

機関番号：16101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590976  
 研究課題名(和文) 腎不全時のカルシウム／リン比を維持し、骨に導く先導的分子の同定  
 研究課題名(英文) osteocyte has the role to lead calcium and phosphate to bone.  
 研究代表者 辰巳 佐和子 (TATSUMI SAWAKO)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：80420545

研究成果の概要(和文)：骨へのリン・カルシウムの先導的因子の同定を目指したものである。骨細胞死滅マウスにおいて、リン・カルシウムの蓄積の異常が認められた。さらに尿中リン排泄、リン負荷における応答性の異常が認められた。そのメカニズムを検討するため骨のDNAマイクロアレイ解析によりいくつかの候補分子を見いだした。これらの因子が骨へのリン／カルシウムの蓄積を制御すると考えられたため、今後さらに研究を進める。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that alterations in osteocytes metabolism occur in very early stages of chronic renal disease (CKD) and likely mediate altered bone and mineral metabolism in patients with even very mild degree of renal dysfunction. In a previous study, we have established a transgenic mouse model, based on the diphtheria toxin (DT) receptor-mediated cell knockout (TRECK) system, in which inducible and specific ablation of osteocytes is achieved in vivo (Tatsumi S et al. Cell Metab 2007). "Osteocyte-ablated" mice exhibited excessive bone resorption, impaired mineralization and adipose tissue proliferation in marrow space, all of which are hallmarks of the ageing skeleton. To analysis the role of osteocyte in Pi homeostasis, we investigated renal Pi handling in the osteocyte-ablate mice. Plasma Pi and calcium concentration were not changed in the ablated mice. Plasma FGF23 levels were significantly decreased and plasma PTH levels were not changed in the ablated mice. Urinary Pi excretion was markedly increased and renal sodium dependent Pi cotransporter NaPi-IIa and NaPi-IIc protein levels were significantly decreased in the ablated mice. Thus, the osteocyte-ablated mice show increased renal Pi excretion. Osteocytes prevent renal phosphate loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：リン、骨細胞、腎臓、慢性腎臓病、人工透析

1. 研究開始当初の背景

生体構成成分は、食事成分と共通であり

(グルコース、コレステロールなど)、生体はその構成成分を絶えず入れ替えている。腎

不全／透析患者にみられるミネラル代謝異常（高リン血症等）や合併症（異所性石灰化）は、腸管から吸収された栄養素が、本来なら各臓器代謝を経て、腎臓から排泄されるはずが、上述した入れ替え機構の異常により生体のあらゆる組織に蓄積することが原因と考えられる。骨の素材であるカルシウム／リンは、各組織や血中、またその細胞内小器官に至るまで、その比率は一定に維持されている。腎臓が障害されると、摂取したカルシウム／リンは、骨に移行できず、むしろ血管や軟組織に蓄積し、異所性石灰化の原因となる。一方、血管から投与したカルシウム／リンは骨には蓄積せず、ただちに尿中に排泄される。これらの事実は、腸管を介したカルシウム／リンには骨に移行するための何らかのマーカーが付随しており、血管からの投与ではこのマーカーは付加されない、つまり、このマーカー分子を介して骨のカルシウム／リンの交換が行われていると想定される。我々は、世界に先駆け任意の時期に誘導的に骨細胞を破壊できるマウスを樹立し（Tatsumi S et al, *Cell Metabolism* 5, 464-475 (2007)、特許公開 2007-178356）、カルシウム／リン比を一定に保つ機構に関して新しいヒントを得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨細胞と腎臓を結ぶカルシウム／リン比の制御機構の解明をおこなうことで、食事から摂取したカルシウム／リンを骨に導く先導因子の同定を目的とする。

## 3. 研究の方法

### <動物>

本研究では、研究代表者らが樹立した、ジフテリア毒素(DT)投与により任意の時期に骨細胞を特異的に死滅させることができる

トランスジェニックマウス(Dmp1-HB-EGF)のを使用した。8～12週齢のTgマウスおよび野生型マウスはDT投与後9日間(投与量25～30ng/kg, 1 shot)、室温23℃の恒温の飼育室で、暗明サイクル(8:00～20:00)のもと、代謝ケージ内で実験動物用固形飼料(オリエンタル酵母)と水道水の自由摂取により飼育した。その間、毎日体重を測定し、適宜採血及び24時間蓄尿を行い血液と尿を採取した。

### <血液、尿生化学解析>

各マウスより得た血漿および尿を以下の各種キットを用いて測定した。無機リン濃度はp-メチルアミノフェノール還元法を用いたホスファ C テスト Kit (Wako, Osaka, Japan)、カルシウム濃度はメチルキシレノールブルー発色法を用いたカルシウム E テスト Kit (Wako, Osaka, Japan)、クレアチニン濃度はJaffe法を用いたクレアチニンテスト Kit (Wako, Osaka, Japan)により測定した。

### <マイクロDNAアレイ>

骨細胞死滅マウスと正常マウスの腎臓Total RNAを用いAffimetrix社のmouse DNA マイクロアレイを使用し、解析を行なった。

### <骨の形態観察>

4%パラホルムアルデヒド/0.1M PBSにより固定した各組織を0.1M PBS溶液中に入れ洗浄(4℃, over night)した。脛骨及び大腿骨は付着している筋肉を除去後、10% EDTA pH 7.5 溶液に浸し、4℃で緩やかに攪拌しながら14日間脱灰反応を行った。脱灰後、定法に従いパラフィン薄切標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色にて解析を行なった。

### <腎臓の免疫組織染色>

4%パラホルムアルデヒド/0.1M PBS で固定し、定法に従いパラフィン薄切標本を作製する。次に脱パラフィンを行い、マイクロウェーブ法により抗原を賦活化し抗原抗体反応を行なった。使用した抗体は、当研究室で作成した NaPi-IIa-C 末ペプチド抗体、及び NaPi-IIc-C 末ペプチド抗体を用いた。次に HRP 標識された二次抗体を反応させ、検出は DAB 染色で行なった。陽性反応は茶色に染色された。

#### <腎臓 BBMV によるリン輸送活性測定>

腎臓 BBMV の  $^{32}\text{P}$  輸送活性は急速膜濾過法により測定した。蛋白質量を 20  $\mu\text{g}$  に調整した腎臓 BBMV サンプルに uptake solution ( $^{32}\text{P}$  20  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes/Tris pH7.5) を加えて混ぜ、30 秒および 60 秒反応させた後、氷冷した生理食塩水を加えて反応をとめた。ニトロセルロース膜 (pore size 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC) に滴下して吸引濾過を行い、BBMV をニトロセルロース膜に吸着させた。このニトロセルロース膜をアクアゾル II (PACKARD) で溶かした後、液体シンチレーションカウンタで放射活性を測定した。

#### 4. 研究成果

ジフテリア毒素投与により骨細胞を死滅させたマウスでは、著しい骨の石灰化障害が生じ骨粗鬆症を発症させることを既に報告している。これは骨吸収促進と骨形成抑制に起因する。Tatsumi S et al, *Cell Metabolism* 5, 464-475 (2007)。骨細胞はリン代謝調節因子である、PHEX、DMP1、FGF-23 が分泌することが知られている。これらの因子の遺伝子欠損および遺伝子変異は、低リン血症、高リン血症を発症することが知られている。

今回、骨細胞死滅マウスを作製して解析し

た結果、FGF-23、PHEX、MEPE、DMP1 mRNA は著しく減少しており、また血清 FGF-23 濃度は正常マウスと比して約 40%に低下している事が分かった。

一方、血中リン・カルシウム濃度は正常マウスと有意な差は認められなかった。

また、尿中カルシウム排泄も正常であった。しかしながら、尿中リン排泄は著しく上昇し、リン再吸収の阻害が認められた。そこで、腎臓においてリン再吸収を担う NaPi-IIa、

NaPi-IIc の発現検討およびナトリウム依存性リン輸送活性の測定を行なった。

腎臓のパラフィン薄切切片を用いて免疫化学染色を行った結果、骨細胞死滅マウスにおいて NaPi-IIa、NaPi-IIc の膜局在量が著しく減少していた。また、腎臓 BBMV を用いた Western Blot 解析においても同様に NaPi-IIa、NaPi-IIc の蛋白質量の減少がみられた。さらに、ナトリウム依存性リン輸送活性を測定した結果、骨細胞死滅マウスにおいて、腎臓 BBMV でのリンの取り込み量が有意に減少していた。また、NaPi-IIa、NaPi-IIc mRNA 発現も低下していた。これらの結果より、骨細胞死滅マウスでは NaPi-IIa、NaPi-IIc の合成阻害、および分解が促進していることが示された。

また、骨から遊離したカルシウムは尿中カルシウム排泄量、血中カルシウム濃度が正常であったため、骨以外の組織へ蓄積している可能性が示唆される。今後、異所性石灰化を呈していないかどうかを検討する必要がある。これらの結果より、骨細胞死滅マウスではカルシウム・リンを骨へ先導する機能が損失している可能性が示唆された。次に、骨の遺伝子発現の変動を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。結果として、正常骨細胞マウスとはことなるクラスターを示した。変動があった遺伝子機能の未知なものを

含め7個に絞り込んだ。ただしこれらの遺伝子には、既存のリン代謝調節因子である、FGF-23、MEPE、DMP 1、PHEX は含まれない。この中で、リン再吸収を抑制する可能性のある遺伝子を腎臓培養細胞系を利用して輸送活性の阻害、およびリン酸トランスポーター発現量を減少させる遺伝子の同定を現在進めている。

本研究より骨細胞は骨に先導的にリン/カルシウムを蓄積させる働きがあることが明らかとなった。またこれらの先導因子の解析を進める事で、腎不全時においても骨へ、リンカルシウムを蓄積させ異所性石灰化を抑止する基盤研究となりうると考える。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

1) 宮本賢一, 山口誠一, 辰巳佐和子, 木戸慎介, 瀬川博子. フォスファトニンとリン, 200-202, 腎と透析, Vol.69No.2 (2010) 査読無

2) 辰巳佐和子, 菊井聡子, 花房悦世, 木戸慎介, 宮本賢一. リン代謝と腸管, 腎と骨代謝 Vol.23No.2 99-104. (2010) 査読無

3) Ito M, Sakurai A, Hayashi K, Ohi A, Kangawa N, Nishiyama T, Sugino S, Uehata Y, Kamahara A, Sakata M, Tatsumi S, Kuwahata M, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto KI. An apical expression signal of the renal type IIc Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporter in renal epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol. Jul;299(1):F243-54 (2010). 査読有

4) Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K, Kaneko I, Tominaga R, Hanabusa E, Aranami F, Furutani J, Kuwahara S, Tatsumi S, Matsumoto M, Ito M, Miyamoto KI. Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. Am J Physiol Renal Physiol. 298(6):F1341-50 (2010) 査読有

5) Aranami F, Segawa H, Furutani J, Kuwahara S, Tominaga R, Hanabusa E, Tatsumi S, Kido S, Ito M, Miyamoto K.

Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium. J Med Invest. 57(1-2):95-108 (2010). 査読有

6) 宮本賢一, 瀬川博子, 伊藤美紀子, 辰巳佐和子, 竹谷豊 (2009) リントランスポーターと疾患. 遺伝子医学 MOOK12 創薬研究者必見! 最新トランスポーター研究 2009 243-260 (2009) 査読無

7) Tatsumi S, Ito M, Asaba Y et al. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents *Endocrinology*. 149, 634-641(2008) 査読有

8) 宮本賢一, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 瀬川博子 FGF23/klotho シグナルによるリン代謝調節, Annual Review 腎臓 2008, 43-49 (2008) 査読無

9) 宮本賢一, 瀬川博子, 辰巳佐和子 (カルシウム・リン代謝の基本と最近の話題, medicina, 45(3), 413-416 (2008) 査読無

10) 辰巳佐和子, 瀬川博子, 伊藤美紀子, 宮本賢一 骨細胞とリン代謝. 腎と骨代謝, 21(3), 211-217 (2008) 査読無

11) 伊藤美紀子, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一 ナトリウム依存性リン輸送体の構造と機能調節. THE BONE 22(6)713-717 (2008) 査読無

〔学会発表〕(計18件)

<国際学会>

1) Sawako Tatsumi, Seiichi Yamaguchi, Tatsuya Kamatani, Yuji Shiozaki, Kengo Nomura, Yukiko Saito, Shinsuke Kido, Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto Phosphate Homeostasis in Osteocyte-Ablated Mice. ASN. Colorado Convention Center Denver, CO. 11/16-21(18) (2010).

2) Takashi Nishiyama, Mikiko Ito, Akiko Ohi, Sakiko Sugino, Ishiro Kaneko, Masae Sakata, Akihiro Kamahara, Shinsuke Kido, Sawako Tatsumi, Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto, klotho Modulates the Activity of Type IIc Na<sup>+</sup>-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-11c) in Renal Epithelial Cells. The American Society of Nephrology (ASN) San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA10/27-11/1(30) (2009) .

3) Etsuyo Hanabusa, Otoyua Ueda, Hiroko Segawa, Ichiro Kaneko, Shoji Kuwahata, Sawako Tatsumi, Shuichi Ohtomo, Naoshi Horiba, Takanori Tachibe, Naoko Wada, Yousuke Kawase, Kou-ichi Jishage, Naoshi Fukushima, Kenichi Miyamoto. Characterization of Phosphate Metabolism in the NaPi-11b Hetero Knockout Mice. The American Society of Nephrology (ASN) San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA 10/27 -11/1(30) (2009) .

4) Sawako Tatsumi, Yukako Fukushima, Satoko Shimamura, Mikiko Ito, Hiroko Segawa, Kenichi Miyamoto. 「1.25 (OH) 2Vitamin D3 Modulates The Expression of the Humman TypeIIC Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter(NaPi-IIC) Gene in Renal Osteoblast Cells」(ASN)11/4-9. (8) (2008) .

5) Mikiko Ito, Aya Sakurai, Akiko Ohi, Keiji Hayashi, Takashi Nishiyama, Natsumi Kangawa, Sakiko Sugino, Sawako Tatsumi, Hiroko Segawa, Kenichi Miyamoto. 「Mutation of Type IIC Na<sup>+</sup>- Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-IIC) and Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hyper calci uria (HHRH)」 The American Society of Nephrology(ASN), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia Pennsylvania.11/4-9(7) (2008).

<国内学会>

1) 坂田雅映, 木戸慎介, 橋本由衣, 辰巳佐和子, 瀬川博子, 松本俊夫, 宮本賢一 (2011) FGF23/Klotho を介した新たな腎尿細管リン・カルシウム代謝調節機構の解明. 第14回日本病態栄養学会年次学術集会. 1/15-16. (16)横浜

2) 宮本賢一, 花房悦世, 辰巳佐和子, 木戸慎介, 瀬川博子 (2010) 腸管とリン代謝. 第28回日本骨代謝学会学術集会. 7/21~23. 東京.

3) 野村憲吾, 辰巳佐和子, 菊井聡子, 斎藤友紀子, 塩崎雄治, 山口誠一, 木戸慎介, 宮本賢一 (2010) 新規リン利尿因子の探索. 第64回日本栄養・食糧学会大会. 5/21-23 (22) . 徳島.

4) 斎藤友紀子, 辰巳佐和子, 野村憲吾, 菊井聡子, 山口誠一, 塩崎雄治, 金子一郎, 瀬川博子, 木戸慎介, 宮本賢一 (2010) リン酸輸送担体遺伝子欠損マウスの病態解析. 第

64回日本栄養・食糧学会大会. 5/21-23 (22) 徳島.

5) 大井 彰子, 西山 俊, 伊藤 美紀子, 杉野 紗貴子, 木戸 慎介, 辰巳 佐和子, 瀬川 博子, 宮本 賢一 (2010) 寿命調節因子 Klotho によるリン代謝調節調節, 第13回日本病態栄養学会年次学術集会. 1/9-10. 京都.

6) 菊井 聡子, 辰巳 佐和子, 野村 憲吾, 斎藤 友紀子, 塩崎 雄治, 山口 誠一, 木戸 慎介, 宮本 賢一 (2010) シナカルセト塩酸塩によるリン管理, 第13回日本病態栄養学会年次学術集会. 1/9-10. 京都.

7) 斎藤友紀子, 辰巳佐和子, 野村憲吾, 菊井聡子, 山口誠一, 塩崎雄治, 木戸慎介, 金子一郎, 瀬川博子, 宮本賢一 (2009) CLCA6(Chloride channel calcium activated 10)のリン代謝への関与, 第42回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会. 11/7-11/8. 鳥取.

8) 宮本賢一, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 金子一郎 (2009) リン代謝調節解明の進歩, 第54回(社)日本透析医学会学術集会・総会. 6/5-7 (7) 横浜.

9) 辰巳佐和子, 八杉昌憲, 野村憲吾, 宮本賢一 (2009) 肝臓切除後の低リン血症を誘導するリン利尿因子の探索, 第52回日本腎臓学会学術総会. 6/3-5 (3) 横浜.

10) 野村憲吾, 辰巳佐和子, 八杉昌憲, 菊井聡子, 斎藤友紀子, 木戸慎介, 伊藤美紀子, 宮本賢一 (2009) 肝臓切除による低リン血症発症メカニズムの解明, 第63回日本栄養・食糧学会大会. 5/20-22 (22) 長崎.

11) 西山俊, 伊藤美紀子, 大井彰子, 杉野紗貴子, 坂田雅映, 蒲原彰宏, 木戸慎介, 辰巳佐和子, 瀬川博子, 宮本賢一 (2009) 老化関連因子 klotho によるリン代謝調節機構の解明, 第63回日本栄養・食糧学会大会. 5/20-22 (22) 長崎.

12) 福島有佳子, 辰巳佐和子, 島村仁子, 山本浩範, 伊藤美紀子, 瀬川博子, 宮本賢一 (2008) 腎臓と骨を結ぶリン代謝系の探索: NaPi-IIC の遺伝子制御機構の解明. 第62回日本栄養・食糧学会. 5/4. 東京.

13) 辰巳佐和子, 伊藤昌子, 宮本賢一, 池田恭治 (2008) 長寿命のカロリー制限食は、骨に良いのか悪いのか?. 第62回日本栄養・食糧学会. 5/3. 東京.

〔図書〕（計3件）

1) 桑原頌治, 西山俊, 大井彰子, 金子一郎, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 竹谷豊, 宮本賢一  
リン酸トランスポーター関連分子群とリン代謝異常症, トランスレショナルリサーチを支援する遺伝子医学 MOOK<sup>®</sup>トランスポートソーム生体膜輸送機構の全体像に迫るー基礎, 臨床, 創訳応用研究の最新成果ー244-248 (2011. 3. 31) (メディカルドゥ社)

2) 宮本賢一, 竹谷豊, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 瀬川博子, 無機リン酸イオンとトランスポーター, トランスポートソームの世界ー膜輸送研究の源流から未来へー P230-239 (2011. 3) (京都廣川書店)

3) 木戸 慎介, 辰巳 佐和子, 宮本 賢一  
リンバランスとその調節機構, CKD-MBD ハンドブック, 25-30. (2009) (日本メディカルセンター)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辰巳 佐和子 (TATSUMI SAWAKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号: 80420545

### (2) 研究分担者

宮本 賢一 (MIYAMOTO, KEN-ICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 70174208

### (3) 連携研究者

なし