

学 位 論 文 題 名

24R,25-Dihydroxyvitamin D₃ : a vitamin D₃
metabolite essential for the healing process
of a fracture and the evidence for its membrane
receptor in fracture healing tissue

(骨折治癒におけるビタミンD₃代謝物 24R,25- ジヒドロキシ
ビタミンD₃の役割とその受容体に関する研究)

学位論文内容の要旨

ビタミン D の生物学的作用は、摂取されたコレステロールが皮膚にてプレビタミン D₃ を
経由してビタミン D₃ に変換され、さらに肝臓と腎臓で水酸化反応を受けた後に発揮されることが
知られている。1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1 α ,25(OH)₂D₃]は代表的な活性型ビタミン D₃ 代謝物であ
り、これに対応する核内受容体についても広く研究が行なわれている。一方、24R,25-
dihydroxyvitamin D₃ [24R,25(OH)₂D₃]は、1 α ,25(OH)₂D₃ とは異なる部位に水酸基が導入された代謝物
であるが、血漿中に高濃度で存在するにもかかわらず、この代謝物の生物学的役割はまだ充分に
は解明されていない。本研究では、骨における 24R,25(OH)₂D₃ の生物学的役割について、ニワトリ
における骨折治癒の実験モデルを用いて確定し、更にこの代謝物に対する特異的受容体の存在に
ついて検討した。

まず始めに、ビタミン D 欠乏食で飼育したニワトリを骨折させ、その後の治癒に対する
24R,25(OH)₂D₃ の飼料添加効果を検討した。24R,25(OH)₂D₃ は、単独では低い効果しか示さなかつ
たが 1 α ,25(OH)₂D₃ と共に飼料に添加すると骨力学強度のパラメーター(ねじり強度、弾性変形限界
角、硬度)と骨灰分量を改善させた。非天然型の光学異性体である 24S,25-dihydroxyvitamin D₃
[24S,25(OH)₂D₃]と 1 α ,25(OH)₂D₃ の併用群、もしくは 1 α ,25(OH)₂D₃ の単独投与群では、24R,25(OH)₂D₃
と 1 α ,25(OH)₂D₃ の併用に比較して治療効果は低かった。

上記の結果から、骨折治癒仮骨形成に際して、24R,25(OH)₂D₃ と 24S,25(OH)₂D₃ とは識別
される可能性が示されたので、次に骨折治癒仮骨に 24R,25(OH)₂D₃ に対する特異的な受容体が存在
するか否かを検索した。骨折治癒仮骨においては、古典的な核内/可溶性の 24R,25(OH)₂D₃ に対する
受容体は見出せなかった。一方、24R,25(OH)₂D₃ に対する特異的な受容体/結合タンパク質が骨折治
癒仮骨の膜画分に見出され、特異的なリガンド結合親和性を示した。この 24R,25(OH)₂D₃ 受容体の、
解離定数 K_D は 18.3 $\pm$ 1.9 nM、最大結合量 B_{max} は 43.9 $\pm$ 6.0 fmol/mg mg 蛋白であり、親和性の指標
である Relative Competitive Index (RCI)は、24R,25(OH)₂D₃/24S,25(OH)₂D₃/25(OH)₂D₃/1 α ,25(OH)₂D₃ の
各ビタミン D 代謝物に対して 100/37/42/1.8 であった。この RCI パターンは、光学異性体の差異を
識別しないニワトリ血清中のビタミン D 結合タンパク質(DBP)の RCI パターン(RCI =

100/100/219/4.3)とは異なっていた。この膜に存在する $24R,25(OH)_2D_3$ 受容体は $24R,25(OH)_2D_3$ に対する特異性が高いので、光学異性体 $24R,25(OH)_2D_3$ と $24S,25(OH)_2D_3$ との間にある僅かな構造上の差異を識別しているものと考えられる。

従来、 $1\alpha,25(OH)_2D_3$ に対する核内の受容体は骨芽細胞株に存在するが破骨細胞には存在しないことが知られている。しかしながら、骨折治癒過程に形成される仮骨組織での受容体については系統的な検索はなされていない。そこで、腓骨の骨折治癒仮骨組織のすべての画分、即ち核画分、後核り膜画分、及び超遠心処理後の可溶性画分について、 $1\alpha,25(OH)_2D_3$ に対する受容体/結合タンパク質を検索した。いずれの画分も結合活性を示したが、核画分に対する結合は高濃度の $1\alpha,25(OH)_2D_3$ においても飽和状態を示さなかった。しかし、仮骨の膜画分と可溶性画分については、飽和状態を示す結合が見出され、 K_D/B_{max} 値はそれぞれ $0.83 \pm 0.35 \text{ nM}/35.8 \pm 5.28 \text{ fmol/mg 蛋白}$ ならびに $0.66 \pm 0.38 \text{ nM}/9.8 \pm 1.4 \text{ fmol/mg 蛋白}$ であった。これらの受容体-リガンドのパラメーター値は、 $24R,25(OH)_2D_3$ -受容体の値とは明らかに異なっていた。

以上の結果から、仮骨の膜画分には $24R,25(OH)_2D_3$ に対する受容体/結合タンパク質が存在すること、及びこの受容体は $1\alpha,25(OH)_2D_3$ に対する受容体や DBP とは異なることが明らかとなった。従って、 $24R,25(OH)_2D_3$ は $1\alpha,25(OH)_2D_3$ とは異なる情報伝達の経路を介して生物学的応答を起こす可能性が示されたことになり、これが骨折治癒過程における本ビタミン D_3 代謝物の効果に関与するものと考えられる。以上本研究の結果から、 $24R,25(OH)_2D$ は仮骨形成において重要なビタミン D_3 代謝物であり、膜受容体との相互作用によって骨折治癒過程にその機能を発現していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

24R,25-Dihydroxyvitamin D₃ : a vitamin D₃ metabolite essential for the healing process of a fracture and the evidence for its membrane receptor in fracture healing tissue

(骨折治癒におけるビタミンD₃代謝物 24R,25-ジヒドロキシ
ビタミンD₃の役割とその受容体に関する研究)

ビタミンDの生物学的作用は、ビタミンD₃が水酸化反応を受けた後に発揮されること
が知られている。1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃[1 α , 25(OH)₂D₃]は代表的な活性型 ビタミン
D₃代謝物であり、これに対応する核内受容体についても広く研究されている。一方、
24R,25-dihydroxyvitamin D₃[24R,25(OH)₂D₃]は、血漿中に高濃度で存在するにもかかわらず生物学的役割はまだ充分には解明されていない。本論文では、骨における
24R,25(OH)₂D₃の生物学的役割について、ニワトリにおける骨折治癒の実験モデルを用い
て確定し、更にこの代謝物に対する特異的受容体の存在について検討した。

まず始めに、ビタミンD欠乏食で飼育したニワトリを骨折させ、その後の治癒に対す
る24R,25(OH)₂D₃の飼料添加効果を検討した。24R,25(OH)₂D₃は、単独では低い効果しか
示さなかったが、1 α , 25(OH)₂D₃と共に飼料に添加すると骨力学強度のパラメーター（ね
じり強度、弾性変形限界角、硬度）と骨灰分量を改善させた。しかし異性体である
24S,25(OH)₂D₃は無効であった。

これらの結果から、骨折治癒仮骨形成に際して、24R,25(OH)₂D₃と24S,25(OH)₂D₃とは
識別される可能性が示されたので、次に24R,25(OH)₂D₃に対する受容体について検討した。
骨折治癒仮骨においては、24R,25(OH)₂D₃に対する古典的な核内／可溶性の受容体は見出
せなかったが、膜画分に特異的な受容体／結合タンパク質の存在が見出された。この
24R,25(OH)₂D₃受容体の解離定数KDは18.3 $\pm$ 1.9nM、最大結合量Bmaxは43.9 $\pm$ 6.0fmol/mg
蛋白であり、親和性の指標であるrelative competitive indexは24R,25(OH)₂D₃ /
24S,25(OH)₂D₃ / 25(OH)D₃ / 1 α , 25(OH)₂D₃に対して100 / 37 / 42 / 1.8であった。同じ仮骨
標品について、1 α , 25(OH)₂D₃に対する受容体／結合タンパク質を検索した所、膜画分と

可溶性画分について飽和状態を示す結合が見出され K_D / B_{max} 値はそれぞれ $0.83 \pm 0.35 \text{ nM} / 35.8 \pm 5.28 \text{ fmol/mg}$ 蛋白ならびに $0.66 \pm 0.38 \text{ nM} / 9.8 \pm 1.4 \text{ fmol/mg}$ 蛋白であった。これらのパラメーター値は、 $24R,25(OH)_2D_3$ 受容体の値とは明らかに異なっていた。

以上のように本論文では、仮骨の膜画分に、 $1\alpha,25(OH)_2D_3$ に対する受容体とは別に、 $24R,25(OH)_2D_3$ に対する新しい受容体／結合タンパク質が存在することを明らかにし、骨折治癒過程における本ビタミン D_3 代謝物の効果に関与する可能性を示した。これらの成果は、ビタミンDの作用機構についての新しい知見を提供するものである。よって、審査員一同は、加藤明氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分であると認めた。