

<研究課題>

ビタミン K が高齢者の精神・行動へ及ぼす新規作用の解明 分子生物学から疫学まで

代表研究者 東京大学医学部附属病院 老年病科 講師 東 浩太郎

共同研究者 東京都健康長寿医療センター研究所 テーマリーダー 笹井 浩行

【抄録】

ビタミン K は、脂溶性ビタミンの一種であり、血液凝固に必要な因子として発見された。疫学研究において、ビタミン K 不足は骨粗鬆症、変形性関節症などの加齢性疾患に関わることが過去に示されている。私達も、日本人の地域在住高齢者において、ビタミン K の摂取不足と認知機能低下、フレイル、うつとの関連を疫学研究にて示し、報告してきた。本研究では、新たな独立した地域高齢者集団においても、ビタミン K 不足とうつ症状との関連を検証することができた。また、ビタミン K の作用メカニズムに関しては不明な点が多く残されている。新たなビタミン K 結合蛋白質の同定およびビタミン K の作用に重要なγグルタミンカルボキシラーゼ (GGCX) 自身のカルボキシル化の意義についての基礎研究を進めており、疫学研究の結果を説明できるような神経系における新たなビタミン K 作用の解明を目指している。

1. 研究の目的

ビタミン K は、脂溶性ビタミンの一種であり、血液凝固に必要な因子として発見された。疫学研究において、骨粗鬆症、変形性関節症などの加齢性疾患に関わることが過去に示されている。私達は、日本人の地域在住高齢者において、ビタミン K の摂取不足と認知機能低下 (Front Nutr. 8, 811831, 2022)、フレイル (Front Aging. 3, 865178, 2022)、うつ (Am J Geriatr Psychiatry. 30, 1051-1052, 2022) との関連を報告し、幅広い加齢性疾患にビタミン K の充足度が関与している可能性を示した。認知機能、フレイル、うつとの関連は、ビタミン K が人の精神機能や運動機能、行動制御に影響を及ぼしていることが示唆され、そのメカニズムとして神経系や筋組織に影響を及ぼしていることが推測される。

ビタミン K の作用メカニズムとしては、γグルタミンカルボキシラーゼ (GGCX) の補酵素としての働きが古くより解明されている。GGCX は小胞体膜に局在し、小胞体内において基質蛋白質のグルタミン酸 (Glu) 残基のγ位の炭素をカルボキシル化 (Gla 化) する反応を触媒し、凝固因子等 20 種ほどの基質が知られる。申請者らは、これとは異なるメカニズムとして、ビタミン K が核内受容体 SXR (ステロイド X 受容体) のリガンドとして転写を活性化作用およびその加齢性運動器疾患に

おける意義 (J Endocrinol 207, 257, 2010, PLoS One. 10, e0119177, 2015) について報告してきた。

本研究では、ビタミン K が GGCX や SXR 以外の分子と結合して作用する新規メカニズムの検証とその応用を目的の 1 つとした。

さらに、健康長寿医療センター研究所に所属する共同研究者が、2023 年に行った地域在住高齢者を対象とした縦断研究「板橋健康長寿縦断研究」において、ビタミン K の充足度を、これまで評価に用いていた低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) に加えて、PIVKA-II を用いて評価した。これまでの研究とは異なる指標および異なる集団で、認知機能、フレイル、うつ、との関連を検証することにより、メカニズム解析の根拠を与えるヒトを対象とした疫学データを蓄積し、栄養学的応用に役立てることを 2 つ目の目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 ビタミン K 結合蛋白質候補の同定

ビタミン K が結合しうる未知の分子の探索を行った。ビオチン化されたビタミン K を入手し、細胞内においてビタミン K と結合している蛋白質をストレプトアビジンを用いて網羅的に探索した。質量分析と組み合わせることにより、複数のビタミン K 結合蛋白質の候補

が同定された(論文未発表のため、分子名は伏せさせていただきます)。過去の報告より、ビタミン K 結合タンパク質は、ビタミン K の結合によりウエスタンブロッティングにおいて、泳動速度が変化することが推測されたため、候補蛋白質に対して、ビタミン K 刺激に有り・無しの条件において、ウエスタンブロッティングを行った。

2-2 γ グルタミンカルボキシラーゼ (GGCX) の泳動変化に関する検討

GGCX をビタミン K 刺激することにより、GGCX の泳動状態が変化することを我々は見出しており、そのメカニズムや生物学的意義の解析を試みた。GGCX は、基質蛋白質の Gla 化だけでなく、自らも Gla 化を受けることが知られており、Gla 化により GGCX の泳動状態が変化するのではないかと仮説を立てた。Gla 化がこれまでに報告されている Glu 残基や、我々が独自に同定した Gla 化を受ける Glu 残基を Ala に変えた変異型 GGCX を作成し、ビタミン K 刺激によるウエスタンブロッティングにおける泳動変化を評価した。また、これらの変異型 GGCX の細胞内局在に関して、免疫蛍光染色法により評価を行った。

2-3 板橋健康長寿縦断研究

他の疫学研究に参加していない東京都板橋区在住の 70 歳以上、85 歳以下の高齢者を対象として、老年医学健診(板橋健康長寿縦断研究)を 2023 年 2 月に実施した。採血検査にて、低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) を測定し、ビタミン K 充足度の指標とした。

3. 研究の成果

3-1 ビタミン K 結合蛋白質候補の同定

ビタミン K 結合蛋白質候補それぞれに対して、FLAG もしくは Halo tag 配列を付加した cDNA を作成し、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞にトランスフェクションした。これらの蛋白質の発現を tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。これらのビタミン K 結合蛋白質候補を HEK293 細胞にトランスフェクションした状態で、10 μM の MK-4(ビタミン K2)にて刺激したが、泳動性の変化を認めるものは存在しなかった。

3-2 γ グルタミンカルボキシラーゼ (GGCX) の泳動変化に関する検討

GGCX の Gla 化を受ける候補の Glu 残基をいくつかまとめて Ala に変異させた変異 GGCX を複数作成した(論文未発表のため、具体的な Glu 残基の部位は伏せさせていただきます)。これらの変異 GGCX には、FLAG 配列を付加し、FLAG 抗体にて検出できるようにした。変異 GGCX の plasmid を HEK293 細胞にトランスフェクションし、ビタミン K 刺激(20 μM, MK-4)を行った際の泳動状態の変化を評価したところ、変異の部位によっては、泳動状態の変化が消失するものが存在した。このことから、Glu 残基の Gla 化が、GGCX の泳動状態に影響を及ぼすことが推測された。この原因が、GGCX の局在変化に伴うものであるかを調べるため、HEK293 細胞およびヒト神経細胞由来の SH-SY5Y 細胞に、変異 GGCX をトランスフェクションし、FLAG 抗体を用いた、免疫蛍光染色にて評価を行った。GGCX は小胞体に局在することが知られ、小胞体局在の蛋白質 Calnexin と共局在を示す。本研究においては、Calnexin 抗体を用いた二重染色により、変異を入れた GGCX は、変異を入れない GGCX 同様、Calnexin と共局在を示し、いずれも小胞体局在であることが示された。

3-3 板橋健康長寿縦断研究

過去に私たちが疫学研究の対象とした高齢者集団とは異なる地域在住高齢者に対して、ビタミン K 充足度と認知機能、フレイル、うつとの関連について横断研究を行った。

うつ症状について、解析を行ったところ、対象者は 619 名であり、平均年齢 75.7 歳、うつ症状の該当者は 21.6%であった。四分位数により低い値から順に Q1 から Q4 の 4 群に分割した PIVKA-II もしくは ucOC を主要曝露変数、うつ症状 (GDS15 の 6 項目以上) を従属変数とした二項ロジスティック回帰分析を行った。年齢、性別、教育歴、BMI、併存疾患、喫煙歴を交絡因子として補正した。ucOC の Q1 を基準とした際に、Q4 のうつ症状に対するオッズ比は 1.92 (95%信頼区間: 1.04, 3.56) であり、傾向検定において線形の関連が認められた (P=0.045)。本研究において、地域在住高齢者において、ucOC の高値とうつ症状の関連が独立した集団において検証された。

4. 今後の課題

疫学研究の結果より、ビタミン K 不足は、認知機能、フレイル、うつ症状との関連が推測される。本研究は、観察研究にとどまっており、本研究の成果を元にした介入研究に発展させることが、今後の課題である。

また、認知機能やフレイル、うつ症状との関連は、神経組織におけるビタミン K の作用を推測させるものである。ビタミン K 作用の新たなメカニズムに関して、神経組織を標的にした解析が望まれる。

本研究ではビタミン K 結合蛋白質候補をいくつか同定したが、ビタミン K 結合の確証は未だ得られていない状況である。ウエスタンブロットティングにおける泳動状態の変化以外の

方法で、ビタミン K 結合を裏付ける証拠を得ることが今後の課題である。質量分析を用いた方法を現在検討している。また、ビタミン K の働きを担う酵素である GGCX に関して、本研究において新たな知見が得られた。現在は、変異した GGCX の活性を評価する方法を確立するための実験を進めているところである。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた新たな知見に関して、学会発表および論文発表を行う予定である。

以上

Novel psychological and behavioral effect of vitamin K in older adults; molecular biological and epidemiological approach

Primary Researcher: Kotaro Azuma
Assisitant Professor, Department of Geriatric Medicine,
The University of Tokyo Hospital

Co-researchers: Hiroyuki Sasai
Theme Leader,
Tokyo Metropolitan Institute for Geriatrics and Gerontology

Vitamin K is a fat-soluble vitamin which was discovered as a factor necessary for blood coagulation. Epidemiological studies revealed that vitamin K insufficiency was shown to be related with some aging-related diseases such as osoteoporosis and osteoarthritis. We have conducted a epidermiological study and reported that insufficient vitamin K intake is related with cognitive impairment, frailty, and depressive symptoms. We performed cross-sectional study based on independent cohort of community-dwelling older people and verified the reltiohship between vitamin K insufficiency and depressive symptoms. As for mechanism of vitamin K action, a lot of questions remain to be elucidated. We are searching for new candidates of vitamin K-biniding proteins. We are also interested in self-carboxylation of gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) which is an important enzyme for vitamin K function. The biological significance of carboxylation of GGCX is under investigation. We aim to clarify novel function of vitamin K in the nevous system which can explain the results of our epidemiological studies.