

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500012

研究課題名(和文)骨・血管リン臓器相関解析による異所性石灰化分子機序の解明とCKD栄養療法への応用

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanism of calcification and development to CKD nutritional therapy by correlation of bone and vascular

研究代表者

伊藤 美紀子 (ITO, MIKIKO)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：50314852

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)：慢性腎臓病(CKD)患者にて心血管疾患を引き起こす、異所性石灰化進展の抑制を目指した栄養療法を開発するために、骨と血管の臓器相関によるリン代謝調節を明らかにすることを目的とした。本研究では骨と血管双方で機能するリン調節候補分子の検討をin vitro、in vivoで行った。破骨細胞分化ならびに血管石灰化の両方で発現上昇する遺伝子から候補を絞り、種々の解析を行った結果、血管石灰化に伴って発現が上昇し、CKDモデル動物大動脈血管の石灰化部位にて発現し、リン調節分子として機能する可能性のある分子を明らかにした。今後、栄養との関連などさらなる検討を行い、栄養療法の開発につなげていく。

研究成果の概要(英文)：Vascular calcification is a risk factor for cardiovascular events in chronic kidney disease (CKD) patients. In order to develop nutritional therapy for suppressing vascular calcification, we examined to clarify the phosphate regulation by bone-vessel interaction. In this study, we searched candidate molecule that function in phosphate regulation in both bone and vessel and then we analyzed the function in vitro and in vivo. The candidate molecule expression increased after differentiation of osteoclasts and calcification of vascular smooth muscle cells. In CKD model rat, the candidate molecule expressed at calcification area in vascular aorta. Thus, it was indicated that this molecule is likely to be involved in calcification. We will further research the function and relation with nutrition in the future, and will lead to the developing of nutrition therapy.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：血管石灰化 慢性腎臓病 高リン血症

1. 研究開始当初の背景

我が国の成人人口における慢性腎臓病 (CKD) 患者数は、1,330 万人(12.9%)と推定されており、今や「国民病」と言える疾患となっている。2012 年の透析患者死亡者数は 31,110 人であり、その死因として心不全、心筋梗塞、脳血管障害といった心血管病変が約 40%を占めており、このリスクは健康人の 10~20 倍に相当することが特筆すべきことである。これらの心血管病変には、高リン血症が惹起する血管の異所性石灰化による動脈硬化が前段階として観察され、異所性石灰化には食事からのリン摂取量が直接関与することが知られている。

そのため、透析患者では食事からのリン摂取制限が設けられている。しかしながら近年、透析導入時には約半数の患者で既に異所性石灰化が進行しており、早期のリン管理が重要であることが強く示唆されている。これらのことから、健康寿命を目指すためにもリン管理は重要であり、特に生命予後に強い相関を示す CKD 患者において、異所性石灰化の抑制を目指した栄養療法が大きく期待される。

申請者は、これまで透析患者の生命予後の改善を目指して、腎・骨のリン代謝調節機構における分子機序の解明を行ってきた。リンはその 85%が骨に貯蔵され、骨吸収、骨形成を介してリン代謝に常に関与しているにもかかわらず、その調節機構に関する報告は少ない。特に骨吸収を担う破骨細胞は、多核の巨細胞であり、骨吸収時のエネルギーを確保するために大量の ATP、すなわちリンを必要とする。また吸収した骨 (ハイドロキシアパタイト; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を排出する機構が存在しており、これが生体のリン代謝調節分子であるとの考えのもと、研究を進めてきた。その結果、破骨細胞に存在するユニークなリン代謝調節分子の存在を明らかにした。これらリン代謝調節分子が未だ詳細が不明な異所性石灰化において重要な役割を果たしていると考え研究を遂行している。

2. 研究の目的

骨と血管の臓器相関に注目して、リン代謝調節分子を探索し、リンによる異所性石灰化の分子機序との関連を明らかにする。さらに、食事性リン (特に加工食品中の無機リン) との関連を明らかにすることで CKD に適応できる栄養療法への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞におけるリン代謝調節候補分子の解析

マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞 (理研バイオリソースセンター) を RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor B Ligand)を用いて破骨細胞に分化させた破骨細胞様細胞、ならびにマウス骨髄から作成した primary 破骨細胞における分化前・分化後の DNA microarray のデータの結

果から、リン輸送に関わる可能性のある ANK (骨芽細胞におけるピロリン酸排出分子)、NaPi-III 類似輸送体 Xpr1 に注目して検討を行った。

破骨細胞分化前後における遺伝子発現ならびにタンパク質発現の検討

破骨細胞分化前後の発現変化を、リアルタイム PCR (Step One Real-Time PCR System; Applied Biosystems 社)にて定量解析した。ISOGEN を用いて抽出した total RNA を、First-Strand Synthesis Kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いて cDNA を合成し、PCR を行った。タンパク質発現解析は、市販の抗体を用いた 10% SDS-PAGE によって解析した。

細胞内局在の検討

分化前の RAW264.7 細胞、分化後の破骨細胞を用いて、その局在を各細胞内器特異的マーカー (Organelle Detector Sampler kit; BD Transduction Laboratories) による二重染色により検討した。一次抗体として上記抗体を使用し、二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) を使用し、二重染色を行った。

細胞外リンならびにリン調節ホルモンとの関連解析

サンプル回収 16 時間前に細胞外リン濃度を普通リン (1.0mM)、高リン (2.0 mM) または低リン (0.1 mM) にすることで、発現量の変化と局在の変化を検討した。また、骨成分の代替としてリン酸カルシウムの添加による局在変化から、リンに対する機能を検討した。リン調節ホルモン FGF23, PTH 添加による遺伝子発現変化を検討した。

(2)血管平滑筋細胞を用いたリン代謝調節分子の解析

正常ヒト大動脈由来血管平滑筋細胞 (AoSMC; Lonza 社)を用いた。血管平滑筋細胞を 2.6 mM リン存在下で培養して石灰化を誘導し、血管石灰化モデル細胞とした。石灰化の確認は、von kossa 染色により行い、誘導後 6 日目、12 日目で石灰化が観察された。

石灰化前後における遺伝子発現ならびにタンパク質発現の検討

非石灰化、石灰化誘導後 3, 6, 12 日の AoSMC から RNA を調整し、ANK, Xpr1 遺伝子発現をリアルタイム PCR にて検討した。また、タンパク質発現をウエスタンブロッティングにより検討した。

局在の検討

石灰化誘導、非誘導の AoSMC 細胞から、膜タンパク質抽出キット (Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit; Thermo Fisher 社)を用いて細胞質と膜画分での発現量を比較した。

(3)破骨細胞分化ならびに血管石灰化に関わる新たなリン代謝調節候補分子の探索

破骨細胞分化後ならびに血管石灰化後に共通して上昇する遺伝子を DNA microarray により探索した。血管平滑筋細胞を用いて石灰化を誘導し、誘導後 0,3,6,12 日後に RNA を調整し DNA microarray(タカラバイオ株式会社)に供した。先行研究で明らかにしている破骨細胞分化後に上昇する遺伝子群と比較し、共通して上昇する膜タンパク質 SLC ファミリーの中から候補分子を探索した。

候補分子 B に関して、上記 (1)(2)の検討ならびに、*in vivo* にて下記の検討を行った。

(4) アデニン誘発 CKD モデル動物を用いた *in vivo* での検討

12 週齢の SD 系雄性ラットをアデニン食にて 2~3 週間飼育し腎機能を低下させた CKD モデルラットを作成したのち、リン 0.2%含有餌 (LP 摂食群)、リン 1.0%含有餌 (NP 摂食群) にて 3 週間飼育後、胸部・腹部大動脈を採取し、パラフィン固定した。血管における石灰化は von kossa 染色にて行い、連続切片を用いて、候補分子の免疫染色を行った。石灰化の指標として、石灰化で上昇する Runx2 遺伝子の発現を検討した。

(5) 統計解析

各実験結果における値は、平均値 ± 標準誤差で示した。解析は、統計ソフト Statcel 3 を用いて行った。破骨細胞、血管平滑筋細胞を用いた解析には、スチューデントの t 検定を用いて検討を行った。CKD モデル動物を用いた解析には、一元配置分散分析及び多重比較法 (Tukey-Kramer 法) を用いて行った。有意差は、危険率 5%において検定した。

4. 研究成果

(1) 候補分子としての ANK, Xpr1 の検討

破骨細胞ならびに血管石灰化モデル細胞を用いて解析を行った結果、候補分子 ANK は破骨細胞分化後に約 20 倍遺伝子発現が増加した。ANK は骨芽細胞にてリン類似体であるピロリン酸を輸送する事が知られていることから候補分子とした。しかしながら、タンパク質の局在解析から ANK は分化前の破骨細胞においてそのほとんどは細胞質に発現しており、分化後もその局在に変化を示さなかった。

Xpr1 はナトリウム依存性リン酸トランスポーターの一つである NaPi-III 類似輸送体であり、破骨細胞への分化後発現が 4 倍増加しており、細胞膜での発現が観察されたことから候補分子とした。しかしながら、リン調節ホルモン FGF23 やリン濃度による発現変化は示さなかった。血管平滑筋細胞における検討では、石灰化誘導 6 日目に有意に発現が上昇したが、石灰化誘導 12 日後の発現は低下した。

これらの結果から、2 つの候補分子は、骨と血管において共通性は見出されたが、石灰化ならびにリン調節との関連を明らかにす

る事は出来なかった。

(2) 新たな候補分子の探索

新たに血管石灰化モデル細胞を用いて、非石灰化と石灰化誘導後 3,6,12 日後で DNA microarray を行い、破骨細胞分化前後での結果と比較した。破骨細胞分化後ならびに血管石灰化後に共通して発現が上昇する遺伝子を指標とし、特に膜タンパク質である SLC ファミリーに注目して探索した結果、リンを輸送する可能性のある候補分子を新たに見出すことが出来た。本分子の機能はリン、骨との関連が示唆されているが、詳細な機能は現在のところ不明である。

本候補分子 B のリアルタイム PCR 解析では破骨細胞分化後に 16 倍発現が上昇し、血管石灰化 12 日目において有意に発現が上昇した。タンパク質発現解析では、破骨細胞分化後ならびに血管石灰化後に発現が増加した。破骨細胞においては細胞膜とエンドソームでの局在が観察され、膜タンパク質抽出によるウエスタンブロッティング解析においても、膜での発現が観察できた。

CKD モデル動物を用いた *in vivo* での血管石灰化との関連解析では、CKD 条件下において LP 摂食群より多くのリンを摂取した NP 摂食群で発現が高く、石灰化マーカーである Runx2 発現で評価した血管石灰化の度合いに応じて、遺伝子の発現上昇が示された。免疫染色では、von kossa 染色で確認された石灰化部位にて発現が観察された。

以上のことから、本候補分子 B が骨と血管に關与するリン調節因子であり、血管石灰化に關与している可能性を示唆したものである。今後さらなる解析をすすめることで、CKD 患者および透析患者の異所性石灰化発症の予防につながる栄養療法の一助になることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Suga N., Murakami A., Nakamura Y., Ishisaka A., Kitamoto N., Ito M., Kato Y. Cytotoxic and cytoprotective effects of tryptamine-4,5-dione on neuronal cells: a double-edged sword. Free Radical Research. 2017;51(5):545-553. doi: 10.1080/10715762.2017.1331038 査読有

Nitta Y, Yasukata F, Kitamoto N, Ito M, Sakaue M, Kikuzaki H, Ueno H. Inhibition of Morganelle morganii Histidine Decarboxylase Activity and Histamine Accumulation in Mackerel Muscle Derived from *Filipendula ulumaria* Extracts. J Food Prot. 2016;79(3):463-7. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-313. 査読有

Ito M., Tanaka S. Bone disorder and nutrition. Clin Calcium. 2016; 26(3): 375-83 doi: CliCa1603375383. 査読無

Tanaka S., Ito M. Bone and Nutrition. Nutrition care of renal osteodystrophy Clin Calcium. 2015 ;25(7):1057-62 doi: Cl207iCa150710571062. 査読無

Shiozaki Y, Segawa H, Ohnishi S, Ohi A, Ito M, Kaneko I, Kido S, Tatsumi S, Miyamoto KI. Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-11c) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells. J Med Invest. 2015;62 (3.4): 209-218. doi: 10.2152/jmi.62.209. 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; 25(4): 761-72 doi: 10.1681/ASN. 2013060569. 査読有

[学会発表](計 29 件)

谷真理子 他 異所性石灰化における骨・血管連関新規リン調節分子の探索 第20回日本病態栄養学会 年次学術集会 国立京都国際会館(京都府京都市) 2017.1.13~1.15

田嶋奈津美 他 血液透析患者の食意識が食事からのリン摂取量に与える影響 第20回日本病態栄養学会 年次学術集会 国立京都国際会館(京都府京都市) 2017.1.13~1.15

安國和恵 他 血液透析患者における食物からの有機リンの摂取バランスと栄養状態の関連 第20回日本病態栄養学会 年次学術集会 国立京都国際会館(京都府京都市) 2017.1.13~1.15

谷真理子 他 骨・血管連関による新規リン調節分子の探索 第55回日本栄養・食糧学会近畿支部大会 帝塚山学院大学(大阪府堺市) 2016.10.22

Kaneko I. 他 FGF23: A Nurr1-dependent phosphaturic hormone gene that is transcriptionally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D. XVIII ICRNM (International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease) 2016.4.19-23, Okinawa convention center (沖縄県宜野湾市)

田中更沙 他 食品添加物由来無機リン酸の血管内皮機能に及ぼす影響 腎臓病と栄養・代謝・食事フォーラム 2016.3.26 日経ホール(東京都千代田区)

河村弘美 他 食品添加物由来無機リン酸の血管内皮機能に及ぼす影響 第19回日本病態栄養学会 年次学術総会 2016.1.9~10 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

古野史佳 他 血液透析患者におけるコンビニエンスストア利用の実態とリン摂取量 第19回日本病態栄養学会 年次学術総会 2016.1.9~10 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

田中更沙 他 リフィーディングシンドロームにおけるリン代謝異常の検討 第19回日本病態栄養学会 年次学術総会 2016.1.9~10 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

松本優香 他 血液透析患者におけるリン摂取量とその年間変動 第18回日本病態栄養学会 年次学術集会 2015.1.10.11 国立京都国際会館(京都府京都市)

Tanaka S. 他 Analysis of abnormal phosphorus metabolism in fasting status. 12th Asian Congress of Nutrition 2015.5.14-18, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

伊藤美紀子 他 透析患者における習慣的リン摂取とバイオマーカーとの関連 第2回日本腎不全栄養研究会 2014.6.28 新大阪ブリックビル(大阪府大阪市)

市川早紀 他 糖尿病末期腎症で血液透析患者をうける患者におけるリン摂取量の年間変動 第57回日本糖尿病学会 年次学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014.5.22~5.24

[図書](計 6 件)

伊藤美紀子 他 腎・尿路系の疾患、新・臨床栄養学(栄養科学シリーズ NEXT) 講談社 p191-207(総 p309) 2016.1

伊藤美紀子 他 第8章リン摂取と老化制御、ミネラル摂取と老化制御 建帛社 p105-122(総 p165) 2014年5月

伊藤美紀子 他 第30章 マグネシウム(翻訳) 最新栄養学 - 専門領域の最新情報 - 第10版 建帛社 p406-419(総 p1,144) 2014年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美紀子 (ITO, Mikiko)
兵庫県立大学・環境人間学部・教授
研究者番号: 50314852

(2) 研究分担者

坂上 元祥 (SAKAUE, Motoyoshi)
兵庫県立大学・環境人間学部・教授
研究者番号: 20283913