

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22300262

 研究課題名（和文）新規バイオマーカーを組入れた糖尿病末期腎症患者のための
食生活環境評価法の開発

 研究課題名（英文）Development of the eating-habits assessment for patients with
the end stage diabetic renal disease

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

透析患者のリン摂取量を調査した。夏期では冷凍食品とインスタント食品、加工食品からのリン摂取量は有意に低かった。また、夏期には野菜からのリン摂取量が増加した。次に骨代謝マーカーとリン摂取量について解析した。加工食品からのリン摂取量とリン代謝マーカー・骨代謝マーカー・骨質に関わる栄養素との相関がみられ、加工食品からのリン摂取量が透析患者の骨代謝・リン代謝に関連していた。さらに FGF23 とリンとの関連を解析したところ、FGF23 濃度が高い群と低い群のリン摂取量には差はなかった。しかし、加工食品からのリン摂取量が高い群で FGF23 が優位に高かった。

研究成果の概要（英文）：

The intake of phosphorus in the dialysis patients was investigated in this study. In the summer, the phosphorus intake from frozen foods, instant foods, and processed foods was significantly lower, compared with in the winter. Moreover, the phosphorus intake from vegetables increased in the summer. Next, we analyzed the effects of the phosphorus intake on the bone-mineral metabolism markers. There was a correlation between the phosphorus intake from processed foods and biomarkers of phosphate metabolism and bone-mineral metabolism, suggesting that the bone-phosphorus metabolism in dialysis patients was affected by the amount of the phosphorus intake from processed foods. Furthermore, when the relation of FGF23 and phosphorus was analyzed, there was no difference in the phosphorus intake from foods between the higher group in serum FGF23 level and the lower group. However, as for the phosphorus intake from processed foods, serum FGF23 level was significantly higher in the higher group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：糖尿病末期腎症患者、高リン血症、FGF23

1. 研究開始当初の背景

生活環境の欧米化に伴い、糖尿病患者数が増加している。これに伴って糖尿病腎症が増加し、腎症による新規血液透析導入者数は26,901人となっている。糖尿病腎症患者の生命予後は不良で、血液透析後の5年生存率は約50%である。血液透析患者では高リン血症が心血管障害の発症や患者死亡と関連しており、血清リン値のコントロールが重要な課題となっている。さらに、近年外食や中食の機会が増えるにつれ添加物としてのリンを多く含む加工食品の摂取量が多くなった。これらの加工食品のリン含有量は食品成分表示に示されていないため、食事指導や患者の自己管理を困難にしている。

近年、血清リン値のコントロールに関わるfibroblast growth factor 23 (FGF-23)/klothoシステムという新たな分子機構が明らかになった。血液透析患者においてFGF-23値は患者の死亡率に関係する独立した因子である。よってFGF-23は慢性腎臓病や血液透析患者の摂取リン量の把握、病態の理解、予後の予測に有効なマーカーであると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病末期腎症のため血液透析を受ける患者のQOLと生命予後を改善することを目的とする。そのために血液透析患者の心血管障害や死亡率との関連が明らかになっている高リン血症に注目し、良好な血清リンの管理に役立つバイオマーカーを確立する。まず透析中の糖尿病末期腎症患者および非糖尿病性末期腎症患者の食生活や臨床データの調査を行い、次のことを明らかにする。

(1) 血液透析中の糖尿病患者の生活習慣調査を実施し、加工食品などリンを多く含む食品の摂取量を把握する。さらに、加工食品の含有リン量の解析データを用いて摂取リン量を推定する。

(2) 血液透析中の患者の骨代謝マーカーやリン値に関わるマーカーの測定を行い、透析患者の病態との関係を明らかにする。

(3) 透析患者の病態やリン摂取量とFGF-23濃度の関連を明らかにする。

(4) これまで報告があるFGF-23とKlothoのSNPsについて解析を実施し、血清リン濃度や血中FGF-23濃度との関連を明らかにする。

(5) 培養系や実験動物を用いてリン摂取とFGF-23/klothoシステムの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血液透析中の糖尿病患者の生活習慣調査と加工食品におけるリン含量の解析

糖尿病性腎症患者におけるリン摂取の実情を明らかにするため、血液透析に通院する患者の生活習慣を調査し、外食や中食の頻度や加工食品などリンを多く含む食品の摂取量を解析する。食事調査法は食物摂取頻度調査法を用いる。さらに、加工食品の含有リン量の解析データを用いて摂取リン量を推定する。

(2) 加工食品の含有リン量の解析

血液透析患者の正確なリン摂取量の計算を行うため、本研究では加工食品などの正確なリン含有量を測定する。調査対象食品は患者の摂取頻度の高い食品やコンビニなどの弁当とする。食品添加物を含んだ形でのリン摂取量を、食品衛生検査指針による試験法(比色法)に基づき分析する。

(3) 血液透析中の患者のリン値に関わるマーカーと骨代謝マーカーの測定

調査対象とする血液透析患者のリン代謝の状態を分析するため、リン値に関わるマーカーである血中リン濃度、PTH濃度、1,25(OH)2D3濃度を測定する。さらにリンとビタミンDの制御ホルモンである血中FGF-23濃度の測定を実施する。骨ミネラル代謝異常(腎性骨異常栄養症)の状態を評価するため骨形成マーカーとしてはアルカリホスファターゼ(ALP)、骨型ルカリホスファターゼ(BAP)、I型プロコラーゲンCプロペプチド(P1CP)、I型プロコラーゲンNプロペプチド(P1NP)を、骨吸収マーカーとしては酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRACP)、骨型特異的酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRACP-5b)を測定する。

(4) FGF-23とKlothoのSNPsの解析

Klotho遺伝子のrs577912のSNPsは、一年後の生存率において有意な差がみとめられ、in vitro研究によりrs577912のSNPsによりKlothoの発現が16-21%低下することがその原因とされている患者ゲノムDNAを用いて、Klotho遺伝子のrs577912の解析を行う。PCR、シーケンスの一連の作業によりこれらのSNPsを解析する。

(5) 培養系や実験動物を用いたリン摂取とFGF-23/klothoシステムの解析

生体内におけるFGF23の機能を検討するためにFGF23 KOマウスを用いて、リン代謝調節因子の検討を行った。食餌性のリン濃度を変えて、関連遺伝子、タンパク質の発現を確認する。

腎臓近位尿細管のモデル細胞であるOK細胞を用いて、リン再吸収分子typeIIcナトリウム依存性リン酸トランスポーターの発現機序と、本遺伝子の変異が原因で起こる低リン血症性くる病の関係明らかにする。これらのことから、FGF23/Klothoシステムを解析する。

4. 研究成果

(1) 血液透析中の糖尿病患者の生活習慣調査と加工食品におけるリン含量の解析

加工食品中のリン含有量の推定のため、市販食品（ハム、インスタント麺、弁当など）を購入し、直接推定することで、調査に用いる加工食品調査表を作成した。弁当においては、幕の内、揚げ物などに分け調査表を作成した。

対象者の年齢は糖尿病 (DM) 患者の方が 6.2 歳有意に高かった。血清リン濃度は非糖尿病 (N-DM) 患者の方が 0.8mg/dL 高く、有意な差があった。リン吸着剤使用者数は DM 患者 8 名、N-DM 患者 22 名であった。1 日の栄養素摂取量を DM 患者、N-DM 患者にわけて検討した結果、各項目で DM 患者、N-DM 患者に有意な差はなかった。また、体重で補正しても有意差はなかった。

次に DM 患者、N-DM 患者にわけてリン摂取量と血清リン濃度との間の相関関係を調べた。しかし DM 患者、N-DM 患者ともにリン摂取量と血清リン濃度との間に相関関係は認められなかった。また、リン吸着剤の影響を考え、リン吸着剤を使用していない DM 患者と N-DM 患者のリン摂取量と血清リン濃度の相関関係を検討した。しかし DM 患者、N-DM 患者ともにリン摂取量と血清リン濃度との間に相関関係は認められなかった。

加工食品からの摂取量においては、対象者の背景、臨床検査値および 1 日の栄養素摂取量では有意な差がなく、外食・中食の摂取頻度もそれらに相関していなかった。加工食品頻度調査の得点結果において、総得点の他に嗜好飲料水に有意差がみられた ($p < 0.01$) (図 1)。意識アンケートの得点結果では総得点と食態度の項目に有意差がみられた ($p < 0.01$)。

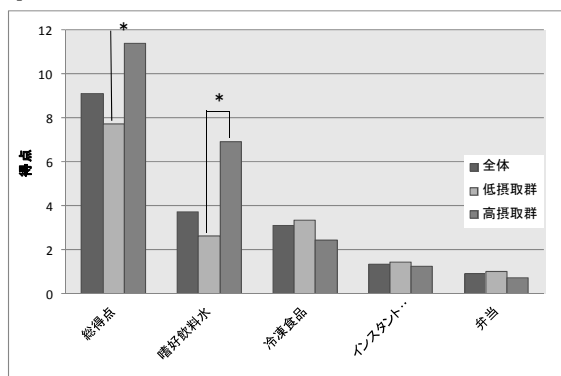


図 1 加工食品からのリン摂取量

1 日のリン摂取推定値への患者背景、食意識アンケートの影響度を検討するため重回帰分析を行ったところ、性別と質問 20「インスタント食品、調理済み冷凍食品やお惣菜をどのくらい利用しますか？」が影響することが分かった。女性の方が高いリン摂取推定値

になりやすいという結果から、男女別に比較したところ実際に女性の方が高い結果となった。

1 日の栄養素摂取量を夏期と冬期にわけて検討した。リン、カルシウム、カリウムの項目で夏期に有意に高いと認められた。次に加工食品からのリン摂取量を夏期と冬期にわけて検討した。冷凍食品やインスタント食品の項目で夏期に有意に低いと認められた。

(2) 血液透析中の患者の骨代謝マーカーとリン値に関わるマーカーの測定

骨代謝マーカーと腎機能を表す検査値との相関、加工食品からのリン摂取量とリン代謝マーカー・骨代謝マーカー・骨質に関わる栄養素との相関がみられ、加工食品からのリン摂取量が透析患者の骨代謝・リン代謝に関連していることが示唆された。またリン吸着剤使用者において、NTX とリン摂取量、FGF23 と加工食品からのリン摂取量との関連が見られた。

リン吸着剤使用の有無と骨代謝に関わる ALP、NTX、ビタミン B₁₂ が関連していた。糖尿病の有無では骨代謝マーカーとの関連は見られなかったが、骨折の有無では糖尿病が骨折に関連している傾向にあった。

対象者の血清 FGF23 濃度を測定した結果、健常者における正常値 (50 pg/ml) に対し、すべての対象者が高値を示した。また、対象者の FGF23 濃度のヒストグラムを描いた結果、分布は偏っていた。したがって、以後の解析には FGF23 濃度の平均値ではなく中央値 (5,480 pg/ml) を用いた。

FGF23 濃度による対象者の背景および血液検査値の違いの有無を検討するため、対象者を血清 FGF23 濃度の中央値で 2 群に分け、差の検定を行った。血清リン濃度においては FGF23 濃度が高い群の方が 0.9 mg/dl 高く、有意差がみられた ($p < 0.01$)。血清クレアチニン濃度は FGF23 濃度が高い群の方が 2.3 mg/dl 高く、有意差がみられた ($p < 0.01$)。その他、服薬状況や血清カルシウム濃度、血清 intact PTH 濃度、血清 1,25(OH)₂D 濃度、血清 klotho 濃度には、有意な差はみられなかった。

対象者を FGF23 濃度の中央値で分けた 2 群間で栄養素摂取推定値の差を検定した。リンや総エネルギー、たんぱく質、カルシウム等の栄養素については、FGF23 濃度の 2 群間における有意な差はみられなかった。次に加工食品摂取頻度調査により、対象者の 1 ヶ月あたりの加工食品からのリン摂取量を推定した。1 ヶ月あたりの加工食品からのリン摂取推定値は、FGF23 濃度が高い群の方が多く、有意な差がみられた ($p < 0.05$)。

血清リン濃度と SQFFQ によるリン摂取推定値、新規バイオマーカーである FGF23 および klotho と SQFFQ によるリン摂取推定値

との関連を調べた結果、いずれのバイオマーカーにおいても、SQFFQ によるリン摂取推定値との有意な相関はみられなかった。一方血中バイオマーカーと加工食品からのリン摂取推定値との相関では、血清リン濃度と血清 klotho 濃度に有意な相関はみられなかったが、血清 FGF23 濃度との相関は $p < 0.05$ で有意となり、相関係数 $R=0.333$ でやや相関があった。

血清 FGF23 濃度に影響する因子を検討するため、ステップワイズ法による重回帰分析を実施した結果を Table 3 に示した。分散分析表 (ANOVA) の結は有意であり、 $R=0.71$ 、 $R^2=0.51$ 、調整済み $R^2=0.47$ であったため、適合度は高いと評価した。これらの変数の標準偏回帰係数はいずれも正であったことから、血清リン濃度が高く、加工食品からのリン摂取推定値が高いほど、血清 FGF23 濃度が高値となりやすいことが示された。

(3) FGF-23 と Klotho の SNPs の解析

解析途中であり、報告出来るデータを有していない。

(4) 培養系や実験動物を用いたリン摂取と FGF-23/klotho システムの解析

新規リン調節ホルモン FGF23 は、腎予後や生命予後と関係することが明らかとなってきたが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、腎にてリンの再吸収を担い、リン調節に直接関与する IIc 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーターの遺伝子欠損モデルマウスを用いて、その機能を検討した。その結果、FGF23 が直接これら分子に効果を及ぼし、調節をしている事が明らかとなった。

IIc 型ナトリウム依存性トランスポーターは、腎近位尿細管に発現し、リンの再吸収を担う分子である。高カルシウム尿症を伴う遺伝性低リン血症性くる病 (HHRH) は、IIc 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター (NaPi-IIc) の変異であることが知られているが、その変異と疾患の関係は不明であった。本研究では、HHRH 患者に見られる変異を導入した変異型 NaPi-IIc を、細胞を用いて機能と局在について検討した。その結果、機能低下や局在以上が認められ、これらの異常が、疾患発症の原因となることが明らかとなった。

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 28 件)

① Yamada F, Ito M. et al. Role of serine 249 of ezrin in the regulation of sodium-dependent phosphate transporter NaPi-IIa activity in renal

proximal tubular cells. *J Med Invest.* 60(1-2):27-34. 2013 査読有
http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/pdf/v60_n1-2_p027.pdf

② Furutani J, Ito M. et al. Dietary inorganic phosphorus regulates the intestinal peptide transporter PepT1. *J Ren Nutr.* 23(2):e11-20. 2013 査読有
doi: 10.1053/j.jrn.2012.02.006.

③ Haito-Sugino S, Ito M., et al. Processing and stability of type IIc sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(9):C1316-30. 2012 査読有
doi: 10.1152/ajpcell.00314.2011.

④ Ryuko S, Ma Y, Ma N, Sakaue M. Kuno T. Genome-wide screen reveals novel mechanisms for regulating cobalt uptake and detoxification in fission yeast. *Mol Genet Genomics.* 287(8):651-62. 2012 査読有
doi: 10.1007/s00438-012-0705-9.

⑤ 岡村吉隆、坂上元祥 睡眠状態と食行動が BMI に及ぼす影響について—女子学生とその両親を対象として日本栄養士会雑誌 55(6):489-495 2012 査読有

⑥ Kuwahara S., Ito M. et al Identification and functional analysis of a splice variant of mouse sodium-dependent phosphate transporter Npt2c. *J Med Invest.* 59(1-2):116-26. 2012 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/59/1/1%2C2/59_1%2C2_116/_pdf

⑦ Tanimura A, Ito M. et al. Analysis of different complexes of type IIa sodium-dependent phosphate transporter in rat renal cortex using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *J Med Invest* 58(1-2): 140-147, 2011 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/58/1/1%2C2/58_1%2C2_140/_pdf

⑧ 曲木恵美、塚本 眞弓、坂上 元祥 2型糖尿病患者の肥満関連遺伝子多型と肥満および血糖コントロールとの関係 日本予防医学学会雑誌 6(1):21-28, 2011 査読有
http://jspm.jp.net/magazine/pdf/mokuji_Vol.6No.1.pdf

⑨ Ito M. et al. An apical expression Signal of the renal type IIc Na⁺-dependent phosphate cotransporter in renal epithelial cells. *Am J Physiol*

Renal Physiol. 299(1):F243-54 2010
査読有 doi: 10.1152/ajprenal.00189.2009

- ⑩岡村吉隆、田村智子、岡村幹夫、坂上元祥
奥田豊子 睡眠時無呼吸症候群(ASA)患者
重症度に影響する肥満、食意識・食行動お
よび生活習慣 栄養学雑誌 68(3), 166-
172, 2010 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/eiyogakuzashi/68/3/68_3_166/_pdf
- ⑪Tomoe, Y. Ito M. et al. Phosphaturic
action of fibroblast growth factor 23
in Npt2 null mice. Am J Physiol
Renal Physiol. 298(6): F1341-50, 2010
査読有
doi: 10.1152/ajprenal.00375.2009.

[学会発表] (計 37 件)

- ①津本佳奈 糖尿病末期腎症で血液透析を
受ける患者のリン摂取量の季節変動. 第 56
回日本糖尿病学会年次学術集会 2013 年 5
月 16~18 日、熊本市市民会館他(熊本県)
- ②津本佳奈 血液透析患者のリン摂取量に
影響する加工食品の利用頻度と食意識調
査 第 16 回日本病態栄養学会年次学術集
会 2013 年 1 月 12~13 日、京都国際会館
(京都府)
- ③森本里枝 診療所に通院する 2 型糖尿病患
者の血糖コントロールやセルフケアと自
尊感情の関係 第 16 回日本病態栄養学会
年次学術集会 2013 年 1 月 12~13 日、
京都国際会館(京都府)
- ④塩崎雄治 Cell density regulates
expression of type II Na⁺-dependent
phosphate cotransporter Npt2a and
Npt2c in Proximal Tubule Epithelial Cell.
第 35 回 日本分子生物学会年会 2012 年 12
月 11~14 日福岡国際会議場(福岡県)
- ⑤古戎なな恵 血液透析を受ける糖尿病末
期腎症患者のリン摂取量の調査 第 49 回
日本糖尿病学会近畿地方会 2012 年 11 月
17 日 京都国際会館(京都府)
- ⑥井垣誠 2 型糖尿病患者に対する運動療法
は血流依存性血管拡張反応を改善させる
第 55 回糖尿病学会年次学術集会 2012 年
5 月 17~19 日パシフィコ横浜(神奈川県)
- ⑦福山悦子 肥満 2 型糖尿病患者の食事摂取
と血中アディポネクチンの関連について
第 15 回日本病態栄養学会年次学術集会
2012 年 1 月 14~15 日 京都国際会館(京都
府)
- ⑧岡村吉隆 入院時早期における糖尿病患
者の食後血糖値に影響を及ぼす栄養素等
の要因 第 15 回日本病態栄養学会年次学
術集会 2012 年 1 月 14~15 日 京都国際
会館(京都府)
- ⑨森光ゆり子 2 型糖尿病患者における血糖

コントロール・セルフケアと自尊感情との
関係 第 48 回日本糖尿病学会地方会
2011 年 10 月 29 日大阪国際会議場(大阪府)

- ⑩Kanbara S. The relationship between
health behavior and psychological stre
ss of diabetic patients in Yogyakarta, In
donesia. The world Academy of
nursing society, 2nd Conference 2011
年 7 月 14 日 Universai Expo Center
(メキシコ)
- ⑪Igaki M. Effect of frequency of exer
cise therapy on improvement in
insulin resistance in overweight
patients with lifestyle-related diseases.
American Diabetes Association's 71st
Scientific Sessions San Diego
Convention Center, (USA)
- ⑫井垣誠 運動療法の頻度は肥満生活習慣
病患者のインスリン抵抗性改善効果に影
響する 第 54 回日本糖尿病学会年次学術
集会 2011 年 5 月 19~21 日 さっぽろ芸術
文化の館(北海道)
- ⑬伊藤美紀子 慢性腎臓病におけるリンの
問題 第 14 回日本病態栄養学会年次学術
集会 2011 年 1 月 15~16 日パシフィコ横
浜(横浜市)
- ⑭Kanbara S. Spiritual belief, self
regulations and emotional distress of
diabetic patients in Yogyakarta,
Indonesia. The 8th International
Diabetes Federation Western Pacific
Region Congress 2010 年 10 月 17-20 日
BEXCO (Korea)
- ⑮Magaki M. Dietary behavior, rather
Than polymorphisms in the thrifty
genes, was associated with the efficacy
of the weight reduction program in
Japanese females. American Diabetes
Association 70th Scientific Sessions
2010 年 6 月 25-29 日 Orange County
Convention Center (USA)

[図書] (計 11 件)

- ①伊藤美紀子 講談社サイエンティフィッ
ク 栄養生理学・生化学実験: 血中ミネラ
ル(Fe, Ca, Mg, P)の定量 2012 年
76-80
- ②坂上元祥、春日雅人 南江堂 New 薬理
学 改訂第 6 版 膵ホルモン 2011 年
209-212
- ③伊藤美紀子他 日本メディカルセンター
腎不全医療における栄養管理の基礎知識、
栄養不良の定義 2011 年 71-81

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

神原 咲子 (KANBARA SAKIKO)
近大姫路大学・看護学部・講師
研究者番号：90438268

(H22-23 年度)

新田 陽子 (NITTA YOKO)
兵庫県立大学・環境人間学部・助教
研究者番号：70403318

(H24 年度)

(3) 連携研究者

なし