

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17800

研究課題名（和文）細胞内リン酸排出分子Xpr1による抗組織老化作用の解明

研究課題名（英文）How Inorganic phosphate exporter Xpr1 regulates phosphate toxicity in aging

研究代表者

塩崎 雄治（SHIOZAKI, Yuji）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：70908748

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）：本研究は、リン酸排出トランスポーターXpr1が細胞内リン酸蓄積を抑制してリン酸毒性を軽減する、と仮説をたて解析した。本研究の結果では近位尿細管細胞でのXpr1 ノックアウト（KO）によって、リン酸排出だけでなくリン酸取り込み活性も減少するが、細胞内リン酸量が増加することを認めた。さらに、Xpr1 KO細胞は高リンメディアやCPPに対するリン毒性感受性が亢進した。また、高リン血症を呈するKlotho KOマウスでは全身の臓器においてXpr1発現が変化した。これらの結果より、Xpr1はリン酸排出によって細胞内リン酸蓄積を防ぎ、高濃度のリン酸およびCPP抵抗性に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞レベルでのリン酸排出活性が高リンに対する毒性軽減に寄与することを示した。一方で、近位尿細管細胞ではXpr1抑制がリン酸排出だけでなくリン酸取り込みにも影響したことから、Xpr1活性は腎臓の再吸収などにも関与し血中リン濃度に影響する可能性があることが示唆される。今後、老化に伴って臓器・細胞のXpr1発現変化とリン毒性抑制への役割を明らかにすることで、Xpr1活性を標的とした創薬や食品成分によるリン毒性およびリン代謝制御を可能とし、リン関連疾患の治療・緩和につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that Xpr1, an inorganic phosphate exporter, can reduce high phosphate-induced toxicity via regulating of intracellular inorganic phosphate levels. In this study, we conducted following research, 1) whether Xpr1 regulates intracellular phosphate levels and 2) whether knockout of Xpr1 aggravate high phosphate-induced toxicity. We prepared Xpr1 knockout (KO) proximal tubular cells by CRISPR-Cas9. Expression of phosphate transporter (Inward) such as NaPi2a and NaPi2c were downregulated in Xpr1 KO cells, but Xpr1 KO cells keep higher intracellular phosphate levels than WT cells after 3 hours incubation as efflux analysis. Xpr1 KO cells had high toxic sensitivity to high-phosphate media or Calciprotein particles (CPP) compared with WT cells. Accordingly, this research suggested that Xpr1 can regulate intracellular phosphate levels and inhibit phosphate-induced toxicity.

研究分野：分子栄養学

キーワード：リン代謝 リン毒性 老化 Xpr1 リン酸排出

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において、リンは核酸、タンパク質、リン脂質などの構成成分としての機能、シグナル伝達および骨の形成など様々な役割を担う。しかしながら、食事からの過剰なリン摂取は慢性腎臓病の発症や合併症の進行に関与するだけでなく、様々な臓器において組織障害や老化の進行に関与する可能性が示唆されている。全身の臓器においてほとんどの細胞は、リン酸取り込みトランスポーターとして III 型 Na 依存性リン酸トランスポーター PiT1 (SLC20A1) および PiT2 (SLC20A2) のみを発現するが、腸管は NaPi2b (SLC34A2)、腎臓では NaPi2a (SLC34A1) および NaPi2c (SLC34A3) も発現し、リンの吸収もしくは再吸収に機能する。一方で多くの細胞はリン酸排出トランスポーターとして Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor (XPR) 1 を発現する。XPR1 は現段階において哺乳類で唯一の無機リン酸排出活性に寄与する分子であることが同定されており、細胞内リン酸濃度の調節に不可欠であることが予想される。本研究は XPR1 が全身の臓器・細胞でのリン蓄積を防ぐことで、臓器・細胞レベルでのリン酸毒性およびリン誘導性の組織老化を防ぐ役割があるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

XPR1 はリン酸排出機能を介した細胞内リン酸濃度制御により、高リン誘導性の障害を防ぐ機能を持つことを明らかにすることを目的とし、(1) Xpr1 knockout (KO) マウスモデルもしくは Xpr1 KO 細胞を作製して細胞内リン酸の蓄積がみられるか、(2) Xpr1 KO マウスまたは Xpr1 KO 細胞株ではリン毒性が亢進するか、(3) 高リン血症を呈する Klotho KO マウスで Xpr1 遺伝子発現が変化するか、の3項目を解析した。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 による Xpr1 KO 細胞の作製

近位尿細管 (フクロネズミ腎臓:OK) 細胞の Xpr1 遺伝子を機能欠損するために、Xpr1 遺伝子コーディング配列内の ATG に近い箇所において single guide RNA を設計し、Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red) (TaKaRa) に組み込んだ。作成したプラスミドを細胞に導入して 24 時間後に赤色蛍光にて単離し、96-well プレートに播種しシングルセル由来の細胞クローンを得た。単離した細胞株でのフレームシフト変異を確認したうえで、内因性 Xpr1 タンパク質発現を検討した。野生型株 (WT) と比較し、タンパク質の発現消失が見られるクローンを Xpr1 knockout (Xpr1 KO) 株とし、解析を行った。

total RNA 抽出及び cDNA 合成

播種後 5 日目の OK 細胞に ISOGEN (Wako) 200 μ l を加え回収し、50 μ l のクロロホルムを加え、白濁するまでボルテックスし室温で 5 分間静置した後、12000 x g (4 $^{\circ}$ C) で 15 分間遠心した。次に水層を回収し、そこへ等量の 2-プロパノールを加えてボルテックスでよく混和し、室温で 10 分間静置した後、12000 x g (4 $^{\circ}$ C) で 10 分間遠心した。生じた沈殿を 70 %エタノールで洗浄、真空乾燥させた。得られた沈殿を滅菌水に溶解し、total RNA とした。total RNA を DNase 処理し、M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) と反応させて cDNA を合成した。

32 P を用いた細胞外リン酸排出の測定

過去の報告を参考に一部を改変して行った (Xingyao Li., *et al.* *PNAS*, 2020 Feb 18;117(7):3568-3574.)。細胞内へ 20 分間 32 P を取り込ませた後、細胞を 600 μ l Pi free medium (Cat. No. 11971025, Gibco) で 2 回洗浄し、1 mM の Pi を含む efflux media (Pi free medium+1 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5, 15 mM HEPES-KOH, pH 7.4) を 600 μ l 加えた。細胞 plate を 37 $^{\circ}$ C に移して静置し細胞外へ 32 P を排泄させ、30 分間、1 時間、2 時間経過時にそれぞれ上清 60 μ l を回収し、3 時間経過時点ですべての上清を回収した。続いて、氷冷した 400 μ l stop solution で 1 回洗浄後、細胞を 300 μ l の 0.1 N NaOH で溶解し、20 μ l をタンパク定量に使用し、細胞溶解液の残りおよび回収上清の 32 P 活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。上清の測定にあたり、30 分間、1 時間、2 時間での 60 μ l 回収上清には 360 μ l メディウムを加え、3 時間の回収上清 (約 420 μ l) に液量を合わせた。排出活性は、各時間の回収時点での推定メディウム中 Pi 存在量を計算し、メディウム中 Pi 排出 (%) 活性を算出した。

高リン酸培地および Calciprotein particle (CPP) 添加と細胞生存率測定

過去の報告を参考に CPP を調製した (Kunishige, R., *et al.* *Sci Rep.* 2020; 10: 20125.)。OK 細胞 WT 株および Xpr1 KO 株を播種し、2 日間おきにメディウムを交換し 6 日目まで培養後、コントロール培地 (1 mM Pi)、1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH7.4 を加えて 3 mM Pi に調整したメディウム (3 mM Pi)、もしくは CPP 懸濁液を添加したメディウム (CPP) に交換し、6~8 時間 37 $^{\circ}$ C CO₂ インキュベータで培養した。1xPBS で洗浄後、Trypsin/EDTA 処理によって細胞を剥がし、遠心してメディウムに懸濁し、細胞数を計測した。3 well ずつ解析し (n=3)、野生型の 0 時間時点の細胞数平均値を 1 とし、細胞生存数を相対値にて算出した。

動物

徳島大学動物実験委員会の許可の下、徳島大学動物実験管理規則に従って行った。マウスは恒温の飼育室で明暗サイクルの条件下、プラスチックケース内で実験動物用固形飼料 (MF) と水道水の自由接触により飼育した。α-Klotho Knockout マウスは日本クレア株式会社より購入したものを使用した。

統計処理

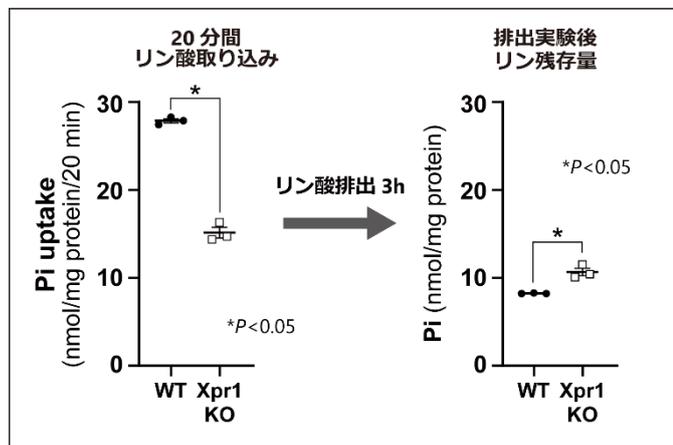
2 群間の比較は Student T-test、多群間の比較は ANOVA および Tukey-Kramer 法を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 近位尿細管細胞株 Xpr1 欠損株の作製とリン酸トランスポーター発現変化、細胞内リン酸取り込みと排出活性の測定および細胞内リン酸蓄積の検討

OK 細胞の Xpr1 KO 株を作製し、内因性 Xpr1 の遺伝子配列を検討したところ、Xpr1 遺伝子コーディング配列内の開始コドンに近い位置に終止コドンを生じるフレームシフト変異を確認し、Xpr1 アミノ酸配列のほとんどを欠損する細胞株を得た (Xpr1 KO 株)。

OK 細胞の野生型 (WT) 株および Xpr1 KO 株を分化期まで培養し、mRNA・タンパク質発現を解析したところ、内因性 Xpr1 タンパク質発現の消失を確認した。OK 細胞は内因性の Na 依存的リン酸取り込みトランスポーターとして NaPi2a および NaPi2c を発現するが、Xpr1 KO 株にて NaPi2a および NaPi2c mRNA 発現低下、NaPi2a タンパク質の発現減少がみられた。続いて、放射性同位体 ^{32}P を用いてリン酸取り込みおよびリン酸排出活性を測定した。20 分間のリン酸取り込みを解析したところ、Xpr1 KO 株ではリン酸取り込みは WT 株と比較して約 50% 程度有意に減少した (図左)。リン酸排出活性について、WT 株は 3 時間で取り込んだリン酸量の 68% を排出したが、Xpr1 KO 株では 20% のみリン酸を排出した。一方で、排出実験終了時点 (取り込み実験より 3 時間インキュベーション後) の Xpr1 KO 株細胞内リン酸残量は、WT よりも有意に増加した (図右)。このことから、Xpr1 KO 株ではリン酸取り込み活性が WT 株の 50% 程度に抑制されるにも関わらず、リン酸排出活性が著しく低下することによって、細胞内リン酸蓄積が起りやすくなる可能性が示唆された。

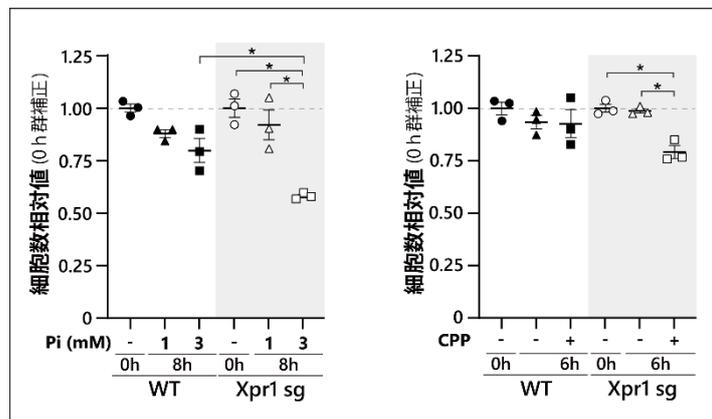


(2) 近位尿細管細胞における Xpr1 の高リン酸に対する毒性抑制作用検討

近位尿細管細胞はリン再吸収を担うためリン酸取り込み活性が高く、リン酸毒性の抑制には Xpr1 リン酸排出機能の関連が考えられる。近位尿細管におけるリン酸毒性は、過去の報告から、高濃度の無機リン酸あるいは高リン血症時の血中において肝臓由来の分泌タンパク質 Fetuin A とリン酸及びカルシウムが結合して形成される Calciprotein particle (CPP) が原因となる可能性が示唆されているため、Xpr1 KO 株のこれらリン毒性に対する感受性を解析した。高リン酸 (3 mM) 培地および CPP を添加し、6~8 時間後の細胞数の増減を検討したところ、WT 株では開始時点 (0h) の細胞数と比較して高リン酸培地 8 時間では減少傾向、CPP 添加 6 時間では有意な変化はみられなかった (図 黒色マーカー)。しかしながら、Xpr1 KO 株では高リン酸および CPP どちらの添加によっても、開始時点と比較して細胞数が有意に減少した。また、3 mM 高リン酸添加時群を比較すると、Xpr1 KO 株は WT 株よりも有意に減少した (図 白色マーカー)。これらの結果から、リン酸排出活性が低下する Xpr1 KO 株ではリン酸毒性に対する感受性が高くなる可能性が示唆された。

(3 mM) 培地および CPP を添加し、6~8 時間後の細胞数の増減を検討したところ、WT 株では開始時点 (0h) の細胞数と比較して高リン酸培地 8 時間では減少傾向、CPP 添加 6 時間では有意な変化はみられなかった (図 黒色マーカー)。

しかしながら、Xpr1 KO 株では高リン酸および CPP どちらの添加によっても、開始時点と比較して細胞数が有意に減少した。また、3 mM 高リン酸添加時群を比較すると、Xpr1 KO 株は WT 株よりも有意に減少した (図 白色マーカー)。これらの結果から、リン酸排出活性が低下する Xpr1 KO 株ではリン酸毒性に対する感受性が高くなる可能性が示唆された。



(3) Klotho KO マウスにおける全身性の Xpr1 遺伝子発現変化の解析

FGF23- α klotho シグナル異常によりリン酸再吸収抑制機構が破綻し、高リン血症を呈することで血管石灰化などを生じる α -Klotho KO マウスを通常食 (MF) で 8 週程度飼育し、肝臓、肺、腸管、骨、腎臓などの組織を採取し、total RNA 精製後、cDNA 合成を行い、real time PCR 法にて WT マウスと比べての Xpr1 遺伝子発現変化を検討した。WT マウスと比較し、Klotho KO マウスでは Xpr1 遺伝子発現が血管および腎臓で増加傾向、頭蓋骨、大腿骨で低下傾向がみられた。この結果から、高リン血症に応じて組織ごとに Xpr1 遺伝子発現が変化し、リン毒性に対する感受性の抑制、あるいは亢進が起こる可能性が示唆された。

研究成果のまとめ

近位尿細管細胞 Xpr1 KO 株を用いた解析から、Xpr1 がリン酸排出活性を介して細胞内リン酸蓄積を抑制し、高リン酸および CPP などに対する毒性を緩和する可能性が示唆された。また、Klotho KO マウスで Xpr1 の発現変化がみられたことから、高リン血症による臓器障害になんらかの役割を持つ可能性が示された。しかしながら、Xpr1 が実際に老化に応じて発現変化するか、組織の細胞内リン酸濃度が増減するかについては、今後、老齢マウスなどを用いて詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki S, Shiozaki Y, Hanazaki A, Koike M, Tanifuji K, Uga M, Kawahara K, Kaneko I, Kawamoto Y, Wiryasermkul P, Hasegawa T, Amizuka N, Miyamoto K. I, Nagamori S, Kanai Y, and Segawa H	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 1-16
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 Sumire Sasaki, Megumi Koike, Kazuya Tanifuji, Minori Uga, Kota Kawahara, Aoi Komiya, Mizuki Miura, Yamato Harada, Yuki Hamaguchi, Shohei Sasaki, Yuji Shiozaki, Ichiro Kaneko, Ken-ichi Miyamoto, Hiroko Segawa	4. 巻 69
2. 論文標題 Dietary polyphosphate has a greater effect on renal damage and FGF23 secretion than dietary monophosphate.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 173-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.69.173	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 Kazuya Tanifuji, Yuji Shiozaki, Megumi Koike, Minori Uga, Aoi Komiya, Mizuki Miura, Ayami Higashi, Takaaki Shimohata, Akira Takahashi, Noriko Ishizuka, Hisayoshi Hayashi, Yasuhiro Ichida, Shuichi Ohtomo, Naoshi Horiba, Ken-ichi Miyamoto, Hiroko Segawa	4. 巻 70
2. 論文標題 Effects of E0S789, a novel pan-phosphate transporter inhibitor, on phosphate metabolism: Comparison with a conventional phosphate binder.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 260-270
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 瀬川博子、塩崎雄治、金子一郎、宮本賢一
2. 発表標題 リンに関する生体機能 - 成長、疾患、寿命 -
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩崎雄治、瀬川博子
2. 発表標題 腎リン酸トランスポーターの機能制御と疾患
3. 学会等名 第16回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦美月、佐々木すみれ、小池萌、谷藤和也、宇賀穂、小宮蒼、濱口ゆき、原田和、塩崎雄治、宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 ポリリン酸は、モノリン酸よりも腎障害およびFGF23分泌に大きな影響を与える
3. 学会等名 第69回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木すみれ、塩崎雄治、小池萌、谷藤和也、宇賀穂、Wiriyasermkul Pattama、長谷川 智香、網塚憲生、宮本賢一、永森収志、金井好克、瀬川博子
2. 発表標題 Tmem174はリン酸トランスポーターを調節し高リン血症を予防する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minori Uga, Ichiro Kaneko, Sumire Sasaki, Megumi Koike, Kazuya Tanifuji, Kota Kawahara, Yuji Shiozaki, Peter W. Jurutka, Hiroko Segawa
2. 発表標題 The role of intestinal Cytochrome P450 in vitamin D metabolism.
3. 学会等名 22nd International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuji Shiozaki, Minoru Uga, Mizuki Miura, Aoi Komiya, Kazuya Tanifuji, Megumi Koike, Ken-ichi Miyamoto, Hiroko Segawa
2. 発表標題 Analysis of regulation of Tmem174 expression by Pi concentration and PTH signaling in opossum kidney cells
3. 学会等名 Physiology, Biology and Pathology of Phosphate Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦美月、佐々木すみれ、塩崎雄治、谷藤和也、小池萌、宇賀穂、宮本賢一、瀬川博子
2. 発表標題 Tmem174 はリン酸トランスポーターを調節し高リン血症を予防する
3. 学会等名 第7回日本CKD-MBD学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 増田真志、塩崎雄治、竹谷豊、宮崎淳	4. 発行年 2022年
2. 出版社 公益社団法人日本薬学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 ファルマシア 58 巻 4 号	

1. 著者名 瀬川博子、小池萌、塩崎雄治、宮本賢一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊～栄養・代謝物シグナルと食品機能～	

1. 著者名 谷藤和也、小池萌、宇賀穂、塩崎雄治、瀬川博子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 6
3. 書名 腎と透析 93巻5号 (11月号)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------