

令和元年6月16日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03046

研究課題名(和文) エピゲノム変化を指標とした新しい食事評価研究手法(エピゲノム食事学)の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel research strategy for dietetics based on epigenomics (epigenome dietetics)

研究代表者

竹谷 豊 (TAKETANI, Yutaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：30263825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養素、特に近年過剰摂取が懸念されているリンについて、過剰摂取した際の体内での変化を反映する新しい指標を見い出すことを目的として、動物モデルおよびヒトにおいて継続的なリン過剰摂取を反映する指標の探索を行った。その結果、線維芽細胞増殖因子23と呼ばれるホルモンの一種が適切な指標の1つとなり得ることを示すことができた。また、ヒトで日常的なリン摂取状態を簡便に調査する方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン過剰摂取は、慢性腎臓病患者で問題になるだけでなく、健常者においても心血管疾患の発症リスクや総死亡リスクと関連することが指摘されている。リン過剰摂取とこれらの疾患の発症リスクや総死亡リスクとの間をつなぐメカニズムにエピゲノム修飾の存在が推定される。本研究で見出された指標を用い研究を進めることで、健康増進を進めるための適切なリン摂取量の設定あるいは慢性腎臓病患者の適切な食事指導に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Overintake of phosphate, which is an essential nutrient, has been concerned about the risk factor associated with cardiovascular disease and all-cause mortality. In this study, we have explored a novel biomarker reflecting continuous overintake of phosphate in mice and validated the marker in human. We demonstrated that fibroblast growth factor 23 (FGF23), which is a phosphaturic hormone, can be a good biomarker reflecting continuous overintake of phosphate. In addition, we developed a convenient evaluation tool to assess the daily intake of phosphate in human. This tool and the marker, FGF23, are useful tool to determine adequate recommended dietary allowance of phosphate and for nutritional education in chronic kidney disease patients who are required dietary phosphate restriction.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：リン 慢性腎臓病 エピゲノム ライフステージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンは、必須の栄養素であるが、不足しても過剰であっても健康障害をもたらす。リンは、多くの食品に含まれていることから通常の食生活では不足することはなく、むしろ近年の飽食化やリン酸塩を含む加工食品の消費拡大に伴い、過剰摂取が懸念されている。しかしながら、リン過剰摂取と健康障害に関する研究は、未だ全容解明にはほど遠い。一方、モデル動物を用いた基礎研究や慢性腎臓病や心血管疾患に関する疫学研究からは、リンの過剰摂取が、慢性腎臓病、心血管疾患などの生活習慣病の発症と密接に関わっており、寿命を規定する因子とも言われている (Kuro-o M, et al. Nature 1997, Ohnishi M, et al. FASEB J, 2010, Yamamoto KT, et al. Kidney Int 2013, Chang AR, et al. Am J Clin Nutr, 2014)。

このような問題が指摘されているにも関わらず、わが国では適切なリン摂取量に関するエビデンスが不十分なことから、食事摂取基準において推奨量が設定されていない。そのため、国民健康・栄養調査のリン摂取量を参考に目安量として設定されているのが現状であり、リンによる健康障害の予防・治療を目指した食事摂取基準の策定にまで至っていない。問題は、日常的なリン摂取が生体に及ぼす影響を評価するための適切な評価指標(バイオマーカー)が無いことである。

我々は、リン摂取量とリン代謝調節因子である副甲状腺ホルモン PTH や線維芽細胞増殖因子(FGF23)の血清濃度、血管内皮機能との量的・時間的關係について検討してきた(Nishida Y, Taketani Y, et al., Kidney Int, 2006, Shuto E, Taketani Y, et al., J Am Soc Nephrol, 2009, Watari E, Taketani Y, et al., J Clin Biochem Nutr, 2015)。これらの一連の研究結果から、PTH はリン過剰摂取後数時間以内の変化の指標となるが、空腹時には速やかに低下してしまう。一方、FGF23 は、リン過剰摂取が継続されている間は、空腹時でも上昇しており一定の指標とはなり得るが、リン摂取量が低下すると速やかに血清濃度が低下し、やはり直近の食事の影響を受ける。従って、PTH も FGF23 も日差変動が大きい日常的なリン摂取量を長期的に評価するための指標としては適していないのではないかと考えた。

もう1つの問題は、健康障害を発症するに至る「摂取量」、「摂取期間」、および「摂取時期(ライフステージ)」である。すなわち、どの時期にどれだけの量をどれぐらいの期間摂取すると健康障害に至るのかということをはっきりと明らかにする必要がある。また、同じリン含量の食品であっても、食品の種類が異なると食後血清リン濃度上昇に違いが生じるなど、生体への影響に違いが出てくる。食事調査では、総リン摂取量しか評価できず、リンの質については考慮されていない。我々は、食後の血清リン濃度上昇度を食品毎に評価し、食品のリン負荷指数(Phosphatemic Index: PI)を開発した。この評価法で高PI食品と判定された食品を常用量で継続的に摂取させると、同量のリンを含む低PI食を摂取させた場合に比べて、早朝空腹時に血清 FGF23 値が上昇することを見出した。ヒトにおいて長期的にリン過剰食を投与する介入研究は倫理的にも難しい部分があるが、高PI食品の投与であれば、日常的に摂取する食品と量で介入試験を行うことが可能であり、適切なバイオマーカーと組み合わせることで、日常的な食事からのリン摂取量を量と質の両面から評価するための技術開発に応用できると考えた。

近年、第二の遺伝暗号とも呼ばれるゲノム DNA のエピゲノム変化は、食事を含めた環境要因を記憶するメカニズムとして着目されてきた。我々は、継続的なリンの過剰摂取により、リン代謝の制御因子である *-klotho* 遺伝子の発現がエピゲノム変化により抑制される可能性を見出してきた。このエピゲノム変化の分子メカニズムを解明することができれば、日常的なリンの過剰状態を評価する極めて的確なバイオマーカーとして活用できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、栄養素、特にリンによるエピゲノム変化の分子メカニズムを明らかにし、エピゲノム変化をバイオマーカーとして活用した日常的な栄養素ならびに食事摂取状況を評価するための新たな食事評価技術を開発し、生活習慣病予防・治療を目指したエピゲノム食事学の確立を目指す。具体的には、(1)リン過剰による健康障害の原因と考えられる *-klotho* 遺伝子の発現低下の分子メカニズム、特にエピゲノム変化による遺伝子発現制御機構やライフステージ毎の違いを明らかにするとともに、エピゲノム変化を指標とした継続的なリン過剰の評価指標(バイオマーカー)を同定する。(2)同定したバイオマーカーを用い、我々が開発したリン負荷指数による食品評価法と組み合わせ、介入研究や観察研究を行うことで同定したバイオマーカーを指標とした食事評価法を開発する。

3. 研究の方法

(1)モデル動物を用いたリン過剰によるエピゲノム修飾とバイオマーカーの探索

ライフステージの異なる時期(成熟期、成長期、妊娠期、妊娠前期)のマウスにそれぞれ低リン食あるいは高リン食を一定期間投与し、その後、投与した個体あるいは仔マウスのリン代謝調節系の遺伝子発現およびエピゲノム修飾関連遺伝子の発現を評価した。

(2) ヒト臨床試験による高リン食あるいは高PI食品摂取後のリンバイオマーカーの探索

健常者 100 名を対象に、これらの食品の摂取頻度を BDHQ あるいは他の質問票による食事調査法により調査する方法を開発し、その妥当性について 4 日間の食事記録法による食品および栄養摂取量調査を行うことで検証する。さらに、(1) で評価したマーカーが日常的なリン摂取量の評価指標となり得るかについて検討を行った。

動物試験については、徳島大学動物実験委員会の承認、ヒト臨床試験については、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得るとともに、関係法令・規則に従い適切に実施した。

4. 研究成果

(1) モデル動物を用いたリン過剰によるエピゲノム修飾とバイオマーカーの探索

リン過剰による健康障害発現の原因と考えられる *-klotho* 遺伝子の発現低下の分子メカニズム、特にエピゲノム変化による遺伝子発現制御機構やライフステージ毎の影響の違いを明らかにすることを試みた。その結果、成長期のマウスに高リン食を継続的に投与すると *-klotho* 遺伝子の発現低下が認められるとともに、その後、通常のリンを含む食餌に変更し飼育しても *-klotho* の発現が回復せず、低下したままとなった。このことは、継続的なリン摂取により *-klotho* 遺伝子がエピゲノム修飾され遺伝子発現が抑制されることを示す結果であった。一方、妊娠中に継続的に高リン食を与えた後に生まれた仔マウスの *-klotho* 発現には、コントロール食と比べて有意な差は認められなかったが、リン代謝調節因子である FGF23 や腎臓のリン酸トランスポーターの発現量に有意な差を認めた。以上のことから、継続的な高リン食摂取による *-klotho* のエピゲノム制御には、ライフステージによる違いが認められた。さらに、*-klotho* 遺伝子プロモーター領域のエピゲノム修飾について検討したところ、転写開始点近傍の CpG 領域においては有意な DNA メチル化の違いを認めることはできなかった。

一方、妊娠時や離乳後の食事性リン負荷によるエピゲノム変化についても検討を行った。妊娠期の母マウスに高リン食を投与し、生まれてきた仔マウスへの影響を解析したところ、新たに骨から分泌されるリン代謝調節ホルモンの分泌量に違いが生じていること、および、骨組織におけるメチル化酵素の誘導が生じていることを明らかにした。このことは、食事性リンによりエピゲノム変化を生じる臓器が骨であることを示唆するものである。そこで、妊娠前および妊娠期のマウスに高リン食を摂取させた後、仔マウスにおいて、リン代謝調節ホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) の発現調節系の中心となる骨について解析を行ったところ、DNA メチル化関連遺伝子である DNMTs および Tet の発現が低下することを見出した。この効果は、里親試験によっても確認でき、高リン食がエピゲノム変化による発現調節に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、FGF23 の遺伝子発現が、このような高リン食摂取によるエピゲノム調節を受けることが示され、エピゲノム調節の指標となり得ることが期待された。

(2) ヒト臨床試験による高リン食あるいは高PI食品摂取後のリンバイオマーカーの探索

健常被験者 100 名を対象として、日常的なリン摂取量を質問票による栄養摂取量調査 (BDHQ 法あるいは他の質問票) により解析するために、新たな質問票を開発し、その妥当性を検証した。高リン負荷指数食品 (高PI食品) 摂取量の評価手法の開発では、昨年度開発したより簡便に日常的なリン摂取量を評価する評価方法を用いることで、血清 FGF23 を指標に習慣的な高PI食品の摂取を把握できることを明らかにした。当初、高リン食の持続的な摂取は、腎臓で発現する *-klotho* 遺伝子に対するエピゲノム変化を引き起こすと考えていたが、本研究課題において研究を進めた結果、*-klotho* 遺伝子よりもそれを共役受容体として作用するホルモンである骨の FGF23 の発現調節系に及ぼす影響の方が大きいことが明らかになり、FGF23 遺伝子がよりエピゲノム変化を検出するための指標となる可能性が考えられた。また、日常的なリン摂取量を簡便に評価する方法を開発し、FGF23 を指標にすることで、生体へのリン負荷状況を評価することができると考えられた。

これらの成果は、日常的なリンの過剰摂取が、エピゲノム制御を介して特定の遺伝子発現の制御を行っていることを示唆するものである。FGF23 は、その代表的な指標となりうることを示唆されたが、マウスを用いた研究からは、FGF23 以外にもエピゲノム制御を受ける可能性のある遺伝子を複数見出すことができた。今後、エピゲノム調節が生じるより詳細なメカニズムの解明を進めていく予定である。一方、ヒトにおける評価では、日常的なリン摂取を評価する方法を確立し、その妥当性の検証を行うこと、FGF23 が指標として妥当であることを示すことはできた。しかしながら、実際にエピゲノム修飾に違いがあることを示すまでには至らなかった。引き続き解析を進めることで、ヒトで実証したいと考えている。

リン過剰摂取は、慢性腎臓病患者で問題になるだけでなく、健常者においても心血管疾患の発症リスクや総死亡リスクと関連することが指摘されている。リン過剰摂取とこれらの疾患の発症リスクや総死亡リスクとの間をつなぐメカニズムにエピゲノム修飾の存在が推定される。本研究で見出された指標を用い研究を進めることで、健康増進を進めるための適切なリン摂取量の設定あるいは慢性腎臓病患者の適切な食事指導に活用されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Fukuda-Tatano S, Yamamoto H, Nakahashi O, Yoshikawa R, Hayashi M, Kishimoto M, Imi Y, Yamanaka-Okumura H, Ohnishi K, Masuda M, Taketani Y. Regulation of α -Klotho Expression by Dietary Phosphate During Growth Periods. *Calcif Tissue Int.* 104(6):667-678, 2019. doi: 10.1007/s00223-019-00525-0.

Imi Y, Yabiki N, Abuduli M, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. High phosphate diet suppresses lipogenesis in white adipose tissue. *J Clin Biochem Nutr.* 63(3):181-191, 2018. doi: 10.3164/jcfn.17-141.

Kagawa T, Kozai M, Masuda M, Harada N, Nakahashi O, Tajiri M, Yoshikawa R, Nakao M, Takei Y, Iwano M, Takeda E, Taketani Y, Yamamoto H. Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D3 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 500(2):275-282, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.058.

Yamaguchi C, Yamanaka-Okumura H, Esumi H, Masuda M, Katayama T, Taketani Y. Investigation of dose-dependent effects of fat on blood glucose, serum insulin, and appetite sensation. *J Med Invest.* 65(3.4):203-207, 2018. doi: 10.2152/jmi.65.203.

Yoshikawa R, Yamamoto H, Nakahashi O, Kagawa T, Tajiri M, Nakao M, Fukuda S, Arai H, Masuda M, Iwano M, Takeda E, Taketani Y. The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal α -Klotho gene expression in mice. *J Clin Biochem Nutr.* 62(1):68-74, 2018. doi: 10.3164/jcfn.17-20.

Sugihara K, Masuda M, Nakao M, Abuduli M, Imi Y, Oda N, Okahisa T, Yamamoto H, Takeda E, Taketani Y. Dietary phosphate exacerbates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Biochem Nutr.* 61(2):91-99, 2017. doi: 10.3164/jcfn.16-117.

〔学会発表〕(計 16 件)

林眞由、福田詩織、岸本麻希、増田真志、奥村仙示、山本浩範、竹谷豊、妊娠前に置ける食事性リン負荷が仔のリン・ビタミンD代謝調節系に及ぼす影響、第3回CKD-MBD研究会学術集会・総会、2019年

吉澤和香、中尾真理、伊美友紀子、矢引紀江、新井田裕樹、増田真志、奥村仙示、竹谷豊、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)における骨筋連関、第3回CKD-MBD研究会学術集会・総会、2019年

Mayu Hayashi, Shiori Fukuda, Maki Kishimoto, Hironori Yamamoto, Masashi Masuda, Yutaka Taketani, High phosphate diet before pregnancy dysregulates phosphate metabolism in neonatal offspring mice. American Society of Nephrology, Kidney week 2018, 2018年

Yoko Narasaki, Michiyo Yamasaki, Misaki Katsumoto, Sayaka Matsuura, Mayumi Morinishi, Tomomi Nakagawa, Mami Matsuno, Tsuneyuki Noda, Yutaka Taketani, Continuous ingestion of the different phosphorus bioavailability meal in healthy Japanese. XIX International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease, 2018年(国際学会)

福田詩織、林眞由、岸本麻希、増田真志、山本浩範、竹谷豊、ライフステージにおけるリン摂取量がリン・ビタミンD代謝調節系に及ぼす影響、第91回日本生化学会大会、2018年

林眞由、福田詩織、増田真志、竹谷豊、山本浩範、妊娠前における食餌性リン負荷が新生仔マウスのリン代謝調節系に及ぼす影響、第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年

竹谷豊、リンと心血管疾患：細胞からヒトでの研究まで、第6回日本腎栄養代謝研究会学術集会・エデュケーションセミナー、2018年(招待講演)

岸本麻希、福田詩織、林眞由、増田真志、竹谷豊、妊娠後期の食餌性リン負荷が仔の将来におけるリン代謝調節系に及ぼす影響、第5回日本栄養改善学会四国支部学術集会、2018年

新居紗知、榑崎遥子、奥村仙示、竹谷豊、一塩基多型 rs1697421 は尿中リン排泄以外の経路を介して 食後血清リン濃度上昇に影響する、第5回日本腎栄養代謝研究会、2017年

竹谷豊、榑崎遥子、奥村仙示、増田真志、食事性リンとリン負荷指数、第62回日本透析医学会学術集会・総会、2017年(招待講演)

竹谷豊、福田詩織、増田真志、奥村仙示、リンと心血管疾患：リン制限は寿命を延伸する？第17回日本抗加齢医学会総会、2017年(招待講演)

伊美友紀子、矢引紀江、Maerjianghan Abuduli、増田真志、奥村仙示、竹谷豊、高リン食による白色脂肪組織の減少、日本ビタミン学会第69回大会、2017年

榑崎遥子、山崎通世、勝本美咲、松浦明香、森西真由美、中川倫未、松野真美、野田恒行、奥村仙示、竹谷豊、リン生体利用率の異なる食品が活性型ビタミンD値に及ぼす影響、日本ビタミン学会第69回大会、2017年

新井田裕樹、増田真志、吉澤和香、Ililulati Yimamu、吉田里沙、甲谷芹奈、奥村仙示、河合慶親、竹谷豊、山本浩範、骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴う

Protein-Wasting(CKD-PEW)を誘発する、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年

織田奈央子、杉原恒平、吉本亜由美、上番増喬、増田真志、奥村仙示、竹谷豊、高リン食摂取は腸内環境を変化させる、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年

竹谷豊、榑崎遥子、山本浩範、食事性リンとリン負荷指数、第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年(招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

大竹久夫、杉山茂、佐竹研一、小野寺真一、黒田章夫、竹谷豊、橋本光史、三島慎一郎、村上孝雄、他、リンの事典、朝倉書店、2017年、360(120-121, 123, 144-145, 166, 242-243)

朝倉洋平、石井宏明、伊東稔、井上啓子、伊美友紀子、上嶋章子、植田敦志、大里寿江、加藤明彦、加藤基、金澤良枝、菅野義彦、北島幸枝、坂本杏子、嶋英昭、自見加奈子、瀬戸由美、高橋恵理香、竹谷豊、他、透析患者の病態・栄養指導・治療食、ニュートリションケア2017年冬期増刊号、MCメディカ出版、2017年、168(45-50)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：増田 真志

ローマ字氏名：(MASUDA, Masashi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学域)

職名：助教

研究者番号(8桁)：50754488

研究分担者氏名：山本 浩範

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Hironori)

所属研究機関名：仁愛大学

部局名：人間生活学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60314861

(2)研究協力者

研究協力者氏名：榑崎 遥子

ローマ字氏名：(NARASAKI, Yoko)

研究協力者氏名：福田 詩織

ローマ字氏名：(FUKUDA, Shiori)

研究協力者氏名：林 眞由

ローマ字氏名：(HAYASHI, Mayu)

研究協力者氏名：岸本 麻希

ローマ字氏名：(KISHIMOTO, Maki)

研究協力者氏名：新居 紗知

ローマ字氏名：(NII, Sachi)

研究協力者氏名：伊美 友紀子

ローマ字氏名：(IMI, Yukiko)

研究協力者氏名：新井田 裕樹

ローマ字氏名：(NIIDA, Yuki)

研究協力者氏名：織田 奈央子

ローマ字氏名：(ODA, Naoko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。