

機関番号： 24506

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20590975

研究課題名 (和文) 生命予後を規定する骨・血管型リンチャネルの分子制御機構

研究課題名 (英文) Molecular Regulation of bone-blood vessel type phosphate channel

研究代表者 伊藤 美紀子 (ITO MIKIKO)

兵庫県立大学・環境人間学部・環境人間学科・准教授

研究者番号： 50314852

研究成果の概要 (和文)：

長期透析患者に見られる高リン血症は、異所性石灰化を誘発し生命予後不良につながる直接的な原因となるが、その詳細と抑制方法は現在不明である。骨、特に骨吸収を担う破骨細胞のリン代謝調節に注目し、異所性石灰化の制御分子候補として、リンチャネル BVPiC85 の解析を行った。その結果、膜局在に関わる部位の同定と調節機構、機能に対する糖鎖の重要性ならびに、FGF23-Klotho 経路における役割を明らかにした。これらのことから異所性石灰化におけるリンチャネル分子の重要な役割の解明が進んだといえる。

研究成果の概要 (英文)：

The hyperphosphatemia is observed at high ratio in the hemodialysis patients, and the phosphate (Pi) management is important because this leads of one's death by the cardiovascular disease by the ectopic calcification. Especially, Pi sensor and Pi channel are key protein to clear the ectopic calcification in bone. In this research, we tried to clarify the calcification mechanism by characterization of the Pi channel in the bone and/or the vascular endothelial. In this research, we indicated the molecular regulation of Pi channel and important role of the ectopic calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： 人工透析、リン、カルシウム、異所性石灰化、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全患者は、糖尿病性腎症の著しい増加や社会の高齢化により年々増加の1途をたどり、現在 25 万人を数えている。こ

のほとんどが血液透析患者であるが、透析技術の進歩に伴い長期生存が可能となってきた。しかしながら長期透析患者では高リン血症が高頻度に観察され、異所性石灰化による

心血管病変が死因の約 50% を占めることから、リン管理は生存において非常に重要である。

透析患者における異所性石灰化発症機構は、現在までに様々な観点において報告がなされている。中でも無形成骨症では骨代謝回転が著しく低下しているため、カルシウム・リンの蓄積に異常をきたし、異所性石灰化を惹起すると考えられている。また、血管平滑筋細胞を高リン状態にて培養すると細胞層へのカルシウム沈着量は増加し、さらにその機序には、細胞外から細胞内へリンを取り込む III 型ナトリウム依存性リン共輸送体 (Pit-1) が関与する。そこで私は、これまでに骨並びに血管平滑筋細胞にはこれ以外のリン感受機構があると考え、破骨細胞に注目して検討を行ってきた。特に骨には、リン調節ホルモン、フォスファトニンの一つである FGF23 が発現しており、リン調節機構に重要な役割を果たしている。これまでリン代謝は、カルシウム代謝に付随した調節系で制御されていると考えられてきたが、近年、遺伝性低リン血症性くる病の解明から、新しいリン調節系が明らかとなってきた。その中でも、Hot topics として、FGF23/klotho シグナルがあり、私共も Klotho KOマウスの解析から、骨においてリン代謝調節因子の発現上昇を明らかにし、骨におけるリン調節機構の重要性を明らかにしている。これら新規リン代謝調節経路におけるリンチャネルの役割とその機能を明らかにすることで、異所性石灰化のメカニズム解明につながると考えている。

以上のことから、異所性石灰化メカニズムの解明は、透析患者の生命予後を改善するための、大変重要な鍵となると言える。

2. 研究の目的

異所性石灰化のメカニズムを明らかにし、透析患者の生命予後を改善するために、骨に存在するリンチャネルの分子制御機構を解明する。リンチャネルは、破骨細胞に発現する分子として同定したが、血管平滑筋細胞において発現し、リンチャネルとして機能することが明らかとなれば、異所性石灰化発症を制御する有力な候補分子となりうる。また、FGF23/Klotho とのクロストークが明らかとなることで、骨におけるリン代謝調節の重要性と、異所性石灰化の分子機序の解明につながると考えられる。また、異所性石灰化は、透析導入以前の慢性腎不全患者においても高率で見られており、早期のリン管理の重要性と異所性石灰化抑制が求められている。

以上より、本研究においてリンチャネルの分子制御機構を研究することで、骨による生体内のリン濃度調節機構を明らかにするとともに、慢性透析患者の生命予後を改善でき

る、異所性石灰化阻害薬の開発につながると期待できる。

3. 研究の方法

これまでに私共は、骨吸収を担う破骨細胞に存在するリンチャネル分子を報告し、骨の石灰化に重要な役割を果たす可能性を明らかにしてきた。またリンチャネルが細胞内小胞に発現する興味深いデータを保持している。しかしながら、その機能の詳細と生理機能は未だ不明な点が多い。そこで、本課題では、1) リンチャネル分子の vacuole 型の同定とその機能解析、2) リンチャネル分子の変異による機能ドメインの同定と siRNA を用いた機能損失実験、3) Klotho/FGF23 シグナルにおけるリンチャネルの生理学的役割の解明、4) 血管平滑筋細胞を用いたリンチャネルの機能解明、5) リンチャネルと相互作用する蛋白質の同定を行う。

以上より、リンチャネルの生体内における役割と、生命予後を左右する異所性石灰化の分子制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

骨、特に骨吸収を担う破骨細胞のリン代謝調節に注目し、異所性石灰化の制御分子の候補であるリンチャネル BVPic85 の解析を行った。BVPic85 蛋白質は膜型の糖蛋白質であるため、stable cell line を作製し検討を行った。タンパク質発現解析、in vitro translation による糖鎖解析、confocal を用いた局在の検討の結果、成熟糖鎖の付加が BVPic85 の機能に重要である事を明らかにした。糖鎖付加阻害変異体は、膜での発現量・局在量が低下するとともにリン輸送活性も低下したことより、糖鎖は BVPic85 の膜での安定性に関与することが示された。またその分解経路は Proteasome による可能性が示され、他のリントランスポーターとは異なっており、これらの違いが機能の違いにつながる可能性を示した。またこれら異常に関与する細胞膜への移行に必須な部位を同定し、その変異が ER での膜移行異常を誘引することを、袋ネズミ腎細胞をモデル細胞として用いた Western blotting、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内局在により明らかにした。また立体構造予測シミュレーションソフト MOE software によって、1 塩基変異により電荷変化を伴う立体構造変化が起こることを明らかにした。

本領域に結合する蛋白質が、機能の調節に重要な役割を果たすと考え、yeast-two hybrid 法により同定した。これらの蛋白質が膜局在や膜への移行に大きく関与していると推察される。BVPic85 も多くのトランスポ

ーターと同様にタンパク質複合体（トランスポートソーム）を形成している事が推測された。またこれらの腎での調節機能はや異常は、今後の検討が必要であるが、骨・血管においても生じていると考えられる。

また骨と腎をつなぐ新規リン調節系として注目されている Klotho/FGF23 との関連を検討した結果、klotho が直接 BVPiC85 の機能を調節する可能性を示した。これらのことから、血管平滑筋細胞の異所性石灰化や、高リン食投与時の異所性石灰化の発症速度、また、リン吸着剤における Klotho の影響の重要性が示唆された。

今後も本研究をさらに発展させることで、異所性石灰化のより詳細な制御機構を明らかにし、慢性腎臓病患者からの早期リン管理の重要性ならびに透析患者における生命予後の改善を目指していきたい。

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 6 件)

- ① Tanimura A, Yamada F, Saito A, Ito M, Kimura T, Anzai N, Horie D, Yamamoto H, Miyamoto K, Taketani Y, Takeda E. (2011) Analysis of different complexes of type IIa sodium $-$ dependent phosphate transporter in rat renal cortex using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. J Med Invest. 2011 Feb;58(1-2):140-7. 査読有.
- ② Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K, Kaneko I, Tominaga R, Hanabusa E, Aranami F, Furutani J, Kuwahara S, Tatsumi S, Matsumoto M, Ito M, Miyamoto K. (2010) Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. Am J Physiol Renal Physiol. 298(6): F1341-50. 査読有.
- ③ Ito M, Sakurai A, Hayashi K, Ohi A, Kangawa N, Nishiyama T, Sugino S, Uehata Y, Kamahara A, Sakata M, Tatsumi S, Kuwahata M, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto KI. (2010) 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. 査読有.
- ④ Aranami F., Segawa H., Furutani J., Kuwahara S., Tominaga R., Hanabusa E., Tatsumi S., Kido S., Ito M., Miyamoto

K. (2010) Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium. J Med Inv. 57(1,2) 95-108. 査読有.

- ⑤ Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. (2009) Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. Am J Physiol Renal Physiol. 297(3):F671-8. 査読有.
 - ⑥ Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F, Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. (2009) Type IIc sodium $-$ dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. J Am Soc Nephrol. 20(1):104-13. 査読有.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① H. Segawa, Y. Tomoe, J. Furutani, I. Kaneko, F. Aranami, S. Kuwahara, M. Ito, K. Miyamoto (2008) The Synergistic Role of Npt2a and Npt2c in Inorganic Phosphate Metabolism of Mice. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Montreal, Quebec, Canada September 12-16
 - ② M. Ito, A Sakurai, A Ohi, K Hayashi, T. Nishiyama, N. Kangawa, S. Sugino, S. Tatsumi, H. Segawa, K. Miyamoto (2008) Mutation of Type IIc Na^+ -Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi $-$ IIc) and Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria (HHRH). The American Society of Nephrology (ASN), Philadelphia (USA) November 8-13
 - ③ S. Tatsumi, Y. Hukushima, S. Shimamura, M. Ito, H. Segawa, K. Miyamoto (2008) $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 Modulates The Expression of the Human Type IIc Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-IIc) Gene in Renal Osteoblast Cells. The American Society of Nephrology (ASN), Philadelphia (USA) November 8-13
 - ④ Y. Tomoe, H. Segawa, I. Kaneko, J. Furutani, H. Aranami, S. Kuwahara, R. Tominaga, E. Hanabusa, M. Ito, K. Miyamoto

- (2008) Effect of Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 on Npt2a, Npt2c Double-Knockout (WKO) Mice. The American Society of Nephrology (ASN), Philadelphia (USA) November 8-13
- ⑤ K. Miyamoto, M. Ito, R. Nakamura, H. Segawa, S. Tatsumi (2008) Klotho/FGF23 phosphate homeostasis and extension of life span by dietary phosphate restriction mediated glycolysis. The American Society of Nephrology (ASN), Philadelphia (USA) November 8-13 (SYMPOSIUM)
- ⑥ Nishiyama T, Ito M, Ohi A, Sugino S, Aranami F, Kido S, Tatsumi S, Segawa H., Miyamoto K. (2009) Klotho modulates the activity of Type IIc Na⁺-dependent phosphate cotransporter (NaPi-IIc) The American Society of Nephrology (ASN), San Diego (USA) October 30
- ⑦ 伊藤美紀子(2011) 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 1/15-16 横浜
- ⑧ 大井彰子、富永理恵子、伊藤美紀子、西山俊、杉野紗貴子、木戸慎介、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2010) 副甲状腺ホルモン(PTH)によるリン代謝調節機構の解明 第64回日本栄養・食糧学会大会 5/21-23 徳島
- ⑨ 大井彰子、西山俊、伊藤美紀子、杉野紗貴子、木戸慎介、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2010) 寿命調節因子 Klotho によるリン代謝調節 第13回日本病態栄養学会年次学術集会、1/10 京都
- ⑩ 西山俊、伊藤美紀子、大井彰子、杉野紗貴子、坂田雅映、蒲原彰宏、木戸慎介、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2009) 老化関連因子 Klotho によるリン代謝調節機構の解明、第63回日本栄養・食糧学会大会 5/20-22 長崎
- ⑪ 大井彰子、伊藤美紀子、西山俊、坂田雅映、蒲原彰宏、寒川奈津美、杉野紗貴子、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2009) 無機リン酸代謝異常症の解明：糖鎖による Npt2c cotransporter の機能調節、第63回日本栄養・食糧学会大会 5/20-22 長崎
- ⑫ 伊藤美紀子、蒲原彰宏、大井彰子、西山俊、杉野紗貴子、坂田雅映、辰巳佐和子、木戸慎介、瀬川博子、宮本賢一(2009) 2つのリン酸輸送体分子による生体内輸代謝調節機構の解明、第63回日本栄養・食糧学会大会 5/20-22 長崎
- ⑬ 寒川奈津美、伊藤美紀子、大井彰子、杉野紗貴子、西山俊、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2008) 遺伝子性低リン血症性くる病(HHRH)原因遺伝子 IIc 型 Na 依存性リン酸トランスポーター (NaPi IIc) の解析、第26回日本骨代謝学会学術集会、10月30日、大阪
- ⑭ 伊藤美紀子(2008)、生体内でのリンの役割とリン酸トランスポーターの機能、第26回日本骨代謝学会学術集会、10月29日、大阪。(シンポジウム)
- ⑮ 伊藤美紀子(2008)、FGF23/klotho シグナルとリン酸輸送調節、第2回瀬戸内フォーラム、8月30日、神戸
- ⑯ 瀬川博子、鬼塚朱美、伊藤美紀子、松本満、網塚憲生、宮本賢一(2008) 高Ca尿を伴う遺伝性低リン血症性くる病(HHRH; hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria) 発症機構の解明。第51回日本腎臓学会、6月1日、福岡。
- ⑰ 寒川奈津美、伊藤美紀子、櫻井文、大井彰子、林敬治、杉野紗貴子、西山俊、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2008) 遺伝性低リン血症性くる病原因遺伝子ヒト NaPi IIc 変異体の解析。第62回日本栄養・食糧学会、5月3日、埼玉。
- ⑱ 福島有佳子、辰巳佐和子、島村仁子、山本浩範、伊藤美紀子、瀬川博子、宮本賢一(2008) 腎臓と骨を結ぶリン代謝系の探索：NaPi-IIc の遺伝子制御機構の解明。第62回日本栄養・食糧学会、5月4日、埼玉。
- ⑲ 大井彰子、伊藤美紀子、櫻井文、林敬治、西山俊、寒川奈津美、杉野紗貴子、上畑陽子、辰巳佐和子、瀬川博子、宮本賢一(2008) 無機リン酸代謝異常症の解明；リン酸トランスポートソームの構成タンパク質の膜移行シグナル。第62回日本栄養・食糧学会、5月3日、埼玉。
- ⑳ 竹谷豊、鎌田歩規代、谷村綾子、中村麻子、早川悌一郎、伊藤美紀子、山本浩範、宮本賢一、武田英二(2008) 分子複合体を介したリン酸トランスポーターの活性調節機構。第62回日本栄養・食糧学会、5月3日、埼玉。

[図書] (計5件)

- ① 伊藤美紀子、カルシウム・リンのトランスポーター (2011) 栄養・食品機能とトランスポーター p199-223 (2011.5) (建帛社) 総ページ291 (編集者兼)
- ② 桑原頌治, 西山俊, 大井彰子, 金子一郎, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 竹谷豊, 宮本賢一 (2011) リン酸トランスポーター関連分子群とリン代謝異常症, トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学 MOOK ⑨トランスポートソーム生体膜輸送機構の全体像に迫る-基礎, 臨床, 創訳応用研究の最新成果- P244-248 (2011.3.31) (メディカルドゥ社) 総ページ274
- ③ 宮本賢一, 竹谷豊, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 瀬川博子 (2011) 無機リン酸イオンとトランスポーター, トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ- P230-239 (2011.3) (京都廣川書店) 総ページ471
- ④ 宮本賢一、瀬川博子、伊藤美紀子、辰巳佐和子、竹谷豊 (2009) 最新トランスポーター研究 ~ リントランスポーターと疾患 ~ メディカルドゥ社 p245-262 (総p374)
- ⑤ 宮本賢一, 巴由佳、辰巳佐和子、伊藤美紀子, 瀬川博子 (2008) FGF23/KLOTHO シグナルによるリン代謝調節 Annual Review 腎臓 2008 伊藤克己、浅野泰、遠藤仁、御手洗哲也、東原英二 編集. 中外医学社 p43-49 (総p267)

[総説] (計5件)

- ① 宮本賢一, 瀬川博子, 伊藤美紀子, 桑波田雅士 (2009) 新しいリン調節薬 CLINICAL CALCIUM, Vol. 19, No. 2. 242-247
- ② 伊藤美紀子、辰巳佐和子、宮本賢一 (2008) 栄養不足の定義 エネルギー不足・蛋白不足 臨床透析 Vol. 24, No. 1 p127-133
- ③ 伊藤美紀子、宮本賢一 (2008) 分子栄養学的アプローチによるテラーメイド予防、これからの管理栄養士 からだの科学増刊 p86-91
- ④ 辰巳佐和子、瀬川博子、伊藤美紀子、宮本賢一 (2008) 骨細胞とリン代謝. 腎と骨代謝 Vol. 21 No. 3 p211-217

- ⑤ 伊藤美紀子、瀬川博子、辰巳佐和子、宮本賢一 (2008) ナトリウム依存性リン輸送体の構造と機能調節. THE BONE Vol. 22, No. 6 p713-717

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

宮本 賢一 (MIYAMOTO KEN-ICHI)
徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：70174208

瀬川 博子 (SEGAWA HIROKO)
徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師
研究者番号：70325257