

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：25201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06440・19K21512

研究課題名（和文）妊娠期の過剰なリン摂取が新生児のエピゲノム変化と成長期のリン反応性に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of high phosphate diet during pregnancy on epigenomics in neonates and reactivity to phosphate during growth periods

研究代表者

多々納 詩織（福田フクダ）（Fukuda-Tatano, Shiori）

島根県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：50825198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、リンの過剰摂取が問題視されている。本研究では、ライフステージごと、特に妊娠期におけるリンの過剰摂取が、新生児の発育や成長期のリン代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、動物モデルを用いた検討を行った。その結果、妊娠期における過剰なリン摂取は新生児のリン代謝異常を引き起こすことが明らかとなった。さらに、母体のリン摂取状態の違いは、成長期の過剰なリン摂取時に引き起こされるリン代謝異常の程度に影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適切なリン摂取は慢性腎臓病の進展予防や治療に重要であるが、リンの過剰摂取が危惧されている。近年、妊娠期における母親の栄養状態が新生児の代謝機構に影響を与え、将来の疾患発症リスクに関与するDOHaD仮説が提唱されており、妊娠期の母体のリン摂取状態が将来の慢性腎臓病の発症や進展に寄与している可能性がある。本研究で示唆された結果をもとに、妊娠期における適切なリン摂取管理を進めることで、胎児期から将来の慢性腎臓病発症予防をする新しい栄養管理法の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, excess intake of dietary phosphate has been a concern. The purpose of this study was to investigate the effects of high phosphate diet at different life stage, especially during pregnancy, on the development in neonates and the phosphate metabolism in the growth period, using an animal model. This study showed high phosphate diet during pregnancy caused abnormal phosphate metabolism in neonates. Furthermore, it was indicated that the difference in maternal phosphate intake effects on reactivity to phosphate during growth periods.

研究分野：応用栄養学

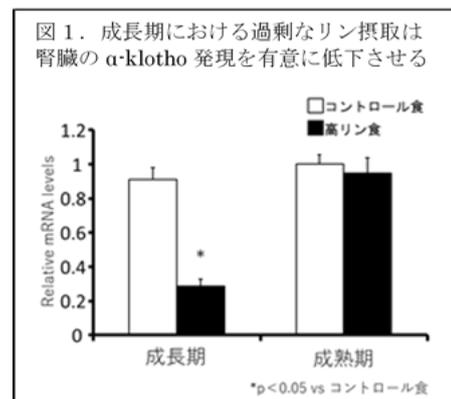
キーワード：妊娠期 成長期 リン FGF23 klotho エピゲノム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) わが国の透析予備軍である慢性腎臓病患者は年々増加傾向にあり、推定で 1,300 万人を超える非常に深刻な問題となっている。さらに、慢性腎臓病患者におけるリン代謝異常による血管石灰化は、心血管疾患の重要な死因であることが明らかにされており、適切なリン摂取は慢性腎臓病の進展予防や治療に重要である。また Foley らは、健常な若年成人の高い血清リン濃度は、正常範囲内であっても将来の心血管疾患発症の重要な危険因子であることを報告している (Foley RN et al. J Am Soc Nephrol, 2009)。リンは骨形成やエネルギー代謝など生体機能維持に必須の栄養素であるが、近年の加工食品の普及による食品添加物からのリン摂取量の増加が危惧されている。食事からのリン摂取量の増加は、血中リン濃度の上昇とともに、線維芽細胞増殖因子 (FGF23) や副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を引き起こす。FGF23 は新たなリン利尿因子であり、腎臓において  $\alpha$ -klotho を共役受容体として FGF 受容体 (FGFR) を介して作用し、腎臓でのリン再吸収を強力に抑制することで尿中リン排泄を促進する。
- (2) リン代謝において重要な役割を担う  $\alpha$ -klotho は老化抑制遺伝子として同定され、過剰なリン摂取は腎臓の  $\alpha$ -klotho 発現を抑制する。さらに、 $\alpha$ -klotho の発現低下や欠損は、高リン血症を惹起し異所性石灰化や骨粗鬆症などの早期老化様病変を誘発する。 $\alpha$ -klotho のプロモーターは CpG 領域に位置しており、DNA メチル化は  $\alpha$ -klotho 発現制御に重要な意味を持つ (Azuma M et al. FASEB J, 2012)。しかしながら、過剰なリン摂取が、 $\alpha$ -klotho の DNA メチル化やその他のエピゲノム変化に及ぼす影響は明らかではない。
- (3) 過剰なリン摂取は血中リン濃度の上昇を引き起こし、異所性石灰化や骨粗鬆症等の早期老化様病変の原因となることが明らかになりつつある。これまで、高齢期と成熟期では過剰なリン摂取がリン代謝異常に与える影響が異なることが確認され (Yoshikawa et al. J Clin Biochem Nutr, 2018)、リン摂取のライフステージ毎の管理の重要性が示された。
- (4) Barker らは、妊娠期における母体の栄養状態が子どもの将来の健康状態に関与することを報告しており (Barker DJ et al. Lancet, 1986)、妊娠期における母親の栄養状態が、新生児の代謝機構に影響を与え将来の疾患発症リスクに関与する DOHaD 仮説が提唱されている。例えば、妊娠前を含めた妊娠期の葉酸不足は新生児の神経管閉鎖障害を引き起こすことが知られ、妊婦は葉酸を積極的に摂取するよう食事摂取基準で定められている。これらのことから、妊娠期の過剰なリン摂取が子どもの将来の慢性腎臓病の発症や進展に寄与している可能性が考えられ、妊娠期の過剰なリン摂取が新生児のリン代謝異常を引き起こすと仮定すると、本研究は将来の慢性腎臓病の発症や進展予防を考える上で非常に重要な課題である。

- (5) これまでに、離乳直後の成長期マウスに高リン食を摂取させた結果、腎臓の  $\alpha$ -klotho 発現が有意に低下し (図 1)、腎臓石灰化が確認された。一方、成熟期マウスにおいては確認されなかった。このことから、成長期マウスにおける高リン食摂取は、成熟期マウスと比較して、早期老化様病変の発症により大きな悪影響を及ぼすことが明らかとなり、ライフステージ毎のリン摂取管理の重要性が示された。しかしながら、妊娠期における過剰なリン摂取が新生児のリン代謝に及ぼす影響は明らかではない。



### 2. 研究の目的

本研究は、妊娠期の過剰なリン摂取が新生児の発育やエピゲノム変化に及ぼす影響を明らかにし、胎児期から将来の慢性腎臓病発症を予防する新しい栄養管理法の確立を目指すものである。具体的には、(1) 妊娠マウスに高リン食を投与することにより、新生児マウスの発育や遺伝子変化に及ぼす影響を検証し、妊娠期の過剰なリン摂取による新生児への影響を明らかにする。(2) エピゲノム変化に関わる因子をマイクロアレイ法により網羅的に探索し、標的因子を絞り込み、具体的なメカニズムを明らかにする。(3) 胎児期に受けた過剰なリン摂取の影響によるエピゲノム変化が、成長期の過剰なリン摂取における反応性に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 妊娠期の過剰なリン摂取が新生児の発育や遺伝子・エピゲノム変化に及ぼす影響の検討  
妊娠マウスに、通常食または高リン食を投与し、新生児マウスの発育に及ぼす影響を検証した。新生児の離乳が終了する3週齢時に解剖を行い、血液や尿、腎臓、骨などの組織を採取した。遺伝子変化については、「腎臓」と「骨」を中心に新生児のリン・カルシウム代謝関連遺伝子やエピゲノム変化関連遺伝子（メチル化酵素等）の解析を mRNA レベルで行った。さらに、過剰なリン摂取で発現抑制される  $\alpha$ -klotho の DNA メチル化について、MSP 法（メチル化特異的 PCR 法）を用いて候補領域の検索を行い、妊娠期の過剰なリン摂取により生じるメチル化領域を同定することを試みた。
- (2) 胎児期に生じたエピゲノム変化による、成長期のリン反応性への関与の検証  
胎児期に受けた過剰なリン摂取の影響によるエピゲノム変化が、離乳直後の成長期の過剰なリン摂取における反応性に及ぼす影響を検証した。妊娠時に高リン食を投与した母マウスから生まれた新生児の離乳が終了する3週齢時から21日間、仔マウスに対して通常食または高リン食を投与し、6週齢時に解剖を行った。血液や尿、腎臓、骨などの組織を採取し、リン代謝異常や腎機能低下に及ぼす影響を検証した。

モデル動物試験については島根県立大学動物実験委員会の承認を得るとともに、動物実験の実施に関する基本的指針に準拠して研究を推進した。

### 4. 研究成果

- (1) 妊娠期に高リン食を投与した母マウスから生まれた新生児マウスの3週齢時点において、尿中リン排泄量の有意な減少が確認された。このことから、新生児は体内にリンが貯留しやすい変化が生じていることが考えられ、将来的に血中リン濃度の上昇や腎機能低下を引き起こす可能性が考えられた。一方、成長期マウスに高リン食を投与することで発現低下を認めた腎臓の  $\alpha$ -klotho 遺伝子については、有意な変化を確認することができなかった。このことから、ライフステージごとで高リン食投与がリン・ビタミンD代謝に及ぼす影響が異なることが示唆され、改めてライフステージごとのリン摂取管理の重要性が示された。エピゲノム変化を検討するため、過剰なリン摂取で発現抑制される腎臓の  $\alpha$ -klotho の DNA メチル化について、MSP 法（メチル化特異的 PCR 法）を用いて候補領域の検索を行ったが、有意な変化は確認できなかった。その他の腎臓におけるリン・カルシウム代謝関連遺伝子の有意な変化も少なかったため、エピゲノム変化が生じている標的臓器を骨と考え、マイクロアレイ法を用いて網羅的な解析を行った。いくつかの興味深い変化は確認できたが、現時点では標的因子の同定には至っていないため、引き続き解析を続けていく。
- (2) 胎児期に受けた母体の過剰なリン摂取による影響が、成長期の過剰なリン摂取に対する反応性に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。その結果、高リン食を投与した母マウスから生まれた仔マウスは、通常食を投与した母マウスから生まれた仔マウスと比較して、過剰なリン摂取時において、血中リン濃度に有意な差は確認されなかったが、尿中リン排泄量の低下傾向が確認された。さらに、腎臓におけるリン・ビタミンD代謝関連遺伝子の mRNA 発現を検討したところ、 $\alpha$ -klotho 遺伝子については、有意な変化を確認することができなかったが、興味深いことに、腎臓でのリン再吸収を担うナトリウム依存性リン酸トランスポーター Npt2a の mRNA 発現が有意に上昇することが確認された。また、腎臓での活性型ビタミンD合成酵素である Cyp27b1 の mRNA 発現が上昇傾向を示すことも確認された。これらのことから、胎児期における母体のリン摂取状態は、成長期の過剰なリン摂取時における、腎臓のリン・ビタミンD代謝関連遺伝子発現に影響を及ぼすことが確認された。

以上より、妊娠期における過剰なリン摂取は新生児のリン代謝異常を引き起こし、母体のリン摂取状態の違いは、成長期の過剰なリン摂取時に引き起こされるリン代謝異常の程度に影響する可能性が示唆された。

これらの成果は、母体のリン摂取状況が新生児期のリン・ビタミンD代謝に影響を及ぼすだけでなく、成長期におけるリン・ビタミンD代謝に影響を及ぼすことを示唆するものであり、胎児期から将来のリン・ビタミンD代謝異常を伴う慢性腎臓病発症を予防する新しい栄養管理法の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuda-Tatano Shiori, Yamamoto Hironori, Nakahashi Otoki, Yoshikawa Ryouhei, Hayashi Mayu, Kishimoto Maki, Imi Yukiko, Yamanaka-Okumura Hisami, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Taketani Yutaka	4. 巻 104
2. 論文標題 Regulation of $\beta$ -Klotho Expression by Dietary Phosphate During Growth Periods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 667 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-019-00525-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福田詩織, 林真由, 岸本麻希, 増田真志, 山本浩範, 竹谷豊
2. 発表標題 ライフステージにおけるリン摂取量がリン・ビタミンD代謝調節系に及ぼす影響
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸本麻希, 福田詩織, 林真由, 増田真志, 竹谷豊
2. 発表標題 妊娠期の高リン摂取が仔の発育やリン代謝調節系に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田詩織, 山本浩範, 中橋乙起, 吉川亮平, 林真由, 岸本麻希, 伊美友紀子, 奥村仙示, 増田真志, 大西康太, 竹谷豊
2. 発表標題 成長期における短期的・長期的食餌性リン負荷がFGF23/ $\beta$ -klothoシグナルに及ぼす影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田詩織, 山本浩範, 中橋乙起, 吉川亮平, 林眞由, 岸本麻希, 伊美友紀子, 奥村仙示, 増田真志, 大西康太, 竹谷豊
2. 発表標題 成長期における過剰なリン摂取がリン・ビタミンD代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第15回日本栄養改善学会中国支部学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiori Fukuda-Tatano, Hironori Yamamoto, Otoki Nakahashi, Ryouhei Yoshikawa, Mayu Hayashi, Maki Kishimoto, Yukiko Imi, Hisami Okumura-Yamanaka, Kohta Ohnishi, Masashi Masuda and Yutaka Taketani
2. 発表標題 Regulation of $\beta$ -klotho Expression by Dietary Phosphate during Growth Periods
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----