

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：33403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00875

研究課題名(和文) 生体リン・ビタミンDセンシング機構の解明と新規CKD-MBD診断・予防法の開発

研究課題名(英文) Analysis of phosphorus/vitamin D sensing mechanism and development of the novel CKD-MBD diagnosis/prevention methods

研究代表者

山本 浩範 (Yamamoto, Hironori)

仁愛大学・人間生活学部・教授

研究者番号：60314861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性腎臓病CKDや透析患者に生じる心・血管組織への石灰化に至らしめる腎不全の病態CKD-MBDの解明および新しい食事療法の開発の基盤となるリン・ビタミンDセンシング機構を解明することとして食事性リンの遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。リン含有量の異なる食餌を与えたマウス腎臓および小腸、肝臓、骨、血管より全RNAを抽出し、マイクロアレイ解析およびGene Ontology解析を行った。その結果、腎臓におけるリン感受性遺伝子群としてリン・ビタミンD代謝や解毒代謝の調節に関連する遺伝子、時計遺伝子の発現変動が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、腎臓病の発症進展に関して予防または治療する観点から離乳期、成長期、壮年期など発達段階や各ライフステージにおいて食事からのリン摂取が生体にどのような影響を及ぼすのか、体内での栄養素、リンやカルシウム、ビタミンDの代謝調節の変動を明らかにした。本研究成果は、リンセンシング機構の解明という新しい研究フィールドを開拓するものであり、学術的意義がある。また、リン管理による新規疾患予防・診断・治療戦略の提案およびリン摂取目標値(食事摂取基準)の策定のための科学的エビデンスとなることで、国民の健康増進、健康寿命の延長に寄与することが期待できることから社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism of CKD-MBD (chronic kidney disease-mineral bone disorder) leading the calcification of cardiovascular tissue in CKD and/or dialysis patients, and establish a phosphorus/vitamin D sensing mechanism that is the basis for the development of a new diet. The effect of dietary phosphorus on gene expression was examined. Total RNA was extracted from kidney and small intestine, liver, bone, and blood vessels in mice fed with dietary phosphorus (1.5%, 1.2%, 0.6%, 0.2%), and microarray and gene ontology analysis. As a result, we found several genes related the phosphorus/vitamin D metabolism and detoxification metabolism as a phosphorus-sensitive gene group.

研究分野：臨床栄養

キーワード：腎臓病 リン ビタミンD 栄養代謝 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎不全透析患者で高頻度に見られる慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)は、高リン血症および低ビタミンD血症、二次性副甲状腺機能亢進により腎性骨異常栄養症、血管や心臓における異所性石灰化を主とする心血管疾患発症および死亡リスクを増大させることが知られている。また、腎機能が正常でも高リン血症は、心不全の発症および死亡リスクが上昇することや、リンおよび活性型ビタミンDの血中濃度は日内リズムが存在することが報告されている。このことから、食事リンの量的・質的・時間的な摂取管理は、ビタミンD・カルシウム・骨代謝や腎疾患の発症・進展予防に役立つだけでなく、心血管疾患の合併予防にも重要とされている。しかしながら、リンは生体の腎臓、骨、腸管だけでなく肝臓、血管、脳など様々な臓器で複雑に応答し、さらに、発達段階でのリン・ビタミンDの利用効率やビタミンD代謝の日内リズムに影響を与えると考えられる。そのため、生体におけるリンとビタミンDの作用およびセンシング機構を理解することが新しいCKD-MBDの診断・予防法の確立に必要な不可欠である。

これまで我々は、ヒトビタミンD受容体(VDR)遺伝子の同定と転写調節機構の解明、新規ビタミンD製剤(2MD)の生物学的特徴を科学的に証明した。さらに、甲状腺ホルモン受容体および脂質代謝調節因子SREBP1によるビタミンD合成酵素CYP27B1遺伝子の転写制御機構を明らかにした。また、腎でのリン再吸収調節の分子機構の解明、健康人での高リン食摂取後のカルシウムおよびリン、調節因子の副甲状腺ホルモン(PTH)やFibroblast Growth Factor 23 (FGF23)、活性型ビタミンDの経時的変動と役割およびPKC活性化や酸化ストレス産生を介した血管内皮機能へのリンの影響を明らかにした。また、CKD-MBDを呈するKlotho変異マウスの腎臓、血管および心臓において、スタニオカルシン2が異所性石灰化を抑制することを発見した(Bone 2012)。近年、我々は、トランスクリプトーム解析により腸管および肝臓においてリン感受性遺伝子群として、栄養素や薬物の体内解毒、癌ストレス制御に重要な転写因子Nrf2、日内リズム制御に重要な時計遺伝子(Clock, BMAL1)、そして骨石灰化抑制因子Fetuin-Aを同定した。さらに、プロテオミクス解析により、腎Klotho、CYP27b1や肝臓Fetuin AがCKD-MBDの発症制御に関与し、疾患特異的に食事性リンをセンシングすることを新たに見出した。

このことから、生体リン・ビタミンDセンシング機構には、従来報告されているPTH・FGF23を介した調節系と共に、複数の因子による疾患特異的・日内リズムに依存的な調節機構が存在することが示唆され、疾患・日内リズム特異的な生体リン・ビタミンDセンシングの分子基盤の解明は、CKD発症とその合併症のCKD-MBDへの進展や健康寿命延長に対する統合的理解につながるものである。

2. 研究の目的

栄養素固有の標的遺伝子の同定およびセンシング機構の解明は、栄養素の生体作用を理解する上で必須であり、健康の維持、疾病の診断や治療、予防を考える上で重要である。これまで申請者は、ミネラル・ビタミンの生体センシング機構の解明を行い、最近ではリン感受性遺伝子群として体内解毒、体内時計、血管石灰化を制御する遺伝子の同定と慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常CKD-Mineral and Bone Disorders; CKD-MBDにおけるCYP27b1の変異修飾化タンパクの同定に成功した。そこで本研究では、ヒト、動物、細胞を用いたオミックス解析による新たなリン・ビタミンDセンシング機構の解明を行い、疾患特異的なタンパクおよび時間栄養を考慮したCKD-MBD発症・進展の診断・予防法の開発と確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) CKD-MBD合併に至らしめる腎不全、糖尿病、急性炎症疾患のモデル動物の骨、腸管、腎臓、肝臓そして心血管組織より抽出した全RNAを用いてマイクロアレイ解析およびGene Ontology解析を行い、各臓器におけるリン感受性遺伝子群(FGF23、Klotho、Nrf2標的遺伝子、ビタミンD代謝酵素、Hypoxia-inducible factor(HIF)標的遺伝子、時計遺伝子)の発現変動を解析した。また、日内変動パターンZeitgeber time(ZT)1,5,9,13,17,21の点にて発現変動の有無を検討した。2)腎近位尿細管OK-Pおよび腸管上皮細胞Caco2を用いてルシフェラーゼおよびゲルシフト、ChIP法を用いて時計遺伝子Clock、BMAL1、DBP、RORによる腸管リン輸送担体Npt2b、ビタミンD代謝酵素CYP27b1およびCYP24a1の発現調節機構解析した。また、Clock欠損マウスを用いたリン・ビタミンDセンシング機構への時計遺伝子の関与を解析した。さらに各種細胞株を用いて細胞外リン濃度の変動による時計遺伝子やNrf2の活性化機構をゲルシフト法やタンパク抗体解析、転写活性化評価を行った。

4. 研究成果

1) 食事性リン (1.5%, 1.2%, 0.6%, 0.2%) を与えたマウス腎臓および小腸、肝臓、骨、血管より全 RNA を抽出し、腎臓のサンプルを用いマイクロアレイ解析および Gene Ontology 解析を行った。その結果、腎臓におけるリン感受性遺伝子群として Klotho、ビタミン D 代謝酵素、解毒代謝関連遺伝子、時計遺伝子の発現変動が明らかになった。興味深いことに、時計遺伝子の CLOCK/BMAL1 によりリン輸送担体遺伝子の Npt2b やビタミン D 代謝酵素遺伝子が調節される可能性も見出した。さらに、細胞内リンのトラフィック キングに關与するリン輸送担体遺伝子も食事性リンで変動することから、細胞内リンの挙動の変動が示唆された。

2) 1, 2, 13 ヶ月齢マウスとリン濃度の異なる食餌 [高リン食 (Pi 1.2%) または低リン食 (Pi 0.02%)] を用いて、加齢による腎 alpha-klotho 発現変動とビタミン D 代謝の関連性について研究を行った結果、リンの血中濃度および尿中排泄率は、各月齢の高リン食群で高値を示し、カルシウムの血中濃度および尿中排泄率は、各月齢の低リン食群で高値を示した。次に、血中活性型ビタミン D [1,25(OH)₂D] 濃度を測定した結果、1, 2 ヶ月齢で高リン食群が低値を示したが、13 ヶ月齢では有意差を認めなかった。腎臓における alpha-klotho の mRNA 及びタンパク質発現を解析した結果、1, 2 ヶ月齢の高リン食群で低い傾向を示した。興味深いことに、両群ともに 1 ヶ月から 2 ヶ月齢にかけて alpha-klotho の発現は増加し、13 ヶ月齢では減少した。以上の研究結果から、加齢による alpha-klotho 発現変動は食餌性リンの反応性を変化させ、ビタミン D 代謝に影響を及ぼす可能性が示唆され、ライフステージに応じたリンの管理の必要性が示唆された。

3) C57BL/6J マウスを用い、食餌性リン負荷試験を行った。短期試験では、離乳直後 (3 週齢) と青年期 (7 週齢) のマウスを無作為に 7 つのグループに分け、リン濃度 0.02 から 1.8% までの異なるリン含有食をそれぞれ 7 日間与えた。また長期試験では、離乳直後のマウスにリン濃度 0.6% または 1.8% の異なるリン含有食をそれぞれ 21 日間与え、経時的に観察した。結果、短期試験では、離乳直後の高リン食群において、血中リン濃度や FGF23 濃度の上昇、腎 alpha-klotho 発現の低下が観察された。また、腎臓における FGF23/alpha-klotho シグナルの標的遺伝子である Egr-1 発現は、離乳直後の高リン食群において上昇しており、腎臓における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, Npt2c) 発現は低下していた。さらに離乳直後マウスへの高リン食投与は、腎臓の顕著な石灰化を誘発した。しかしながら、青年期では、リン濃度 1.8% の高リン食を与えられても腎石灰化は観察されなかった。離乳直後のマウスにおける長期試験の結果より、長期的な高リン食摂取は、血中リン濃度や FGF23 濃度の上昇、腎 alpha-klotho 発現の低下を引き起こし、FGF23/alpha-klotho シグナルを抑制した。これらの結果は、成長期の中でも幼若期における高リン食摂取が、青年期以降の期間よりもより有害である可能性を示唆している。さらに、高リン食の長期摂取は、腎臓の alpha-klotho 発現抑制による FGF23 耐性状態を引き起こし得ることも示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshikawa Ryouhei, Yamamoto Hironori, Nakahashi Otoki, Kagawa Tomohiro, Tajiri Mari, Nakao Mari, Fukuda Shiori, Arai Hidekazu, Masuda Masashi, Iwano Masayuki, Takeda Eiji, Taketani Yutaka	4. 巻 62
2. 論文標題 The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal -Klotho gene expression in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 68～74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.17-20	査読の有無 有
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 Kagawa Tomohiro, Kozai Mina, Masuda Masashi, Harada Nagakatsu, Nakahashi Otoki, Tajiri Mari, Yoshikawa Ryouhei, Nakao Mari, Takei Yuichiro, Iwano Masayuki, Takeda Eiji, Taketani Yutaka, Yamamoto Hironori	4. 巻 500
2. 論文標題 Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D3 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 275～282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.04.058	査読の有無 有
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 Harada Nagakatsu, Okuyama Maiko, Yoshikatsu Aya, Yamamoto Hironori, Ishiwata Saori, Hamada Chikako, Hirose Tomoyo, Shono Masayuki, Kuroda Masashi, Tsutsumi Rie, Takeo Jiro, Taketani Yutaka, Nakaya Yutaka, Sakaue Hiroshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum Stress in Mice Increases Hepatic Expression of Genes Carrying a Premature Termination Codon via a Nutritional Status-Independent GRP78-Dependent Mechanism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3810～3824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.26031	査読の有無 有
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 Kohei Sugihara, Masashi Masuda, Mari Nakao, Maerjianghan Abuduli, Yukiko Imi, Naoko Oda, Toshiya Okahisa, Hironori Yamamoto, Eiji Takeda, Yutaka Taketani	4. 巻 61
2. 論文標題 Dietary phosphate exacerbates intestinal inflammation in experimental colitis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of clinical biochemistry and nutrition.	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.16-117	査読の有無 有
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 Ryouhei Yoshikawa, Hironori Yamamoto, Otoki Nakahashi, Tomohiro Kagawa, Mari Tajiri, Mari Nakao, Shiori Fukuda, Hidekazu Arai, Masashi Masuda, Masayuki Iwano, Eiji Takeda, Yutaka Taketani	4. 巻 62
2. 論文標題 The age-related changes of dietary phosphate responsiveness in plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels and renal Cyp27b1 and Cyp24a1 gene expression is associated with renal -Klotho gene expression in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of clinical biochemistry and nutrition.	6. 最初と最後の頁 68 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.17-20	査読の有無 有
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 Abuduli M, Ohminami H, Otani T, Kubo H, Ueda H, Kawai Y, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Sakaue H, Yamamoto H, Takeda E, Taketani Y.	4. 巻 310
2. 論文標題 Effects of dietary phosphate on glucose and lipid metabolism.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Physiol Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 526-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00234.2015.	査読の有無 有
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 Futawaka K, Tagami T, Fukuda Y, Koyama R, Nushida A, Nezu S, Yamamoto H, Imamoto M, Kasahara M, Moriyama K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Transcriptional activation of the wild-type and mutant vitamin D receptors by vitamin D3 analogs.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Mol Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 23-32.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-16-0048.	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井晶子、阿部航太郎、伊美友紀子、Yilimulati Yimamu、竹内綾乃、増田真志、奥村仙示、神戸大朋、山本浩範、竹谷豊
2. 発表標題 慢性腎臓病における亜鉛代謝異常と亜鉛補充食の効果
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新居紗知、勝本美咲、榎崎遥子、世古千裕、山崎通世、奥村仙示、山本浩範、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 一塩基多型rs1697421 は日本人において食後血清リン濃度に影響する
3. 学会等名 第21回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小尾麻菜、山本浩範、竹谷豊、中尾玲子、岩野正之
2. 発表標題 自発運動が食餌誘導性高リン血症に及ぼす影響についての研究
3. 学会等名 第13回日本栄養改善学会北陸支部学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田里沙、新井田裕樹、足立雄一郎、酒井晶子、奥村仙示、大西康太、内田貴之、河合慶親、山本浩範、二川健、竹谷豊、増田真志
2. 発表標題 スルフォラファンのリポファジーを介した脂肪分解効果
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 第72回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本浩範
2. 発表標題 ビタミンDの多様な生理作用と代謝調節機構
3. 学会等名 日本ビタミン学会第70回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾真理、山本浩範、中橋乙起、増田真志、竹谷豊
2. 発表標題 CKDラットにおいてリンは鉄代謝および腎性貧血の増悪に影響を与える
3. 学会等名 第6回日本腎栄養代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹谷豊、伊美友紀子、増田真志、山本浩範
2. 発表標題 リン過剰摂取の病態栄養学
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本浩範、福田詩織、増田真志、竹井悠一郎、竹谷豊
2. 発表標題 食餌性リンはNuclear factor-E2-related factor 2を介し酸化ストレス応答・解毒関連遺伝子の発現を調節する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林真由、福田詩織、竹谷豊、山本浩範
2. 発表標題 妊娠前における食餌性リン負荷が新生仔マウスのリン代謝調節系に及ぼす影響
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川東美菜、中橋乙起、森川咲子、山本浩範
2. 発表標題 CYP24A1のサブライシングパリアント体(CYP24A1-SV)は正常ラットの肝臓においても高発現している
3. 学会等名 第65回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本浩範、香川知博、中橋乙起、石黒真理子、増田真志、武田英二
2. 発表標題 生体ビタミンD 代謝の日内リズムの制御機構の解明
3. 学会等名 日本栄養食糧学会第71回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井田裕樹、増田真志、吉澤和香、Ilimulati Yimamu、吉田里沙、甲谷芹奈、奥村仙示、河合慶親、竹谷豊、山本浩範
2. 発表標題 骨格筋脂質代謝異常が慢性腎臓病に伴う Protein Energy Wasting (CKD-PEW) を誘発する
3. 学会等名 日本栄養食糧学会第71回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本浩範、香川智博、中橋乙起、石黒真理子、増田真志、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 生体ビタミンD代謝の日内リズム制御機構の解明
3. 学会等名 日本ビタミン学会第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田詩織、山本浩範、中橋乙起、増田真志、竹谷豊
2. 発表標題 成長期における食餌性リンによる -klotho発現制御
3. 学会等名 第64回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本浩範、吉川亮平、武田英二、岩野正之、竹谷豊
2. 発表標題 年齢に応じた血中活性型ビタミンD濃度、腎Cyp27b1およびCyp24a1発現に対する食餌性リン反応性の変化には腎 -Klotho遺伝子発現が関連する
3. 学会等名 第35回小児代謝性骨疾患研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本浩範、岡村友理香、石黒真理子、中橋乙起、青木菜摘、柴田重信、岩野正之、竹谷豊
2. 発表標題 ビタミンD代謝の概日リズムの分子機構の解明と時間治療への応用
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 第70回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 杉原康平、増田真志、中尾真理、Maerjianghan Abuduli、石田陽子、山本浩範、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 食事性リンが炎症性腸疾患の病態および腸管バリア機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本栄養食糧学会 第70回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山本浩範、吉川亮平、福田詩織、中橋乙起、石黒真理子、増田真志、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 -klotho発現およびビタミンD代謝に及ぼす加齢と食餌性リンの影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第68回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山本浩範、中橋乙起、石黒真理子、竹谷豊
2. 発表標題 食餌性リン負荷が鉄欠乏性貧血（IDA）の発症・進展に及ぼす影響
3. 学会等名 第63回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山本浩範、田尻真梨、中橋乙起、石黒真理子、竹谷豊、岩野正之、武田英二
2. 発表標題 鉄欠乏性貧血（IDA）の発症および鉄代謝に及ぼすリンの影響
3. 学会等名 第34回小児代謝性骨疾患研究会
4. 発表年 2016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
研究協力者	竹谷 豊 (Taketani Yutaka)		
研究協力者	岩野 正之 (Iwano Masayuki)		