

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461253

研究課題名(和文)骨細胞ネットワークを分子標的としたリン管理の新戦略

研究課題名(英文) A novel strategy for managing plasam phosphate; osteocytes network as a molecular target

研究代表者

辰巳 佐和子 (TATSUMI, Sawako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：80420545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高リン血症は慢性腎臓病患者の血管石灰と関連し、透析患者の血管石灰化による死亡の危険因子と相関がある。慢性腎臓病において、リン管理を目指した治療戦略は生命予後の改善に必須である。骨細胞はFGF23を含むリン代謝制御因子を発現し、内分泌細胞として認識されている。そこで、骨細胞ネットワークは、血中リン濃度、食餌性リン感知が制御すると仮説をたてた。骨細胞死滅による骨細胞ネットワーク破断は食餌性リン負荷に応答しない。また腎臓の線維化、石灰化が見られた。よって骨細胞は食餌性リンを感知細胞であり、骨細胞数の維持は、CKD進展、異所性石灰化予防につながるという新しい知見を見出した。

研究成果の概要(英文)：Hyperphosphatemia is linked to vasculuar calcification with chronic kidney disease (CKD) and an independent risk factor for cardiovascular mortality in haemodialysis patients. In CKD patients, plasma phosphate (Pi) control is essential for improving life prognosis. Osteocytes are known as endocrine cells because osteocytes secrete FGF23 (Fibroblast growth factor 23) as phosphate regulating factors. Osteocytes make osteocytic canaliculi-osteocyte network through dendrites in osteocytic canaliculi to each other. We hypothesized that the osteocyte network controls plasma Pi levels and dietary Pi sensing. The osteocyte network disrupted mice did not respond loading high Pi diet. In osteocyte network disrupted mice, renal fibrosis and ectopic calcification were observed. Thus, we suggested that osteocyte is a sensory cell for dietary Pi loading. We show that maintenance of the number of osteocyte leads to preveting CKD progression and ectopic calcification.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リン 骨細胞 骨細胞ネットワーク 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨に埋没した骨芽細胞の終末細胞であり、解析が困難なため、詳細な役割が不明であった。しかしながら、骨細胞は、骨中に骨細管を介した骨細胞ネットワークを構築し、骨代謝を制御していることが近年の研究で明らかになった (Tatumi Set al. Cell Metabolism. 2007, Nakashima T et al. Nat Med. 2011.)。また骨細胞は FGF23 を含むリン代謝制御因子 (FGF23, PHEX, DMP1) を発現しており、これらのタンパク質の機能異常、欠損は全身性のリン代謝異常をきたすことから、内分泌細胞としての役割が注目されている。近年慢性腎臓病 (CKD) の早期治療、予防への取り組みが、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、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骨細胞より分泌される FGF23 にかわる早期慢性腎臓病のマーカーの探索は重要である。また近年、CKD を伴う全身性ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) において、リン管理を目指した治療戦略は生命予後の改善に必須であると認知されている。そのため、骨細胞-腎臓連関を介した血中リン濃度の制御は重要である。

2. 研究の目的

CKD-MBD における骨細胞ネットワークを分指標的としたリン管理の新戦略』を見いだすために、骨細胞を中心としたリンセンシング破綻機構の解明を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

骨細胞死滅マウス

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) を用いた (Cell Metabolism, 2007)。

Tg マウスはジフテリア毒素投与後 48 時間以内に骨細胞の死滅数を死滅させることが出来る。また本マウスの特性は毒素量を調節することで、約 20-80% の割合で骨細胞を死滅させることが出来る。9~14 週齢の Tg マウスおよび野生型 (WT) マウスに DT (50 µg/kg) を投与し 9 日後に臓器を採取し解析を行う。

肝臓切除マウス

肝臓切除マウスは肝臓のおよそ 70% を切除した。

Nampt ヘテロ遺伝子欠損マウス

Nampt 欠損マウスは胎生致死となるため、Nampt ヘテロマウスと野生型マウスを交配させることにより、Nampt ヘテロマウスを作成しリン代謝の解析に使用した。

(2) リン代謝動態を解析

採血と採尿

採血は、午前 9-10 時に行った。マウスを固定装置に入れ、ヘパリン処理済の毛細管 Haematokrit-Kapillaren (Hirschmann Laborgerate GmbH & CO. KG, Eberstadt, Germany) を用いてマウスの尾部静脈から採取した。血液は、4、3000 rpm で 15 分間遠心後、上清を回収し血漿サンプルとした。24 時間畜尿により採取した尿は、尿量を測定後に室温、1000 rpm で 1 分間遠心し、マウス体毛などの混入物を沈殿させた後、上清を回収してサンプルとした。

血漿、血清および尿中測定項目

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：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)、FGF23：FGF-23 ELISA Kit (KAINO LABORATORIES, INC., Tokyo, Japan)、PTH：Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Immutopics, California, USA) を用いて測定した。

腎臓上皮細胞刷子縁膜の分離

腎臓の刷子縁膜画分 (Brush border membrane vesicle: BBM) の分離は Ca²⁺ 沈降法を用いて行った (16)。そのタンパク濃度は BCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定した。

(3) 骨細胞死滅マウスの食餌性リンセンシングの解析

骨細胞死滅マウスに高リン食を 5 日間自由摂食させる。高リン食 (1.2% Pi, 0.6% Ca) リン含量を変化させた食餌は AIN-93G ミネラル混合 (CaCO₃, KH₂PO₄ 抜き) (Oriental Yeast Co.) を基本に CaCO₃、KH₂PO₄ の添加により独自に作成した。

代謝ケージを用いて尿を採取しリン排泄率を調べた。血中リン濃度の変動を検討した。

4. 研究成果

骨細胞死滅 (OCL) マウスのリン代謝の検討

骨細胞とリン代謝の関連を検討するために、OCL マウスの解析を行った。OCL マウスは Tg マウスにジフテリア毒素 (DT, 50µg/kg body weight) を一回投与し、作製した。毒素投与後 7 日目に血液と尿を回収しリン代謝を検討した。血中リン濃度の値は野生型 (Control) と比べ変化が認められなかったしかし、クレアチニン補正した尿中リン排泄は OCL マウスにおいておよそ 3.7 倍の増加を示した。OCL マウスでは尿中リン排泄の顕著な増加を示したことにより、腎臓 BBM を用いてタンパクレベルでの NaPi-II の発現を検討した。Western Blot 解析において OCL 群は Control 群に比して NaPi-IIa はおよそ 20%、NaPi-IIc は 42% にまで発現の減少がみられた。これらの結果から、OCL マウスでは NaPi-IIa および NaPi-IIc 発現低下により尿中からのリン再吸収能が抑制され、尿中リン排泄が亢進したことが明らかとなった。

OCL マウスにおけるリン代謝調節因子の変動

骨細胞の減少により、NaPi-IIa および NaPi-IIc の蛋白発現が減少したため、これらの蛋白質発現を制御するリン調節因子 (血清 FGF23 濃度、血漿 PTH 濃度および腎臓 Klotho) の発現変動を検討した。OCL マウスの尿中リン排泄は DT 投与後 5 日目から有意に上昇した。血清 FGF23 濃度は、DT 投与後 1 日目、3 日目に減少した。腎臓 Klotho の発現は DT 投与後 5 日目より有意に低下した。さらに血漿 PTH 濃度は DT 投与後 9 日目に著しく増加した。以上より骨細胞減少マウスでは、まず血清 FGF23 濃度が減少し、続いて Klotho の発現抑制が生じ、最後に血漿 PTH 濃度の上昇が認められた。PTH 濃度の上昇は尿中リン排泄の亢進より遅れて認められるため、OCL マウスの尿中リン排泄亢進は PTH が引き金であるとは言えない。Klotho 発現減少は、OCL マウスの腎機能低下を示唆していると考えられた。

骨細胞死滅による腎臓の形態変化

OCL マウスにおいて、腎臓の著しい線維化、さらには異所性石灰化が認められた。

OCL マウスにおける肝利尿因子の亢進

最近我々は、肝臓がリン代謝を調節するリン利尿因子 (ニコチンアミド代謝関連物質 X) を分泌する可能性を見だし、リン代謝における腎臓-肝臓臓器連関を示した (Nomura K, Tatsumi S et al. J Am Soc Nephrol. 2013)。

肝臓リン利尿因子候補 X は実際 OCL マウスにおいて異常に上昇していることが分かった。OCL マウスのリン代謝異常は、骨細胞-肝臓-腎臓の連関による可能性が示唆された。

OCL マウスにおける食餌性リン負荷に対する応答

これまでの結果より、OCL マウスではリン動態に異常がみられることから、食事性リン負荷に対する応答性に異常があるのではないかと、仮説をたてた。OCL マウスに食餌による高リン負荷を行ったところ Control 群、著しい尿中リン排泄が認められた。一方、OCL 群では高リン食摂取による尿中リン排泄が促進しなかった。この結果より、骨細胞がないと高リン応答がみられなかったことから、食餌性リン応答に骨細胞が必要であることがわかった。

全体の成果のまとめ

今回の研究成果により、骨細胞死滅による骨細胞ネットワーク破断は食餌性リン負荷にตอบสนองせず、また腎臓の線維化、石灰化が見られた。よって骨細胞は食餌性リンを感知細胞であり、骨細胞数の維持は、CKD 進展、異所性石灰化予防につながるという新しい知見を見出した。

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)

Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. Control of phosphate balance by the kidney and intestine. Clin Exp Nephrol. 2017; Mar 21 (Suppl 1): 21-26.

doi:10.1007/s10157-016-1359-4. 査読有.

Tatsumi S, Miyamoto K. Regulation of inorganic phosphate ion homeostasis: crosstalk kidney and other organs. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2016; 147(2): 84-88.

doi:10.1254/fpj.147.84. 査読無.

Tatsumi S, Miyagawa A, Kaneko I, Shiozaki Y, Segawa H, Miyamoto K. Regulation of renal phosphate handling: inter-organ communication in health and disease. J Bone Miner Metab. 2016 Jan; 34(1): 1-10.

doi: 10.1007/s00774-015-0705-z. 査読有.

Shiozaki Y, Segawa H, Ohnishi S, Oh A, Ito M, Kaneko I, Kido S, Tatsumi S,

Miyamoto K. Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells. *J Med Invest*. Vol 62 (3-4) Aug 2015 ;209-218. doi:10.2152/jmi.62.209. 査読有.

Kaneko I, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Genetic diseases of renal phosphate handling. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 2015;57(4):758-765. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126333> 査読無.

Tatsumi S, Nagamoto K, Ogata M, Miyamoto K. Bone and Nutrition. Sclerostin and bone metabolism. *Clin Calcium*. 2015;25(7):1043-1047. doi: CliCa150710431047. 査読無.

Taketani Y, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K, Takeda E, Yamamoto H. Niacin and chronic kidney disease. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61 Suppl:S173-175. doi: 10.3177/jnsv.61.S173. 査読有.

Tatsumi S, Fujii O, Miyagawa A, Miyamoto K. Sodium-dependent inorganic phosphate transporters and biomineralization. *Clin Calcium*. 2014;24(2).249-255. doi:CliCa1402249255. 査読無.

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*. 2014 Jun;139 (2) 301-316. doi:10.1093/toxsci/kfu043. 査読有.

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*. 2014;vol.25,No.4.761-772. doi:10.1681/ASN.2013060569. 査読有.

[学会発表](計 28 件)

瀬川博子, 佐々木祥平, 結城志帆子, 金子一郎, 辰巳佐和子, 宮本賢一. 生体内リン恒常性における Intestinal Alkaline Phosphatase (IAP) の役割. 第 1 回 CKD MBD 研究会学術集会・総会. コクヨホール東京・品川 (東京都品川区) 2017/3/4.

Tatsumi S, Miyagawa A, Fujii O, Ogata M, Kaneko I, Segawa H, Miyamoto K. Hepatectomy-Induced Hypophosphatemia: Mechanisms Underlying Downregulation of Phosphate Transport in the Small Intestine. *American Society of Nephrology. Kidney Week 2016*. シカゴ (米国) 2016/11/17.

Ikuta K, Segawa H, Yuki S, Kaneko I, Hanazaki A, Fujii T, Kushi A, Tatsumi S, Miyamoto K. Salivary Pi Handling May Be under the Control of Gastrointestinal Pi Sensing. *American Society of Nephrology Kidney Week 2016*. シカゴ (米国) 2016/11/16.

高濱和子, 辰巳佐和子, 宮川淳美, 藤井理, 新垣友啓, 緒方雅央, 木下瑛美, 金子一郎, 瀬川博子, 宮本賢一. リン代謝動態の概日リズム形成機序解明. 第 49 回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会, 徳島大学 (徳島県徳島市) 2016/11/12.

辰巳佐和子, 高濱和子, 小柳悟, 宮本賢一. Elucidation of the circadian rhythm in renal phosphate excretion (腎臓リン排泄における概日リズムの解明). 第 23 回日本時間生物学会学術大会. 名古屋大学豊田講堂. (愛知県名古屋市) 2016/11/12.

辰巳佐和子. CKD-MBD と食欲の連関. 第 3 回腎と栄養研究会. KPP 八重洲ビル (東京都中央区) 2016/9/24.

辰巳佐和子, 藤井理, 宮川淳美, 宮本賢一. 骨と健康寿命の検討について. 第 63 回日本栄養改善学会. リクスター・ショール青森 (青森県青森市) 2016/9/8.

辰巳佐和子, 藤井理, 宮川淳美, 宮本賢一. 骨と健康寿命の検討について. 第 3 回日本栄養改善学会四国支部学術総会. 四国大学 (徳島県徳島市) 2016/4/23.

Kaneko I, Rimpi K Saini, G. Kerr Whitfield, Ito M, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K, Mark R. Haussler, and Peter W. Jurutka. A Nurr1-dependent phosphaturic hormone gene that is transcriptionally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D. XVIII International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease (ICRNM2016). 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市) 2016/4/19.

西口詩織, 瀬川博子, 養島さくら, 桑原煩治, 金子一郎, 前田彰, 辰巳佐和子, 宮本賢一. リン血症是正に対する FGF23/Klotho シグナルの解明. 第 19 回日本病態栄養学会年次学術集会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016/1/9.

新垣友啓, 辰巳佐和子, 緒方雅央, 阪口晴菜, 安井朗洋, 藤井理, 永元健太, 金子一郎, 瀬川博子, 宮本賢一. 骨細胞の減少による胆汁酸代謝異常についての解析. 第19回日本病態栄養学会年次学術集会. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市). 2016/1/9.

安井朗洋, 辰巳佐和子, 宮本賢一. 骨細胞欠損マウスにおける FGF19 ファミリーシグナル経路の破綻. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会. 神戸ポトアイト. (兵庫県神戸市) 2015/12/3.

Hanazaki A, Segawa H, Ikuta K, Fujii T, Kaneko I, Yuki S, Nishiguchi S, Notsu K, Shiozaki Y, Tatsumi S, Miyamoto K. Genetic Deletion of NaPi-2c Rescue Phenotype of klotho Knockout Mice without Improving Severe Hyperphosphatemia. American Society of Nephrology Kidney week. サテイト (米国) 2015/11/8.

花崎愛, 瀬川博子, 福尾真理, 金子一郎, 辰巳佐和子, 宮本賢一. Klotho and NaPi-2c, double deletionから導く NaPi-2c の重要性. 第48回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会. 八ッ子広島 (広島県広島市) 2015/11/1.

宮川淳美, 辰巳佐和子, 永元健太, 宮本賢一. 慢性腎臓病による高リン血症改善におけるナイアシンの効果. 第62回日本栄養改善学会学術総会. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市) 2015/9/25.

宮本賢一, 辰巳佐和子. 肝臓切除因子による高リン血症抑制機序の解明. 第60回日本透析医学会学術集会・総会. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/6/27.

Miyamoto K, Tatsumi S, Hamada Y. Clinical Nutrition education in Japanese dietitians. 第60回日本透析医学会学術集会・総会. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/6/26.

Yuki S, Segawa H, Sasaki S, Ikuta K, Kaneko K, Fujii T, Hanazaki A, Nishiguchi S, Notsu K, Aki E, Shiozaki Y, Tatsumi S, Miyamoto K. Disruption of intestinal alkaline phosphatase (Akp3) affects the phosphate homeostasis. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/5/16.

Sakaguchi H, Tatsumi S, Ogata M, Fujii O, Arakaki T, Miyagawa A, Nagamoto K, Takahama W, Hirobata Y, Yasui A, Kaneko I, Segawa H, Miyamoto K. Bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis: Study of

osteocyte-ablated mice. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/5/16.

Segawa H, Kaneko H, Shiozaki Y, Tatsumi S, Miyamoto K. The role of Na⁺-dependent Phosphate transporters in the body. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/5/15.

②1 Taketani Y, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Tatsumi S, Miyamoto K, Takeda E, Yamamoto H. Niacin and Chronic Kidney Disease. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2015/5/15.

②2 辰巳佐和子. 無機リン酸イオン調節の多層の制御機序解析. 第88回日本薬理学会年会. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015/3/19.

②3 緒方雅央, 辰巳佐和子, 藤井理, 阪口晴菜, 新垣友啓, 宮川淳美, 永元健太, 高濱和子, 廣畠佑希子, 金子一郎, 瀬川博子, 宮本賢一.

「骨細胞除去マウスのカルシウム/リン代謝異常解析について」第47回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会. 四国大学交流プラザ (徳島県徳島市) 2014/11/16.

②4 Ikuta K, Segawa H, Sasaki S, Kaneko I, Shiozaki Y, Tatsumi S, Miyamoto K. Inorganic Phosphate Handling in Salivary Glands. American Society of Nephrology kidney week. サテイト (米国). 2014/11/11.

②5 辰巳佐和子, 野村憲吾, 宮川淳美, 永元健太, 瀬川博子, 宮本賢一. 肝臓切除に伴う低リン血症発症機序の解明: ニコチンアミド 転写因子 Namp1 を介した全身性リン代謝制御機構についての検討. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2014/7/26.

②6 辰巳佐和子, 野村憲吾, 宮川淳美, 永元健太, 藤井理, 瀬川博子, 宮本賢一. ニコチンアミド 転写因子 Namp1 を介した全身性リン代謝制御機構についての検討. 第57回日本腎臓学会学術総会. 八ッ子横浜 (神奈川県横浜市) 2014/7/6.

②7 齋藤直朗, 李敏啓, 辰巳佐和子, 池田恭治, 網塚憲生, 小林正治. 骨細胞特異的死滅マウスの骨小腔基質溶解における微細構造学的検索. 第34回日本骨形態計測学会. さっぽろ芸文館 (北海道札幌市) 2014/6/14.

②8 宮川淳美, 辰巳佐和子, 野村憲吾, 永元健太, 瀬川博子, 宮本賢一. NAD 合成酵素 Namp1 を介したリン代謝制御機構. 第68回日本栄養・食糧学会大会. 酪農学園大学 (北海道江別市) 2014/6/1

〔図書〕(計 8 件)

金子一郎, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一.
腎と透析診療方針 2016, 腎と透析 vol180 増刊
号.300-306 (804) 東京医学社.2016 年.

辰巳佐和子, 宮川淳美, 宮本賢一.
Annual Review2016.169-174 (201) 中外医薬
社.2016 年.

金子一郎, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一.
腎臓内科・泌尿器科, 2 (6): 581-587 (628)
科学評論社.2015 年.

金子一郎, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一.
日本腎臓学会誌. Vol157, No4, 2015.
758-765 (788) 東京医学社.2015 年.

辰巳佐和子, 宮本賢一.
Osteo Lipid Vascular & Endocrinology 骨
代謝と生活習慣病の連関 2015.2Vol.5 No.1
P43-46(68P)メディカルレビュー社.2015 年.

辰巳佐和子, 藤井理, 阪口晴菜, 緒方雅央,
新垣友啓, 宮本賢一. 腎と骨代謝.
Vol28.No1.57-61 (78P)
日本メディカルセンター.2015 年.

辰巳佐和子, 金子一郎, 瀬川博子, 宮本賢
一. Drug Delivery System (Official
Journal of the Japan Society of Drug
Delivery System 2014Vol.29 Nov No.5
408-416 (469) 日本 DDS 学会.2014 年.

辰巳佐和子, 瀬川博子, 宮本賢一.
透析医学.472-475 (719) 医薬ジャーナル
社.2014 年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 佐和子 (TATSUMI, Sawako)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 80420545