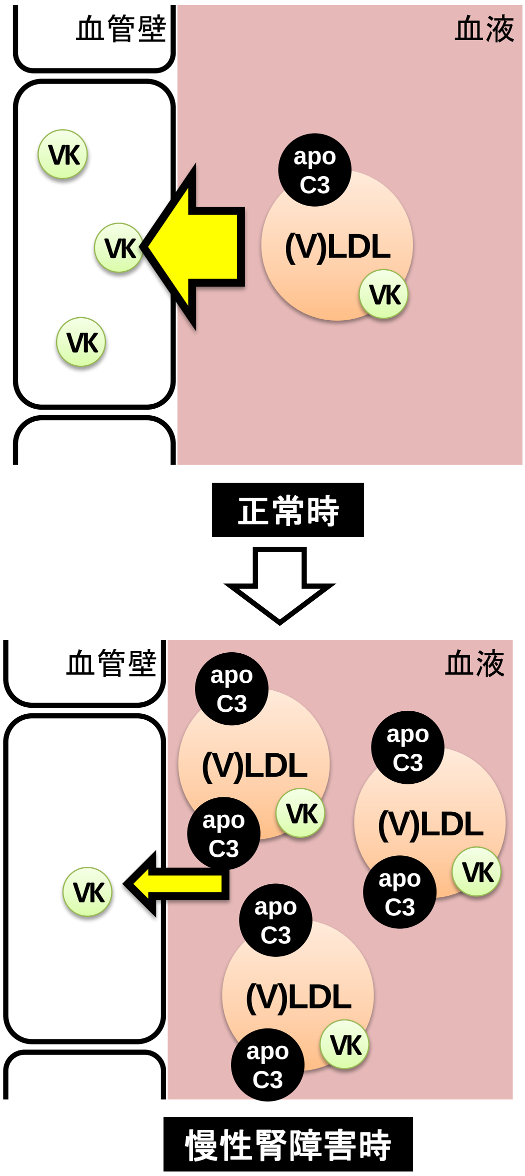

図2：慢性腎障害時のビタミンK挙動変化

また、慢性腎障害時には末梢組織由来のビタミン K 欠乏マーカーが上昇することが知られているが、実際の末梢組織でのビタミン K 欠乏状態の有無及びその欠乏の原因は不明であった。そこで、慢性腎障害時の末梢組織におけるビタ

ミン K の濃度変動について検討するため、胸部大動脈壁中濃度を測定したところ、慢性腎障害モデルにおいては胸部大動脈壁中のビタミン K 濃度が著しく低下していることが見出され、慢性腎障害時にはビタミンKの末梢組織への移行不全が生じていることが示された。以上より、慢性腎障害時には、リポタンパク質の血液中への蓄積に伴い、リポタンパク質に分布するビタミン K も血液中に蓄積しているにも関わらず、血管壁への移行不全の結果として血管壁中ビタミン K 濃度の低下が生じていることが示された (図 2) 。

３　血管壁石灰化に及ぼすビタミン K の影響

慢性腎障害に合併する血管壁石灰化は、致命的な心血管イベントを誘発し患者の予後に大きく影響を及ぼす。そこで、２で示された慢性腎障害時の血管壁中ビタミン K 濃度低下と、慢性腎障害に伴う血管壁石灰化との関係について検討するため、単離組織を用いた *ex vivo* 培養実験を行った。雄性 Wistar ラットの胸部大動脈を単離し輪状にした血管壁を、慢性腎障害を模した高リン酸濃度下において培養し、放射性同位体カルシウムの血管壁への蓄積量により血管壁の石灰化状態を評価した。その結果、ワルファリン存在下におけるカルシウム蓄積量の顕著な増加が見出され、ワルファリンによるビタミン K 欠乏状態の惹起が血管壁の石灰化を促すことが確認された。さらに、ビタミン K の添加によって、カルシウムの異常蓄積状態がレスキューされたことから、慢性腎障害時における血管壁石灰化は、血管壁中ビタミン K 濃度を上昇させることにより抑制されることが示された。

【まとめと考察】

本研究の結果、脂溶性ビタミンの末梢組織への分配経路には、RBP や DBP との結合を介した経路に加え、リポタンパク質を介する経路も存在することが示唆された。本研究で得られた知見より、LDLR 欠損等のリポタンパク質挙動の異常を伴う脂質代謝異常時には、脂溶性ビタミンの動態変化が生じうることが予想される。

また、実際に、リポタンパク質挙動の変化を伴う脂質代謝異常によって脂溶性ビタミンの動態が変化し、病態を誘発する例として、慢性腎障害時の血管壁石灰化の増悪が示唆された。慢性腎障害時の脂質代謝異常に伴い、ビタミン K は VLDL に蓄積することが見出された。さらに、血漿中のビタミン K 濃度の顕著な上昇にも関わらず、大動脈壁中のビタミン K 濃度は低下していた。ビタミン K は血管壁石灰化抑制作用を有したことから、慢性腎障害時の大動脈壁中ビタミン K 濃度低下が血管壁石灰化の増悪を誘発することが示唆された。以上より、ビタミン K のリポタンパク質を介した移行不全が、慢性腎障害時の血管壁石灰化の増悪の原因となることをはじめて提唱することができた。

血管壁石灰化は、致命的な心疾患イベントの発症リスクを高めるため、適切な対処が求められる。本研究の結果より、慢性腎障害時における血管壁石灰化増悪を抑制する対処法として、脂質代謝異常改善による血管壁へのビタミン K 移行の回復が提唱可能であり、今後の応用が期待される。