

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09269

研究課題名(和文)リン恒常性の破綻による臓器障害の病態解明

研究課題名(英文)Mechanism of phosphate-induced organ impairment

研究代表者

椎崎 和弘 (SHIIZAKI, KAZUHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10423930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食事由来のリンによる臓器障害(本研究では腎障害)の機序として、過剰なリンの摂取からリンの恒常性を維持するため、尿中への大量のリン排泄が尿細管腔内でのリン濃度を上昇させ、リンがカルシウムなどと結晶を形成し、これを尿細管細胞の表面に発現しているToll-like receptor 4 (TLR4)が感知しシグナルを活性化して、細胞障害・線維化・慢性炎症などが誘導されることの関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dietary ingestion of excess phosphorus might induce various organ damages. In this study, the phosphorus-induced kidney damage was investigated. The concentration of phosphorus is increased in renal tubule for a large amount of phosphorus excretion into the urine resulting in the maintenance of phosphorus homeostasis. Very small particles consisting of crystals might be formed by the excess of phosphorus with calcium, proteins and so on. Toll-like receptor 4 (TLR4) which is expressing on the surface of renal tubule cells might sense such particles and activate its signaling pathway resulting in cell damage, fibrosis and chronic inflammatory response. A series of these phenomena via TLR4 was suggested as a mechanism of organic disorder by excess phosphorus.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 ミネラル代謝異常 臓器障害 慢性炎症 自然免疫反応

1. 研究開始当時の背景

リンを摂取すると、リンの恒常性を保つためリン利尿ホルモンである Fibroblast growth factor 23 (FGF23) が骨から分泌される。FGF23 は腎に発現する Klotho と複合体を形成した FGF receptor に作用し、尿中リン排泄を増やしてリンの恒常性を保つ。この FGF23-Klotho 内分泌系が破綻した Klotho 欠損マウスや Klotho の発現が低下する慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) マウスや患者では、リン排泄障害のためリン恒常性が維持できなくなり、高リン血症を来す。そのため、血管石灰化や心肥大などの多彩な老化様臓器障害を発症して短命となる。

高リン血症を有する CKD 患者や CKD モデル動物では、血中に Calciprotein particles (CPP) が出現する。CPP とは、リン酸カルシウム結晶とミネラル結合蛋白 (Fetuin-A など) の複合体ナノ粒子で、コロイド状に血清中に分散していると考えられている。CPP の臨床的意義として、血中 CPP の増加と血管石灰化や炎症所見などが相関することが示されている。一方、我々の研究室では、さまざまな培養細胞を用いて、リン酸カルシウム結晶の析出 (核生成) さえ抑えれば培養液中のリンは高濃度でも無害であること、逆に、リン濃度を上げなくても CPP の存在下では細胞障害が起こることを確認している。つまり、リンによる細胞障害を誘導する原因は、リンそのものではなく、CPP の形成と作用であると考えられる。

Toll-like 受容体 4 (TLR4) は様々な結晶や Fetuin-A を認識することから、CPP も TLR4 で認識され、自然免疫反応や細胞障害を引き起こすのではないかと着想した。我々は、CPP が TLR4 に高い親和性 ($K_D = 9.6 \text{ nM}$) で結合

することや、TLR4 を発現する免疫担当細胞に CPP を作用させると NF- κ B シグナルを活性化し、炎症性サイトカインなどの発現を誘導することも確認している。つまり血中の CPP は、さまざまな臓器細胞を障害したり炎症細胞に自然免疫反応を誘導したりして、慢性炎症や様々な臓器障害を引き起こすと考えられる。また、CPP は血中だけでなく、原尿中にも出現する。リン摂取後に FGF23 が分泌されてリン利尿が起きると、原尿中のリン濃度が上昇し、尿細管管腔内で CPP が形成されることも、我々は *in vivo* imaging で確認していた。原尿中の CPP が尿細管細胞を障害すると腎線維化などの腎障害を引き起こすと考えられる。実際、野生型マウスを高リン食で飼育するだけで腎線維症 (間質の線維化とマクロファージの浸潤) が発症する。

2. 研究の目的

(1) CPP のコロイド粒子物性が活性に及ぼす影響の解析 CPP はコロイド粒子であり、生体内には粒子径・比重・表面電荷などの物性が異なる粒子が混在していると考えられる。実際、CKD 患者の血清には「大きくて重い」CPP (H-CPP) と、「小さくて軽い」CPP (L-CPP) の少なくとも 2 種類の CPP が混在することを見出した。リンを主成分とする結晶分子の細胞障害や自然免疫反応を誘導する活性に違いがあるか解析する。健常者の血清には L-CPP は存在するが H-CPP は存在しないので、H-CPP が「病原体」としての活性を持つと予測される。

(2) CPP 受容体の同定 CPP の受容体として、既に TLR4 を同定していたため、野生型マウス、TLR4 欠損マウス、から単離した初代培養細胞 (尿細管細胞など) を CPP など刺激

激し、細胞障害や自然免疫反応の定量・比較、高リン食による CPP の形成を介する臓器障害（腎障害）について、野生型マウス、TLR4 欠損マウスで比較検討する。

（ 3 ）責任分子 TLR4 を発現する CPP の標的細胞の検証 残存するネフロン数が減少しつつある CKD 患者や高リン食負荷モデルでは、血液中および尿細管腔中の両方で CPP が形成されることが知られており、CPP による腎障害の機序として、尿細管腔中で形成された CPP による尿細管細胞の TLR4 を介する作用と、血液中で形成された CPP により TLR4 が活性化された炎症細胞の間質への浸潤による作用、のどちらかもしくは両方が想定される。

3 . 研究の方法

（ 1 ）培養尿細管細胞、野生型マウスや TLR4 欠損マウスから単離した腎尿細管細胞の初代培養細胞で、リンやカルシウム含有量が異なるリン酸カルシウム結晶（hydroxyapatite (HA)、 tricalcium phosphate (TCP)、 amorphous calcium phosphate (AM)) や CPP による細胞障害や自然免疫反応を誘導する活性への影響を比較検討した。また、リンの添加による細胞障害に対する、結晶形成抑制剤としてのクエン酸やビスホスホネートの効果も検討した。

（ 2 ）野生型マウスや TLR4 欠損マウスを通常食（リン含有量は 0.35%）または高リン食（リン含有量は 2.0%）で飼育し、高リン食による CPP 形成を介する効果を、CPP 形成抑制剤のひとつであるビスホスホネートを用いて検討した。

（ 3 ）野生型および TLR4 欠損マウスから採取した骨髄を、それぞれ野生型および TLR4 欠損マウスの両方に移植したモデル動物を作成し、

これらすべてを高リン食（リン含有量は 2.0%）で飼育した。

（ 4 ）（ 2 ）および（ 3 ）について、リン、カルシウム、活性型ビタミン D、FGF23 などの FGF23-Klotho 内分泌系や腎機能などの解析、腎臓について組織学的解析と分子マーカー（サイトカインなどの炎症マーカーや線維化マーカー、尿細管細胞の障害マーカーの発現）について Real-time PCR 法などにより検討した。

4 . 研究成果

（ 1 ）リンやカルシウム含有量が異なるリン酸カルシウム結晶（HA、TCP、AM）は合成した CPP とほぼ同様に腎尿細管細胞の障害や炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導し、その一部に TLR4 が関与していることが明らかになった。また、リンを添加することによる細胞障害などの変化は、結晶形成を抑制するクエン酸やビスホスホネートの添加により有意に抑制されたため、リンによる細胞障害などには、過剰なリンにより誘導される結晶形成が関与していることが細胞実験により明らかになった。

（ 2 ）野生型マウスの高リン食により誘導される腎障害は、消化管でのリン吸収抑制剤やビスホスホネートの投与や、TLR4 欠損マウスで有意に抑制されていたことから、これには、リンの消化管での吸収、CPP などの結晶形成、TLR4 シグナルの活性化が関与していることが動物モデルにて確認された。

（ 3 ）骨髄移植モデルより、高リン食により誘導される腎障害には、炎症細胞などの骨髄由来細胞に発現している TLR4 ではなく、尿細管細胞などの臓器細胞に発現している TLR4 が関与していることが明らかになった。

(4) リンにより誘導される腎障害には、腎臓でのリン負荷量(残存するネフロン数当たりのリン排泄量)が大きく影響しており、それを示す指標として血液中の FGF23 濃度の測定が有用であることが動物モデルにより明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H, Kuro-o M. Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2018 Jan 19;8(1):1256, 2018.

Kohara M, Masuda T, Shiizaki K, Akimoto T, Watanabe Y, Honma S, Sekiguchi C, Miyazawa Y, Kusano E, Kanda Y, Asano Y, Kuro-o M, Nagata D. Association between circulating fibroblast growth factor 21 and mortality in end-stage renal disease. *PLoS One.* 2017 Jun 5;12(6): e0178971, 2017.

Santoso P, Nakata M, Shiizaki K, Boyang Z, Parmila K, Otgon-Uul Z, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Kuro-o M, Yada T. Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep.* 2017 Apr 4;7: 45819. 2017.

Shen ZJ, Hu J, Shiizaki K, Kuro-o M,

Malter JS. Phosphate-Induced Renal Fibrosis Requires the Prolyl Isomerase Pin1. *PLoS One* 11 (2): e0150093, 2016.

Otani-Takei N, Masuda T, Akimoto T, Honma S, Watanabe Y, Shiizaki K, Miki T, Kusano E, Asano Y, Kuro-o M, Nagata D. Association between Serum Soluble Klotho Levels and Mortality in Chronic Hemodialysis Patients. *Int J Endocrinol.* 2015, 406269, 2015.

[学会発表](計11件)

国際学会

1. Kohara M, Shiizaki K, Iwazu Y, Miura Y, Akiyama K, Nakano T, Kaneda R, Kurosu H, Kuro-o M. Phosphate Retention Induces Growth Retardation in Adolescent Mice. 51st Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. 10.31-11.05. New Orleans
2. Murakami T, Masuda T, Kohara M, Shiizaki K, Akimoto T, Muto S, Honma S, Watanabe Y, Saito O, Kusano E, Asano Y, Kuro-o M, Nagata D: Nocturnal Intermittent Hypoxia is Associated with Elevated Circulating Fibroblast Growth Factor 21 in Endstage Renal Disease. 51st Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. 10.31-11.05. New Orleans
3. Kohara M, Masuda T, Shiizaki K, Akimoto T, Watanabe Y, Honma S, Sekiguchi C, Miyazawa Y, Kusano E, Asano Y, Kuro-o M, Nagata D: Serum

Fibroblast Growth Factor 21 Predicts All-Cause Mortality in End Stage Renal Disease. 50th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2016.11.15-11.20. Chicago

4. Kimura T, Shiizaki K, Kuro-o M, Yagisawa T: FGF23 initially plays an important role on phosphate homeostasis in chronic kidney disease. 50th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2016.11.15-11.20. Chicago

国内学会

1. 秋山健一, 椎崎和弘, 藤田実希, 小原麻里菜, 中野寿洋, 三浦 裕, 岩津好隆, 黒須 洋, 黒尾 誠: 食事性のリン摂取は、摂取後の FGF23 分泌の増加から恒常的な高 FGF23 血症を誘導する. 第 62 回日本透析医学会学術集会・総会, 2017 年 6 月 16 日-18 日. 横浜
2. 木村貴明, 椎崎和弘, 岩津好隆, 黒須洋, 清水俊洋, 黒澤 明, 新里高広, 久保太郎, 南木浩二, 黒尾 誠, 八木澤隆: 腎機能が正常でも腎臓での Klotho 遺伝子の発現低下は腎障害に関連する. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017 年 5 月 26 日-28 日. 仙台
3. 村上琢哉, 増田貴博, 小原麻里菜, 椎崎和弘, 秋元 哲, 本間寿美子, 渡邊裕子, 草野英二, 浅野 泰, 黒尾 誠, 長田太助: 末期腎不全患者の血中 FGF21 高値は睡眠呼吸障害と関連する. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017 年 5 月 26 日-28 日. 仙台
4. 小原麻里菜, 増田貴博, 椎崎和弘, 秋元 哲, 本間寿美子, 渡邊裕子, 宮澤保

春, 浅野 泰, 黒尾 誠, 長田太助: 末期腎不全患者の血中 fibroblast growth factor 21(FGF21)高値は生命予後悪化の危険因子である. 第 114 回日本内科学会総会・講演会, 2017 年 4 月 14 日-16 日. 東京

5. 木村貴明, 椎崎和弘, 黒澤 明, 清水俊洋, 新里高広, 南木浩二, 佐久間康成, 三木 厚, 黒尾 誠, 八木澤 隆: 腎移植ドナーの腎提供後は残存腎機能を考慮したリン管理を必要とする. 第 52 回日本移植学会総会, 2016 年 9 月 29 日-10 月 1 日. 東京
6. 木村貴明, 椎崎和弘, 岩津好隆, 清水俊洋, 黒澤 明, 南木浩二, 秋山健一, 小原麻里菜, 黒尾 誠, 八木澤 隆: リン制限は CKD ステージ 3 で開始すべきである. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 2016 年 6 月 17 日-19 日. 横浜
7. 小原麻里菜, 増田貴博, 椎崎和弘, 秋元 哲, 本間寿美子, 渡邊裕子, 齋藤修, 武藤重明, 草野英二, 浅野 泰, 黒尾 誠, 長田太助: 透析患者の血中 FGF21 高値は生命予後悪化の危険因子である. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 2016 年 6 月 17 日-19 日. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎崎 和弘 (SHIIZAKI, Kazuhiro)

自治医科大学 医学部・講師

研究者番号 10423930