

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04053

研究課題名(和文) 体内リンセットポイントの分子機序解明と老化関連病変の新たな治療標的への応用

研究課題名(英文) Elucidation of set-point mechanism for phosphate homeostasis and development of a novel therapeutic target for age-related diseases

研究代表者

竹谷 豊 (TAKETANI, Yutaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：30263825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：体内のリン濃度は一定になるようにリン代謝調節ホルモンなどの作用でその恒常性が維持されている。このリン濃度は、乳幼児期には高く、成長するに従って低下する。本研究では、リン濃度のセットポイントを決定する因子を同定するとともに成長期の異所性石灰化抑制機構を明らかにすることを目的とした。その結果、リン濃度を決定する新たな調節因子として肝臓における組織非特異的アルカリホスファターゼを見出した。また成長期における異所性石灰化抑制因子の同定を試みたところ、血清fetuin-Aおよび血管の組織非特異的アルカリホスファターゼが成長期の異所性石灰化抑制の重要な因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中リン濃度は、乳幼児期には成人の2倍程度高く、成長するに従って低下する。この乳幼児期のリン濃度は、成人であれば高リン血症とされ、血管などに異所性石灰化を引き起こすには十分な濃度であるにもかかわらず、乳幼児期にはそのような異所性石灰化は生じない。異所性石灰化は老化関連病変の1つであり、慢性腎臓病や糖尿病などの多くの生活習慣病においてみられ、動脈硬化などを引き起こし、生命予後を規定する重要な因子である。本研究成果は、老化様病変である異所性石灰化の新たな予防法・治療法を開発するための基礎的成果である。

研究成果の概要(英文)：Blood phosphorus concentration is maintained within a certain range by phosphate regulating hormones. The phosphorus concentration is high in infancy, then decreases as the child grows. The purpose of this study was to identify the factors that determine the phosphorus concentration and to clarify the mechanism of ectopic calcification suppression during the growth period. As a result, we found tissue-non-specific alkaline phosphatase in the liver as a new regulator that determines phosphorus concentration. In addition, an attempt to identify ectopic calcification inhibitor during the growth phase revealed that serum fetuin-A and vascular tissue-nonspecific alkaline phosphatase are important factors for the suppression of ectopic calcification during the growth phase.

研究分野：栄養学

キーワード：高リン血症 異所性石灰化 慢性腎臓病 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

リンは、骨格を形成するのみならず、ATP 形成などエネルギー代謝や核酸・リン脂質などの生体構成成分として、多くの生命活動を支える必須の栄養素である。体内のリン量に過剰や不足が生じると骨格の異常や細胞機能の異常を来すため、細胞外環境すなわち血中リン濃度は、ヒト成人では 2.5~4.5 mg/dL の範囲で一定に保持されている。近年、リン恒常性の調節機構の解明が進み、従来の副甲状腺ホルモン(PTH)、活性型ビタミン D(1,25(OH)<sub>2</sub>D)に加えて線維芽細胞増殖因子 23(FGF23)がリン恒常性に重要な役割を担っていることが明らかになってきた(Taketani Y, Clin Exp Nephrol 21:27-36, 2017)。血清リン濃度は、乳幼児期に高く、ヒトでは 4~7 mg/dL と成人では高リン血症と診断される濃度に維持されており、成長するに従い低下する。成長期には骨の成長に必要なリンの血清濃度を高めることで、石灰化しやすい環境を提供しているとすれば合目的であるが、どのような仕組みで成長に伴うリン濃度の決定がなされているのか、その分子メカニズムは明らかになっていない。また、血中リン濃度には、個人差があり、成人においては血中リン濃度が高いほど総死亡率や心血管イベントの発症率も高い(Chang AR, et al. Am J Kidney Dis 2014)。大規模な遺伝子多型の解析により、いくつかの血中リン濃度と関連する一塩基多型が報告されている(Kestenbaum B, J Am Soc Nephrol 21:1223-32, 2010)が、その遺伝子多型がどのように個人の血中リン濃度の決定に関わるのかは明らかではない。このようなライフステージ毎あるいは個人の血中リン濃度の恒常性のセットポイント(リンセットポイント)を決定するメカニズムの解明は、体内の栄養素代謝の恒常性を理解する上で栄養学的にも極めて重要であり、動脈硬化などの老化様病変の発症と相関する血清リン濃度を決定するリンセットポイントの解明は、老化様病変の予防・治療につながることを期待される。

臨床的には、特に慢性腎臓病(CKD)は重要である。CKD は、長期にわたり腎機能が低下し、最終的に生命維持のために透析や腎移植を必要とする。我が国では糖尿病や高血圧などの患者数の増加に伴い、その終末像としての CKD ならびに透析に至る患者が増加しており、既に CKD 患者は 1,300 万人とも推定されている。CKD では、腎機能の低下に伴い、体内へのリン貯留が進行し、やがて高リン血症が顕在化する。通常、血中リン濃度は 2.5~4.5 mg/dL であるが、末期の CKD 患者では 5~10 mg/dL に達する。このような病態では、二次性副甲状腺機能亢進症や高 FGF23 血症に加え、高リン血症による血管を主とした異所性石灰化病変を呈する。老化関連病変である異所性石灰化は、動脈硬化や心不全の原因となり生命予後を著しく低下させる。異所性石灰化は、糖尿病や CKD で見られ、その主たる原因は、高リン血症である。高リン血症による石灰化誘導の分子メカニズムについては解明が進んでいるものの、なぜ血中リン濃度の上昇が異所性石灰化を引き起こすシグナルを活性化できるのか、その詳細な分子機序は明らかでなく、治療法の開発も進んでいない。

ここで注目すべきは、乳幼児期には、血中リン濃度は慢性腎臓病患者に匹敵する濃度であるにも関わらず、異所性石灰化を生じないということである。この乳幼児期における異所性石灰化が生じない分子メカニズムを解明することができれば、慢性腎臓病患者さらには広く老化に伴い発症する異所性石灰化を予防・治療するための全く新しい方法を開発できると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的の 1 つは、リンセットポイントを決定するメカニズムを明らかにすることである。これを明らかにするには、次の 2 つの重要な課題を明らかにする必要がある。すなわち、(1)ライフステージ毎のホルモンを介した消化管・腎臓・骨のリン代謝調節機構の関与と制御メカニズム、(2)それらを制御する血中リン濃度の感知機構である。血中リン濃度は、主に消化管からの吸収、骨形成と骨吸収のバランス、腎臓での再吸収(尿中への排泄)により調節されている(図 1)。

血中リン濃度の上昇を感知し、副甲状腺から PTH が骨から FGF23 が分泌されるといずれも腎臓でのリン再吸収を抑制する。特に FGF23 は、老化関連遺伝子の  $\alpha$ -klotho(KL) を介して近位尿細管のリン再吸収と 1,25(OH)<sub>2</sub>D 合成の律速酵素である 1 $\alpha$  水酸化酵素(CYP27B1)の両方を抑制する。1,25(OH)<sub>2</sub>D の低下により、消化管でのリン吸収が低下し、血中リン濃度が低下する。乳幼児期には、これらの応答性に違いが生じるだけでなく、血中のリン濃度を高い状態が維持される。我々は、このような違いは、外的環境要因によるものではなく、内的にプログラムされたものであり、リン感知機構、ホルモンの応答性、リン吸収・再吸収機構のいずれかにおいて、血中リン濃度を高く保持するためのリンセットポイントに変化が生じていると考えた。

本研究のもう 1 つの目的は、乳幼児期における高リン状態から異所性石灰化を生じさせないメカニズムの解明である。乳幼児期と成熟期の異所性石灰化の違いについては、石灰化に関わる骨芽細胞様細胞の起源の違い(平滑筋細胞由来や循環している骨芽細胞前駆細胞(circulating osteoblast progenitor cells; OPC)から誘導されるものなど)、BMP-4 など石灰化誘導シグナルの違い、さらにはマトリックス Gla プロテイン(MGP)、fetuin-A、ピロリン酸などの石灰化抑制

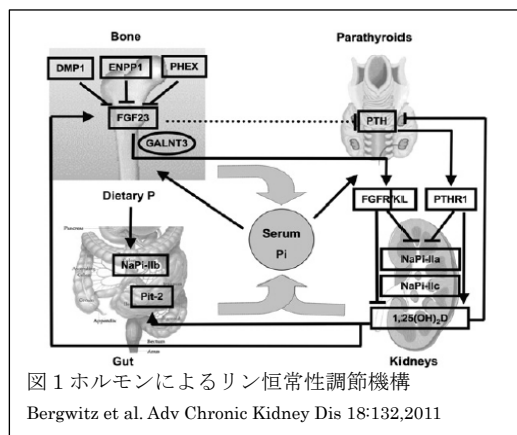


図 1 ホルモンによるリン恒常性調節機構  
Bergwitz et al. Adv Chronic Kidney Dis 18:132,2011

因子の発現量の違いなどが関与している可能性が考えられる。しかしながら、乳幼児期と成熟期との間でこれらの可能性についてはこれまで全く検討されていない。また、従来知られていなかった新たな石灰化抑制機構がある可能性もある。本研究では、乳幼児期と成熟期の血管や腎臓などの石灰化が生じやすい部位の臓器において、網羅的な解析を行うことで、新たな石灰化機構を解明する。

### 3. 研究の方法

これまでに、我々は血清リン濃度決定に関わる SNP (rs1697421) が組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) の遺伝子発現を有意に変化させることを見出していることから、個人のリンセットポイントの決定に TNSALP の活性の違いが影響すると考え、TNSALP の血清リン濃度を決定に関わるメカニズムについて、特に肝臓における役割について培養細胞ならびに動物モデルを用い検討した。

異所性石灰化のメカニズム解明においては、リン濃度の異なる食事を与えた 3～4 週齢のマウスと 10 ヶ月齢のマウスにおいて、高リン血症時に見られる異所性石灰化の典型的な臓器である大動脈、腎臓、心臓について、石灰化抑制因子の発現を DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法を用いて網羅的に解析し、発現量の違いについて検討した。発現量の違いが明確になった遺伝子については、血管平滑筋細胞にこれらの遺伝子を過剰発現させ、実際に高リンによる石灰化に対する抑制能を検討することでその作用を証明するとともに、発現が促進するメカニズムについて分子細胞生物学的な解析を行った。

### 4. 研究成果

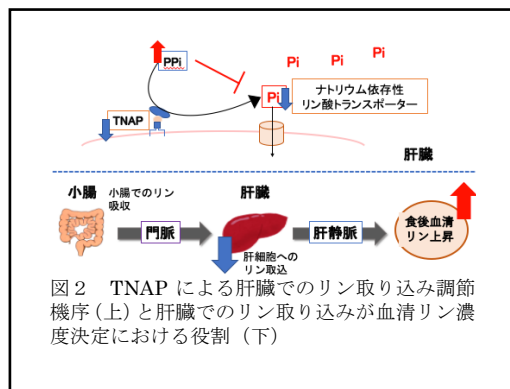
#### (1) リンセットポイント決定のメカニズムに関する研究

リンセットポイント決定のメカニズムに関する研究を明らかにすることを目的とし、特に血清リン濃度決定に関わる一塩基多型 (rs1697421) が組織非特異的アルカリホスファターゼの遺伝子発現に影響することを見出した。さらに、肝臓における組織非特異的アルカリホスファターゼの遺伝子多型の違いが、酵素活性の違いを引き起こし、酵素の基質となるピロリン酸の分解量に変化する、その結果、血中ピロリン酸濃度が変化することで肝臓におけるリン酸取込活性が抑制されることで食後の血清リン濃度上昇に差が生じると考えられた。(図 2)。

#### (2) 乳幼児期における異所性石灰化抑制機構の解明

乳幼児期と成熟期における異所性石灰化関連因子の発現について網羅的に解析を行い、乳幼児期における石灰化防御機構を明らかにすることを目的とし、マウスを用い、乳児期と成熟期にそれぞれ高リン食を投与し、異所性石灰化因子の発現を検討したところ、異所性石灰化抑制因子である Fetuin-A の発現が乳幼児期に増大していることを見出した。さらに、マウスを用い、乳児期と成熟期にそれぞれ高リン食を投与し、乳幼児期と成熟期における異所性石灰化関連因子の遺伝子発現について網羅的に解析を行った。その結果、乳幼児期と成熟期の血管で発現量の異なる複数の遺伝子を見出すことができた。DNA マイクロアレイや RNAseq を用いた網羅的解析を行なった結果、マウスの成長期と成熟期での血管平滑筋において組織非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP) の遺伝子発現にリン応答性の違いが見られ、成長期と比較し、成熟期で発現の増加が認められた。血管平滑筋に対し TNAP の阻害剤であるレバミゾールを処理することで高リン処理による石灰化誘導の抑制が認められたことから、成長期では TNAP の発現量が抑制されたため、高リン血症にも関わらず異所性石灰化が抑制されていると考えられた。

本研究課題のこれまでの研究で TNAP の発現を制御するエンハンサー領域の SNP が血清リン濃度の決定因子の一つとなっていることを明らかにしてきた。成長期と成熟期の血清リン濃度の違いのメカニズムまでを明らかにすることはできなかったが引き続き今後も検討を続けていく。高リン負荷に応答する遺伝子発現制御に関わる ncRNA の網羅的解析については引き続き解析を行っているところであるが、石灰化の抑制と血清リン濃度の調節の両方に TNAP の関与が示されたことは重要な成果であり、体内のリン環境に応答するシステムとして TNAP の発現調節系が働いていると考えられた。さらに、TNAP を標的とした治療により、異所性石灰化を抑制することができる可能性が示された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohnishi Kohta, Yano Satoshi, Fujimoto Moe, Sakai Maiko, Harumoto Erika, Furuichi Airi, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Dietary Phytochemicals Capable of Enhancing the Autophagy Flux in HeLa and Caco-2 Human Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9121193	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 Niida Yuki, Masuda Masashi, Adachi Yuichiro, Yoshizawa Aika, Ohminami Hirokazu, Mori Yuki, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Uchida Takayuki, Nikawa Takeshi, Yamamoto Hironori, Miyazaki Makoto, Taketani Yutaka	4. 巻 67
2. 論文標題 Reduction of stearyl-CoA desaturase (SCD) contributes muscle atrophy through the excess endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 179 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.20-24	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 Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1727309	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 -
1. 著者名 竹谷豊、榎崎遥子、織田奈央子、伊美友紀子	4. 巻 88
2. 論文標題 【CKD-MBD up to date】管理・治療 透析、食事による管理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 113-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Masuda M, Yamamoto H, Takei Y, Nakahashi O, Adachi Y, Ohnishi K, Ohminami H, Yamanaka-Okumura H, Sakaue H, Miyazaki M, Takeda E, Taketani Y	4. 巻 477
2. 論文標題 All-trans retinoic acid reduces the transcriptional regulation of intestinal sodium-dependent phosphate co-transporter gene (Npt2b).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem J	6. 最初と最後の頁 817-831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190716	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 該当する

1. 著者名 Adachi Yuichiro, Masuda Masashi, Sakakibara Iori, Uchida Takayuki, Niida Yuki, Mori Yuki, Kamei Yuki, Okumura Yosuke, Ohminami Hirokazu, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Nikawa Takeshi, Taketani Yutaka	4. 巻 5
2. 論文標題 All-trans retinoic acid changes muscle fiber type via increasing GADD34 dependent on MAPK signal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202101345	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 亀井優輝、大南博和、大西康太、増田真志、奥村仙示、竹谷豊
2. 発表標題 成長期における血管石灰化抑制機構の解明
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木皓平、増田真志、足立雄一郎、森優樹、野邊悠太郎、大南博和、大西康太、奥村仙示 山本浩範、竹谷豊
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるall-trans retinoic acid水酸化酵素Cyp26b1制御機構の解明
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y.Adachi, M.Masuda; K.Sasaki, H.Ohminami, H.Yamanaka-Okumura, H.Yamamo, Y. Taketani
2. 発表標題 Hypervitaminosis A Contributes to Kidney Injury Through Excessive Endoplasmic Reticulum Stress in CKD
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷さとの、新居紗知、榑崎遥子、奥村仙示、山本浩範、増田真志、大西康太、大南博和、竹谷豊
2. 発表標題 肝細胞における組織非特異的アルカリフォスファターゼ遺伝子発現とリン酸代謝に対するSNPrs1697421の影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田真志、山本浩範、竹谷豊
2. 発表標題 All-trans retinoic acidは腸管II型ナトリウム依存性リン酸輸送担体(Npt2b)遺伝子発現を低下させる
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松原彩乃、岸本麻希、林真由、江原みゆ、大南博和、大西康太、増田真志、奥村仙示、竹谷豊
2. 発表標題 妊娠前の食餌性リン負荷が、仔マウスのリン応答性に及ぼす影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井麻衣子、大西康太、増田真志、大南博和、奥村仙示、原太一、竹谷豊
2. 発表標題 栄養素応答シグナルmTORC2を介したリソソーム活性制御機構の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松原彩乃、岸本麻希、多々納詩織、林真由、江原みゆ、大南博和、大西康太、増田真志、奥村仙示、竹谷豊
2. 発表標題 妊娠前的高リン食摂取は、仔マウスの食後血中リン濃度上昇を亢進させる
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本浩範、田尻真梨、中橋乙起、増田真志、大南博和、大西康太、武田英二、竹谷豊
2. 発表標題 糖尿病時におけるビタミンD・カルシウム代謝異常の分子機構の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井 優輝, 大南 博和, 大西 康太, 増田 真志, 奥村 仙示, 竹谷 豊
2. 発表標題 小児期において血中 Fetuin-A 濃度とリン濃度は相関する
3. 学会等名 第52回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Oda, Kohei Sugihara, Miho Ikeda, Yuho Higashimura, Takashi Uebanso, Hirokazu Ohnami, Kohta Ohnishi, Masashi Masuda, Hisami Yamanaka-Okumura, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Dietary Phosphate Disturbs of Gut Microbiome in Mice
3. 学会等名 Kidney Week 2019, Annual Meeting of American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Narasaki, Michiyo Yamasaki, Misaki Katsumoto, Yutaka Taketani
2. 発表標題 A Crossover Study of Continuous Intake of the Different Phosphorus Bioavailability Meal in Healthy Japanese
3. 学会等名 Kidney Week 2019, Annual Meeting of American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 美萌, 織田 奈央子, 上番増 喬, 大南 博和, 大西 康太, 増田 真志, 奥村 仙示, 竹谷 豊
2. 発表標題 高リン食が腸内環境を介して慢性腎臓病に与える影響
3. 学会等名 第23回日本病態栄養学会年次集会
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
研究 分担 者	増田 真志  (MASUDA Masashi)  (50754488)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教    (16101)	



6. 研究組織（つづき）

	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	山本 浩範  (YAMAMOTO Hironori)  (60314861)	仁愛大学・人間生活学部・教授    (33403)	
研究分担者	大西 康太  (OHNISHI Kohta)  (80723816)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教    (16101)	

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			
米国	コロラド大学			