

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08637

研究課題名(和文)新規リンネットワーク破綻がもたらす栄養障害の分子機序解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of malnutrition caused by novel phosphate network disruption

研究代表者

宮本 賢一 (Miyamoto, Ken-ichi)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：70174208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リン代謝におけるTM2D (Tmem174) の役割を検討した。TM2D-KOマウスでは、血清 FGF23 濃度が著しく上昇したが、リン排泄の増加および低リン血症は呈しない。さらに、TM2D-KOマウスは、FGF23 投与に対する NaPi2a 応答性の低下を示した。リン負荷は、TM2D-KOマウスで顕著な高リン血症を引き起こした。これらの結果より、TM2Dは、高リン負荷と腎障害による血清リン濃度の上昇を防ぐと考えられた。よって CKDにおけるリン代謝異常や栄養障害に TM2D(Tmem174)は、深く関与すると予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)の患者数は成人人口の12.9%と、現代の国民病ともえる状態である。CKDは血液透析を要する末期腎不全に至るだけでなく、脳卒中や心筋梗塞などの心血管病とも深く関連している。そのためには、CKDにおける骨ミネラル代謝異常や栄養不良に関する研究が重要である。本研究の目的は、未知のエネルギー代謝にリンクする新しいリン調節系の中心分子(TM2D/Tmem174)を同定して、リン代謝における役割を明確にし、CKDにおける重要性を明らかにした。本研究は、新規CKD治療薬や栄養療法に対する新しい考え方の構築に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focus the role of a new molecule (TM2D/Tmem174) involved in phosphate (Pi) metabolism. In TM2D-KO mice, the serum fibroblast growth factor 23 (FGF23) concentration was markedly increased but increased Pi excretion and hypophosphatemia were not observed. In addition, TM2D-KO (Tmem174-KO) mice exhibit reduced Pi transporter (NaPi2a) responsiveness to FGF23 administration. Furthermore, a dietary Pi load causes marked hyperphosphatemia and abnormal NaPi2a regulation in TM2D-KO (Tmem174-KO) mice. Thus, TM2D (Tmem174) is thought to be associated with FGF23 induction in bones and the regulation of NaPi2a to prevent an increase in the plasma Pi concentration due to a high Pi load and kidney injury. Therefore, TM2D (Tmem174) was expected to be deeply involved in Pi network abnormalities and malnutrition in kidney disease.

研究分野：分子栄養学

キーワード：慢性腎臓病 リン トランスポーター FGF23 栄養障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病に伴うミネラル代謝異常 (CKD-MBD)の病態には、リン代謝異常の理解が重要である。特に高リン血症に伴うリン代謝異常は、透析患者における生命予後を規定する必須の因子と考えられる。一方で、CKD や透析患者に特徴的な栄養障害protein-energy wasting (PEW) は生存率に大きく関与することから、栄養代謝の重要性が知られている。さらに、栄養障害にリン代謝異常が加わると、本来なら骨に集積すべきカルシウム/リンが、腎機能不全時には軟組織に蓄積することで異所性石灰化の病態を加速させる。遺伝性低リン血症性骨軟化症の原因遺伝子解明などの研究によりFibroblast growth factor 23 (FGF23)やklotho などのリン独自の代謝系が解明され、血中リン濃度調節機序の破綻が、寿命制御や老化などの様々な病態に関与することが明らかにされた (1-3)。一方でリン代謝は、高度に発達した臓器間リンネットワーク (P net)が組織の栄養状態 (ATP 濃度など)を反映して配置されているが、その詳細は明らかではない。特に、リンは肝臓や骨格筋において重要な役割を演じているが、CKD や透析患者での挙動は不明である。このように腎機能障害に起因する全身性リン代謝異常の分子機序についての知識が重要となる (1-3)。

2. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD)の進行や透析患者の生命予後においてリン酸 (以下リン) コントロールは非常に重要な役割を演じている。リン代謝異常は早期CKD から生じており、リンバランスの維持は生命予後を規定する重要な調節系であると考えられる (4)。近年、リン代謝調節系 (リンシグナルネットワーク) を支配する機構が徐々に解明され、リン代謝における臓器相関の重要性が明らかにされた。その破綻は、各組織のエネルジー代謝、特に NAD代謝と深くリンクしており、その解明は CKDにおける栄養障害 (PEW)の理解につながると考えられるが、その詳細は明らかではない (4)。

我々は、骨と腎臓を結ぶ線維芽細胞様増殖因子 23 (FGF23)/klotho 系に加えて、肝臓と腎臓を結ぶ Nampt/NAD系の存在を明らかにした。さらに、両方のリンシグナルネットワーク調節に共通に関わるリン応答複合体 (TM2D:Tmem174)の存在とリン代謝異常発症を明らかにしてきた。本研究では、TM2D(Tmem174)の新しいリンシグナルネットワークにおける役割を解明する。そのために、TM2D(Tmem174)-KOマウスを用いたFGF23の応答性を中心としたリン代謝異常の発症機序を解析し、本分子の役割解明を目指す(5)。

3. 研究の方法

(1) TM2D-KO (Tmem174-KO)マウスの解析

動物実験は徳島大学動物実験委員会の許可のもと、徳島大学動物実験指針に従って行った (共同研究者、瀬川博子先生担当)。マウスは恒温の飼育室において明暗サイクル条件下(8:00-20:00)、プラスチックケージ内で、実験動物用固形飼料MF (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)と水道水の自由摂取により飼育した。WTマウス; C57BL/6J系統のWTマウスは日本チャールズリバー株式会社より購入した。TM2D (Tmem174)KOマウス; C57BL/6J系統のTM2Dヘテロマウスは、大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学 金井好克教授、永森収士准教授 (現奈良医科大学 生体分子不均衡制御学共同研究講座教授) より分与して頂き、ヘテロマウスを交配し、TM2D KO (Tmem174 KO)マウスを得た (5)。

(2) FGF23 強制発現実験

WT および TM2D-KO (Tmem174-KO) マウスは 9 週齢より 14 日間 LP 食を自由摂取下にて飼育した。実験食は AIN93G 変形食(Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を基本とし、LP 食(0.02% Pi, 0.6% Ca)を作成した。LP 食開始 9 日目に FGF23 強制発現を行った。FGF23 強制発現は TtransIT®-EE (Enhanced Expression) Hydrodynamic Delivery Solution(Mirus, WI, USA)を使用し、pCAGGS3 FGF23R120Q 1 µg/head を尾静脈投与した。FGF23 強制発現は肝臓における human FGF23 mRNA 発現を確認することで行った (5)。

(3) 血漿・尿の生化学検査

FGF23 強制発現より 2 日後から代謝ケージを開始し、24 時間糞を回収した。また、FGF23 強制発現後 5 日目に解剖を行い、サンプルを採取した。解剖時には、採尿および下大静脈より採血を行なった。下大静脈血および尾静脈血は血漿を分離した。各マウスより得られた試料を以下に示すキットを用いて測定した。カルシウム濃度はメチルキシレノールブルー発色法を用いたカルシウム E テスト Kit (Wako, Osaka, Japan)を用いて測定した。無機リン濃度は p-メチルアミノフェノール還元法を用いたホスファ C テスト Kit (Wako)を用いた。部分尿中の無機リン及びカルシウム排泄は血漿リン濃度および尿中クレアチニン濃度で補正した。クレアチニンはクレアチナーゼ・HMPS 法を用いた L タイプワコー CRE・M Kit (Wako)を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 低リン食投与による TM2D-KO マウス

WT および TM2D KO マウスに低リン食を与えた。WT マウスおよび TM2D KO マウスにおいて、低リン食投与により血漿リン濃度は有意に低下した。さらに TM2D KO マウスにおける過度な血漿 FGF23 濃度上昇も低リン食投与により低下した。WT マウスと同様に TM2D KO マウスにおいて、低リン食投与により Npt2a タンパク質発現は有意に増加し、消失していた Npt2c タンパク質発現も有意に増加した。さらに、klotho タンパク質発現も WT マウスと同程度まで回復していた。

(2) 低リン食投与 TM2D KO における FGF23 強制発現

WT および TM2D KO マウスにおいて、低リン食投与 9 日後に Naked DNA 法を用いた FGF23 強制発現を行った。肝臓における hFGF23 mRNA 発現を確認し、FGF23 強制発現が成功したことを確認した。次に、腎臓における klotho 発現を検討した。klotho mRNA 発現は、WT および TM2D-KO マウスコントロール群において変化は認められなかった。FGF23 強制発現により WT および TM2D-KO マウスにおいて klotho mRNA 発現は減少傾向を示した。さらに、FGF23 強制発現により klotho タンパク質発現は両マウスにおいて有意に低下した。また、WT マウスにおいて FGF23 強制発現により TM2D タンパク質発現は変動しなかった。

(3) FGF23 強制発現によるリン代謝とビタミン D 代謝における影響

FGF23 強制発現による血漿リン濃度および尿中・糞中リン排泄を確認した。WT および TM2D-KO マウスにおいて、FGF23 強制発現により血漿リン濃度は低下傾向を示した。また、WT マウスと同様に TM2D-KO マウスにおいて、FGF23 強制発現によりリン利尿促進が生じていた。さらに、WT および TM2D-KO マウス両群において、腸管からのリン排泄量は FGF23 強制発現により増加傾向を示した。また、WT および TM2D-KO マウス両群において、FGF23 強制発現により活

性型ビタミン D 産生を促進する Cyp27B1 mRNA 発現は有意に抑制されていた。一方で、活性型ビタミン D を分解系へと導く Cyp24A1 mRNA 発現は、WT および TM2D-KO マウス両群において FGF23 強制発現により有意に増加していた。

(4) FGF23 強制発現によるリン酸トランスポーター発現

腎臓におけるリン酸トランスポーター mRNA 及びタンパク質発現を検討した。WT および TM2D-KO マウスにおいて、FGF23 強制発現により Npt2a mRNA 発現は抑制傾向を示す一方、Npt2c mRNA 発現に変動はなかった。WT マウスでは FGF23 強制発現により腎臓における Npt2a および Npt2c タンパク質発現は有意に抑制された。しかし、TM2D-KO マウスでは FGF23 強制発現により Npt2c タンパク質発現は有意に抑制された一方で、Npt2a タンパク質発現は抑制されなかった。また、免疫蛍光染色においても同様の結果が確認された。

(5) FGF23/Klotho シグナル関連分子の発現

FGF23 シグナル伝達 に関与する腎 FGFR mRNA、および FGF23/klotho シグナル下流に位置する ERK のリン酸化を検討した。まず、腎臓における FGFR mRNA 発現を確認した。FGFR1 および FGFR4 mRNA 発現は WT マウスおよび TM2D-KO マウス両群において変動は認められず、また FGF23 強制発現による変動も認められなかった。次に FGF23 強制発現による ERK リン酸化を検討した。WT マウスでは FGF23 強制発現において ERK リン酸化は増加した。一方で、TM2D-KO マウスではコントロール群においても ERK リン酸化は亢進していたが、FGF23 強制発現によるさらなる ERK リン酸化亢進は生じていなかった。また、MF 食飼育時における ERK リン酸化は、TM2D-KO マウスにおいて増加傾向を示した。

(1) から (5) の結果を整理すると、TM2D-KO マウスでは高 FGF23 血症を呈するが、リン再吸収を担うリン酸トランスポーター Npt2a タンパク質発現は予想に反し増加した。また、FGF23 シグナル伝達に重要な役割を担う klotho 発現は、TM2D-KO マウスにおいて低下しており、FGF23 シグナル伝達は減弱している可能性が示唆された。また、TM2D-KO マウスにおいて klotho タンパク質発現は低リン食投与により回復し、WT マウスと同様に FGF23 強制発現により減少した。さらに、TM2D-KO マウスにおいて、FGF23 強制発現により WT マウスと同様に尿中リン排泄増加、血漿リン濃度低下、および正常な活性型ビタミン D 調節系の応答を示した。しかし、TM2D-KO マウスにおいて、Npt2a 発現は抑制されなかった (5)。

以上より、TM2D 欠損により Npt2a 内在化が阻害され、リン利尿因子 FGF23 による Npt2a 発現制御の破綻が生じている可能性が示唆された。これらの結果は FGF23/klotho シグナル支配下において、TM2D (Tmem174) による Npt2a 発現が制御されている事実を示している。よって、TM2D (Tmem174) の役割は、CKD におけるリン代謝異常の中核分子として機能している可能性がある (5)。つまり、腎機能低下による TM2D (Tmem174) の減少により、CKD における骨からの FGF23 分泌誘導、高リン食負荷による異所性石灰化、及び栄養代謝異常などが引き起こされると予想される。

引用文献

1、小池萌、瀬川博子、宮本賢一.

リントランスポーターと疾患.

別冊・医学のあゆみ - トランスポーターのすべて . P 97-102. (総ページ 155 P)

2020.8.20 発行、医歯薬出版株式会社.

2、瀬川博子、小池萌、塩崎雄治、宮本賢一.

抗老化因子を制御するミネラル栄養学 - リン代謝恒常制御の重要性.

実験医学増刊 ~ 栄養・代謝物シグナルと食品機能 ~ vol40.No7. (236P)

2022年4月20日発行.

3、谷藤和也、小池萌、宇賀穂、塩崎雄治、瀬川博子.

Ca,P ホメオスタシス.

腎と透析 vol.93No.5. 736-741. 2022年11月25日発行.東京医学社.

4、Common dietary sources of natural and artificial phosphate in food.

Miyamoto K, Oh J, Razzaque MS. Adv Exp Med Biol. 2022, 1362:99-105

5、Sasaki S, Shiozaki Y, Hanazaki A, Koike M, Tanifuji K, Uga M, Kawahara K, Kaneko I, Kawamoto Y, Wiriyasermkul P, Hasegawa T, Amizuka N, **Miyamoto K. I**, Nagamori S, Kanai Y, and **Segawa H**.

Tmem174, a regulator of phosphate transporter prevents hyperphosphatemia.

Sci Rep 2022, 12: 6353, doi: 10.1038/s41598-022-10409-3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyamoto Ken-ichi, Oh Joanna, Razzaque Mohammed S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Common Dietary Sources of Natural and Artificial Phosphate in Food	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-91623-7_10	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 該当する
1. 著者名 Sasaki Sumire, Shiozaki Yuji, Hanazaki Ai, Koike Megumi, Tanifuji Kazuya, Uga Minori, Kawahara Kota, Kaneko Ichiro, Kawamoto Yasuharu, Wiriyasermkul Pattama, Hasegawa Tomoka, Amizuka Norio, Miyamoto Ken-ichi, Nagamori Shushi, Kanai Yoshikatsu, Segawa Hiroko	4. 巻 12
2. 論文標題 Tmem174, a regulator of phosphate transporter prevents hyperphosphatemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6353-6360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10409-3	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 金子一郎、宇賀穂、塩崎雄治、宮本賢一、瀬川博子	4. 巻 95
2. 論文標題 生体内リン恒常性を維持するビタミンD作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 280-285
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 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 Ichida Yasuhiro, Ohtomo Shuichi, Yamamoto Tessai, Murao Naoaki, Tsuboi Yoshinori, Kawabe Yoshiki, Segawa Hiroko, Horiba Naoshi, Miyamoto Ken-ichi, Floege Jurgen	4. 巻 36
2. 論文標題 Evidence of an intestinal phosphate transporter alternative to type IIb sodium-dependent phosphate transporter in rats with chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfaa156	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小池萌、佐々木すみれ、谷藤和也、有馬佑貴、野沢 愛、宇賀 穂、川原康太、春田帆乃香、佐藤哲彦、金子一郎、宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 成長ホルモン作用における抗老化因子 -klothoの関与.
3. 学会等名 第53回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷藤和也、佐々木すみれ、小池萌、有馬佑貴、野沢愛、川原滉太、春田帆乃香、金子一郎、宮本賢一、瀬川博子.
2. 発表標題 リン排泄分子Xpr1の生理学的役割の解明.
3. 学会等名 The 15th Annual Meeting of the Japan Transporter Research Association (JTRA 2020) 第15回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 リンの制御機構
3. 学会等名 第63回 日本腎臓学会 教育講演
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 リンの分子栄養学：過去から未来へ
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会 温故知新セッション
4. 発表年 2020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	瀬川 博子 (Segawa Hiroko) (70325257)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (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
---------	---------