

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19455

研究課題名(和文)リン・ビタミンD代謝を制御する多臓器連関の解明

研究課題名(英文)Clarification of multi-organ communication controlling with phosphate and vitamin D metabolism.

研究代表者

金子 一郎 (KANEKO, Ichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：40389515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)に伴う骨・ミネラル代謝異常は、リン代謝破綻に起因する“多臓器疾患”である。本研究では多臓器に渡るミネラル代謝破綻機序とその治療効果について解析を行った。CKD誘発ビタミンD受容体(VDR)欠損マウスでは、血中尿素窒素やリン濃度の上昇抑制が見られ、VDRの阻害が腎保護に効果的であることが示唆された。さらに組織選択的VDRの重要性と低リン食、ビタミンD投与による治療効果も評価している。

また、メタボローム解析装置を用いて、生体内の代謝産物を網羅的に検出し、膨大なデータを得た。これらの結果を用いてCKD-MBD発症の早期診断マーカーや多臓器合併症予測マーカーの同定を試みている。

研究成果の概要(英文)：Bone-mineral metabolic abnormalities associated with Chronic Kidney Disease (CKD) are "multiple organ diseases" caused by failure of phosphate metabolism. In this study, we analyzed the mechanism of abnormal mineral metabolism across multiple organs and its therapeutic effects. In CKD-induced vitamin D receptor (VDR)-deficient mice, suppression of blood urea nitrogen and phosphorus elevation was observed, suggesting that the inhibition of VDR is effective for renal protection. Furthermore, the importance of tissue selective VDR action and the therapeutic effects by low phosphate diet or vitamin D administration are evaluated.

Also, we comprehensively detected metabolic (biological) products using metabolome analyzers, and obtained enormous data. Based on these results, we are attempting to identify early diagnostic markers for CKD-Mineral Bone Disorder and predictive markers for multiple organ complications.

研究分野：腎臓分子栄養学

キーワード：リン ビタミンD

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)は、生活習慣や食習慣の変化を背景に糖尿病性腎症の増加も相まって世界的に増加の一途を示している。慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常“CKD-MBD”は、リン代謝破綻に起因する“多臓器疾患”である。CKD患者にとって、骨異栄養症や血管石灰化のみならず、最近では、心肥大を伴う心疾患や骨格筋萎縮による予後の悪化が極めて深刻な問題である。CKDでは、血中FGF23の上昇と1,25Dの低下が比較的早期より観察され、副甲状腺機能亢進、骨代謝異常、心疾患など様々な合併異常を引き起こす原因となっている。また、終末期では腎臓リン代謝破綻により生体内にリンが蓄積する結果、往々にして血管石灰化、骨繊維化、筋萎縮等を引き起こすことから全身性の包括的理解と早期予防が必須である。

血管や軟組織の異所性石灰化の主な発症要因は、平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への形質転換により、そこにカルシウム・リンが沈着することで起こると考えられる。従って、潜在的リン蓄積、低1,25D、過剰FGF23を統括的に考慮し、CKD早期から臓器・組織各々に応じた複合的対策を行なうことが透析導入を回避するための非常に有益な方法であると考えられる。

2. 研究の目的

CKD-MBD発症をモデルマウスで再現し、組織別CKD多臓器疾患の進行を検討する。同時にCKD-MBD発症VDR欠損マウスを同様の方法で作製することで、CKD-MBD発症における組織選択的VDRの役割についても検討する。とくに腸管及び筋組織(骨格筋、心筋、平滑筋)でのVDRの役割について注目し、異所性石灰化や筋萎縮発症機序と治癒効果について評価する。

- (1) CKD-MBD早期に起こる組織選択的リン蓄積、ビタミンD代謝、FGF23産生の実態解明。
- (2) CKD-MBDから起こる多臓器連関疾患(特に筋組織)の発症機序と治療効果の評価。
- (3) CKD-MBDの早期診断マーカーや多臓器合併症予測マーカーの同定。

3. 研究の方法

- (1) アデニン誘導CKD-MBDモデルマウスを作製し、CKD進行に応じた各組織別リン代謝、ビタミンD代謝、FGF23遺伝子の変動を検討し、合併症が起こりうる組織を同定する。
- (2) CKD-MBDの動脈(平滑筋石灰化)、心臓(心筋や動脈弁石灰化)、骨格筋(筋萎縮)に注目し、低リン食やビタミンD治療による構造的且つ機能的改善効果の評価する。
- (3) DNAマイクロアレイによるCKD-MBD早期と末期の組織特異的遺伝子発現変動解析を行い、メタボロミクスによってCKD-MBD合併症予測のためのバイオマーカーの同定を行う。

4. 研究成果

- (1) CKD-MBD発症をモデルマウスで再現し、組織別にCKD多臓器疾患の進行を検討した。同時にCKD-MBD誘発ビタミンD受容体(VDR)欠損マウスを同様の方法で作製することで、CKD-MBD発症における組織選択的VDRの役割についても検討を行った。とくに血管及び筋組織(骨格筋、心筋、平滑筋)でのVDRの役割について注目し、異所性石灰化や筋萎縮発症機序と治癒効果について評価した。CKD-MBD誘発VDR欠損マウスでは、血中尿素窒素やリン濃度の上昇抑制が見られ、VDRの阻害が腎保護に効果的であることが示唆された。FGF23産生についても検討を行ったが、CKD誘導における骨組織以外でのFGF23発現に大きな変動はみられなかった。CKD-MBDにおける心臓、大動脈について、血管石灰化の程度をVonKossa染色を用いて組織化学的に評価した。さらに、血管細胞から骨芽細胞様細胞分化の程度を調べるため、骨芽細胞マーカーであるRunx2やOsteocalcinの発現を確認した。また心臓は重量を測定し、心肥大マーカーであるANP、skACT、 β MHC等々を評価した。CKD-MBDにおける骨格筋組織(腓腹筋、ヒラメ筋)について、各々重量及びサイズの計測を行った。また、HE染色を行い、顕微鏡下で筋繊維を観察、筋繊維数や筋繊維横断面積を測定し、筋萎縮を形態学的に評価した。尚、解剖の前にはグリップテストを行い、骨格筋機能として計測した。骨格筋に発現するミオシン重鎖(MyHC)アイソフォームmRNA発現を定量PCR、蛋白発現を免疫組織化学染色、Western blottingにて検討した。また、筋機能調節因子であるMyf5、Myogenin、MyoD、MRF4、E2Aについて検討し、生化学的に筋機能を評価した。また、筋組織内における局所でのビタミンD代謝機序を明らかにするため、合成酵素であるCyp27b1や不活化酵素であるCyp24a1等の発現を評価した。
- (2) 低リン食や経口活性型ビタミンD投与がCKD多臓器疾患に及ぼす治療効果の評価した。特にCKD時の筋組織にとって低リン食や活性型ビタミンDが有用であることが示唆された。以上のことから、CKDにおいてVDR阻害作用は、腸管でのリン吸収抑制、血管でのリン蓄積を抑制することと、反面VDRを介した筋組織や骨量の維持効果があることが考えられる。CKD進行を遅らせる、その最大限の効果を得るためには、組織選択的にVDRを制御する必要があることが示唆される。
- (3) CKD-MBDモデルマウスから回収したサンプルを用い多臓器に渡るミネラル代謝破綻機序とその治療効果についてメタボローム解析とDNAマイクロアレイ解析を中心に検討した。メタボローム解析では、CE/MS装置を中心に用い、既知の低分子(標準検体として脂

肪酸、アミノ酸、核酸、エネルギー代謝に関する110因子)の変動について徹底的に解析した。またパスウェイ解析により生物学的な臓器間および細胞内シグナルの関連性を評価した。引き続き、血液や尿中に含まれる代謝産物を抽出し、CKD-MBDの早期診断マーカーや多臓器合併症予測マーカーに適している候補因子を探索している。さらに、CKD ステージ各々の、腓腹筋、ヒラメ筋、心臓、動脈、結腸等 mRNA を用い DNA マイクロアレイ解析にて、創薬ターゲットを網羅的に明らかにすることで次世代の創薬デザインに役立て、CKD-MBD の効果的予防法や多臓器疾患対策について展開している。

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 11 件)

原著論文・総説

- ① Ikuta K, Segawa H, Sasaki S, Hanazaki A, Fujii T, Kushi A, Kawabata Y, Kirino R, Sasaki S, Noguchi M, Kaneko I, Tatsumi S, Ueda O, Wada NA, Tateishi H, Kakefuda M, Kawase Y, Ohtomo S, Ichida Y, Maeda A, Jishage K, Horiba N, Miyamoto KI. Effect of Npt2b deletion on intestinal and renal inorganic phosphate (Pi) handling. *Clin Exp Nephrol*. 22(3):517-528, 2018. DOI: 10.1007/s10157-017-1497-3. 査読有
- ② Miyagawa A, Tatsumi S, Takahama W, Fujii O, Nagamoto K, Kinoshita E, Nomura K, Ikuta K, Fujii T, Hanasaki A, Kaneko I, Segawa H, Miyamoto KI. The sodium phosphate co-transporter family and nictinamide phosphoribosyltransferase contribute to the daily oscillation of the plasma inorganic phosphate concentration. *Kidney Int*. 93(5):1073-1085, 2018. DOI: 10.1016/j.kint.2017.11.022. 査読有
- ③ Dussik CM, Hockley MM, Grozić A, Kaneko I, Zhang L, Sabir MS, Park J, Wang J, Nickerson C, Yale S, Rall C, Foxx-Orenstein A, Borrer C, Sandrin TR, Jurutka PW. Gene expression profiling and assessment of vitamin D and serotonin pathway variations in patients with Irritable Bowel Syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*. 24(1):96-106, 2018. DOI: 10.5056/jnm17021. 査読有
- ④ Fujii O, Tatsumi S, Ogata M, Arakaki T, Sakaguchi H, Nomura K, Miyagawa A, Ikuta K, Hanasaki A, Kaneko I, Segawa H, Miyamoto KI. Effect of osteocyte-ablation on inorganic phosphate metabolism: analysis of bone-kidney-gut axis. *frontiers in Endocrinology*. 8:859, 2017. DOI: 10.3389/fendo.2017.00359. 査読有
- ⑤ Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI. Control of phosphate balance by the kidney and intestine. *Clin Exp Nephrol*. 21(suppl1):21-26, 2017. DOI: 10.1007/s10157-016-1359-4. 査読有
- ⑥ Tatsumi S, Miyagawa A, Kaneko I, Shiozaki Y, Segawa H, Miyamoto K. Regulation of renal phosphate handling: inter-organ communication in health and disease. *J Bone Miner Metab*. 234(1):1-10, 2016. DOI: 10.1007/s00774-015-0705-z. 査読有
- ⑦ Segawa H, Shiozaki Y, Kaneko I, Miyamoto K. The Role of Sodium-Dependent Phosphate Transporter in Phosphate Homeostasis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 61(Suppl):S119-21, 2015. DOI: 10.3177/jnsv.61.S119. 査読有
- ⑧ Shiozaki Y, Segawa H, Ohnishi S, Ohi A, Ito M, Kaneko I, Kido S, Tatsumi S, Miyamoto K. Relationship between sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIc) function and cellular vacuole formation in opossum kidney cells. *J Med Invest*. 62(3-4):209-218, 2015. DOI: 10.2152/jmi.62.209. 査読有
- ⑨ Kaneko I, Sabir MS, Dussik CM, Whitfield GK, Karrys A, Hsieh JC, Haussler MR, Meyer MB, Pike JW, Jurutka PW. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D. *FASEB J*. 29(9):4023-4035, 2015. DOI: 10.1096/fj.14-269811. 査読有
- ⑩ Kaneko I, Saini RK, Griffin KP, Whitfield GK, Haussler MR, Jurutka PW. FGF23 gene regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D: opposing effects in adipocytes and osteocytes. *J Endocrinol*. 226(3):155-66, 2015. DOI: 10.1530/JOE-15-0225. 査読有
- ⑪ Marshall PA, Jurutka PW, Wagner CE, van der Vaart A, Kaneko I, Chavez PI, Ma N, Bhogal JS, Shahani P, Swierski JC, MacNeill M. Analysis of differential secondary effects of novel rexinoids: select rexinoid X receptor ligands demonstrate differentiated side effect profiles. *Pharmacol Res Perspect*. 3(2):e00122, 2015. DOI: 10.1002/prp2.122. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 金子一郎. リン利尿因子 FGF23 の転写調節機序の解明. 第 50 回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会. (鳥取, 2017)
- ② 金子一郎. 脳機能におけるビタミン D の役割. 第 64 回日本栄養改善学会 (徳島, 2017 年)
- ③ 金子一郎. 脳機能におけるビタミン D の役割. 日本ビタミン学会第 68 回大会 (富山, 2016 年)
- ④ Ichiro Kaneko. FGF23: A Nurr-1 dependent phosphaturic hormone gene that is transcriptionally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D. *XVIII*

International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease 2016. (Okinawa, Japan. 2016)

- ⑤ **金子一郎**. 脳機能におけるビタミン D の役割について. **第 19 回日本病態栄養学会** (横浜, 2016 年)
- ⑥ **Ichiro Kaneko**. 1,25-Dihydroxyvitamin D enhances human tryptophan hydroxylase gene expression through vitamin D responsive elements in human brain cells. *Asian Congress of Nutrition 2015.* (Yokohama, Japan. 2015)

[図書] (計 4 件)

- ① 池田彩子, 井上裕康, 沖嶋直子, 香川靖雄, **金子一郎**, 亀井康富, 木戸慎介, 桑波田雅士, 竹中優, 立花宏文, 中田理恵子, 服部正平, 松本高広, 三坂巧, 宮本賢一, 山下広美, 山田一哉, 山本浩範. ミネラル、非栄養素の分子栄養学『**NEXT 分子栄養学**』 総 223 ページ (P111-121), 2018 年 3 月 27 日発行, 講談社
- ② 貝原奈緒子, **金子一郎**, 桑波田雅士, 重村泰毅, 高橋律子, 友竹浩之, 古谷美知, 増田真志, 宮田富弘, 安澤俊紀. ミネラル (無機質) の栄養, 『**NEXT 新・栄養学総論**』 総 156 ページ (P94-111), 2016 年 11 月 7 日発行, 講談社
- ③ **Kaneko I**, Yamamoto H, Ikuta K, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI. Transcriptional Regulation of Sodium-Phosphate Cotransporter Gene Expression. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Total pp558 (Chapter 36, pp437-445). September 29th, 2016.
- ④ Haussler MR, Saini RK, Sabir MS, Dussik CM, Khan Z, Whitfield GK, Griffin KP, **Kaneko I**, Jurutka PW. Vitamin D Nutrient-Gene Interactions and Healthful Aging. *Molecular Basis of Nutrition and Aging*. Total pp758 (Chapter33, pp441-461). April 28th, 2016.

[その他] (計 5 件)

- ① **金子一郎**, 宮本賢一, 二川健. ビタミン D と筋組織. 『**Clinical Calcium**』 Vol.27 No.11 P63-70, 2017. 平成 29 年 10 月 28 日発行. 医薬ジャーナル社
- ② **金子一郎**, Sabir MS, Dussik CM, Whitfield GK, Karrys A, Hsieh JC, Haussler MR, Meyer MB, Pike JW, Jurutka PW. 活性型ビタミン D は、トリプトファン水酸化酵素およびレプチン遺伝子発現を制御する. 『**ビタミン**』 Vol.91 No.2 P132-134, 2017. 平成 29 年 2 月 25 日発行. 日本ビタミン学会
- ③ **金子一郎**, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一. 尿細管リン再吸収障害によるくる病/骨軟化症. 『**腎と透析診療方針 2016, 腎と透析 vol180 増刊号**』 P300-306, 2016. 平

成 28 年 6 月 10 日発行. 東京医学社.

- ④ **金子一郎**, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一. FGF23. 『**腎臓内科・泌尿器科**』 2 (6) : 581-587, 2015. 平成 27 年 12 月 28 日発行. 科学評論社.
- ⑤ **金子一郎**, 瀬川博子, 辰巳佐和子, 宮本賢一. 遺伝性リン代謝異常症. 『**日本腎臓学会誌**』 Vol.57 No.4 P758-765, 2015. 平成 27 年 5 月 30 日発行. 東京医学社.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 一郎 (KANEKO, Ichiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学系)・助教

研究者番号 : 40389515