

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591218

研究課題名(和文)慢性腎臓病における全身性NADワールドの解明

研究課題名(英文)The systemic NAD world in chronic kidney disease

研究代表者

辰巳 佐和子(TATSUMI, Sawako)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80420545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はNAD合成関連酵素(Nampt)を介した新たなリン代謝経路の存在を明らかにするものである。Namptの活性化は尿中リン排泄の亢進、腸管リン吸収抑制作用を示すことを明らかとした。また、肝臓切除を伴う低リン血症発症の原因がNampt/nicotinamide経路の活性化によることを明らかにした。これらの成果はリン代謝において肝臓-腎臓連関の存在を提示するものである。今後Namptを介したリン/カルシウム比を一定にする機序をさらに検討することは、慢性腎臓病患者の心血管疾患予防に貢献出来ると考える。

研究成果の概要(英文)：This study determines the presence of the new phosphate(Pi)metabolic pathway through the nicotinamide phosphoribosyltransferase(Nampt)as the first rate-limiting enzyme in converting NAM to NAD.The activation of Nampt caused the significantly increased levels of urinary Pi excretion and the decreased levels of intestinal Pi absorption.The present data suggest that the cause of hypophosphatemia and hyperphosphaturia observed after 70% hepatectomy is caused by abnormal Nampt/NAM activation in the liver and kidney.

These result shows presence of the liver-kidney axis in Pi metabolism.

We examine a mechanism to do constantly the Pi/Ca ratio through Nampt.We think these research may be contribute to the prevention of cardiovascular disease development of patients with chronic renal disease.

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 ニコチンアミド NAD 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) 患者数、透析導入数の増加にともない CKD への取り組みが、世界的に注目されている。老化に伴い通常腎機能は低下することから、近年の急速な高齢化社会での CKD の予防、進行の防御は急務であり、FGF23、血中リン濃度にかわる早期慢性腎臓病のマーカの探索は必須である。慢性腎臓病は腎臓の廃絶を引き起こすのみならず合併症として、ミネラル代謝異常 (高リン血症)、二次性副甲状腺機能亢進症、腎性骨症および異所性石灰化を発症することが知られている。リンは、各組織や血中、またその細胞内小器官に至るまで、厳密にコントロールされている。リン・カルシウム比は一定になるように調節を受けているが、腎臓が廃絶されると、腸管から吸収されたリンは、骨に移行できず、血中リン濃度の上昇を受けて、高リン血症を発症させるだけではなく、血管や軟組織に蓄積し、異所性石灰化の原因となる。しかしながら、細胞内のリン・カルシウム比を一定にするメカニズム解明研究はほとんどなされておらず、不明のままであった。

2. 研究の目的

CKD は高リン血症から、副甲状腺機能亢進症、腎性骨症、異所性石灰化などの合併症が惹起され、生命予後を悪化させる。全身性の代謝、老化制御機構として「NAD ワールド」と名付けられた新たな概念は、NAD が各臓器、組織における様々な代謝のペースメーカーであることを示す。さらに全身性 NAD 合成関連酵素 (Namp1) は NAD 合成系を制御し、老化関連遺伝子で Sirt1 の脱アセチル化活性を調節する。申請者は肝臓、腸管由来のリン調節因子が、Namp1 を制御し各種臓器、血管でのリン / カルシウム比を一定にすると機序を担うと仮説を立てた。本機構を明らかにすることは、CKD 患者の新たなリン恒常性維持、異所性石灰化の予防、老化促進防御の基盤研究となることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

これまでの骨細胞欠損マウスの研究で、申請者は腸管、肝臓由来のリン調節因子の存在を明らかにしてきた。これらの因子の作用が全身性 NAD 合成酵素である Namp1 を介して血中リン濃度を制御する機構を有するという仮

説を明らかにするために以下の方法に従って研究を進めた。

(1) 骨細胞死滅マウスにおけるリン代謝異常の解析

申請者が開発した、任意の時期に誘導的に骨細胞のみを死滅させることのできるトランスジェニックマウス (Tg) を用いる。Tg はジフテリア毒素投与後 48 時間以内に約 80% の骨細胞を死滅させることが出来る。骨細胞を死滅後、血清、尿生化学データを解析する。本マウスの血中および腎臓内 NAD 量を測定、および Namp1 発現変動を定量 PCR 法、western blotting 法を用いて検討する。

(2) 肝臓切除モデルラット、およびマウスを用いたリン代謝の解析

申請者はこれまでのラットを用いた肝臓切除実験の結果より、術後速やかに低リン血症の発症することを見つけている。また、門脈内とリン注入により、速やかに著しいリン排泄促進が認められることも見いだしている。肝臓切除モデル動物を作成し解析を行なった。肝臓切除は定法にしたがい 70% 切除する。血液、尿生化学検査によりリン代謝変動を検討する。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：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：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)、クレアチニン濃度：酵素法を用いた L タイプワコー CRE-M (Wako)、BUN：尿素窒素 B-テストワコー (Wako)、グルコース：グルコース C テストワコー (Wako)、FGF23：FGF-23 ELISA Kit (KAINO LABORATORIES, INC, Tokyo, Japan)、PTH: Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Immutopics, California, USA)、1,25(OH)2D3: 1,25(OH)2 Vitamin D3 ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany)、Namp1 (Visfatin/PBEF mouse/rat) Dual ELISA Kit (Adipogen Corporation, San Diego, USA)。血中 pH、K⁺、Na⁺、iCa²⁺ は血液ガス分析装置ラピッドラボ 248/348 (SIMENSE Japan Tokyo, Japan) を用いて測定した。

リン利尿調節因子の候補としての Namp1 の生理作用を検討する。本肝臓切除モデルラットにおいて腎臓および腸管 Namp1 mRNA およびタンパク発現量を定量 PCR および、western

blotting 法を用いて解析する。さらに、ニコチンアミド関連代謝産物の解析を行なった。

(3) Nampt 遺伝子改変マウスの解析

Nampt KO マウスは耐性致死であるために Nampt hetero マウスの分与を受け、安定的に繁殖し実験に使用した。導入してリン代謝を詳細に解析する。2)で既に記載した方法を用いる。

4. 研究成果

(1) 骨細胞欠損マウスのリンおよびニコチンアミド代謝解析

骨細胞を 50%以上死滅させたマウスでは著しい尿中リン排泄亢進を認めた。この時、既存のリン排泄促進作用をもつ FGF23、PTH の血中濃度に変動は認められなかった。既存のリン調節システムとは異なる尿中リン排泄亢進システムの存在を明らかにした。この時腎臓内 NAD 量の上昇を認めた。さらに Nampt mRNA 発現が上昇した。

(2) 肝臓切除ラット動物におけるリン代謝動態変動の解析

肝臓切除ラット動物において、著しい尿中リン排泄促進作用を認めた。さらに血中リン濃度の低下を見いだした。さらに肝臓切除ラットの腎臓を用いてマイクロ DNA アレイ解析をおこなったところ、腎臓内 NAD 代謝関連遺伝子のまとまった変動を見いだした。実際、腎臓 Nampt mRNA、タンパク質発現の増加を確認した。そこで腎臓内 NAD を測定したところ、肝臓切除群では有意に上昇していた。

(3) 細胞外型 Nampt (eNampt) によるリン再吸収抑制作用の検討

肝臓や脂肪組織より Nampt は分泌されることが知られている。そこで、細胞外型 Nampt である eNampt にリン再吸収抑制作用があるか否かを検討した。Naked DNA 法を用いて肝臓での Nampt 発現を増加させた。その後、血中に分泌される eNampt の作用を検討した。血中 eNampt の上昇は認められたが、尿中リン排泄促進作用は認められなかった。腎臓培養細胞に Nampt を過剰発現させその培養上清中に分泌された Nampt がリン再吸収を担う NaPi-11a の発現抑制を持つか否かを検討し

た。結果 NaPi-11a のタンパク発現には変動がみられず、さらにリン輸送活性にも違いが認められなかった。このことから、eNampt はリン排泄促進因子ではないことが明らかとなった。

(4) Nampt/Nicotinamide 経路による 2 型リン酸トランスポーター (NaPi-II) 発現抑制 Nampt の活性化が、腸管リン吸収阻害、腎臓での尿中リン排泄促進を誘導する可能性が明らかとなった。そこで、リン吸収阻害、リン排泄亢進の機序について検討した。Nampt が腸管、腎臓で活性化すると、各々の組織に発現する 2 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター (NaPi-11a, NaPi-11b, NaPi-11c) の膜発現量が著しく減少する。さらに腎臓培養細胞で Nampt のリン代謝へ効果を検討したところ、同様の結果を得た。また、この効果は Nampt から合成される NAD やその中間体である NMN には依存しないことも明らかとなった。よって今回の我々の結果から、腸管からのリン吸収阻害および腎臓での尿中リン排泄促進作用は組織内 NAD 量に依存するのではなく、Nampt 酵素活性に依存することを見いだした。

(5) Nampt 酵素活性の特異的阻害剤である FK866 を用いた リン代謝変動

既に述べた、Nampt/Nicotinamide 経路の活性化が 2 型リン酸トランスポーターの発現を抑制するの否かを Nampt 酵素活性の特異的阻害剤である FK866 を用いてその効果が完全に阻害されるかを検討した。FK866 は完全に Nampt/Nicotinamide 経路によるリン代謝変動を抑制し、逆に著しいリン再吸収、リン吸収促進効果を認めた。

(1)-(5)の本成果は、リン代謝において腎臓-肝臓の臓器連関を示すものであり、全身性ニコチンアミド/Nampt 経路の活性化は生体内のリン恒常性維持の新たな経路であることを明らかとした。本機構の異常な活性化が、これまで不明であった肝臓切除患者の予後を悪化させる低リン血症の原因となることを明らかとした。これらの結果をまとめて論文発表をした。(Nomura K, Tatsumi S et al. J Am Soc Nephrol. vol.25, No.4. 761-772.2014.) 本研究成果は、腎機能低下

モデルにおいてリン吸収を抑制するための創薬に応用できる可能性を示唆した。

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 10 件)

Kido S, Fujihara M, Nomura K, Sasaki S, Mukai R, Ohnishi R, Kaneko I, Segawa H, Tatsumi S, Izumi H, Kohno K, Miyamoto KI. Molecular Mechanisms of Cadmium-Induced Fibroblast growth Factor 23 Upregulation in Osteoblast-Like Cells. Toxicol Sci. Jun;139(2):301-316. 2014. 査読有. DOI: 10.1093/toxsci/kfu043.

Nomura K, Tatsumi S, Miyagawa A, Shiozaki Y, Sasaki S, Kaneko I, Ito M, Kido S, Segawa H, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K, Miyamoto KI. Hepatectomy-Related Hypophosphatemia: A Novel Phosphaturic Factor in the Liver-Kidney Axis. J Am Soc Nephrol. vol.25, No.4. 761-772. 2014. 査読有. DOI: 10.1681/ASN.2013060569

Tatsumi S, Fujii O, Miyagawa A, Miyamoto K. Sodium-dependent inorganic phosphate transporters and biomineralization. Clin Calcium. Feb;24(2):249-255. 2014. 査読無. DOI: 10.1007/s12010-013-0255-5.

Ohnishi R, Segawa H, Ohmoto T, Sasaki S, Hanazaki A, Mori A, Ikuta K, Furutani J, Kawakami E, Tatsumi S, Hamada Y, Miyamoto K. Effect of dietary components on renal inorganic phosphate (Pi) excretion induced by a Pi-depleted diet. J Med Invest. 61(1.2):162-170. 2014. 査読有. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jmi/61/0/_contents

Kido S, Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. Vitamin D and type II sodium-dependent phosphate cotransporters. Contrib Nephrol. 180:86-97. 2013. 査読有. DOI: 10.1159/000346786

Kido S, Fujihara M, Nomura K, Sasaki S, Shiozaki Y, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium. Nihon Eiseigaku Zasshi 67(4):464-471. 2012. 査読無.

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjh/67/4/_contents

Kuwahara S, Aranami F, Segawa H, Onitsuka A, Honda N, Tominaga R, Hanabusa E, Kaneko I, Yamanaka S, Sasaki S, Ohi A, Nomura K, Tatsumi S, Kido S, Ito M, Miyamoto K. Identification and functional analysis of a splice variant of mouse sodium-dependent phosphate transporter Npt2c. J Med Invest. 59(1.2):116-126. 2012. 査読有.

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jmi/59/1,2/_contents

Haito-Sugino S, Ito M, Ohi A, Shiozaki Y, Kangawa N, Nishiyama T, Aranami F, Sasaki S, Mori A, Kido S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. Processing and stability of type IIc sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemia rickets with hypercalciuria. Am J Physiol Cell Physiol 302:C1316-1330. 2012. 査読有. DOI: 10.1152/ajpcell.00314.2011.

Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. Sodium-dependent phosphate cotransporters: Lessons from gene knockout and mutation studies. J Pharm Sci. 100(9):3719-3730. 2011. 査読有. DOI: 10.1002/jps.22614

Ohi A, Hanabusa E, Ueda O, Segawa H, Horiba N, Kaneko I, Kuwahara S, Mukai T, Sasaki S, Tominaga R, Furutani J, Aranami F, Ohtomo S, Oikawa Y, Kawase Y, Wada NA, Tachibe T, Kakefuda M, Tateishi H, Matsumoto K, Tatsumi S, Kido S, Fukushima N, Jishage KI, Miyamoto K. Inorganic phosphate homeostasis in sodium-dependent phosphate co-transporter Npt2b^{+/-} mice. Am J Physiol Renal Physiol November .301: F1105- F1113. 2011. 査読有. DOI:10.1152/ajprenal.00663.2010

〔学会発表〕(計 10 件)

辰巳佐和子.

リン恒常性維持機構の破綻と疾患 - 腎臓切

除によるリン恒常性破綻機構の解明.

日本薬学会第 134 年会.2014 年 3 月 30 日

.熊本大学(熊本県) 招待

Nomura K, Tatsumi S, Miyagawa A, Shiozaki Y, Sasaki S, Segawa H, Miyamoto K.Hepatectomy Hypophosphatemia:A Novel Phosphaturic Factor in the Liver Kidney Axis.American Society of Nephrology. 2013.11.8. GeorgiaWorldCongressCenter, Atlanta,GA,USA.

辰巳佐和子, 木戸慎介,瀬川博子,宮本賢一.骨とリン利尿因子.第 58 回日本透析医学会学術集会・総会.2013 年 6 月 21 日.

福岡国際会議場(福岡県) 招待

Kido S, Fujiwara M, Nomura K, Sasaki S, Shiozaki Y, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Molecular mechanisms of cadmium (Cd) dependent fibroblast growth factor 23 secretion in bone. (oral presentation). American Society of Nephrology.2012.11.2. San Diego Convention Center, CA,USA.

Tatsumi S, Kamatani T, Nomura K, Yoshimi A, Shiozaki Y, Sasaki S, Manabe M, Kido S, Segawa H, Miyamoto K. Mechanisms of hyperphosphatemia in the osteocyte-abelated mice. American Society of Nephrology.2012.11.2.

San Diego Convention Center, CA,USA.

Miyamoto K, Ohnishi S, Shiozaki Y, Segawa H, Tatsumi S. Clinical consequences of gene mutations involved in renal phosphate transport. International Symposium on Epithelial Barrier and Transport. 2012.9.16.

Ritsumeikan University. Kusatsu, Shiga, Japan.

Kido S, Hashimoto Y, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Muscle atrophy in patients with CKD results from FGF23/Klotho-mediated suppression of Insulin/IGF-I signaling. XVI

International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease.2012.6.27. Hilton Hawaiian Village, Honolulu, Hawaii, USA.

Nomura K, Tatsumi S, Shiozaki Y, Yamaguchi S, Kamatani T, Segawa H, Kido S, Miyamoto K, Post-Hepatectomy

Hypophosphatemia in Rats. American Society of Nephrology.

2011.11.12.Pennsylvania Convention Center in Philadelphia,USA.

Segawa H, Mukai T, Ohnishi S, Sasaki S, Ohi A, Kuwahara S, Kido S, Tatsumi S, Ishikawa Y, Ueda O, Horiba N, Jishage K, Fukushima N, Miyamoto K.Role of Sodium-Dependent

Phosphate(Pi)Transporter(Npt2b)on Salivary Pi Secretion. American Society of Nephrology. 2011.11.11. Pennsylvania Convention Center in Philadelphia,USA.

Ohi A, Haito Sugino S, Ito M, Shiozaki Y, Nomura K,Kusaka Y, Sasaki S, Ohnishi S, Yamaguchi S, Kido S, Tatsumi S,Segawa H, Miyamoto K.Molecular Consequences of the SLC34A3 Mutations of Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria(HHRH). American Society of Nephrology. 2011.11.10. Pennsylvania Convention Center in Philadelphia,USA.

〔図書〕(計 8 件)

辰巳佐和子,野村憲吾,宮本賢一. CKD-MBD ハンドブック 2nd Edition . P286-291 (325P) 2013 年.日本メディカルセンター.

辰巳佐和子,藤田みゆき,野村憲吾,藤井理,宮本賢一.NephrologyFrontier.Vol.12, No.4. P36-40(104P) 2013 年.メディカルレビュー社.

桑原煩治,大井彰子,野村憲吾,辰巳佐和子,木戸慎介,瀬川博子,宮本賢一.日本消化吸収学会雑誌 Vol.34 No.3(11P)2012 年.日本消化吸収学会.

辰巳佐和子,木戸慎介,宮本賢一,伊藤美紀子.透析療法ネクスト ~新時代の高リン血症治療~P11-20 (114P) 2012 年.医学図書出版株式会社.

瀬川博子,佐々木祥平,向井朋,真鍋舞,木戸慎介, 辰巳佐和子,宮本賢一. CLINICAL CALCIUM 2012 Vol.22 No.10. P13-20 (150P) .2012 年.医薬ジャーナル社.

辰巳佐和子,野村憲吾,宮川淳美,木戸慎介,瀬川博子. CLINICAL CALCIUM 2012 Vol.22 No.10 .P81-85(150P)2012 年. 医薬ジャーナ

ル社.

辰巳佐和子,野村憲吾,釜谷達哉,宮本賢一.
循環器内科 Vol.71 No.3 Mar2012. 253-259.
(324P) 科学評論社.

伊藤美紀子,宮本賢一,辰巳佐和子.
腎不全医療における栄養管理の基礎知識.P71-81(177P)2011年.日本メディカルセンター.

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

木戸 慎介 (KIDO, Shinsuke)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特任助教
研究者番号：30437652

(3)連携研究者

()

研究者番号：