

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560057

研究課題名(和文) 食事性リンの感知機構の解明と副甲状腺ホルモン初期分泌障害の病態概念の確立

研究課題名(英文) Identification of sensory mechanism of dietary phosphorus and pathophysiology of impaired early secretion of parathyroid hormone.

研究代表者

竹谷 豊 (TAKETANI, Yutaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：30263825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)は、カルシウムとともにリン代謝を調節するホルモンである。これまでに、ヒトにおいて、食後血清リン濃度の上昇に先行してPTH分泌が上昇することを示してきたが、そのメカニズムや意義は明らかではない。本研究では、このPTH初期分泌のメカニズムを解明し、その生理的・病態的意義を明らかにすることを目的に、モデル動物を用いたPTH初期分泌の評価系を確立し、そのメカニズムの解明を試みた。その結果、空腸下部においてリン酸輸送体を介して食事のリンを感知し、迷走神経求心路を介した経路でPTH分泌が促進され、血清リン濃度上昇に対し速やかに腎臓でのリン再吸収抑制に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) is not only a calcium-regulating hormone but also phosphate-regulating hormone. We have demonstrated that PTH secretion was induced by dietary phosphate intake before postprandial serum phosphate increase. However, the detail mechanism and physiological role of the early phase PTH secretion has not been clarified. In this study, we established animal model to evaluate the early phase PTH secretion in response to dietary phosphate. We also identified that dietary phosphate can be sensed via phosphate transporter in the distal intestine, the signal was transmitted to parathyroid gland via a vagus nerve, and the secreted PTH suppressed renal phosphate reabsorption to adapt postprandial increase in serum phosphate.

研究分野：臨床栄養学

キーワード：リン PTH 慢性腎臓病 リン感知機構

1. 研究開始当初の背景

リン代謝の調節において、副甲状腺ホルモン(PTH)は最も重要なホルモンである。過剰なリン摂取により血清リン濃度が上昇すると速やかに副甲状腺より PTH が分泌される。そして、腎臓の近位尿細管に作用し、リン再吸収を抑制して尿中リン排泄を促す。このシステムにより、血中リン濃度は一定に保たれている。

ところが、実際にヒトで過剰なリンを経口投与すると、食後2時間で血清リン濃度がピークに達するのに対して、PTH の分泌は食後15分から30分で最初のピークがあり、その後4-6時間で2回目のピークを示す二峰性の経時曲線を示すことを見いだした (Nishida Y, Taketani Y, et al. *Kidney Int* 70: 2141-2147, 2006)。このことは、消化管にリンが入ったことを認識して、血清リン濃度が上昇する前に PTH を分泌させる機構が存在することを示唆するものである。

我々がこれまでに報告したように食後の血清リン濃度上昇は、血管内皮機能障害を惹起する (Shuto E, Taketani Y, et al. *J Am Soc Nephrol* 20: 1504-1512, 2009, Tan VV, Taketani Y, et al. *J Clin Biochem Nutr* 51: 27-32, 2012) ことから、PTH 初期分泌量が低い人あるいは PTH 初期分泌に障害がある場合は、食後血清リン濃度上昇を引き起こしやすいあるいは高リン血症になりやすいと考えられる。さらに、このような人は、慢性腎臓病発症時に全身性に骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)になりやすいと考えられる。CKD-MBD を発症すると生命予後が著しく低下することから慢性腎臓病患者においては喫緊の対策課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、モデル動物を用いて PTH 初期分泌を惹起するメカニズム (消化管リンセンサー、神経経路および液性因子を解明するとともに、初期の慢性腎臓病患者において PTH 初期分泌能を評価し、血清リン濃度上昇との関係を明らかにし、PTH 初期分泌の生理・病態的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 経時的 PTH 分泌評価モデルラットの作製

10週齢雄性 Sprague-Dawley ラット (SD ラット) を実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母) と超純水を用いて自由摂取にて飼育した。実験当日に経時的な採血をするために、SD ラットに対してペントバルビタールナトリウムを腹腔内に 0.12 mg/kg 投与し完全に麻酔が作用したことを確認し、右大腿静脈にカテーテルを留置して経時的な採血を可能にした。

中性リン酸水溶液は胃内へ直接投与し、採血はリン酸投与後、0分、5分、10分、20分、30分、60分の6点でカテーテルより行い、採尿はリン酸投与直前と解剖直前の2点で膀

胱から直接行った。

(2) 迷走神経求心路遮断群および sham 群の作製

カプサイシンを用いた迷走神経求心路の遮断による検討は、既報の手法を基に行った。経時的 PTH 分泌評価モデルラット (SD ラット、334.33±2.03 g) において、カプサイシン溶液 (カプサイシン 1 mg (Sigma-Aldrich) を溶媒に溶解) を適当な長さの無菌ガーゼに浸して腹部食道周囲に優しく巻きつけ 30 分処置した。Sham 群について、カプサイシンを含まない溶媒を使用して同様の手順で処置した。

(3) 小腸ナトリウム依存性リン酸トランスポーター阻害剤投与群の作製

ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの阻害剤である Phosphonoformic acid (PFA) を 1mM, 10mM, 100mM (30.00 mg/ml) で胃内にリン酸と同時に単回投与した。

(4) 小腸上部投与群および下部投与群の作製

経時的 PTH 分泌評価モデルラットに対し、小腸上部投与群は胃内に投与物を投与し、下部投与群は縫合糸で縛った位置直下の管腔内にリン酸を投与した。

(5) PTH 分泌阻害剤投与群の作製

経時的 PTH 分泌評価モデルラットに、シナカルセト塩酸塩 (Selleckchem) を溶媒 captisol (sulfobutyl ether bata-cyclodextrin sodium; Sigma-Aldrich) に溶かして 3.0 mg/kg/ml (pH 7.0) に調整した溶液を、実験開始1時間前にゾンデを用いて経口投与した。

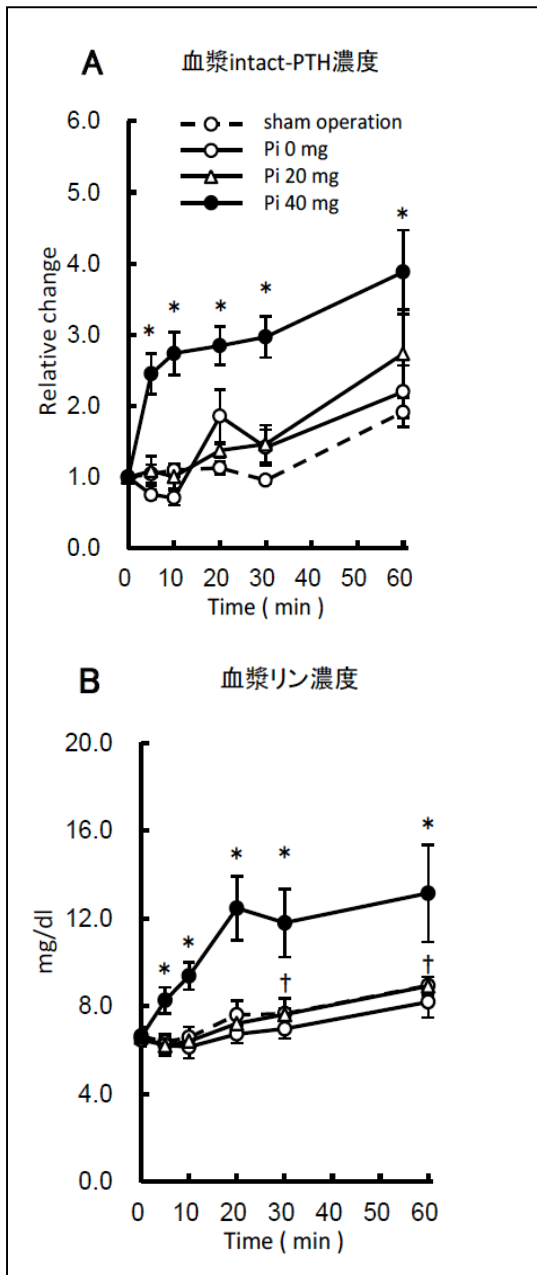
4. 研究成果

(1) 消化管へのリン投与に応答した早期 PTH 分泌評価系の確立

消化管へのリン投与に応答した早期 PTH 分泌を評価するために、10週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、大腿静脈にテーテルを留置し、胃内にリン酸水溶液を投与、投与後60分までの血漿 PTH 濃度を経時的に評価するモデルを作製した。

それぞれ1匹あたり0 mg、20 mg、40 mg のリンを投与し、投与後60分までの血漿リン濃度および血漿 intact-PTH 濃度を経時的に測定したところ、40 mg のリンを投与した際に、投与後5分で血漿リン濃度および血漿 intact-PTH 濃度のいずれもが0分値のベースラインと比較して有意に上昇した (図1)。また、血漿リン濃度の上昇ピークよりも早期に血漿 intact-PTH 濃度の著明な上昇を認め (図1)。クレアチニンあたりの尿中リン排泄量はリン酸投与量依存的に増加したが、早期の PTH 分泌増加による明らかな影響は認められなかった

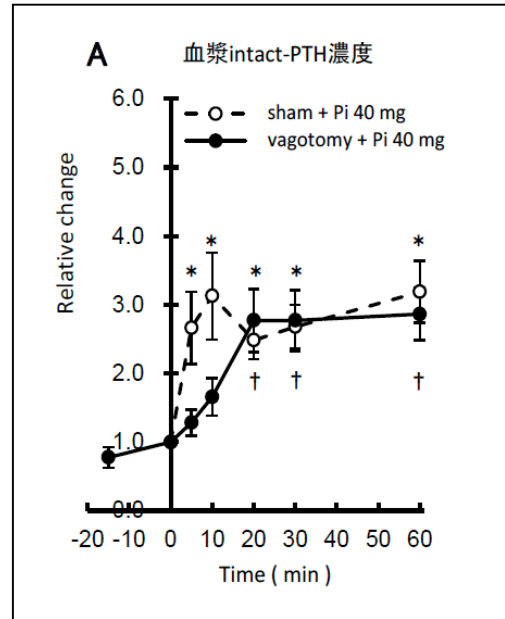
図1. 消化管へのリン投与に反応した早期PTH分泌



(2) 消化管へのリン投与に反応した早期 PTH 分泌機序における迷走神経求心路の役割

消化管へのリン投与に反応した早期 PTH 分泌機序における迷走神経求心路の役割を検討するために、腹部食道周囲を走行する迷走神経求心路をカプサイシンにより遮断した。カプサイシン投与群では sham 群と比較して、リン投与後の早期の血漿 intact-PTH 濃度の上昇が消失した。一方、リン投与後 20 分値以降の血漿 intact-PTH 濃度に差は認められなかった (図2)。血漿リン濃度に差は認められなかった。

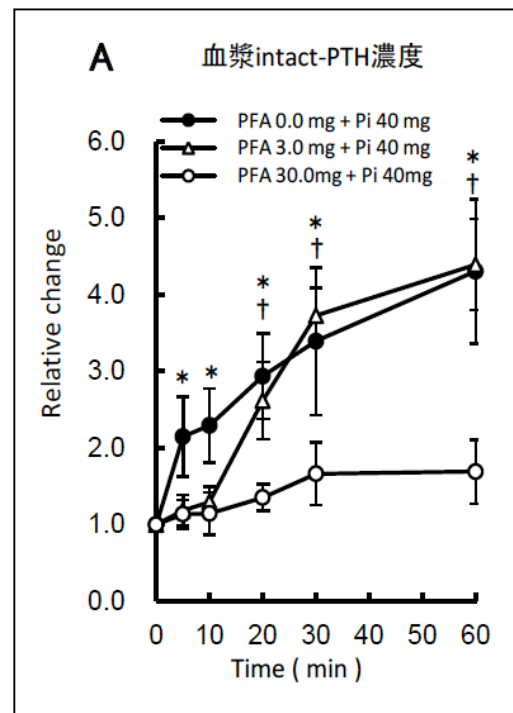
図2 早期 PTH 分泌に対する迷走神経求心路遮断の影響



(3) 消化管へのリン投与に反応した早期 PTH 分泌機序におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーターの役割

Phosphonoformic acid (PFA) は、小腸ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの阻害剤であることから、PFA 存在下で PTH 早期分泌の検討を行った。その結果、PFA 濃度依存的に血漿 intact-PTH 濃度の上昇はリン投与後 5 分値から抑制された (図3)。一方で、PFA により血漿リン濃度は抑制されず、血漿カルシウム濃度は変化がなかった。

図3. 早期 PTH 分泌に対する PFA の影響



(4) リン投与の小腸部位の違いによる早期 PTH 分泌応答の違い

小腸上部または下部に分けてリン 40 mg を投与した際、小腸下部への投与でのみ、血漿 intact-PTH 濃度、血漿リン濃度ともに、投与後 5 分で、0 分値のベースラインと比較して有意な上昇を認めた。血漿カルシウム濃度には変化はなかった。

(5) シナカルセト投与による早期 PTH 分泌抑制が腎 NaPi2a タンパク質発現に及ぼす影響

消化管へのリン投与に反応した早期 PTH 分泌のリン代謝調節における役割を明らかにするために、消化管へのリン投与に反応した早期 PTH 分泌を PTH 分泌阻害剤であるシナカルセトを用いて抑制させた際の腎 NaPi2a 発現を検討した。

腎臓尿細管 BBM における NaPi2a タンパク質発現量は、シナカルセトおよびリン 40 mg 投与群で減少した。

以上の結果から、腸管には食事中的のリンを感知して、血中リン濃度の上昇に先立って PTH 分泌を促進する作用があること、またその作用には下部小腸のナトリウム依存性リン酸トランスポーターと迷走神経求心路が重要な働きを担っていることが明らかとなった。さらにナトリウム依存性リン酸トランスポーターや迷走神経求心路の抑制により、腎臓の近位尿細管における NaPi2a の低下が抑制されたこと、さらに PTH の早期分泌上昇をシナカルセトを用いて抑制したところ尿中リン排泄量が低下したことから、この経路を介した PTH の早期分泌が腎臓での速やかなリン排泄を促進し、生体内のリン代謝恒常性の維持に重要であると考えられた。

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 1 件)

① 竹谷豊、伊美友紀子、Maerjianghan Abuduli、リンの有する新しい作用、CLINICAL CALCIUM、25 巻、1015-1021、2015、査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 竹谷豊、木藤有紀、福田詩織、増田真志、山本浩範、栄養額領域でのトランスポーター研究と今後の展望、トランスポーター研究会 2015 年会、2015 年 6 月 20 日～21 日、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス (東京都・港区)
- ② 木藤有紀、阿部航太郎、中尾真理、大西里奈、伊美友紀子、石田陽子、矢引紀江、大南博和、奥村仙示、竹谷豊、食事性リン摂取による副甲状腺ホルモン初期分

泌機構の解明、第 58 回日本腎臓学会学術集会、2015 年 6 月 6 日～8 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

- ③ 竹谷豊、リン代謝調節機構の破綻と心血管疾患、第 26 回腎とフリーラジカル研究会、2014 年 9 月 20 日、ウイנקあいち (愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹谷 豊 (TAKETANI, Yutaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：30263825

(4) 研究協力者

木藤 有紀 (KITO, Yuki)

徳島大学・大学院栄養生命科学教育部・博士前期課程 2 年

研究者番号：