

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03359

研究課題名（和文）生体内リン代謝と老化を繋ぐ分子機序解明の研究基盤

研究課題名（英文）Research for elucidating the molecular mechanisms linking phosphorus metabolism and aging.

研究代表者

増田 真志（MASUDA, Masashi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：50754488

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）：本研究は、老化に起因する小胞体ストレスによる腸管リン吸収制御機構の解明を目指す。若齢と高齢マウスの腸管リン吸収活性を比較した結果、高齢群のリン吸収活性は高かった。腸管リン酸輸送担体（Npt2b、PiT1/2）の中でもNpt2b遺伝子発現量は低かったが、PiT1/2の発現量は高かった。また、腸管における小胞体ストレス応答因子の中でもsXBP1の発現量は高齢群で低く、C/EBPbの発現量は高齢群で高かった。そして、PiT1/2遺伝子転写活性はC/EBPbによって促進することから、老化で腸管リン吸収が増加する原因はC/EBPbを介したPiT1/2の発現増加であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレスは細胞内外の環境変化に起因する小胞体内の異常タンパク質の蓄積により生じ、加齢によってもタンパク質の折り畳み機能が低下することで小胞体ストレスは増大する。軽度の小胞体ストレスは生体内防御反応を誘発するが、それでは処理しきれない程に過剰になると細胞に対して悪影響を及ぼして、糖尿病、神経変性疾患、脂質異常症、循環器疾患、がん等、種々の加齢性疾患を誘発する。これまで生体内リンも加齢性疾患や寿命に影響を与えることが報告されてきたが、その詳細な機序に関しては不明な点が多い。本研究の成果は、老化状態における小胞体ストレスと生体内リンを介した加齢性疾患発症機序の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the regulatory mechanism of intestinal phosphorus absorption by endoplasmic reticulum (ER) stress caused by aging. A comparison of intestinal phosphorus absorption activity between young and aged mice showed that the aged group had higher phosphorus absorption activity. Among the intestinal phosphate transporters (Npt2b and PiT1/2), Npt2b gene expression was low, but PiT1/2 expression was high. Among the ER stress response factors in the intestine, the expression level of sXBP1 was low in the aged group, while the expression level of C/EBPb was high in the aged group. Moreover, PiT1/2 gene transcriptional activity is promoted by C/EBPb, suggesting that the cause of increased intestinal phosphorus absorption in aging is increased PiT1/2 expression via increased expression of C/EBPb.

研究分野：老化

キーワード：生体内リン 小胞体ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体ストレスは、細胞内外の環境変化を起因とする小胞体内の異常タンパク質の蓄積により生じ、加齢によってもタンパク質のフォールディング能が低下することで小胞体ストレスは増大する。この小胞体ストレスが軽度の場合は生体内防御反応を誘発するが、それでは処理しきれない程に過剰になると細胞に対して様々な悪影響を及ぼし、その結果、糖尿病、神経変性疾患、脂質異常症、循環器疾患、がん等、様々な加齢性疾患を誘発する。また、小胞体ストレスは転写因子の ATF4 や CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ホモログタンパク質 CHOP と同様に C/EBP $\beta$  発現も誘導する (Chen C. *J Biol Chem* 279, 2004)。血清リン濃度は、主に腸管に発現する Na 依存性リン酸トランスポーター Npt2b を介した小腸でのリン吸収、腎臓に発現する Npt2a と Npt2c を介した尿中リン排泄の制御により、一定範囲内に維持される。これら Npt2 ファミリー遺伝子の発現調節は、食事性リンやホルモン (活性型ビタミン D、副甲状腺ホルモン、繊維芽細胞増殖因子 23 など) による制御がよく知られている (Wagner CA. *Pflugers Arch* 466, 2014)。一方、我々は Npt2b 遺伝子発現が C/EBP $\beta$  の調節を受けることを見出した (Masuda M. *Biolchem J* 477, 2020)。C/EBP $\beta$  は 1 つのエクソンから成る遺伝子で、C/EBP $\beta$  mRNA からは翻訳開始点の異なる 3 つのアイソフォーム (LAP1、LAP2、LIP) が合成される。LIP には LAP1/2 に存在する転写活性化ドメインが存在しないものの、転写活性を有する。さらに、老化マウスの LAP/LIP 比が減少し、これが寿命の短縮や老化促進に関わる。C/EBP $\beta$  により Npt2b 遺伝子発現が誘導されることを我々は明らかにしたが、その調節に関わる C/EBP $\beta$  アイソフォームなどの詳細な機序は不明のままである。

(2) 近年、リンと寿命を含めた老化との関連が注目されており、加齢性疾患である慢性腎臓病などで生じる高リン血症は、骨ミネラル代謝異常や筋萎縮など更なる病態の悪化に繋がることを我々は報告している (Masuda M. *J Clin Invest* 125, 2015; Niida Y, Masuda M. *J Clin Biochem Nutr* 67, 2020)。また、我々はビタミン A が C/EBP $\beta$  を介して腸管のリン吸収や Npt2b 発現を抑えることを見出したが (Masuda M. *Biolchem J* 477, 2020)、慢性腎臓病モデル動物にビタミン A を投与しても同様の影響は見られない (未発表)。この原因として、慢性腎臓病で増加する小胞体ストレスに着目した。慢性腎臓病で過剰になる小胞体ストレスにより増加する転写因子 ATF4 と C/EBP $\beta$  は、二量体を形成し血管平滑筋細胞のリン取込みを担う PiT1/2 を増加させる (Masuda M. *JCI Insight* 1, 2016)。また、この小胞体ストレスは C/EBP $\beta$  mRNA から産生される LAPs/LIP 比に影響を与えることが報告されている (Li Y. *J Biol Chem* 283, 2008)。

### 2. 研究の目的

本研究は、生体内リンと老化との関係を明らかにするために、老化に起因する小胞体ストレスによる腸管リン吸収制御機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 若齢マウス (24 週齢) と高齢マウス (90 週齢) の血漿リン濃度を測定した。さらに、腸管を採取し、腸管リン吸収活性、腸管リン酸トランスポーター (Npt2b、PiT1/2) の mRNA 発現量、小胞体ストレス応答因子 (sXBP1、CHOP、C/EBP $\beta$ ) の mRNA 発現量、C/EBP $\beta$  のアイソフォーム比 (LAP/LIP) を解析した。また、腎臓においては、腎臓のリン酸トランスポーター (Npt2a、Npt2c) の mRNA 発現量、小胞体ストレス応答因子 (sXBP1、CHOP、C/EBP $\beta$ ) タンパク質発現量、C/EBP $\beta$  のアイソフォーム比を解析した。

(2) 若齢マウス(9週齢)に小胞体ストレス誘導剤である Thapsigargin (1 mg/kg) を腹腔内投与 24 時間後に腸管を採取し、腸管のリン酸トランスポーター (Npt2b、PiT1/2) の mRNA 発現量、小胞体ストレス応答因子 (ATF4、CHOP、sXBP1、ATF6) 遺伝子の発現量を解析した。

(3) human Npt2b 遺伝子転写開始点上流 - 1.5 kbp (hNp2b-1.5k)、- 1.1 kbp (hNp2b-1.1k)、- 0.2 kbp (hNp2b-0.2k)、+17 bp (hNp2b+17) を含むルシフェラーゼレポーターベクターと sXBP1 の発現ベクターを作製し、NIH3T3 細胞に各ベクターを遺伝子導入して sXBP1 による Npt2b 遺伝子転写活性への影響を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 若齢マウスと高齢マウスの生体内リン代謝調節機構の変化を検討した。その結果、若齢マウスと比較して高齢マウスで血漿リン濃度は増加傾向を示し、腸管リン吸収活性も高齢群で増加傾向を示した。しかし、若齢マウスと比較して高齢マウスで腸管の Npt2b mRNA 発現量は減少していたが、腸管の PiT1/2 mRNA 発現量は高齢群で増加していた。次に、腸管の小胞体ストレス応答因子の発現変化を検討した結果、小胞体ストレス応答因子の中でも sXBP1 mRNA 発現量は高齢マウスで有意に減少した。CHOP mRNA 発現量は加齢による変化はなかったが、C/EBPβ mRNA 発現量は高齢マウスの腸管で有意に増加した。また、腸管の C/EBPβ のアイソフォーム比 (LAP/LIP) は若齢と高齢間で差は認められなかった。

次に、腎臓の Npt2a と Npt2c の mRNA 発現量を検討した結果、若齢と高齢間で差は認められなかった。腎臓の sXBP1 と C/EBPβ mRNA 発現量は高齢マウスで減少傾向を示したが、CHOP mRNA 発現量は高齢マウスで有意に増加した。また、腎臓の C/EBPβ のアイソフォーム比は高齢マウスで増加傾向を示した。

(2) マウスに小胞体ストレス誘導剤を投与して腸管のリン代謝調節機構の変化を検討した。その結果、有意ではなかったが小胞体ストレス誘導剤は腸管の Npt2b mRNA 発現量を有意に低下させた。また、腸管の小胞体ストレス応答因子の ATF4、CHOP、ATF6 の mRNA 発現量は若齢と高齢との間に差は認められなかったが、sXBP1 mRNA 発現量は高齢マウスで増加した。

(3) 各 human Npt2b 遺伝子レポーターベクター (hNp2b-1.5k、hNp2b-1.1k、hNp2b-0.2k、hNp2b+17) を遺伝子導入した NIH3T3 細胞に sXBP1 を過剰発現させると、hNp2b+17 以外のレポーターベクターでは sXBP1 によって転写活性が低下した。このことから、human Npt2b 遺伝子転写開始点上流 - 0.2 kbp から +17 bp までの間に、sXBP1 に応答する領域が存在する可能性が示唆された。実際に、ゲノム解析ソフトウェア Genomatix によっても sXBP1 に応答する領域が予測された。

以上の結果から、加齢によって腸管リン吸収活性は促進すること、そして腸管 Npt2b mRNA 発現量は減少するが、PiT1/2 mRNA 発現量は増加することが分かった。また、腸管の小胞体ストレス応答因子の sXBP1 mRNA 発現量は加齢によって低下し、C/EBPβ mRNA 発現量は加齢で増加することが分かった。過去の我々の報告で、PiT1/2 遺伝子転写活性は C/EBPβ によって促進することが分かっている。つまり、老化によって腸管リン吸収能は促進するが、その原因は腸管 Npt2b ではなく、C/EBPβ を介した PiT1/2 の発現増加が寄与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Miyazaki-Anzai Shinobu, Masuda Masashi, Keenan Audrey L., Shiozaki Yuji, Miranda Jose G., Miyazaki Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Activation of the IKK2/NF- B pathway in VSMCs inhibits calcified vascular stiffness in CKD	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e174977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.174977	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 Mori Yuki, Masuda Masashi, Yoshida-Shimizu Risa, Aoyagi Saki, Adachi Yuichiro, Nguyen Anh The, Maruyama Yusuke, Okumura Yosuke, Kamei Yuki, Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Ohminami Hirokazu, Taketani Yutaka	4. 巻 126
2. 論文標題 All-trans retinoic acid induces lipophagy through the activation of the AMPK-Beclin1 signaling pathway and reduces Rubicon expression in adipocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 109589 ~ 109589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2024.109589	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 Okumura Yosuke, Abe Kotaro, Sakai Shoko, Kamei Yuki, Mori Yuki, Adachi Yuichiro, Takikawa Masaki, Kitamura Ayano, Ohminami Hirokazu, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Kambe Taiho, Yamamoto Hironori, Taketani Yutaka	4. 巻 326
2. 論文標題 Elevated luminal inorganic phosphate suppresses intestinal Zn absorption in 5/6 nephrectomized rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F411 ~ F419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00310.2023	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 Oda Naoko, Sugihara Kohei, Uebanso Takashi, Ohminami Hirokazu, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Yamanaka-Okumura Hisami, Taketani Yutaka	4. 巻 73
2. 論文標題 Dietary phosphate disturbs of gut microbiome in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 221 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.23-9	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 Kamei Yuki, Okumura Yosuke, Adachi Yuichiro, Mori Yuki, Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Ohminami Hirokazu, Masuda Masashi, Yamanaka-Okumura Hisami, Taketani Yutaka	4. 巻 73
2. 論文標題 Humoral and cellular factors inhibit phosphate-induced vascular calcification during the growth period	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 198 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.23-11	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 Yimamu Yilimulati, Ohtani Ayako, Takei Yuichiro, Furuichi Airi, Kamei Yuki, Yamanaka-Okumura Hisami, Ohminami Hirokazu, Masuda Masashi, Miyazaki Makoto, Yamamoto Hironori, Taketani Yutaka	4. 巻 71
2. 論文標題 25-hydroxyvitamin D-1 -hydroxylase (CYP27B1) induces ectopic calcification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 103 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.22-16	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 Masuda Masashi, Yoshida-Shimizu Risa, Mori Yuki, Ohnishi Kohta, Adachi Yuichiro, Sakai Maiko, Kabutoya Serina, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Yamamoto Hironori, Miyazaki Makoto, Taketani Yutaka	4. 巻 106
2. 論文標題 Sulforaphane induces lipophagy through the activation of AMPK-mTOR-ULK1 pathway signaling in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 109017 ~ 109017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2022.109017	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 Miyazaki-Anzai Shinobu, Masuda Masashi, Shiozaki Yuji, Keenan Audrey L., Chonchol Michel, Kremoser Claus, Miyazaki Makoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Free Deoxycholic Acid Exacerbates Vascular Calcification in CKD through ER Stress-Mediated ATF4 Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 857 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/kid.0007502020	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 Adachi Yuichiro, Masuda Masashi, Sakakibara Iori, Uchida Takayuki, Niida Yuki, Mori Yuki, Kamei Yuki, Okumura Yosuke, Ohnami 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 e202101345
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17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masashi Masuda, Yuichiro Adachi, Yutaka Taketani
2. 発表標題 All-trans retinoic acid changes muscle fiber type via increasing GADD34 dependent on MAPK signal
3. 学会等名 The 3rd Japan-France International Symposium on Space Nutrition/Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nguyen The Anh, 増田真志, 森優樹, 足立雄一郎, 大南博和, 竹谷豊
2. 発表標題 All-transレチノイン酸はマウス肝細胞においてオートファジーを介して脂肪分解を誘導する
3. 学会等名 第46回日本日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuichiro Adachi, Allison M. Williams, Masashi Masuda, Yutaka Taketani, Paul J. Anderson, Pavel Ivanov
2. 発表標題 Stress granules at the crossroad of acute and chronic stress
3. 学会等名 A Biochemical Society Scientific Meeting RNA Granules 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Mori, Masashi Masuda, Risa Yoshida-Shimizu, Anh The Nguyen, Kohta Ohnishi, Hirokazu Ohnami, Koichiro Hamada, Yutaka Taketani
2. 発表標題 All-trans retinoic acid induces lipolysis via autophagy in mouse adipocytes
3. 学会等名 2023Kern Lipid Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森優樹、増田真志、Nguyen The Anh、大西康太、大南博和、濱田広一郎、竹谷豊
2. 発表標題 レチノイン酸によるリポファジーへの影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本菜摘、増田真志、足立雄一郎、春本恵里花、野邊悠太郎、大南博和、竹谷豊
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルマウスの腎臓内ビタミンA代謝調節機構
3. 学会等名 日本ビタミン学会第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増田真志
2. 発表標題 骨ミネラル代謝異常における脂溶性ビタミンおよび生理活性脂質の病態生理学的役割の研究
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春本恵里花、増田真志、佐々木皓平、足立雄一郎、森優樹、大南博和、山本浩範、竹谷豊
2. 発表標題 高齢マウスの腎臓におけるビタミンA代謝関連遺伝子発現変化
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野邊悠太郎、増田真志、佐々木皓平、足立雄一郎、大南博和、竹谷豊
2. 発表標題 慢性腎臓病の腎臓におけるall-trans retinoic acid水酸化酵素Cyp26b1制御機構の解明
3. 学会等名 第55回日本栄養・食糧・学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立雄一郎、増田真志、竹谷豊、Paul Anderson、Pavel Ivanov
2. 発表標題 長時間の小胞体ストレス暴露はストレス顆粒形成不全を引き起こす
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本菜摘、増田真志、春本恵里花、野邊悠太郎、大南博和、竹谷豊
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルマウスの腎臓内ビタミンA代謝変化
3. 学会等名 第26回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 足立雄一郎、増田真志、榊原伊織、内田貴之、佐々木皓平、野邊悠太郎、大南博和、大西康太、奥村仙示、山本浩範、二川健、竹谷豊
2. 発表標題 all-transレチノイン酸は小胞体ストレス応答関連因子GADD34の発現制御を介して筋線維タイプ変化を誘導する
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 増田真志
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるエピジェネティクス制御によるビタミンA代謝変動
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立雄一郎、増田真志、榊原伊織、内田貴之、大南博和、奥村仙示、二川健、竹谷豊
2. 発表標題 all-transレチノイン酸は小胞体ストレス応答関連因子GADD34の転写・転写後制御を介して筋線維タイプ変化を引き起こす
3. 学会等名 第62回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Adachi, Masashi Masuda, Kohei Sasaki, Hirokazu Ohnami, Hisami Yamanaka-Okumura, Hironori Yamamoto, Yutaka Taketani
2. 発表標題 Hypervitaminosis A contributes to kidney injury through excessive endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease
3. 学会等名 ASN Kidney week 2021 (国際学会)
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、春本恵里花、大南博和、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腎臓の小胞体ストレスを介したall-trans retinoic acid水酸化酵素Cyp26b1制御機構の解明
3. 学会等名 第6回 日本CKD-MBD研究会
4. 発表年 2022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	金子 一郎 (KANEKO Ichiro) (40389515)	兵庫県立大学・環境人間学部・准教授  (24506)	
研究分担者	谷村 綾子 (TANIMURA Ayako) (10610199)	島根県立大学・看護栄養学部・准教授  (25201)	
研究分担者	安倍 知紀 (ABE Tomoki) (00736605)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員  (82626)	

#### 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
---------	---------