

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00861

研究課題名(和文) FGF23を分子標的とした慢性腎臓病(CKD)の新たな食事・栄養療法の開発

研究課題名(英文) New nutritional treatment strategies for chronic kidney disease for FGF23

研究代表者

木戸 慎介(KIDO, Shinsuke)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30437652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)患者にみられる高リン血症はCKD-MBDと称される骨・ミネラル代謝障害や併発する心血管イベントの発症に深く関わる。血中リン濃度は食事由来のリン含有量に左右されるが、食事由来のリンを選択的に制限することは容易ではない。そこで本研究では、リン利尿因子FGF23に着目し、CKD患者におけるFGF23産生亢進機序解析を試みた。その結果、骨でのFGF23産生はCKD患者体内で蓄積が見られる尿毒症物質の一種(IS)によりAhR依存的に誘導されることを新たに見いだした。一方で、この作用はAhR阻害活性作用を有する食品由来機能性成分により減弱することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Indoxyl sulfate (IS) as uremic toxins, is accumulated in the serum to CKD patients. However, the relationship to between rise in serum FGF23 and IS has not been elucidated. The present study was undertaken to examine the effects of IS on FGF23 production in rat osteosarcoma UMR-106 cells. We obtained following findings: (1) The up-regulation of GalNAc-T3 by IS suppress proteolytic processing of FGF23 and probably stimulates the elevation of serum FGF23; (2) We investigated effect of an ethanol-extract from several vegetables on the FGF23 production in UMR106 cells. As a result, the production of FGF23 by IS was inhibited by addition of the ethanol extracts from Broccoli sprout (*Brassica oleracea* var. *italica*) and mulukhiya (*Corchorus olitorius*). Our finding could contribute to develop the FGF23-targeting the development of diet therapy for CKD.

研究分野：骨・ミネラル代謝学

キーワード：慢性腎臓病 高リン血症 食事療法 細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

高リン血症 (Hyperphosphatemia) は慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) 患者に共通してみられる病態であり、副甲状腺機能亢進症や腎性骨症などの骨・ミネラル代謝障害の原因となるばかりでなく、その悪化は血管石灰化の進行や心血管イベントの増加を引き起こし、患者の生命予後を悪化させることが様々な観察研究 (Levin A et al. *Kidney Int*, 71: 38-8, 2007, Wolf M et al. *Kidney Int*, 72:1004-13, 2007) から明白である。血中リン濃度と生命予後との関連については非透析患者においても透析患者と同様に血中リン濃度の上昇が総死亡リスクを上昇させること、さらに一般健常人においても心血管イベントや CKD の発症・進展と血中リン濃度との間に相関関係を示すこと (Tentori F et al. *Kidney Int* 70:1858-65, 2007, Naves-Diaz M et al. *Kidney Int* 74:1070-8, 2008) が報告されている。これらの成績は、例えば血中リン濃度が基準範囲内であっても高値であれば少なからず生命予後に何らかの悪影響を及ぼす可能性を示唆するものである。しかしながら現時点では、血中リン濃度と生命予後との関連性を明確に示すランダム比較試験が存在しないことなどから、血中リン濃度をどの範囲までコントロールすれば生命予後を改善可能かについて、未だ結論は得られていない。また、例えば血中リン濃度が基準範囲内であっても相対的に高値であれば合併症発症のリスクが高まること、さらに最近その有用性が新たに明らかとなった新規リン利尿因子である Fibroblast growth factor 23 (FGF23) が、血中リン濃度が上昇するよりも早い時期から上昇していること (Shoben AB et al. *JASN* 19:1613-9, 2008) や、血中 FGF23 値と生命予後・腎機能予後が関連すること (Thandhani R et al. *JAMA* 307: 674-84, 2010, Zeuw D et al. *Lancet*, 376:1543-51, 2010) などから、

CKD の病期 (ステージ) に関わらず血中リン濃度を基準範囲内に保つことの重要性が示唆されるとともに、基準範囲内であっても血中 FGF23 濃度を上昇させる食事由来のリン負荷は可能な限り避けるべきであるとも考えられる。

血中リン濃度は食事由来のリン摂取量に大きく左右されることが知られている。通常、食事から摂取されるリンの量は調理による損失を考慮しても不足することは希であり、食の欧米化 (動物性食品の摂取量増加など) や食品添加物由来のリン酸塩など、むしろ過剰摂取の危険性が指摘されている。CKD 患者にとってリンの摂取制限は腎機能の悪化および透析導入を阻止する上で必要不可欠である。一方で、リンは広く食品に含まれ、特に我々が摂取するタンパク質性食材 (食品) に多く含まれることから、リンの摂取制限は結果的にタンパク質の制限に繋がり、これが透析患者や CKD 患者における栄養障害の一因となっている恐れがある。このため、CKD 患者においては栄養障害を来さない範囲でのリン代謝障害への対策が必要となる (Fouque D et al. *Kidney Int* 80:348-357, 2011)。近年、リン管理の観点から、リン吸着薬が注目されているが、本剤特有の消化器症状などの副作用、服用剤数の多さなどの要因から服薬が遵守されにくいなどの問題点が指摘されている。これらの現状を打破すべく本研究では、リン負荷により惹起されるリン利尿因子 FGF23 を標的とした新たな食事・栄養学的リン管理の実現可能性について検証することを主たる目的とする。

## 2. 研究の目的

FGF23 は骨で産生され、腎尿細管に作用しリンの再吸収を抑制するいわば内分泌因子 (ホルモン) として機能するポリペプチドである。FGF23 は転写制御に加えて分子内切断による活性制御を受けており、O 型糖鎖付加

酵素 GaINAc-T3 は当該切断部位への糖鎖修飾を介して活性制御に関わる鍵分子である。申請者は慢性的なカドミウム暴露によって生じる低リン血症と骨軟化症を主徴とする骨ミネラル障害(イタイタイ病)の病態解析から、本症患者では血中 FGF23 値が亢進していることを明らかにしている (Aranami F et al. J Med Invest 57(1):95-108,2010)、またその分子機序としてカドミウムは芳香族炭化水素受容体 (AhR) 依存的に GaINAc-T3 を誘導することで FGF23 産生を亢進するといった、新たな分子機序の存在を明らかにした (Kido S et al. Toxicol Sci 132(2):310-16,2014)。さらに申請者は、CKD 患者体内で蓄積し合併症発症に深く関わるとされる尿毒症物質 indoxyl sulfate (IS) が AhR 依存的に GaINAc-T3 を誘導する事を見いだしている (木戸慎介他、第 16 回日本病態栄養学会学術集会、2013 年)。本成績は CKD 患者における FGF23 高値の分子機序解明の手助けになるだけでなく、CKD 患者における FGF23 産生・誘導機序 (AhR ~ GaINAc-T3) を分子標的とした新たな食事・栄養療法の実現可能性を強く示唆するものである。そこで本研究計画では、CKD 患者におけるリン管理の新たな方策として、FGF23 を標的とした新たな食事・栄養療法の可能性について検証を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 尿毒症物質 IS による GaINAc-T3 の発現誘導を介した FGF23 活性制御機構の解明

本研究計画は CKD の病態が骨での FGF23 産生を惹起するという仮説に基づくものであり、CKD 患者体内で蓄積するとされる尿毒症物質の一種である IS をその惹起因子と仮定するものである。そこでまずこの仮説が正しいものであるのかを検証するため、Adenine 誘導性腎不全モデルを作成し、骨における FGF23 遺伝子およびその分子内切断に関わる

GaINAc-T3 遺伝子の発現変動を解析する。またこの惹起因子が尿毒症物質である事を確認するため、腎不全モデルに経口尿毒症吸着活性炭薬 (クレメジン) を投与後の病態並びに血清 FGF23 値の変動を検討するとともに、健常動物に尿毒症物質 IS を過剰投与することで GaINAc-T3 mRNA の誘導並びに血中 FGF23 値の上昇といった一連の現象が AhR 依存的であるか否かを検証するため、Adenine 誘導性腎不全モデル動物に AhR antagonist (3,4-DMF など) を投与し、GaINAc-T3 mRNA の誘導並びに血中 FGF23 値の変動を観察する。

#### (2) AhR を標的とした FGF23 誘導を抑制可能な食品あるいはその機能性成分の探索

申請者は CKD 患者と同じく骨・ミネラル代謝異常を呈するイタイタイ病患者の病態解析から、カドミウムによる GaINAc-T3 遺伝子の転写誘導は AhR 依存的であること、またカドミウムによる GaINAc-T3 の誘導並びにそれに伴う FGF23 の産生増加(分子内切断の抑制)は AhR antagonist により減弱することを明らかにしている (Kido S et al. Toxicol Sci, 2014)。そこで尿毒症物質 IS による同作用についても AhR antagonist による抑制効果が見られるか否かについて培養骨芽細胞を用いた系により検証する。また近年、植物由来のポリフェノールやインドール系化合物において、AhR のリガンドとして作用する化合物が数多く発見されてきている。そこで本研究では尿毒症物質 IS による GaINAc-T3 mRNA の誘導およびそれに続く FGF23 産生誘導(分子内切断抑制)を指標に、当該病態の軽減に有効な機能性成分の探索 (スクリーニング) を試みる。

#### (3) AhR 阻害活性を有する機能性成分の探索およびその有効性検証

(2) で得られた機能性成分が *in vivo* でも期待される効果を発揮するか否かについて、Adenine 誘導性への投与実験を通じてその有効性を検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 尿毒症物質 IS による GalNAc-T3 の発現誘導を介した FGF23 活性制御機構の解明

本研究計画はCKD患者体内で蓄積するとされるISがFGF23の惹起因子と仮定するものである。そこでまずこの仮説を検証すべく、CKDモデル動物(Adenine投与マウス)を用いた検討を試みた。その結果、Adenine投与マウスでは投与2週間程度から血中クレアチニン、リンの軽度上昇とともに、FGF23値の上昇を認めしたが、これは経口尿毒素吸着活性炭(クレメジン)の併用により低下した。また健常動物へのISの単独大量投与で血中FGF23値の軽度上昇を認めた。このISによる血中FGF23値の上昇に関わる機序を解析するため、培養骨芽細胞を用いた検討を加えた。培養骨芽細胞(UMR106)にISを添加したところ、培養上清中におけるFGF23濃度の上昇(FGF23産生の増加:ELISAにより解析)を認めた。一方、FGF23 mRNAは不変であった。そこでFGF23の翻訳後修飾(分子内切断)に関わる糖鎖修飾酵素GalNAc-T3の発現に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、ISの添加はGalNAc-T3 mRNAを用量依存性に誘導した。またIS添加によるFGF23産生の増加(培養上清)は内因性GalNAc-T3の発現抑制(siRNA)により減弱した。次にISによるGalNAc-T3遺伝子の誘導機序の詳細を明らかにするため、GalNAc-T3遺伝子の5'転写調節領域(プロモーター)への影響についてLuciferase reporter assayによる検討を試みた。その結果、ISはGalNAc-T3遺伝子の転写を用量依存性に促進すること、またその効果は転写調節領域上に見いだしたAhR応答様領域(XRE-like)(Kido S et al. Toxicol Sci, 2014)に依存したものであることを明らかにした。

### (2) AhR を標的とした FGF23 誘導を抑制可能な食品あるいはその機能性成分の探索

そこで次にISによるFGF23産生増加を抑制可能な食品あるいはその機能性成分を探索するため、培養骨芽細胞を用いた検討を加えた。まず候補食材およそ20種(既報において、AhR活性に何らかの影響を及ぼすことが報告されている食材を選択した)から抽出した抽出物を培養骨芽細胞系細胞にISと同時に添加した際のFGF23産生について検討した。その結果、IS単独添加によりFGF23産生の有意な増加がみられたが、これはモロヘイヤの脂溶性画分、ブロッコリースプラウト並びにブロッコリースーパースプラウトの脂溶性画分の同時添加によりその産生は強く抑制された。

### (3) AhR 阻害活性を有する機能性成分の探索およびその有効性検証

培養骨芽細胞を用いた解析により3種の食材(モロヘイヤ、ブロッコリースプラウト、ブロッコリースーパースプラウト)の抽出物において、IS刺激によるGalNAc-T3の発現誘導およびそれに続くFGF23産生増加に対して抑制効果を示す事を明らかにしている。そこでこの効果がin vivoでも認められるかについて検証を加えた。なおこの今回の検討では、この3種の食材のうち、最も阻害効果の強かったブロッコリースプラウトについて検証を加えた。

健常動物にAdenineを経口投与すると、投与2週間後において血中クレアチニンおよび血中リン濃度の軽度上昇が認めらると共に、血中FGF23値の顕著な上昇を認めしたが、Adenineとブロッコリースプラウト抽出物を併用投与した群では、血中クレアチニン、血中リン、血中FGF23値ともに改善傾向を認めた。

以上、本研究計画では、CKD患者におけるFGF23産生亢進の分子機序解析と、その軽減に有効な食品機能性成分の探索を試みた。

CKD とその合併症に関する研究は、(1) 患者数が多く今後も増加が見込まれること、(2) CKD の治療には多額の費用が必要であり、これが社会医療費圧迫の大きな要因となりつつあること、(3) CKD などの不可逆性慢性疾患は患者の生活の質 (QOL) および生命予後を大きく作用することなどから、国内外における類似の研究 (基礎、臨床面) は非常に活発である。また CKD はその進行度を正確かつリアルタイムに把握することが非常に難しいとされてきたが、FGF23 は CKD をはじめ様々な腎機能障害のごく早期から血中濃度が上昇するバイオマーカーとして有効性が期待されている。またバイオマーカーとしてのみならず、CKD 患者における FGF23 濃度が上昇する機序とその病態との関連性についても興味を持つ研究者は多い。一方で、CKD の栄養・食事療法についてはこれまでタンパク制限・リン制限が中心であったが、リンは多くの食品に含まれるとともに、食品中のタンパク質と結合していることから、容易に除去することは難しい。また最近の報告では CKD モデル動物でみられる高リン尿症は食餌性リン制限により一部改善されるが、FGF23 の上昇は改善できないことが示されている (Zhang S et al. *Kidney Int* 84:713-21,2013)。そこで本研究計画では既存のリン制限ではなく、リン負荷により惹起される FGF23 の産生あるいは活性を抑制することでリン管理を実現できないか、またその手段として、AhR 阻害活性を指標に FGF23 産生を抑制する食品並びにその機能性成分を探索することを目的としている。本研究計画の成果は、CKD 患者のみならず現代の食生活が抱える潜在的リン過剰の現状をも食事で改善可能であるという、公衆栄養学的観点からも公益性の高いものである点が特徴である。またその成果は CKD 等の慢性疾患患者に対する食事・栄養療法の評価や効果判定に有用であると共に、単なる食品機能性成分の臨床応用に

とどまることなく、特定の病態の改善や治療に有効な食品の選択やその治療法を含めた、より科学的根拠に基づく食事・栄養療法の実現に新たな可能性をもたらすものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Shiozaki Y, Segawa H, Ohnishi A, Ito M, Kaneko I, Kido S, Tatsumi S, Miyamoto K. Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells. *J Med Invest*, 査読有り, 62(3-4):209-218, 2015

[学会発表](計10件)

木戸慎介、上西梢、山本麻伊、吉田衣里、安岡美総、富田圭子、加藤博一、CKD 患者の病態進展阻止に有効な新たな食事・栄養療法の開発、第 37 回食事療法学会、パシフィックホテル沖縄 (沖縄県、那覇市)、2018 年 3 月

上西梢、木戸慎介、慢性腎臓病患者の新たな食事・栄養療法の開発、慢性腎臓病患者の新たな食事・栄養療法の開発、第 64 回日本栄養改善学会学術集会、アスティ徳島 (徳島県、徳島市) 2017 年 9 月 15 日

上西梢、安岡美総、富田圭子、加藤博一、木戸慎介、慢性腎臓病患者の新たな食事・栄養療法の開発～食物繊維が体内リン代謝動態に及ぼす影響～、第 64 回日本栄養改善学会学術集会、アスティ徳島 (徳島県、徳島市) 2017 年 9 月 14 日

上西梢、川端佑季、野方美里、木戸慎介、慢性腎臓病患者の新たな食事・栄養療法の開発～リン管理における植物性たんぱく質の有効性について～、第 15 回日本栄養改善学会近畿支部学術総会、神戸学院大学ポートア

イランドキャンパス(兵庫県、神戸市) 2016年12月18日

木戸慎介、富田史子、上西梢、小島誠也、加藤博一、安岡美穂、富田圭子、慢性腎臓病患者向け食事療法が抱える栄養学的課題の抽出：ビッグデータを活用した新たな栄養学的アプローチ、第15回日本栄養改善学会近畿支部学術総会、神戸学院大学ポートアイランドキャンパス(兵庫県、神戸市)、2016年12月18日

木戸慎介、上西梢、加藤博一、安岡美穂、富田圭子、情報技術を基盤とした網羅解析による慢性腎臓病患者向け食事療法に潜在する栄養学的課題の抽出、第63回日本栄養改善学会学術総会、リンクステーション青森(青森県、青森市)、2016年9月8日

上西梢、安岡美穂、富田圭子、加藤博一、木戸慎介、慢性腎臓病患者の新たな食事・栄養療法の開発～タンパク質源の違いが体内リン代謝動態に及ぼす影響～、第63回日本栄養改善学会学術総会、リンクステーション青森(青森県、青森市)、2016年9月8日

小島誠也、富田圭子、木戸慎介、森田晶、金谷重彦、稲村真弥、上西梢、高富貴史、山本豪志朗、サンドアクリスチャン、加藤博一、在宅食事療法の栄養素情報の分析と動的な献立計画支援手法の提案、電子情報通信学会一食メディア研究会、名城大学(沖縄県、名護市)、2016年3月7日

梶原千裕、松林英里、上西梢、木戸慎介、慢性腎臓病の発症・進展に関わるリン利尿因子FGF23の動態と治療への展開、第14回日本栄養改善学会近畿支部学術総会、帝塚山大学(奈良県、奈良市)、2015年12月6日

木戸慎介、上西梢、慢性腎臓病の発症・進展におけるリン利尿因子FGF23の関与とその進展予防に向けた新たな食事療法の開発、第62回日本栄養改善学会学術総会、福岡国際会議場(福岡県、博多市)、2015年9月25日

[その他]

ホームページ等

<http://www.kindai.ac.jp/agriculture/research-and-education/teachers/introduce/shinsuke-kido-0b8.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 慎介 (KIDO, Shinsuke)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30437652