

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04127

研究課題名(和文)慢性腎臓病(CKD)重症化予防戦略：リンの時間栄養学解明

研究課題名(英文)Strategy for Prevention of Chronic Kidney Disease (CKD) Severity: Analysis of Phosphorus Time Nutrition

研究代表者

辰巳 佐和子 (Sawako, Tatsumi)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：80420545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性腎臓病(CKD)の重症化予防を目指して「血中リン濃度の概日リズム形成機序解明とリン時間栄養療法」について検討した。肝臓特異的Namp1欠損(LNKO)マウスにおいて、血中リン濃度の概日リズムが異常を示した。さらに、LNKOはCKDを重症化させることが分かった。また、食餌のタイミング、Namp1活性化因子を含む食餌を調整することにより、野生型のCKDマウスにおいて、血中リン濃度の概日リズムは改善し、高リン血症、CKDの進展が抑止された。以上より、Namp1/NAD系の活性化促進、食事のタイミングと食事内容は慢性腎臓病患者のリン時間栄養療法確立のターゲットとなると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマウスで実施したものであるが、血中リン濃度の日内リズム調節因子(Namp1活性化因子)の複数の候補を見出したことで、微量な血液や尿により、Namp1活性化因子を測定することで、慢性腎臓病の進展予測ができると思われる。さらに透析を導入されている患者では、定期的に採血や蓄尿を実施しているため、地域の透析病院などと連携することができれば、時間栄養療法だけでなく、Namp1活性化因子をターゲットとした治療薬の開発や、先制医療にもつながる基盤研究となるため、学術的創造性が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, "Elucidation of Circadian Rhythm Formation Mechanism of Plasma Phosphate Concentration and Phosphate Chrono-nutrition Therapy" was investigated to prevent the severity of chronic kidney disease (CKD). Liver-specific Namp1-deficient (LNKO) mice showed abnormal circadian rhythm of blood phosphorus concentration. Furthermore, LNKO was found to cause severe CKD. In wild-type CKD mice, the circadian rhythm of plasma phosphate concentration was improved, and the progression of hyperphosphatemia and CKD was suppressed by adjusting the timing of the diet and the diet containing Namp1 activating factors. These results suggest that promotion of Namp1/NAD system activation, meal timing and diet content are targets for establishing phosphate-Chrono-nutritional therapy for CKD patients.

研究分野：時間栄養学 腎臓病学

キーワード：時間栄養 リン Namp1

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病(肥満,糖尿病や高血圧など),加齢に伴う腎機能の低下により超高齢社会の我が国では,慢性腎臓病(CKD)の罹患率は高い.CKDの進行に伴う新規透析導入数を減少させるために,CKD重症化予防の新たな先制治療戦略を見出すことは,喫緊の課題である.

腎機能が正常であれば,リンの組織への出入りが厳密に管理され,血中濃度の恒常性が維持されるとされている.また吸収されたリンは様々な組織に過不足なく分配されて利用されると考えられている.また,CKD患者においては非常に早期であっても多臓器でリン代謝異常は生じており,リン組織移行の異常によりCKDが進展し,高リン血症が生じ異所性石灰化,心血管疾患により死亡するリスクが高まる可能性が示唆されてきた.しかしながら,その機序は未だほとんど解明されていなかった.血中リン濃度には,顕著な概日リズムが存在し,CKD患者の高リン血症の是正には,その形成機序の理解が重要であると示唆されてきた.特に,維持透析患者の死亡リスクは,早朝空腹時のリン濃度が規定するとされているが,その機序についての報告もなかった.この血中リン濃度の概日リズムを刻むには,食事時のリンが腸管より吸収され,血中を介して各組織に必要な量のリンを過不足なく出し入れするためのリン組織移行システムが重要と想定されるが,その詳細も不明であった.そのため,時間栄養学を考慮したリン栄養管理についての研究もなされていなかった.

2. 研究の目的

我々は,水溶性ビタミンB3であるニコチンアミド(NAM)の代謝酵素である,ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(Nampt)が血中リン濃度を制御すること(1),さらにNampt/NAMシステムを介した血中リン濃度の概日リズム制御について提示してきた(2,3)これらの研究成果より,血中リン濃度の日内リズム形成機序を明確にすることは,CKD患者のリン組織移行を正常化することに繋がると考えている.つまり,「CKD患者においては全身性のNampt/NADシステムの異常により,血中リン濃度の日内リズムが乱れるため,各組織へのリン移行障害が生じることが原因である」と仮説を立てた.そこで,本研究の目的は,「血中リン濃度の概日リズム形成機序の解明,リン時間栄養療法の開発」により,CKD重症化予防戦略の基盤を構築することとした.

3. 研究の方法

[動物]本研究で行った動物実験は滋賀県立大学動物実験専門委員会の承認ならびに指導のもと,滋賀県立大学動物実験管理規定に従って行った.

飼育は,恒温23の飼育室で明暗サイクル(6:00~18:00)のもとケージ内で飼育した.C57BL/6Jマウス(日本クレア株式会社)をまたCKDモデルマウスとして,5/6腎臓摘出術を施したマウスおよび偽手術を施したマウスを購入した(日本クレア株式会社).アデニン誘発腎不全マウスは,食餌にアデニンを混餌し給餌した.肝臓特異的Nampt欠損マウス(LNKO)はCre-loxP法を用いて作出したNampt^{fllox/fllox}マウスとAlbumin-Creマウスを交配させて作出した.時計遺伝子であるClock変異マウス(Clock^{-/-})は自然発症の変異マウスである.餌,水はともに自由摂食とした.摂食量の評価,尿の回収,糞便の回収の際には,代謝ケージを用いて実験を行った.[血液・尿生化学検査]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,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,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,PTH:Mouse PTH 1-84 ELISA Kit,BUN濃度:Detect X Urea Nitrogen Colorimetric Kitを用いて測定した.総NAD測定は定法に従って実施した(2,3).

[糞・臓器の灰化]24時間の蓄糞,ならびに各種臓器は110℃で24時間以上乾燥した.乾燥重量を測定し,250℃で3時間,350℃で3時間,550℃で24時間灰化した.ピーカーの冷却後,重量を測定し,1% HClを加え,室温で一晩保存後,加熱を行い完全に溶解し,溶解液が5 mlとなるように調整した.溶解液のリンおよびカルシウム濃度を測定し,臓器中,糞中の含量を算出した(4).

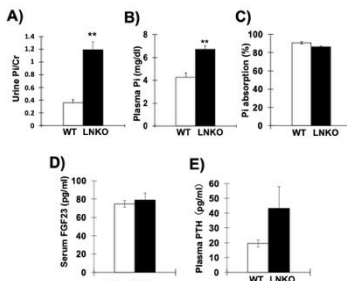
[組織学的検査]腎臓パラフィン薄切標本を作製し,HE染色,Masson-Trichrome染色,Von Kossa染色を実施することで,病理像,腎臓の線維化,カルシウム沈着(異所性石灰化)を検討した.

[統計解析]統計処理は,Two-tail unpaired t-test (Student's t-test)により実施した.平均値±標準誤差(SEM),** $P < 0.01$,* $P < 0.05$.2群間で対応の場合は,Unpaired t-testで検定を行った.対応のない3郡以上のデータは二元配置分散分析(Two-way ANOVA)をおこない,分散に有意が認められた検定に関しては,多重比較検定として,Tukey検定をおこなった.

4. 研究成果

1)肝臓特異的Nampt欠損マウスのリン代謝と血中リン濃度の概日リズムの変動
全身性Namptヘテロ欠損マウス(Nampt^{+/-})では,血中リン濃度の概日リズムが著しく減弱してい

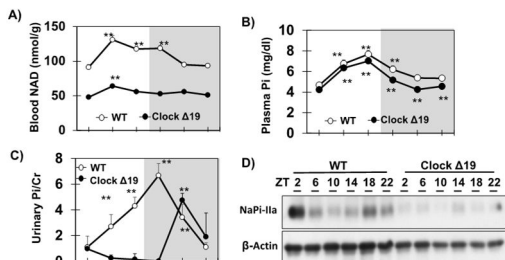
た．肝臓および腸管特異的 Namp1 欠損マウス(LNKO, INKO) マウスにおいて, LNKO では休息期(暗期)に著しく上昇していた．INKO では野生型マウス(Namp1^{flox/flox})と違いがなかった．これらの結果より, 血中リン濃度の概日リズムの制御には, 肝臓 Namp1 の働きが必須であると示唆された．



2) 19 clock 変異マウス(19 clock)におけるリン代謝異常の解析(図2)

19 clock では血中の総 NAD 量が著しく減少していた．図には示していないが, 特に肝 Namp1 の著しい減少, 総 NAD 量の低下が認められた．次に血中リン濃度の概日リズムは野生型と比較し変化は認められず正常な概日リズムを示した．

図2



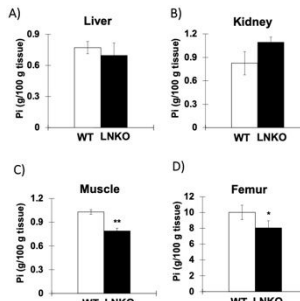
また, 尿中リン排泄の概日リズムが後方ヘシフトしていた．腎臓でリンを再吸収担う NaPi-IIa 発現量が著しく減少しており, そのリズムが消失していることが明らかとなった．また, NaPi-IIa の発現量が減少していると通常尿中リン排泄が上昇するがそのような現象が認められない．さらに血中リン濃度の上昇も認められないことから, 吸収されたリンの各臓器へ移行し蓄積する可能性が示唆された．これらの結果により, 肝臓 Namp1/NAD

系の活性化の減少はリン代謝異常を引き起こすと考えられた．

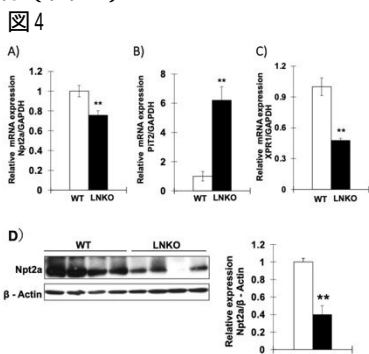
3) 肝臓特異的 Namp1 欠損マウスの組織中リン含量の検討(図3)

LNKO マウスにおける血中リン濃度上昇の原因について, 我々は肝臓 Namp1 欠損によってリン組織移行が変化している可能性を考えた．そのため, 灰化実験により WT マウスおよび LNKO マウスの臓器中リン含量を測定した．WT に比べ, LNKO マウスでは, 骨格筋及び大腿骨のリン含量が有意に低下していた．また, 腎臓のリン含量は LNKO マウスにおいて増加傾向にあった．筋肉や大腿骨へのリン取り込みの減少は示唆された．

図3



4) 肝臓特異的 Namp1 欠損マウスのリントランスポーターの検討(図4)

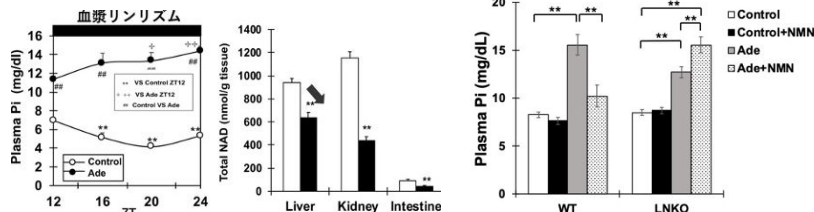


次に LNKO マウスでは尿中リン排泄の上昇, 腎臓リン蓄積傾向がみられたことから, その原因を探るため, 腎臓に発現するリントランスポーターの mRNA 量を調べた．Npt2a の mRNA 発現は, WT と比較して LNKO マウスで有意に低下した．対して, PiT-2 は mRNA 発現は LNKO マウスで有意に低下した．細胞内リン排出トランスポーターである XPR1 の mRNA 発現は LNKO マウスで有意に低下した．次に, Npt2a のタンパク発現を解析したところ, WT マウスと比較して LNKO マウスで約 60% 発現量が低下した．肝臓 Namp1 発現と腎臓トランスポーターの関連についての更なる理解のため, 今後 LNKO マウスの腎臓でのタンパク発現およびリン取り込み・排出機能について詳細に検討していく必要がある．

5) CKD モデルマウスの血中リン濃度の概日リズム異常と総 NAD 量の変化(図5)

次に, アデニン誘発性 CKD マウスの血漿リン濃度の概日リズムの変動を検討した．概日リズムは完全に消失した．肝臓, 腎臓, 腸管の総 NAD 量は著しく低下していた．Namp1/NAD 系の活性化因子の一つである, ニコチンアミドを投与することで, 肝臓の総 NAD 量は著しく改善し, 血中リン濃度が正常レベルにまで低下した．腎機能は著しく低下しているため, 尿中リン排泄量は変動が認められないが, 血中リン濃度が改善したことから, 必要臓器へのリンの組織移行が正常化した可能性が示唆された．一方で LNKO を用いたアデニン誘発性 CKD マウスでは, 野生型(WT)を用いた場合より, 血中リン濃度がさらに高く, ニコチンアミドから Namp1 を介して合成される．

図5



NMN を投与しても, 肝臓 Namp1 欠損により, 肝臓総 NAD 量の改善は認められず, 興味深いことに血中リン濃度の減少が認められなかった．リン組織移行異常に肝臓

Namp1/NAD 系の関与があると示唆された．

6) CKD モデルマウスのリン組織移行障害と腎臓のカルシウム沈着の検討(図6, 図7)

図 6

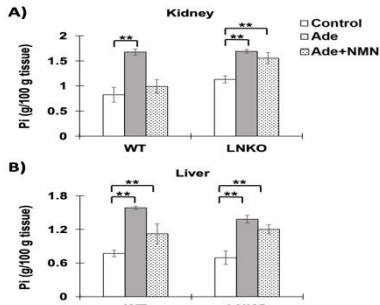
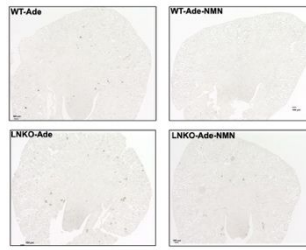


図 7

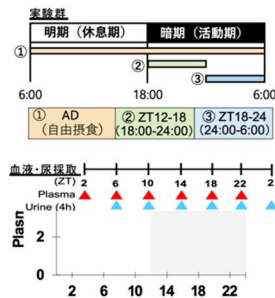


腎臓でのリン含量は野生型、LNKO マウスを用いたアデニン誘発性CKD マウスにNMNを投与すると、WT では腎臓でのリン含量は正常レベルにまで改善するが、LNKO マウスではその効果は全く認められなかった。また、腎臓の

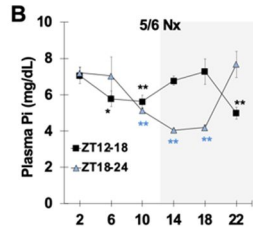
石灰化を評価するため、Von Kossa 染色を検討した。アデニン給餌により、腎臓の石灰化が WT, LNKO で見られた。特に LNKO ではその傾向が強かった。NMN 投与をおこなうと WT では腎臓の石灰化が抑制されたが、LNKO ではその改善効果は見られなかった。腎臓石灰化抑制には肝臓の Namp1/NAD 系に不活性化による可能性が示唆された。

7) 摂食時間を変化させたマウスの血中リン濃度の概日リズムの変動の検討 (図 8)
5/6 腎臓摘出マウス (5/6Nx) で、「いつ」食餌を摂取すると、血中リン濃度の日内リズムの改善が見られるか、空腹時の血中リン濃度が低下するかを検討した。

図 8



マウスは夜行性のため、暗期 (ZT12-18 群と ZT18-24 群) に食餌のタイミングと食餌を摂れる時間を 6 時間のみに制限し、血中リン濃度の概日リズムを検討したところ、自由摂食群 (AD 群) では、5/6 Nx ではアデニン誘発性 CKD マウスと同様に、完全に概日リズムが消失した。一方、摂食時間を 6 時間に制限したマウスでは概日リズムが生じた。また腎臓機能を検討するため、血中 BUN, FGF23, PTH 濃度を検討したところ、暗期の後半である ZT18-24 群では



全ての項目で最も濃度が上昇しており、腎機能をより悪化させた。また、腎臓の線維化も ZT18-24 群では最も悪化しており ZT12-18 群では AD 群より線維化が抑制されていた。今後、食餌のタイミング、時間のみならず、食餌の成分を検討し、時間栄養を考慮したリン栄養管理法を明らかにする必要がある。

まとめ

今回の研究より、血中リン濃度の概日リズム形成は、肝臓 Namp1/NAD 系が関与することが明らかとなり、肝臓 Namp1/NAD 系が破綻すると、リン組織移行が正常に働かず、血中リン濃度が上昇することが明らかとなった。また肝臓 Namp1/NAD 系の抑制は、CKD において異所性石灰化、腎臓線維化が促進させ、CKD の病態を重症化させると示唆された。今後さらに検討を進め、肝臓 Namp1/NAD 系を活性化させる食餌のタイミング、食餌内容を明らかにしたい。

(1) Nomura K, Tatsumi S et al. J Am Soc Nephrol. 2014, 25(4):761-72.
 (2) Miyagawa A, Tatsumi S et al. Kidney Int. 2018, 93(5):1073-1085.
 (3) Tatsumi S, Katai K et al. Pflugers Arch. 2019, 471(1):109-122.
 (4) Fujii O, Tatsumi S et al. Front Endocrinol (Lausanne). 2017, 21;8:359.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 TATSUMI Sawako, KUWAHARA Shoji, SEGAWA Hiroko, MIYAMOTO Ken-ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulation of Plasma Phosphate Concentration and Diurnal Rhythm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oleoscience	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/oleoscience.21.135	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanazaki Ai, Ikuta Kayo, Sasaki Shohei, Sasaki Sumire, Koike Megumi, Tanifuji Kazuya, Arima Yuki, Kaneko Ichiro, Shiozaki Yuji, Tatsumi Sawako, Hasegawa Tomoka, Amizuka Norio, Miyamoto Ken ichi, Segawa Hiroko	4. 巻 8
2. 論文標題 Role of sodium dependent Pi transporter/Npt2c on Pi homeostasis in klotho knockout mice different properties between juvenile and adult stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14324	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 栄養代謝面からみた腎臓リハビリテーション
3. 学会等名 日本腎臓リハビリテーション学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室岡響, 田口裕子, 外池奈美, 桑原頌治, 辰巳佐和子
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるリン代謝異常と 肝臓Namp1-NAD合成系について
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口裕子, 室岡響, 桑原頌治, 辰巳佐和子
2. 発表標題 腸管リン吸収におけるNamp1/NAD系の関与
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原頌治, 外池奈美, 河瀬瑞生, 古川菜摘, 廣瀬かなこ, 田口裕子, 室岡響, 辰巳 佐和子
2. 発表標題 CPP測定による腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳佐和子, 室岡響, 桑原頌治
2. 発表標題 血中リン濃度の日内リズムにおける 肝臓Namp1の役割
3. 学会等名 日本時間栄養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 血中リン濃度調節機構と日内リズム形成
3. 学会等名 第7回日本時間栄養学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 リン代謝における腎 - 肝連関
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑原頌治, 辰巳佐和子 他
2. 発表標題 CPP測定系の樹立:腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴田 重信	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 256
3. 書名 時間栄養学 時計遺伝子, 体内時計, 食生活をつなぐ	

〔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
研究 分担者	桑原 頌治 (KUWAHARA SHOJI) (70645209)	滋賀県立大学・人間文化学部・准教授 (24201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------