

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300273

研究課題名(和文)高リン食投与ラットモデルを用いた主要臓器におけるリン恒常性調節機構解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of phosphorus homeostasis in major organ using high-phosphorus diet administrated rat model and its application

研究代表者

中井 雄治 (Nakai, Yuji)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授(移行)

研究者番号：10321788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを通常食(C群)および高リン食(HP群)で24日間飼育した後、腎臓・肝臓・白色脂肪組織(WAT)を摘出し、RNAを抽出してDNAマイクロアレイ解析を行なった。その結果、両群の遺伝子発現プロファイルは大きく異なり、腎臓ではHP群においてナトリウム依存性リン酸共輸送体であるNaPi-IIbが顕著に発現上昇していた。肝臓では、HP群において脂肪酸酸化の亢進、アミノ酸異化の抑制が認められた。WATについては、肝臓同様、HP群での脂肪酸酸化の亢進が認められた。以上の結果は、高リン食摂取がリン恒常性に影響するだけでなく、様々な代謝パスウェイの変化を引き起こすことを示している。

研究成果の概要(英文)：Ten male Wistar rats were divided into two groups and fed a diet containing 0.3% (C) or 1.2% (HP) phosphorous for 24 days. DNA microarray analyses were performed using kidney, liver and white adipose tissue (WAT) of these animals. A hierarchical clustering analysis revealed that gene expression profiles of the two groups are different from each other. Among the genes that were differentially expressed between the two groups, there was significant upregulation of type IIb sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIb) in the kidney of HP rats. As for the liver, upregulation of fatty acid beta-oxidation and downregulation of amino acid catabolic process by HP diet administration were observed. Upregulation of genes related to fatty acid beta-oxidation was also observed in the WAT of HP rat. Thus, our results indicate that administration of high phosphorus diet induced not only regulation of phosphate homeostasis but also changes in various metabolic pathways.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：高リン食 DNAマイクロアレイ ラット 腎臓 肝臓 白色脂肪組織 NaPi-IIb

1. 研究開始当初の背景

リンは、生体内でカルシウムに次いで2番目に多く含まれるミネラルであり、骨などを形成するのに必須である。ほぼ全ての食品に含まれているため、欠乏症状がでることはほとんどない。一方で、近年、インスタント食品や清涼飲料水などによるリンの過剰摂取が問題となっている。過剰摂取による症状としては骨成長不良や副甲状腺機能の異常亢進などが知られている。しかしながら、リン過剰摂取時の生体応答については、遺伝子発現レベルでの解析は腎臓におけるオステオポンチンの発現上昇、ナトリウム依存性リン酸共輸送体 (Npt / NaPi) IIaの発現低下、大腿骨におけるreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)の発現上昇など数例の報告があるのみであり、網羅的解析についてはほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、高リン食を摂取した時に生体ではどのようなことが起こっているかを解明することを目的とした。具体的には、腎臓、肝臓、白色脂肪組織 (WAT) において長期間の高リン食摂取により発現変動する遺伝子を明らかにし、高リン食摂取によって主要な臓器でどのようなことが起こっているのかについて解明を目指した。さらに、高リン状態を早期に反映する血中バイオマーカーを探索し、過剰摂取状態の早期診断への応用を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

4週齢のWistar系雄性ラット10匹を7日間の予備飼育後、平均体重がほぼ等しくなるように2群 (各群n = 5) に分けた。1つの群はAIN93G食 (リン含量として0.3%) 摂取群 (C群) もう1つの群は高リン食 (リン

含量1.2%) 摂取群 (HP群) として、代謝ケージで24日間飼育した。飼料の組成は表1に示した。体重、摂餌量を測定するとともに、尿および糞を採取し、リンの出納試験を行った。糞は湿式灰化を行うことでミネラルを抽出し、尿はそのまま希釈し、サンプルとして用いた。リン定量はホスファC-テストワコーを用いて行った。飼育終了後、ペントバルビタール麻酔下で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、およびWATを採取した。腎臓については、右腎はリンおよびカルシウムの測定、左腎はDNAマイクロアレイ解析に供した。腎臓中のミネラルの測定は、糞同様湿式灰化を行った後、リンは糞と同様に、カルシウムはICP発光分光法で行った。動物実験は、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認のもと、東京大学動物実験実施規則に従って行った。

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	357.936
Maltodextrin 10	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	70	70
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
Mineral Mix S10022G	35	35
Vitamin Mix V10037	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
KH ₂ PO ₄	0.0	39.55
Total	1000	1000

(2) マイクロアレイ解析

凍結保存しておいた組織よりTRIzol (Invitrogen)にてtotal RNAを抽出し、RNeasy mini kit (QIAGEN)にてtotal RNAを精製した。得られたtotal RNAをもとに、Affymetrix社の3' IVT Express Kitを用いてターゲットの調製を行った。

GeneChip Rat Genome 230 2.0 Arrayにハイブリダイズを行い、Hybridization, Wash and Stain Kitにて染色・洗浄後、スキャンしてDNAマイクロアレイデータを取得した。DNAマイクロアレイ解析に供した検体は、腎臓中のリン含量を基に平均に近い14個体を選抜した。スキャンして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」(フリーソフトウェア)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。データはDistribution free weighted method (DFW)アルゴリズムで正規化を行った後、サンプル間の階層的クラスタリングを行った。C群とHP群で発現に差がある遺伝子の選抜は、DFWと相性がよいとされているRank products法で行った。次に、HP群で有意に発現上昇あるいは発現低下する遺伝子群において、どのような機能を持った遺伝子が多く濃縮されているかについて、DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)のgene-annotation enrichment analysisによって、Gene Ontology (GO)に基づいて解析した。

4. 研究成果

(1) 体重・摂餌量・摂水量およびリン出納試験

24日間の1.2%高リン食投与実験では、C群とHP群の間に、体重・摂餌量・摂水量いずれも有意差は認められなかった。一方、当然のことながら、摂餌量から計算されたリン摂取量はHP群で有意に高かった。また、解剖直前3日間の糞と尿を採取し、リンの出納試験を行った。その結果、リンの吸収量、尿排泄ともにHP群で有意に高い値を示した。しかし、吸収量から尿排泄を差し引い

たリンの体内保留量については、HP群でわずかに高い値を示したものの、有意な差としては認められなかった。腎臓中のリンおよびカルシウム含量はHP群で有意に高かった(図1)。

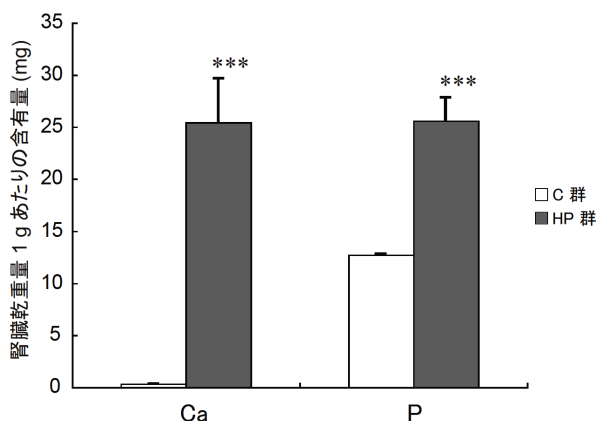


図1 腎臓中のカルシウム (Ca) およびリン (P) 含量

(2) 腎臓のDNAマイクロアレイ解析

まず、リンを排泄する臓器であり、高リン食の影響を強く受けると予想される臓器である腎臓のDNAマイクロアレイ解析を行った。階層的クラスタ解析によって全体の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、C群とHP群がそれぞれ明確なクラスタを形成し、両群の遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかとなった(図2)。このことから、腎臓は予想通り高リン食の影響を強く受けていたと考えられた。

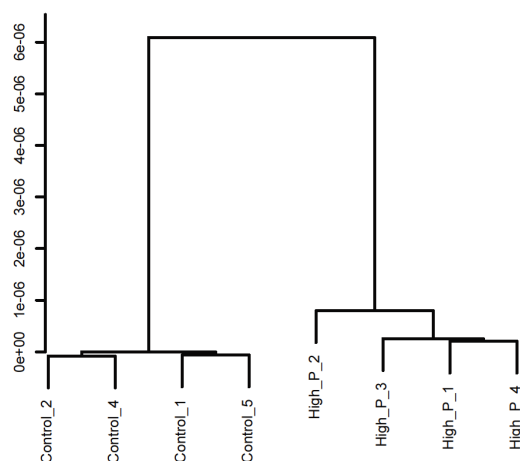


図2 ラット腎臓のマイクロアレイデータの階層的クラスタリング

そこで、二群間で発現に差がある遺伝子の抽出を行った。その結果、HP群で発現の高い/低い遺伝子がそれぞれ838 / 536遺伝子抽出された。これら発現変動遺伝子中に、どのような機能を持った遺伝子が多く濃縮されているか、WebツールDAVIDを用いてgene-annotation enrichment analysisを行った。その結果、HP群で腎石灰化に関わる遺伝子群、免疫・炎症関連遺伝子の有意な発現上昇が認められた。また、既存の知見通りリンの再吸収に関わると考えられているナトリウム依存性リン酸共輸送体であるNaPi-IIaおよびIIcをコードするmRNAの有意な発現低下が認められた。一方、興味深いことに、これまで小腸でリンの吸収に寄与すると考えられており、腎臓での役割がほとんどわかっていなかったNaPi-IIbをコードするmRNAの、高リン食摂取による顕著な発現上昇が認められた。そこで、マイクロアレイ解析と同様の飼育を行ったラットの腎臓を用いて、抗NaPi-IIb抗体を用いた腎組織切片の免疫組織染色を行った（図3）。

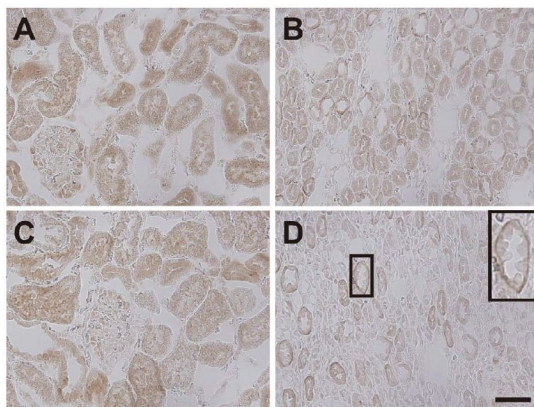


図3 ラット腎臓切片における抗NaPi-IIb抗体による免疫組織学染色

A: C群皮質、B: C群髄質、C: HP群皮質、D: HP群髄質。濃い茶色がNaPi-IIbタンパク質のシグナルを示す。HP群の集合管あるいはヘンレループ上皮細胞の基底膜側にシグナルが認められた。

その結果、HP群ラット腎臓の集合管またはヘンレループ上皮細胞の基底膜側にNaPi-IIbが顕著に発現することがわかった。このことから、NaPi-IIbはこれまで見つかっていなかった、リンを積極的に排泄するための輸送体である可能性が考えられた。

（3）肝臓のDNAマイクロアレイ解析

肝臓のマイクロアレイ解析を行い、腎臓の場合と同様にgene-annotation enrichment analysisを行った。その結果、HP群におけるアミノ酸異化関連遺伝子の発現低下が認められた。このことから、高リン食摂取によるアミノ酸のエネルギーとしての利用の低下が考えられた。さらに、HP群において脂肪酸生合成及びコレステロール生合成関連遺伝子の発現低下、脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現上昇が認められた。これら脂質代謝関連遺伝子の上流で発現を制御する因子の探索を行ったところ、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体- α (PPAR α)の活性化が予測された。PPAR α の制御下にある遺伝子の中で、HP群で発現が高かった遺伝子群の4位にという上位に位置する遺伝子である繊維芽細胞増殖因子21 (FGF21)に着目した。FGF21は肝臓で産生され、血中に分泌されてホルモンとして脂肪組織等に作用し、脂肪分解を誘導する。そこで、ラット血清中のFGF21のELISAによる測定を行った結果、HP群で上昇傾向 ($p = 0.054$) が認められた。従って、高リン食摂取のマーカーとしてFGF21が利用できる可能性が示された。

（4）WATのDNAマイクロアレイ解析

FGF21の主要な標的臓器がWATであることから、WATでもDNAマイクロアレイ解析を同様に行った。その結果、HP群において組織形成関連遺伝子、免疫・炎症関連遺伝子の発現低下、脂質代謝関連遺伝子、と

くに脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、WATに蓄積されたトリグリセリドから脂肪酸を遊離させるリパーゼ遺伝子の発現上昇も認められ、高リン食摂取によって脂肪分解が亢進していることが予想された。免疫・炎症関連遺伝子の中では、プロスタグランジン合成、ロイコトリエン合成に関わる遺伝子のHP群における発現低下が認められた。

(5) まとめ

高リン食摂取による影響を、DNAマイクロアレイを用いて解析した結果、これまで見つかっていなかった変化(腎臓におけるNaPi-IIb mRNAおよびタンパク質の発現上昇、肝臓におけるFGF21タンパク質の発現上昇など)を発見することができた。また、高リン食摂取によって、リンの恒常性に関わる遺伝子のみならず、これまで関連性がほとんど指摘されていなかったエネルギー代謝に関わる遺伝子をはじめとする様々なパスウェイに関わる遺伝子が発現変動することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- (1) Suyama, T., Okada, S., Ishijima, T., Iida, K., Abe, K., and Nakai, Y. “High Phosphorus Diet-Induced Changes in NaPi-IIb Phosphate Transporter Expression in the Rat Kidney: DNA Microarray Analysis” PLoS ONE 7: e29483 (2012)
- (2) Kamei, A., Watanabe, Y., Kondo, K., Okada, S., Shinozaki, F., Ishijima, T., Nakai, Y., Kondo, T., Arai, S., and Abe, K.

“Influence of a Short-Term Iron-Deficient Diet on Hepatic Gene Expression Profiles in Rats” PLoS ONE 8: e65732 (2013)

[学会発表](計10件)

- (1)2011年9月30日、ILSI Japan 30周年記念第6回「栄養とエイジング」国際会議(招待講演)、「The Novel Mechanism of Phosphorus Homeostasis – A DNA Microarray Analysis in High-Phosphorus Diet Administrated Rat Kidney」, 中井雄治、東京大学弥生講堂(東京都)
- (2)2011年12月27日、金沢大学薬学シンポジウム2011(招待講演)、「生命現象の網羅的解析: 遺伝子発現のDNAマイクロアレイ解析」, 中井雄治、金沢大学角間キャンパス(金沢)
- (3)2012年3月25日、日本農芸化学会2012年度大会、「高リン食摂取ラット腎臓の遺伝子発現に対するホエイタンパク質の影響」, 林ちひろ、石島 智子、阿部 啓子、中井雄治、京都女子大学(京都)
- (4) 2012年3月25日、日本農芸化学会2012年度大会、「高リン食摂取がラット肝臓に及ぼす影響のDNAマイクロアレイによる解析」, 千 善宇、石島 智子、陶山 達也、阿部 啓子、中井雄治、京都女子大学(京都)
- (5)2012年6月5日、東京大学「機能性食品ゲノミクス」II期成果報告シンポジウム “食と健康” をめざす統合食品科学のニューフロンティア、「高リン食摂取が遺伝子発現に及ぼす影響」, 中井雄治、東京大学弥生講堂(東京)

(6)2012年10月16日、The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health (招待講演)「Current status and case studies in nutrigenomics」, 中井雄治、朱鷺メッセ(新潟)

(7)2012年12月6日、第3回「食」による生活習慣病予防医学の展開(招待講演)「ニュートリゲノミクス研究の最適化」, 中井雄治、KKR ホテル金沢(金沢)

(8)2013年2月22日、第3回健康科学推進フォーラム(招待講演)「食に対するからだの応答を探る～ニュートリゲノミクス」, 中井雄治、神戸大学梅田インテリジェントラボラトリ(大阪)

(9)2013年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会、「高リン食摂取がラット肝臓及び白色脂肪組織に及ぼす影響:DNAマイクロアレイによる解析」, 千 善宇、石島 智子、陶山 達也、阿部 啓子、中井雄治、東北大学(仙台)

(10)2013年6月15日、第44回農学部公開セミナー 健康を支える食の科学(招待講演)「食に対するからだの応答を遺伝子から探る～ニュートリゲノミクス入門」, 中井雄治、東京大学弥生講堂(東京)

〔図書〕(計 1件)

(1)ニュートリゲノミクスを基盤としたバイオマーカーの開発 -未病診断とテーラーメイド食品開発に向けて- (2013年) 大澤俊彦、合田敏尚監修、第3編第2章「リン」pp81-87、中井雄治、株式会社シーエムシー出版(東京)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中井 雄治 (Nakai, Yuji)

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号: 10321788

(2)研究分担者

石島 智子 (Ishijima, Tomoko)

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号: 80568270

(3)連携研究者

なし

()

研究者番号: