

氏名 (本籍) 市川 文彦

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 薬第 429 号

学位授与年月日 平成 12 年 11 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 活性型ビタミンD₃誘導体の作用に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 中畑 則道 教授 永沼 章

教授 大内 和雄

論文内容要旨

血中カルシウム濃度は、ビタミンD₃、副甲状腺ホルモン (PTH)、カルシトニンなどのカルシウム調節ホルモンによって厳密に調節を受けている。そのうち、ビタミンD₃は、血中カルシウム濃度を上昇させる働きを持ち、その欠乏によりクル病や骨軟化症がおこることが知られている。ビタミンD₃は、1920年代に発見された抗クル病因子であり、その後の研究によって天然型のビタミンD₃そのものは生理作用を有さず、肝臓において25-hydroxyvitamin D₃に、続いて腎臓で1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃)へと変換され、活性を示すことが明らかになった。また、ビタミンD₃受容体がステロイドホルモン受容体と類似性を有することが明らかとなり、ビタミンD₃はビタミンとしてだけでなく、ホルモンとして分類されている。

高齢化に伴い発症する骨粗鬆症患者や腎不全治療のための透析患者の増加に伴い、カルシウム代謝異常に基づくと考えられる骨代謝疾患が増加し、それら疾患を活性型ビタミンD₃製剤を用いて治療する試みがなされている。しかし、カルシウム代謝の複雑性のため、薬物として与えた活性型1 α ,25(OH)₂D₃が必ずしも十分な作用を発揮できない場合があり、各種誘導体の合成とそれら誘導体の代謝経路や作用機序の詳細な解明が検討されている。そこで本研究では、活性型ビタミンD₃誘導体を、骨代謝異常を伴う疾患の治療に応用していくために、それらの代謝および作用機序について研究を行った。

はじめに、活性型ビタミンD₃の前駆体である1 α -hydroxyvitamin D₃ (1 α (OH)D₃)を投与した場合の、1 α ,25(OH)₂D₃の動態およびその薬理作用について検討した。SD系ラットに³H標識した1 α (OH)D₃あるいは1 α ,25(OH)₂D₃を経口あるいは静脈内投与し(投与量はそれぞれ5 nmol/1,850 kBq/kg)、経時的に血清1 α ,25(OH)₂D₃レベルをHPLCで分画して定量した。その結果、1 α (OH)D₃経口投与後の血清1 α ,25(OH)₂D₃の生体内半減期は、1 α ,25(OH)₂D₃そのものを投与した時の半減期に比して長いことを明らかにした。また以前に、1 α (OH)D₃を経口投与すると、骨中1 α ,25(OH)₂D₃が長時間維持される現象が見い出されていたが、本研究では標的組織である骨にビタミンD₃ 25位水酸化酵素 mRNAが存在することをノーザンブロット解析にて確認した。さらに、マウス胎児頭蓋冠の器官培養やマウス由来の骨芽細胞の初代培養系を用いて、骨において1 α (OH)D₃から1 α ,25(OH)₂D₃へと変換されることを見出した。従来、1 α (OH)D₃から1 α ,25(OH)₂D₃への生体内での変換は肝臓で行われ、血流を介して骨へ1 α ,25(OH)₂D₃が供給されると考えられていたが、本研究により、標的組織である骨に1 α (OH)D₃の新規活性化経路が存在することを初めて示した。これらの事実より、1 α (OH)D₃を経口投与すると、骨へ1 α ,25(OH)₂D₃を高いレベルで供給が可能であり、1 α (OH)D₃は骨疾患の治療薬として有用な特性を有する活性型ビタミンD₃前駆体であることが推察される。

骨塩量低下モデルとして汎用されるラットは骨形成が優位な動物種のため、医薬品を開発する上で、ヒトと同様に骨形成と骨吸収が平衡状態にある動物を用いる必要がある。そこで、骨代謝様式がヒトと同様であるビーグル犬が、骨塩量低下モデルになり得るか否かを検討した。併せて1 α (OH)D₃による骨への薬理効果を、授乳期ビーグル犬を用いて検討した。授乳期ビーグル犬母体の腰椎あるいは下腿骨骨密度

(BMD) を二重X線骨塩量定量装置にて測定したところ、その変化を精度良く測定できることを確認した。さらに、授乳期においては、ビーグル犬の腰椎BMDが、交配時と比較して有意に低下することを初めて確認した。これらの結果から、ヒトと同様の骨代謝を有するビーグル犬で、授乳期に顕著なBMDの減少が認められ、薬剤のヒトにおける薬理効果を推測する上で、本実験系が有用であることが示された。この授乳期ビーグル犬に $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を $0.1\mu\text{g/kg}$ の用量で、出産予定日の2週間前より14週間、週3回の割合で経口投与すると、授乳期における腰椎BMDの低下が有意に抑制され、離乳後のBMDの回復が早められることを見出した。以上の結果より、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の骨改善作用が、ビーグル犬を用いることにより初めて明らかにすることができた。

二次性副甲状腺機能亢進症において過剰に分泌されるPTHは、腎性骨異栄養症の原因と考えられている。そこで、二次性副甲状腺機能亢進症への応用を目指し、 $1\alpha,25\text{-dihydroxy-22-oxavitamin D}_3$ (別名: 22-oxacalcitriol: OCT) の作用機序の解析を行った。SD系雄性ラットに5/6腎臓摘出術を施し、およそ3ヶ月飼育すると、血清PTH値が上昇することから、本動物を二次性副甲状腺機能亢進症モデルとして使用した。この病態動物に、OCT ($0.25\sim 6.25\mu\text{g/kg}$) あるいは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0.025\sim 0.625\mu\text{g/kg}$) を週3回 (合計7回) 静脈内間歇投与した。最終投与24時間後における副甲状腺中のPTH mRNA発現量および血清PTH値は、両薬剤の投与により用量依存的に抑制された。カルシウム代謝に関連すると考えられる因子として、ラット小腸では分子量9KDのビタミンD依存性カルシウム結合タンパク (vitamin D-dependent calcium binding protein 9K: CaBP- $\text{D}_{9\text{K}}$), また腎臓には分子量28KDのCaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ が知られている。そこで、これらCaBP-Dの発現に対するOCTあるいは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を比較検討した。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与群ではCaBP- $\text{D}_{9\text{K}}$ およびCaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ の用量依存的な遺伝子発現促進効果が見られたのに対して、OCT投与群では発現促進効果は認められなかった。従って、OCTの作用は標的組織により異なり、副甲状腺におけるPTH転写あるいはPTH分泌を抑制する作用は強く、血中カルシウム濃度上昇作用に関与する小腸および腎臓におけるCaBP-D発現への作用は極めて弱いことが、新たな知見として得られた。すなわち、このような作用に基づいて、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の副作用として知られている高カルシウム血症を引き起こさずに、OCTはPTHを選択的に抑制するものと考えられる。これらの結果より、従来の活性型ビタミン D_3 製剤では治療が困難であった二次性副甲状腺機能亢進症に対して、OCTの静脈内間歇投与は極めて有効な治療法であり、腎性骨異栄養症を改善できる可能性が、病態モデルを用いた結果から示された。

本研究から、骨粗鬆症に対する $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の有効性を示す作用機序の一つとして、経口投与後の $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ が骨中で $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に変換され、骨に対して持続的に作用していることが示唆された。 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の薬理作用として、ヒトと同様の骨代謝様式を有するビーグル犬にて、授乳期におけるBMDの低下を抑制できることを示した。また、二次性副甲状腺機能亢進症に対して、新規活性型ビタミン D_3 誘導体OCTの静脈内間歇投与が、血中カルシウム濃度の上昇を伴わず、副甲状腺からのPTH分泌を選択的に抑制することが示された。これらの結果から、各種の活性型ビタミン D_3 誘導体は、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とは異なった特性を有しており、その特性を利用して、他の疾患に対する医薬品化が可能と推測される。

人類がかつて経験したことのない高齢化を迎えている中で、カルシウム代謝異常による疾患の増加が予想

され、医薬品としての活性型ビタミンD₃誘導体の人類への貢献度がますます高くなるものと考えられる。活性型ビタミンD₃誘導体を医薬品として開発する場合、その唯一ともいえる副作用である血中カルシウム濃度の上昇作用がないものが望まれる。本研究で得られた知見をもとに、活性型ビタミンD₃誘導体がある多彩な作用を分離して、副作用を有さない新規誘導体の探索研究を行うことにより、さらに選択性の高い医薬品の開発が期待される。

審査結果の要旨

高齢化や腎不全治療のための透析患者の増加に伴い、骨粗鬆症や腎性骨異常栄養症などのカルシウム代謝異常に基づくと考えられる骨代謝疾患が増加し、それら疾患を活性型ビタミンD₃製剤を用いて治療する試みがなされている。しかし、カルシウム代謝の複雑性のため、薬物として与えたビタミンD₃製剤が必ずしも十分な作用を発揮できない場合があり、ビタミンD₃製剤の代謝経路や作用機序の詳細な解明が求められている。本研究では、活性型ビタミンD₃誘導体を、骨代謝異常を伴う疾患の治療に応用していくために、それらの代謝および作用機序について研究を行なった。

はじめに、活性型ビタミンD₃の欠乏によって生じる疾患に対し、その前駆体である1 α -hydroxyvitamin D₃ (1 α (OH)D₃)を投与した場合の、1 α ,25(OH)₂D₃の動態およびその薬理作用について検討した。従来、1 α (OH)D₃から1 α ,25(OH)₂D₃への生体内での変換は肝臓で行われ、血流を介して骨へ1 α ,25(OH)₂D₃が供給されると考えられていたが、本研究において、1 α (OH)D₃の新規活性化経路が標的組織である骨に存在することを初めて明らかにした。したがって、1 α (OH)D₃を経口投与すると、骨へ1 α ,25(OH)₂D₃を高いレベルで供給することが可能であり、1 α (OH)D₃は骨疾患の治療薬として有用な特性を有する活性型ビタミンD₃前駆体であると考えられる。

次に、骨代謝様式がヒトと同様であるビーグル犬を用いて1 α (OH)D₃による骨の改善作用を検討した。すなわち、授乳期ビーグル犬の骨密度を二重X線骨塩量定量装置(DXA)にて測定することにより検討したところ、骨塩量低下が認められ、その低下を1 α (OH)D₃は改善した。すなわち、1 α (OH)D₃の骨密度改善作用をビーグル犬を用いることにより実験的に初めて明らかにした。

PTHの分泌が亢進する二次性副甲状腺機能亢進症は、腎性骨異常栄養症の原因と考えられている。そこで、生体内半減期が短く、カルシウム動態の影響が少ない新規誘導体1 α ,25-dihydroxy-22-oxavitamin D₃ (別名: 22-oxacalcitriol: OCT)について、二次性副甲状腺機能亢進症への応用を目指して作用機構の解析を行った。OCTの作用は標的組織によりその作用が異なり、副甲状腺ホルモン(PTH)転写あるいはPTH分泌を抑制する作用は強く、血中カルシウム濃度上昇作用に関与する小腸および腎臓におけるビタミンD依存性カルシウム結合タンパク(CaBP-D)発現への作用は極めて弱いことが、新たな知見として得られた。すなわち、従来の活性型ビタミンD₃製剤では治療が困難であった二次性副甲状腺機能亢進症に対して、OCTの静脈内投与は極めて有効な治療法であることを明らかにした。

以上のように、本研究は各種の活性型ビタミンD₃誘導体が1 α ,25(OH)₂D₃とは異なった固有の特性を有することを示し、各種の活性型ビタミンD₃誘導体の臨床応用に科学的な裏付けを与えたものといえる。

したがって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。