

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01967

研究課題名(和文)カルシウム代謝のロバスト性を生み出す腸上皮感知 - 自律性吸収制御系の解明

研究課題名(英文)study of the intestinal sensing of food elements - autonomy absorption mechanism to produce robust characteristics of the calcium metabolism

研究代表者

増山 律子 (Ritsuko, MASUYAMA)

立命館大学・食マネジメント学部・教授

研究者番号：60297596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸上皮には、摂取した食品成分の情報を感知し、独自に吸収調節する「自律性」が機能する。多くの食品成分の吸収調節に関わると考えられているものの、自律性吸収の仕組みには不明な点が多い。本研究ではマウス個体、ならびに、マウス腸上皮細胞を用いて自律性カルシウム吸収機構の解明を目指した。

カルシウム吸収が変化する栄養条件を検討し、リン摂取量の低下はビタミンD作用を欠き能動的なカルシウム吸収が低下した状態であってもカルシウム吸収を増加すること、その際に腸内ATP量が増加することを確認した。培養腸上皮細胞を用いた検討により、腸管腔側リン濃度の変化に連動したATP代謝が、自律性カルシウム吸収を導くことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分の消化・吸収のしくみは個別に解明されていても、実際の食品には様々な成分が混在し相互に影響しあうため、理論通りの吸収効率は得られない。食品成分による自律性カルシウム吸収調節の明確化は、栄養代謝への成分相互の影響を解明する上で有益な情報を提供する。生体は栄養供給の過不足に常に迅速・柔軟に対応している。本申請研究で打ち立てた仮説が実証されれば、生体のカルシウム代謝の頑健性を生み出す腸上皮機能の理解を大きく進展させる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular low phosphate strongly enhances intestinal calcium absorption independently of active vitamin D [1,25(OH)2D3] signaling, but the underlying mechanisms remain poorly characterized. To elucidate the phosphate-dependent regulation of calcium transport, we investigated part of the enteral environment that is involved in 1,25(OH)2D3-independent calcium absorption, which responds to dietary phosphate levels in mice that lack intestinal vitamin D receptor (Vdr) activity. We found that luminal ATP was regulated by the release and degradation of ATP at the epithelium, and phosphate restriction increased ATP release from epithelial cells via connexin-43 hemichannels. Furthermore, ATP degradation by ectonucleotide pyrophosphatase-1 was reduced, which was caused by the reduction of the MAPK cascade. These findings indicate that luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in the intestine by an 1,25(OH)2D3-independent mechanism in response to dietary phosphate levels.

研究分野：骨ミネラル代謝学

キーワード：カルシウム ビタミンD ATP 吸収 栄養 消化管 腸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

腸は食事成分の情報を感知すると、固有に発達した神経系や局所応答により栄養素代謝を制御する。このしくみは、脳の管理下から外れ、“腸は第二の脳”と言われしめる腸独自の統制である。生物学的にも大変興味深い現象であり、「食事成分はどのように感知認識されるのか」、「生体の要求量に応じた内分泌的な吸収調節機構と異なるのか」、多分野の研究者がこの“自律性の吸収制御”という課題に取り組みはじめた。しかし、解明への第一歩である腸上皮の機能評価モデルさえ、未だ明確に確立されてはいない。

その理由は、腸上皮機能を忠実に模倣できる *in vitro* ツールが存在しないことに大きく起因している。特に、寿命の短い腸上皮細胞には、有用な培養系はほとんどない。食品中の様々な成分は他の成分吸収に影響し合い、微生物の共生といった腸内環境要素が加わることで、吸収のしくみは、より一層複雑化する。腸が食事成分情報を感知すると、どのような変化が導かれるか。適切な評価系で自律性の吸収制御を明確化することは、栄養代謝の理解につながる重要な課題である。

栄養素には生体側の必要性に応じて吸収調節されるものも多い。その代表がカルシウムである。研究代表者は、成長・妊娠・授乳期等、カルシウム要求量が増すとカルシウム吸収効率は高まるが、ビタミンD作用の無いビタミンD受容体欠損(VDRKO)マウスでは、この変化が減弱することを見出した(1)。これは、生体の必要性に応じて、ホルモンやビタミンDの作用が能動的吸収を増加するしくみに基づく。即ち、“全身性の吸収制御”を表している。

一方、VDRKOマウスの特徴的なカルシウム吸収障害は、食事リン量の制限により改善されることを実証した(2,3)。これらの結果は、腸が生体のカルシウム要求に応答するビタミンD作用から独立して吸収調節することを示している。つまり、腸が消化管内リン濃度変化を感知し、独自にカルシウム吸収を調節する“自律性の吸収制御”が機能することを見出した。

ただし、リン動態調節因子の発現はビタミンD作用により増加する(4)。これらを考え合わせると、ビタミンDはカルシウム吸収に必須では無いが、リン濃度変化を感知するしくみには促進的に関与することが推測できる。

腸管腔内のリン濃度変化を感知して腸の自律性カルシウム吸収調節を導くセンサー分子は何か。研究代表者は、ビタミンDが細胞外ATP動態を変えるしくみを世界に先駆けて発見し(5)、このしくみは細胞外リン濃度の変化に応答することを確認した(6)。ATPは多くの細胞でカルシウムの細胞内流入を誘導する。これらの研究背景より、腸上皮のATP代謝系分子が自律性吸収調節機構においてどのような役割を担っているか、詳細な検討が求められる。

## 2. 研究の目的

本申請研究では“腸上皮が食事成分を感知し独自にカルシウム吸収を調節するしくみは、局所のATP代謝に依存する”という作業仮説を提唱し、ビタミンD作用による能動的なカルシウム吸収機構とは独立した仕組みによる腸上皮の食情報感知機能と自律性吸収との連携を検討した。

## 3. 研究の方法

<ビタミンD非依存的なカルシウム吸収の変化、腸管ATP代謝の検討>

小腸特異的ビタミンD受容体欠損マウスを用いた吸収評価試験

4週齢の野生型、および、小腸特異的ビタミンD欠損雄性マウスを用いた。異なるリン濃度の試験飼料(正常食:0.5%、低リン食:0.25%)を、それぞれの遺伝子型マウスに4週間投与し、投与期間中の体重、摂餌量を測定、1週間ごとに各個体から排泄された糞を回収した。飼育終了時には、血液を採取し血清サンプルを調整した。糞中のカルシウム、リン排泄量を測定し、摂取量からの差によりカルシウム、リンの見かけ上吸収量を算出した。また、飼育終了時に腸組織を摘出し、腸上皮よりRNA、タンパク質を抽出し、腸上皮カルシウム輸送分子発現量(局在量)を測定した。また、腸組織はホルマリン固定後にパラフィン切片を作成し、腸上皮におけるカルシウム輸送分子の局在を免疫組織化学的に観察した。

腸上皮におけるセンサー分子の発現・局在変化を観察

カルシウム吸収が全身VDRKOマウスと同程度まで低下する腸特異的VDRKOマウスと、野生型マウスとを比較し、リン量の変化とビタミンD作用の有無とで発現量が変化するATP代謝分子群を、センサー候補因子として絞り込み、腸上皮での発現量の変化を、ウェスタンブロットで捉え、上皮組織での局在を免疫組織化学的に観察した。

自律性カルシウム吸収による骨量増加作用

試験飼料投与後に脛骨を摘出し、メチルメタクリレート樹脂包埋の後に薄切切片を作成し、類骨(オステオイド:石灰化不十分な領域)、および、石灰化骨組織を染色した。大腿骨は、小動物用X線解析装置を用いて骨密度を測定し、さらに、X線解析像による形態的な評価を行った。

<腸上皮細胞培養系による自律性カルシウム吸収評価>

p53欠損マウス由来腸上皮細胞を用いた培養輸送評価系の作出

野生型マウスの腸上皮細胞は寿命が短く培養は困難であるが、p53 機能を欠失すると、長期の培養が可能となる。そこで、p53 欠損マウス胎児由来の腸上皮細胞を用いてトランスウェルシステム培養輸送評価系を構築した。トランスウェルシステムの多孔膜インサートウェルに p53 欠損マウス由来腸上皮細胞を培養し、apical 側（腸管腔側）と基底膜側の極性を出現させた。さらに、apical 側培養液のリン濃度を変化させ、同時に放射性カルシウム同位体  $^{45}\text{Ca}$  を apical 側の培養液に添加し、基底膜側培養液に輸送された  $^{45}\text{Ca}$  を液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### ATP 応答性カルシウム輸送試験

トランスウェルを用いた培養評価系の apical 側培養液への ATP 添加時の細胞内カルシウム流入をカルシウムの細胞内流入を細胞内に導入したカルシウムプローブ Fura-2 による蛍光強度の変化で検出した。その際に、apical 側培養液にカルシウムキレート剤を添加し、細胞内器官から細胞内へのカルシウム放出を遮断することで、外液からのカルシウム流入量を評価した。また、ATP 応答性にカルシウム流入を促進する分子として、P2X 受容体 (purinergic receptor) が候補となることから、P2X の阻害剤を用いてカルシウム流入への関与を検討した。

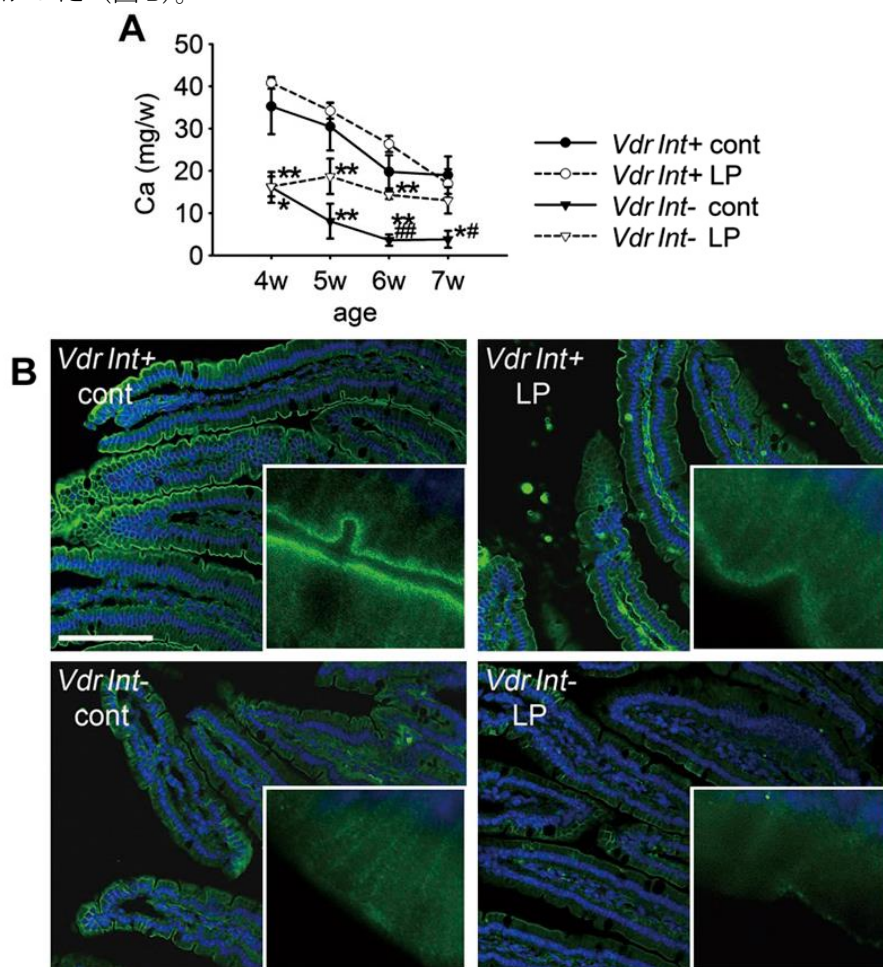
#### 細胞外液リン応答性に ATP 代謝変化を導く細胞内シグナル評価

腸上皮細胞トランスウェル培養系を用いて、外液リン濃度変化に応答する細胞内シグナルとして、RAF/MEK/ERK シグナル伝達経路の関与をウェスタンブロットによる ERK リン酸化の度合いを評価した。また、MEK 阻害剤 PD98059 の投与により、ATP 代謝分子群の局在変化をトランスウェル培養系にて評価した。

## 4. 研究成果

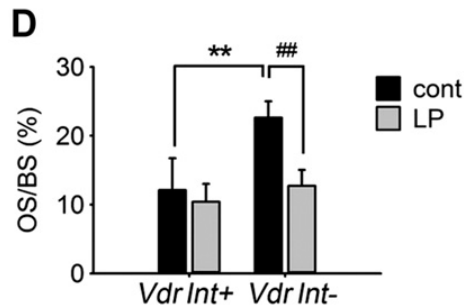
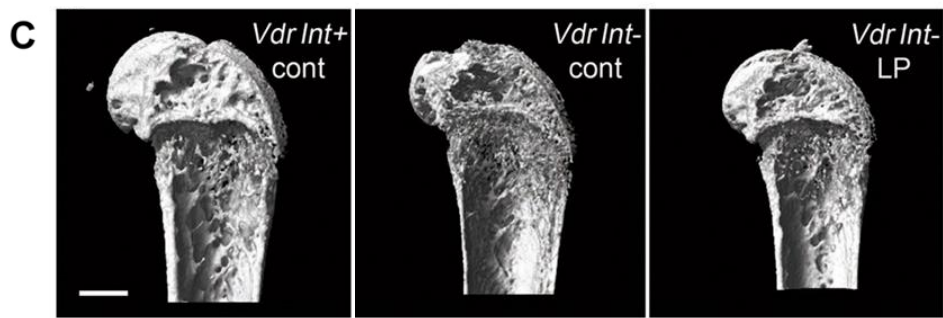
### 小腸 VDRKO マウスへの食事リン制限は、自律性カルシウム吸収を増加する。

小腸 VDRKO マウスでは、ビタミン D 作用依存的な能動カルシウム吸収が低下する。離乳後 4 週齢よりリン濃度の異なる飼料を 4 週間投与したところ、食事リン制限によりカルシウム吸収量が増加した (図 A)。小腸組織におけるカルシウム輸送分子の免疫組織化学的観察を行ったところ、小腸 VDRKO マウスでは発現量は著しく低下し、リン制限による変化は認められなかった (図 B)。



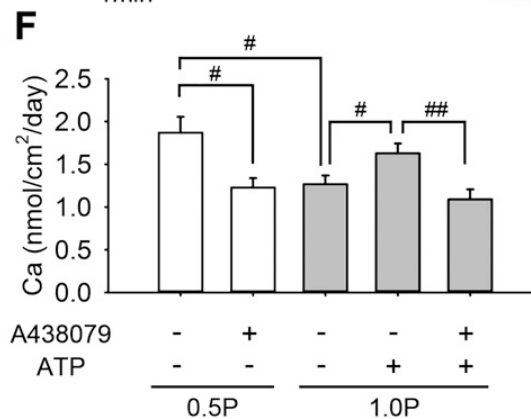
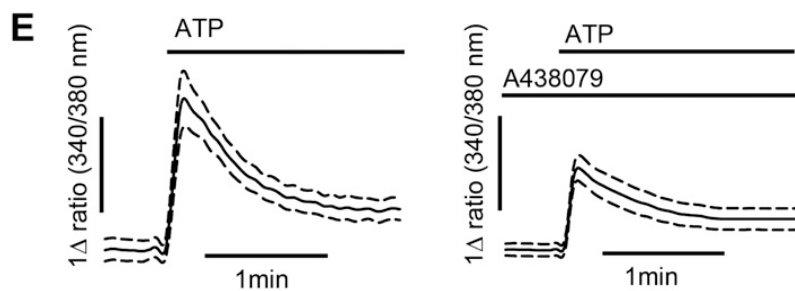
### 小腸 VDRKO マウスの骨量は、食事リン制限による自律性カルシウム吸収により増加した。

マイクロ CT 解析により、リン制限時の自律性カルシウム吸収は、小腸 VDRKO マウスに特徴的な骨量減少を抑制することを確認した (図 C)。特に、石灰化が不完全な類骨領域が減少することで、石灰化骨量が増加したことを確認した (図 D)。



### 腸管腔側 ATP による腸上皮カルシウム輸送

腸上皮細胞培養輸送評価系を用いて、管腔側 (apical 側) 培養液に ATP を添加し、細胞内へのカルシウム流入と、基底膜側へのカルシウム輸送を評価した。ATP 依存的な細胞内へのカルシウム流入は、P2X 阻害剤である A438079 の添加により減弱したことから、P2X 受容体カルシウムチャンネルを介した仕組みであることが示唆された (図 E)。さらに、基底膜側への輸送は apical 側リン濃度の低下により増加し、P2X 阻害により減少した。(図 F)



### 腸上皮におけるリン応答性 ATP 代謝分子局在変化

腸上皮に局在し、管腔側 (apical 側) リン濃度変化に反応する分子として、細胞外に ATP を放出する CX43 が絞り込まれた。培養細胞において、apical 側のリン濃度の増加に伴い発現量が減少することをウェスタンブロットにより確認し、さらに、マウスにおいて食事リン制限により上皮での発現量増加を、免疫組織化学的方法にて確認した。一方、細胞外 ATP 分解酵素 ENPP1 の局在量は CX43 とは異なり、リン制限により減弱することを確認した。

### リン応答性細胞内シグナルの ATP 代謝への関与

管腔側 (apical 側) リン濃度変化により、ERK1/2 リン酸化が変動する。ウェスタンブロットにより、リン濃度の増加に従って ERK1/2 リン酸化は増強することを確認した。そこで、ERK シグナルを PD98059 の培養液添加により阻害したところ、ATP を放出する CX43 の腸上皮における局在量は増加し、逆に、ATP を分解する ENPP1 局在量は減少した。

## 考察

本研究結果より、ビタミンD非依存的な自律性カルシウム吸収の中で、食事由来のリン量に応答して変化するしくみの一部が明らかにされた。管腔内のリン量の増加は、RAF/MEK/ERK シグナル伝達経路を通じてATP代謝分子の発現量・局在化を変化させ、ATP依存的なカルシウム流入を引き起こすことで、腸独自のしくみによる自律性カルシウム吸収が導かれると推察される。

### 〔引用文献〕

- (1) Lieben, L., Carmeliet, G., and Masuyama, R. Calcemic actions of vitamin D: effects on the intestine, kidney and bone. *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab* 25, 561-572 2011
- (2) Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., et al. Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology* 142, 494-497 2001
- (3) Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., et al. Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J Bone Min. Res* 18, 1217-1226 2003
- (4) Masuyama, R., Stockmans, I., Torrekens, S., et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest* 116, 3150-3159 2006
- (5) Lieben, L., Masuyama, R., Torrekens, S., et al. Normocalcemia is maintained in mice under conditions of calcium malabsorption by vitamin D-induced inhibition of bone mineralization. *J Clin Invest* 122, 1803-1815 2012
- (6) Masuyama, R. Bone and Nutrition. *Vitamin D Independent Calcium Absorption. Clinical Calcium* 25, 1023-1028 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uekawa Atsushi, Yamanaka Hitoki, Lieben Liesbet, Kimira Yoshifumi, Uehara Mariko, Yamamoto Yoko, Kato Shigeaki, Ito Kosei, Carmeliet Geert, Masuyama Ritsuko	4. 巻 32
2. 論文標題 Phosphate-dependent luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201700631R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuyama Ritsuko	4. 巻 28
2. 論文標題 Rickets/Osteomalacia. Vitamin D action:Lessons from animal models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Calcium	6. 最初と最後の頁 1365 ~ 1371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) CliCa181013651371	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimie Nakagawa, Yumi Okubo, Ritsuko Masuyama	4. 巻 5
2. 論文標題 Vitamin Status and Mineralized Tissue Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 89 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okubo Y, Masuyama R, Iwanaga A, Koike Y, Kuwatsuka Y, Ogi T, Yamamoto Y, Endo Y, Tamura H, Utani A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Calcification in dermal fibroblasts from a patient with GGCX syndrome accompanied by upregulation of osteogenic molecules.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0177375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuyama R	4. 巻 27
2. 論文標題 Update on recent progress in vitamin D research. Vitamin D and bone, mineral metabolism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Calcium	6. 最初と最後の頁 1525-1532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ClCa171115251532.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, Igawa T, Shimizu T, Umeda M, Nishino A, Horai Y, Hirai Y, Koga T, Kawashiri SY, Tamai M, Ichinose K, Nakamura H, Origuchi T, Masuyama R, Kosai K, Yanagihara K, Kawakami A.	4. 巻 8
2. 論文標題 M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 1958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2017.01958.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山中仁木、増山律子	4. 巻 1
2. 論文標題 ビタミンDの組織特異的作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 12-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masuyama Ritsuko
2. 発表標題 Luminal ATP metabolism and intestinal calcium transport
3. 学会等名 korean society of osteoporosis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増山律子
2. 発表標題 ビタミンD作用応答性ATP代謝による 腸上皮炎症制御機構の検討
3. 学会等名 第72回 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増山律子
2. 発表標題 カルシウム吸収の調節因子 ビタミンD作用とは無関係な経細胞カルシウム輸送の可能性
3. 学会等名 第49回 日本消化吸収学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増山律子
2. 発表標題 ビタミンD作用応答性ATP代謝による腸上皮炎症制御機構の検討
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増山律子
2. 発表標題 細胞内外のカルシウム恒常性と骨代謝制御
3. 学会等名 日本解剖学会(招待講演)
4. 発表年 2017年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山中 仁木  (YAMANAKA Hitoki)  (30533921)	信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授    (13601)	