

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00868

研究課題名(和文) 骨・血管連関新規リン調節分子による異所性石灰化機序解明とCKD栄養療法への展開

研究課題名(英文) Investigation of vascular calcification mechanism by a new phosphorus-regulating molecule and development to CKD nutrition therapy

研究代表者

伊藤 美紀子 (Ito, Mikiko)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：50314852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：進行した慢性腎臓病のために透析導入となった患者では血管の異所性石灰化が進行し生命予後が悪化する。この異所性石灰化には高リン血症が大きく関与する。本研究では骨と血管の臓器連関から、リン調節分子が血管平滑筋細胞に及ぼす影響を明らかにする事で、異所性石灰化を予防するリン栄養療法の開発を目指した。

血管石灰化に伴い発現が上昇したSLC37A2に注目して検討を行った結果、SLC37A2が血管石灰化に関与する可能性をもつ新たな分子の1つであることを示唆した。今後、血管石灰化におけるSLC37A2の機能を明らかにすることで、石灰化メカニズムの解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異所性石灰化に関するSLC37A2の機能を解明するためには、さらなる研究が必要であるが、本研究の発見はリン誘発性血管石灰化のメカニズムを解明するための新しい手がかりになることが期待される。また今後、食事によるリン摂取が、SLC37A2の発現へ及ぼす影響を明らかにすることで、血管石灰化に対する新たなエビデンスにつながり、慢性腎臓病患者の食事療法の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Vascular calcification is major source of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. Hyperphosphatemia leads to increased intracellular phosphorus (P) influx, which leads to an increase in osteoblast-like cells in vascular smooth muscle cell. However, the mechanism of vascular calcification is not completely understood. We hypothesized that P-related molecules belonging to the SLC superfamily would be involved in vascular calcification. As a result of DNA microarray analysis, we focused on SLC37A2 and showed that mRNA expression of these cells increased on calcified AoSMC. As a result, we showed that SLC37A2 is one of the molecules that increase with vascular calcification in vitro and in vivo.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：血管石灰化 高リン血症 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の成人人口における慢性腎臓病 (CKD) 患者数は、日本腎臓学会調査から 1,330 万人 (12.9%) と推定されており、今や「国民病」と言える疾患となっている。2014 年の透析患者の死因として心不全、心筋梗塞、脳血管障害といった心血管病変が約 40% を占めており、このリスクは健常人の 10~20 倍に相当することが特筆すべきことである。これらの心血管病変には、高リン血症が惹起する血管の異所性石灰化による動脈硬化が大きな要因であり、異所性石灰化には食事からのリン摂取量が強く関与することが疫学研究などから明らかとなっている。

透析患者では食事からのリン摂取制限が設けられている。しかしながら近年、透析導入時には約半数の患者で既に血管平滑筋細胞に異所性石灰化が進行しており、早期のリン管理が重要であることが強く示唆されている。しかしながら、異所性石灰化進行メカニズムや抑制方法、食事との関連には未だ不明な点が多いのが現状である。

申請者は骨・血管連関によるリン代謝調節機構に着目して研究を進めている。リンはその 85% が骨に貯蔵され、骨吸収、骨形成を介して生体内リン代謝調節に常に関与しているにもかかわらず、その調節機構に関する報告は少ない。特に骨吸収を担う破骨細胞は、多核の巨細胞であり、骨吸収時のエネルギーを確保するために大量の ATP、すなわちリンを必要とする。また吸収した骨 (ハイドロキシアパタイト; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を排出する機構が存在していることから、これが生体の新規リン調節分子であるとの考えのもと、研究を進めてきた。その結果、破骨細胞に存在するユニークなリン代謝調節分子の存在を明らかにしている。これらリン代謝調節分子が未だ詳細が不明な異所性石灰化において重要な役割を果たしていると考えて研究を遂行し破骨細胞を用いた研究から、新規リン調節候補分子として SLC37A2 を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では 1) 骨と血管の臓器連関から異所性石灰化の分子基盤を明らかにするだけでなく、2) 骨・血管連関リン調節分子が血管平滑筋細胞に及ぼす影響を明らかにする事で、3) 異所性石灰化を予防するリン栄養療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

新規リン調節因子 SLC37A2 について血管石灰化との関連を、*in vitro*, *in vivo* の両面から検討を行った。

in vitro の系では、正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) を用いて異所性石灰化の検討を行った。*in vivo* として血管石灰化を生じさせた CKD モデルマウスを用いて、食餌との関連を明らかにした。

(1) DNA マイクロアレイ

非石灰化 AoSMC、および石灰化を誘導した AoSMC から、total RNA を抽出した。DNA マイクロアレイを用いて、約 26,000 の遺伝子を検討した。

(2) リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 分析

それぞれの細胞から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行なった。

(3) ウェスタンブロッティング分析

Total protein は、石灰化を誘導した AoSMC、ならびに非石灰化 AoSMC から回収し、SLC37A2 タンパク質の発現を検討した。

(4) アデニン誘発性 CKD ラットを用いた *in vivo* 研究

12 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。試験食には、コントロールリン食、アデニン食、低リン (LP) 食、高リン (HP) 食を用いた。コントロール群には、コントロールリン食を 6 週間与えた。アデニン誘発性 CKD 群には、アデニン食を約 3 週間与え、その後、さらに 2 群; CKD-LP 群、CKD-HP 群に群分け、それぞれ LP 食、HP 食を 3 週間与えた。血液と尿サンプルを採取した。解剖後、下大静脈から血液サンプルを採取し、胸腹部大動脈を採取した。血中および尿中のリン、カルシウム、クレアチニン濃度を測定した。

(5) 大動脈における SLC37A2 の発現検討

採取した胸腹部大動脈は石灰化を可視化するための Von Kossa 染色、および免疫染色に使用した。さらに胸腹部大動脈から total RNA を抽出し、合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。

(6) 統計解析

データは、平均値 ± 標準誤差 (SE) として示した。それぞれの方法にあった統計解析法を選択した。すべての検定において、両側 *p* 値が 0.05 未満を統計的に有意であるとみなした。

4. 研究成果

(1) 候補分子の探索

石灰化 AoSMC において発現が増加する分子を探索するために、石灰化 AoSMC および非石灰化 AoSMC mRNA を用いて約 26,000 の遺伝子について DNA マイクロアレイ解析を行った (Fig.1)。SLC37A2 は、石灰化 AoSMC において約 3.1 倍の mRNA 発現増加がみられた。破骨細胞様細胞においても、分化後発言が増加した。SLC37A2 は、リン制御に関連していることが報告されているが、その詳細な機能は不明である。

(2) リンにより誘導した石灰化 AoSMC における SLC37A2 の発現

SLC37A2 が石灰化に関与しているかどうかを明らかにするために、非石灰化 AoSMC および石灰化 AoSMC における SLC37A2 mRNA 発現を検討した。SLC37A2 mRNA は、石灰化により有意に増加した。

(3) CKD モデルラットにおける SLC37A2 の発現

SLC37A2 が血管石灰化に関与するかどうかを *in vivo* で明らかにするために、アデニン誘発性 CKD ラットの血管における SLC37A2 mRNA 発現を検討した。アデニン誘発性 CKD 群の体重は、非 CKD 群に比して、有意に低値であった。

CKD 群は、非 CKD 群に比して、血中リン、クレアチニン濃度は高く、血中カルシウム、および 24 時間尿中リン、カルシウム、クレアチニン排泄量は低値であった。さらに、これらの結果は、CKD-HP 群においてより顕著であった。以上のことから、非 CKD 群に比して、CKD 群、特に CKD-HP 群において腎機能が低下したことを示した。

CKD ラットの大動脈における mRNA 発現を検討した。血管石灰化メカニズムにおいて早期に誘導される骨芽細胞の分化に関わる転写因子である Runx2 mRNA の発現には、有意な群間差はなかったが、骨芽細胞の分化マーカーである osteopontin mRNA 発現は、CKD-HP 群において、非 CKD 群および CKD-LP 群に比して有意に増加した。SLC37A2 mRNA 発現も、非 CKD 群および CKD-LP 群に比して有意に増加した。これらのラットには大きな個体差があったことから、osteopontin と SLC37A2 mRNA の相関を検討した結果、これらの分子間に有意な相関があることが明らかとなった。

胸腹部大動脈を Von Kossa 染色により組織学的に評価した結果、CKD-HP 群の大動脈においてのみ中膜石灰化が観察された。大動脈における SLC37A2 の発現部位を検討するために、CKD-HP 群の動脈の連続切片を用いて免疫染色を行った。SLC37A2 は血管石灰化が生じた部位で強く発現していた。

本研究は SLC37A2 がリン制御に関連する分子であること、および炎症でみられる経路とは異なる経路を介して血管石灰化に関与する可能性を示唆した。さらに、SLC37A2 は Runx2 の下流因子として血管石灰化に関与している可能性がある。石灰化に関して SLC37A2 の機能を解明するためには、さらなる研究が必要であるが、本研究の発見は、リン誘発性血管石灰化のメカニズムを解明するための新しい手がかりになることが期待される。

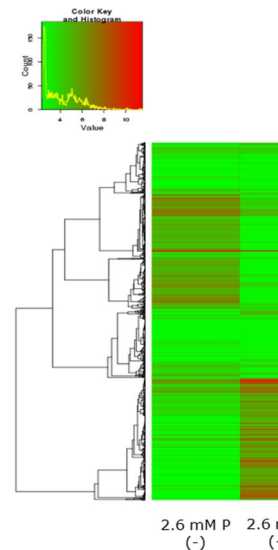


Fig.1 非石灰化及び石灰化 AoSMC の DNA マイクロアレイ Heatmap (雑誌論文 1 より)

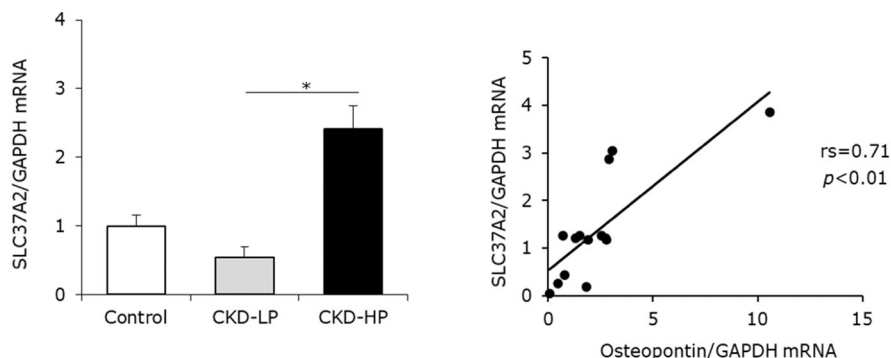


Fig.2 CKD ラットの大動脈における SLC37A2 mRNA 発現と骨芽細胞マーカー osteopontin との相関関係 (雑誌論文 1 より)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tani M, Tanaka S, Oeda C, Azumi Y, Kawamura H, Sakaue M, Ito M	4. 巻 67(2)
2. 論文標題 SLC37A2, a phosphorus-related molecule, increases in smooth muscle cells in the calcified aorta.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.19-114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tani M, Tanaka S, Takamiya K, Kato Y, Harata G, He F, Sakaue M, Ito M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effects of dietary fiber on vascular calcification by repetitive diet-induced fluctuations in plasma phosphorus in early-stage chronic kidney disease rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) in press	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tani M, Tanaka S, Takamiya K, Sakaue M, Ito M	4. 巻 66(2)
2. 論文標題 Effects of repetitive diet-induced fluctuations in plasma phosphorus on vascular calcification and inflammation in rats with early-stage chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 139-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.19-93	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 河村弘美、阪上詩織、田中更沙、松井麻有、谷真理子、石谷翠里、坂上元祥、伊藤美紀子	4. 巻 21(4)
2. 論文標題 血中リンと血管内皮機能に及ぼす水溶性食物繊維の効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本病態栄養学会誌	6. 最初と最後の頁 495-503
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 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 Kawamura H, Tanaka S, Ota Y, Endo S, Tani M, Ishitani M, Sakaue M, Ito M	4. 巻 62
2. 論文標題 Dietary intake of inorganic phosphorus has a stronger influence on vascular-endothelium function than organic phosphorus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.17-97	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 M. Tani, K. Takamiya, S. Tanaka, M. Sakaue, M. Ito.
2. 発表標題 Effects of diet-induced repetitive spikes in plasma phosphorus on vascular calcifications in rats with mild kidney dysfunction.
3. 学会等名 41th European Society for Clinical Nutrition and Metabolism Congress :ESPEN) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka S, Tani M, Kawamura H, Sakaue S, Matsui M, Ishitani M, Sakaue M, Ito M.
2. 発表標題 Effect of soluble dietary fiber on plasma phosphorus and endothelial function.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors(ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷 真理子、田中更沙、高宮佳奈、坂上元祥、伊藤美紀子
2. 発表標題 食餌による一過性血中リン濃度上昇の反復が血管へ及ぼす影響
3. 学会等名 第7回 日本腎栄養代謝研究会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷真理子、田中更沙、河村弘美、阪上詩織、松井麻有、石谷翠里、坂上元祥、伊藤美紀子
2. 発表標題 血中リンと血管内皮機能に及ぼす水溶性食物繊維の効果
3. 学会等名 第22回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawamura H, Ota Y, Endo S, Tani M, Ishitani M, Tanaka S, Sakaue M, Ito M
2. 発表標題 Dietary intake of inorganic phosphorus rather than organic phosphorus impairs endothelial function in healthy young men.
3. 学会等名 39th ESPEN congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 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、伊藤美紀子 他	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 360
3. 書名 リンの事典	

〔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	田中 更沙 (Tanaka Sarasa) (90733387)	兵庫県立大学・環境人間学部・助教 (24506)	