

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01605

研究課題名(和文)リン過剰摂取による脂質代謝の変動に關与する内在性因子とシグナル経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of endogenous factors and signal pathways involved in changes in lipid metabolism due to excessive phosphorus intake

研究代表者

中井 雄治(Nakai, Yuji)

弘前大学・地域戦略研究所・教授

研究者番号：10321788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高リン刺激が生体の脂質代謝に影響を及ぼす機構を解明することを目的として、高リン食を単回投与したラット肝臓での遺伝子発現の変化をDNAマイクロアレイで解析した。その結果、FGF21を含む脂質代謝関連遺伝子が高リン食群で有意に発現上昇していた。同ラット血清中のFGF21タンパク質をELISA法で測定した結果、高リン食群で有意に高値を示した。一方、血中リン濃度上昇に早期に応答するPTHには有意差は認められなかった。以上より、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動は、PTHによる間接的な影響ではなく、高リン刺激を直接感知して起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、リン過剰摂取に対する生体応答の研究は、リン恒常性に関するものがほとんどであった。本研究は、高リン刺激が直接肝臓での脂質代謝関連遺伝子の発現変動を引き起こす可能性を示した初めての研究であり、学術的な意義は大きい。今後さらなる研究によって高リン刺激がどのように代謝に影響しているのかを明らかにすることは、リン過剰摂取の際に生体で起きていることの正確な理解につながり、自覚症状がない早期の段階で、将来起こりうるリン恒常性の破綻の予兆を捉えることができるようになる可能性がある。さらに、リンの恒常性に悪影響を与えず、脂質代謝のみを制御できる内在性因子や生体内標的分子の発見につながる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism by which high-phosphorus stimulation affects lipid metabolism in the organism, we analyzed changes in gene expression of rat liver after an 8-hour administration of a high-phosphorus diet by using DNA microarray. The results showed that lipid metabolism-related genes, including FGF21, were significantly upregulated in the high-phosphorus diet group. The FGF21 protein in the serum of the rats was measured by ELISA and showed significantly higher levels in the high-phosphorus diet group. On the other hand, there was no significant difference in PTH, which responds early to elevated blood phosphate levels. These results suggest that changes in the expression of genes related to lipid metabolism in the liver are caused by direct sensing of high phosphorus stimulation, rather than indirect effects by PTH.

研究分野：ニュートリゲノミクス

キーワード：高リン食 DNAマイクロアレイ ラット 肝臓 FGF21

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンは骨などを形成するのに必須の生体にとって重要なミネラルであるが、ほぼ全ての食品に含まれているため通常は欠乏することはほとんどない。一方で、インスタント食品や清涼飲料水などに含まれるリンによるリン過剰摂取が問題となっており、とくに10~20代の若年層での摂取が多い傾向にある(国民健康・栄養調査データ)。さらに慢性腎臓病患者等でリンの排泄がうまく機能しないケースでは深刻な問題となり得る。腎機能低下による高リン血症では、心血管疾患<sup>1)</sup>や骨疾患<sup>2)</sup>を併発することが多い。それだけでなく、健常人においてもリン過剰摂取は死亡リスクを上昇させるとの報告<sup>3)</sup>もあり、リン過剰摂取による生体への悪影響が懸念される。

過剰摂取されたリンは高リン刺激として副甲状腺で感知され、副甲状腺ホルモン(PTH)の放出、骨からの線維芽細胞増殖因子(FGF)23の分泌、腎臓での活性型ビタミンDの低下・リン再吸収の抑制などが起こることがわかっているが、これらはすべてリン恒常性に関わる研究である。高リン刺激によって脂質代謝がどのように制御されているかはほとんどわかっていない。PTHが脂肪組織での脂肪分解を誘導するという論文<sup>4)</sup>もあるが、その効果は限定的であり、PTHだけでは高リン刺激と脂質代謝を結びつけるのには不十分であった。

我々は、これまで知られていたFGF23だけでなく、肝臓から分泌され、脂質代謝制御に関わるホルモンとしての作用が近年注目されているFGF21の発現が3週間(長期)高リン食を投与したラット肝臓で上昇することを、DNAマイクロアレイ解析を駆使して明らかにしてきた<sup>5)</sup>。そこで、長期高リン食投与ラットの白色脂肪組織重量を調べた結果、高リン食を摂取したラットでは、コントロール食を摂取したラットと摂取量(摂取カロリー)に有意な差がないにもかかわらず白色脂肪組織重量が有意に減少することを確認している。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでに3週間の高リン食摂取(高リン刺激)によってFGF21の発現が上昇することを明らかにしたが、どのような経路でFGF21が発現上昇するのかを含め、メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、高リン刺激が生体の脂質代謝に影響を及ぼす機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験

4週齢のWistar系雄性ラットを1週間の予備飼育後、朝9時から夕方17時の8時間のみ飼料を与える制限給餌を通常リン濃度の飼料で7日間行った。8日目の9時にラットを2群に分け、1群には通常リン濃度の飼料(C群)、もう1つの群には高リン食(HP群)を与え、8時間給餌した。飼料の組成は表1に、制限給餌法の概要は図1に示した。その後17時に両群を麻酔下で解剖し、頸動脈より採血を行い、安楽死させた。採血後直ちに肝臓・腎臓・脂肪組織を摘出し、凍結保存した。ミネラル濃度等各種血清中生化パラメータは長浜バイオサイエンスラボラトリーに委託し解析した。FGF21(R&D Systems)、FGF23(カイノス)、PTH(RayBiotech)およびinsulin(モリナガ)はELISA法にて測定した。動物実験は弘前大学動物実験委員会の承認のもと、「弘前大学動物実験に関する規程」に従って行った。

表1 飼料組成(単位:g)

	Control diet (P: 0.3%)	HP diet (P: 1.2%)
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	397.486	397.486
Dextrinized Corn Starch	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose	50	10.52
Soybean Oil	70	70
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
AIN-93G Mineral Mix	35	35
AIN-93G Vitamin Mix	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0	39.48
Total	1000	1000

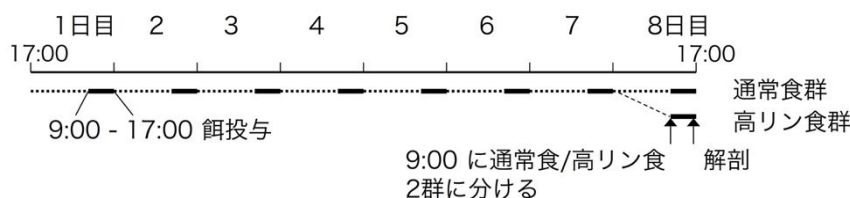


図1 制限給餌法の概要

## (2) DNA マイクロアレイ解析

凍結保存しておいた肝臓より ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、RNeasy Mini kit (QIAGEN) で精製した。得られた total RNA から、GeneChip 3'IVT Plus reagent kit (Thermo) を用いてターゲット調製を行った。GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Thermo) にハイブリダイズさせ、DNA マイクロアレイデータを取得した。得られたマイクロアレイデータ (CEL ファイル) は、統計解析言語環境 R および Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) よりダウンロードしたマイクロアレイデータ解析用パッケージ群を用いて解析を行った。データの正規化は Distribution free weighted method (DFW) アルゴリズムにて行った。C 群と HP 群の間で発現に差がある遺伝子の選抜は Rank products 法で行った。FDR < 0.05 となるような遺伝子を発現変動遺伝子として選抜し、発現変動遺伝子の機能的特徴は DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) で、発現変動遺伝子を制御している上流因子の解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN) を用いて解析した。

## (3) 培養細胞を用いた実験

生物種は異なるが、ヒト肝臓がん由来細胞株である HepG2 を用い、リン酸塩添加に対する遺伝子発現応答を調べた。HepG2 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 培地にて 24 ウェルプレートで 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 72 時間前培養後、コントロール (通常 DMEM 培地、リン酸イオン濃度 0.9 mM)、通常培地の 2 倍 (1.8 mM)・10 倍 (9 mM) のリン酸イオン濃度になるように NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> または KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を添加した DMEM 培地に交換し、さらに 24 時間培養した。リン酸塩の細胞毒性を WST-1 法 (Roche) で、FGF21 mRNA 発現の変化をリアルタイム RT-PCR 法 (THUNDERBIRD® SYBR® Mix, 東洋紡) で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 血清の生化学パラメータ

血清の生化学パラメータの解析の結果は表 2 に示した。HP 群で無機リンが有意に高く、カルシウムは有意に低い結果となり、8 時間の単回投与でも高リン食の影響は確実に認められ、高リン状態になっていることが確認できた。血糖値 (Glu)・中性脂肪 (TG)・総コレステロール (T-CHO)・HDL コレステロール (HDL-CHO) には有意差が認められなかった。これはある意味当然でもあるが、高リン食の 8 時間単回投与では代謝に大きな変動はなかったと考えられる。

表 2 血清生化学パラメータ

	Control 群	HP 群
Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.1	10.0 ± 0.1**
P (mg/dL)	9.2 ± 0.4	10.5 ± 0.2*
Glu (mg/dL)	179.4 ± 6.7	183.8 ± 7.4
TG (mg/dL)	72.0 ± 18.2	55.6 ± 2.5
T-CHO (mg/dL)	75.0 ± 0.9	76.6 ± 2.0
HDL-CHO (mg/dL)	33.0 ± 0.6	31.0 ± 0.8

データは平均値±標準誤差 (n=5) で示した。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs Control 群 (Student's *t*-test)

### (2) DNA マイクロアレイ解析

肝臓の DNA マイクロアレイデータの主成分分析の結果、C 群の 1 個体 (C5) が HP 群に近かった以外は、寄与率の高い第一主成分 (PC1) 方向に C 群と HP 群で概ねクラスタが分離した (図 2)。このことから、群内では遺伝子発現プロファイルが相互に比較的近く、群間では遺伝子発現プロファイルが異なっていたと考えられる。従って、高リン食 8 時間単回投与は肝臓の遺伝子発現にも影響していたといえる。HP 群で発現が高かった遺伝子は 365 個、発現が低かった遺伝子は 355 個だった。

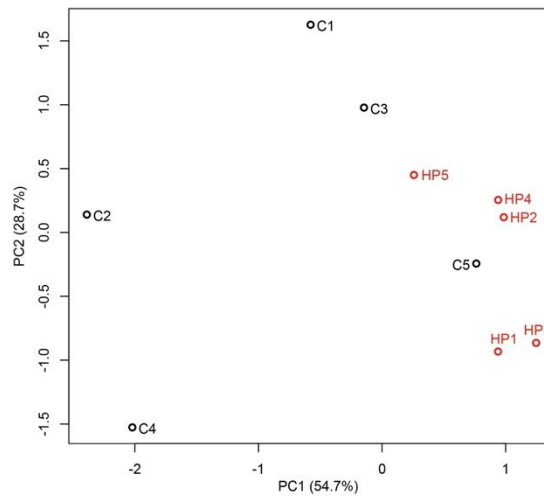


図2 肝臓 DNA マイクロアレイデータの主成分分析  
黒丸: Control 群、赤丸:HP 群、数字は個体番号を示す。

これらの発現変動遺伝子セットに濃縮された機能を DAVID で解析した結果、HP 群で発現が高かった遺伝子では脂質代謝関連が顕著に濃縮されていた。これは、すでに報告した高リン食を3週間（長期）投与したラット肝臓での遺伝子発現<sup>5)</sup>と同じ傾向であった。さらに興味深いことに、長期投与の場合と同様に FGF21 遺伝子の発現が顕著に誘導された。そこで、血清中の FGF21 タンパク質濃度を測定した結果、タンパク質レベルでも HP 群で有意に高い値を示した(表3)。リンに応答して骨で産生される FGF23 も HP 群で有意に高い値となった。一方、比較的初期に血中リン濃度の影響を受けるとされる、副甲状腺から分泌される PTH の値には有意差は認められなかった。Insulin も有意差がなく、制限給餌で摂食のタイミングを揃えた効果か、摂食自体の影響は小さいと考えられた。

表3 血清中ホルモン濃度

	Control 群	HP 群
Insulin (ng/mL)	0.82 ± 0.16	1.18 ± 0.41
PTH (ng/mL)	3.58 ± 0.60	3.49 ± 0.60
FGF21 (pg/mL)	49.3 ± 8.4	96.5 ± 15.9*
FGF23 (pg/mL)	153.1 ± 4.4	292.7 ± 21.5****

データは平均値±標準誤差 (n=5) で示した。

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*\*:  $p < 0.001$  vs Control 群 (Student's *t*-test)

また、IPA による発現変動遺伝子の上流解析を行った結果、HP 群で発現が高かった遺伝子を制御している可能性のある上流因子として、転写因子 PPAR $\alpha$ ・STAT3 が推定された。FGF21 自身も上流因子ネットワークに含まれていた。

### (3) 培養細胞を用いた実験

ラットを用いた *in vivo* の実験により、PTH の上昇を伴わず（一過性に上昇し、その後下がったことによって有意差がなくなった可能性は否定できないが）肝臓が直接血中リン濃度の上昇を感知して FGF21 を含む脂質代謝に重要な遺伝子群の発現が上昇した可能性が考えられた。そこで、培養細胞をリン酸塩で刺激して FGF21 の発現上昇が起こるかどうかが検討した。

まず、HepG2 細胞に通常培地の2倍量・10倍量のリン酸塩を添加して培養し、細胞の生存率に及ぼす影響を調べた。陽イオン側の影響も考慮し、ナトリウム塩 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、カリウム塩 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) の2種類を使用した。その結果、いずれのリン酸塩も通常培地の10倍濃度まで添加しても細胞の生存率に影響は与えなかった(図3)。

次に、リン酸塩添加が HepG2 細胞における FGF21 mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。その結果、リン酸塩添加区ではいずれもコントロールより高い値を示し、10倍濃度 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 添加区では FGF21 mRNA の発現がコントロールと比べ有意に高値を示した。(図4)。これらの結果より、少なくとも培養細胞レベルでは、リン酸塩による刺激のみで FGF21 mRNA の発現が誘導されることが示唆された。

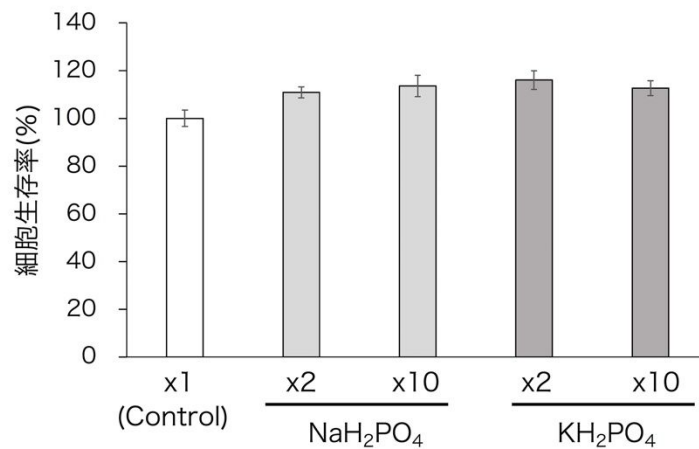


図 3 HepG2 細胞生存率に及ぼすリン酸塩添加の影響  
(Dunnnett's test で有意差なし)

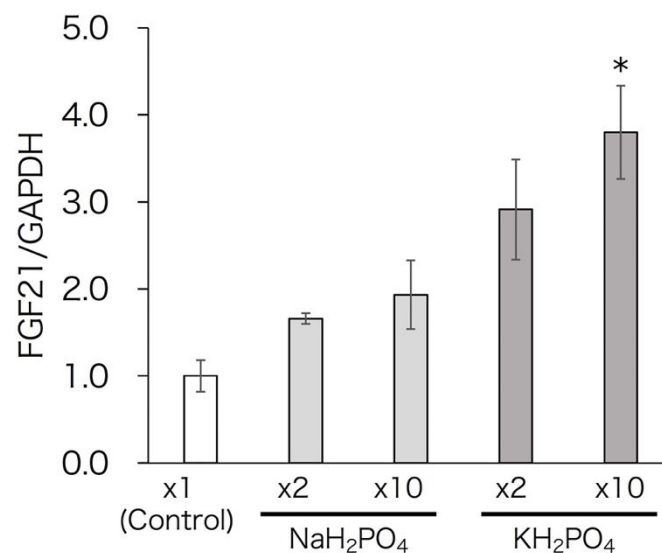


図 4 リン酸塩添加が HepG2 細胞における FGF21 mRNA 発現量に及ぼす影響  
(\*:  $p < 0.05$  vs Control, Dunnnett's test)

#### (4) まとめ

以上の結果より、高リン食 8 時間単回投与とラット肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動は、PTH によって間接的に高リン刺激の影響を受けた結果ではなく、肝臓が高リン刺激を直接的に感知して起こることが示唆された。

#### [引用文献]

- 1) Lau *et al.* (2011) *Adv. Chronic Kidney Dis.* 18, 105-112
- 2) Byon and Chen (2015) *Curr. Osteoporos Rep.* 13, 206-215
- 3) Chang *et al.* (2014) *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 320-327
- 4) Larsson *et al.* (2016) *Cell. Signal.* 28, 204-213
- 5) Chun *et al.* (2016) *PLOS ONE* 11, e0155386

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井雄治、柴田真樹、前多隼人、永長一茂、岡田晋治
2. 発表標題 高リン食単回摂取がラット肝臓における遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前多隼人、柴田真樹、永長一茂、岡田晋治、中井雄治
2. 発表標題 高リン付加による肝臓の脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学地域戦略研究所食料科学研究部門 / 中井個人ページ <a href="https://www.iri.hirosaki-u.ac.jp/sections/foodsciences/foods/nakai-yuji">https://www.iri.hirosaki-u.ac.jp/sections/foodsciences/foods/nakai-yuji</a>
--

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	岡田 晋治  (Okada Shinji)  (50376563)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永長 一茂  (Nagaosa Kazushige)  (70401891)	弘前大学・地域戦略研究所・准教授    (11101)	
研究分担者	前多 隼人  (Maeda Hayato)  (80507731)	弘前大学・農学生命科学部・准教授    (11101)	

	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
研究協力者	柴田 真樹  (Shibata Masaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関