

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617019

研究課題名(和文)骨と血管の臓器相関による異所性石灰化の分子基盤解明とCKD栄養療法の開発

研究課題名(英文)Molecular regulation analysis of bone-blood vessel correlation and development of CKD nutrition therapy

研究代表者

伊藤 美紀子(Ito, Mikiko)

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号：50314852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)の末期に導入される血液透析患者の死因の約40%は、高リン血症がもたらす心血管疾患である血液透析時には半数の患者で既に血管石灰化の進行がみられ、早い段階でのリンの栄養管理が重要となってきた。本研究では、骨と血管の臓器相関から見た異所性石灰化の分子基盤を明らかにすることを目的とした。破骨細胞並びに石灰化させたヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いてリン調節候補分子とリン調節ホルモンによる機能を検討し、異所性石灰化につながる可能性を明らかにした。今後も継続して検討することで、CKD早期からの異所性石灰化抑制や新たな栄養療法の開発につながるかと考えている。

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 and function of Pi channel and role of the ectopic calcification in calcificated Human Aortic Smooth Muscle Cells.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：慢性腎臓病 血管石灰化 破骨細胞 血液透析 高リン血症

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の成人人口における慢性腎臓病 (CKD) 患者数は、1,330 万人 (12.9%) と推定されており、8 人に一人が CKD という計算になることから、今や「国民病」と言える疾患となっている (日本腎臓学会調査)。特に、腎機能が約半分に低下したステージ 3 以上の CKD 患者の総数は 1,098 万人 (10.6%) であり、これら多くの患者が、血液透析の予備軍であると言える。

我が国における CKD 対策の主な目的は、患者の QOL を損ない、多額の医療費を要する末期腎不全患者、ひいては透析・腎移植患者を減少させることにある。我が国の透析にかかる医療費は既に国民総医療費の約 4% (約 1 兆 3 千億円) に達しており、CKD の進行遅延は重要な課題となっている。さらに、血液透析患者の死因では、心不全、心筋梗塞、脳血管障害といった心血管病変が約 40% を占めており、健常人の 10~20 倍にも達することが特筆すべきことである。これらの心血管病変には、高リン血症が惹起する異所性石灰化による動脈硬化が大きく関わっており、食事からのリン摂取量が直接関与することから、透析導入患者においてはリン摂取基準が定められているが、CKD 患者には未だないのが現状である。

しかしながら、最近になって、透析導入時には約半数の患者で既に異所性石灰化が進行していることが報告されており、早期のリン管理が重要であることが示唆されている。これらのことから、CKD の早期リン栄養管理により、血液透析への移行遅延並びに、異所性石灰化の抑制を目指した栄養療法が大きく期待される。

### 2. 研究の目的

慢性腎臓病 (CKD) の末期に導入される血液透析患者は、年々増加の一途をたどり、2010 年には 30 万人を数えている。血液透析患者の死因の約 40% は、高リン血症がもたらす心血管疾患によることが明らかとなっており、血液透析導入時においてリンの摂取制限が設けられている。しかしながら、血液透析時には半数の患者で、既に血管の異所性石灰化の進行がみられ、早い段階でのリンの栄養管理が重要となってきた。本研究では、1) 骨と血管の臓器相関から見た異所性石灰化の分子基盤を明らかにし、2) これら分子基盤に基づいた CKD のリン栄養療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

CKD 患者における異所性石灰化進展の抑制を目指す栄養療法を開発するために、骨と血管の臓器相関からリン代謝調節を明らかにすることを目的とする。特に申請者がその存在を明らかにしている破骨細胞におけるリンチャンネルに注目して *in vitro*, *in vivo* の両面から検討を行う。

*in vitro* の系では、RAW264.7 細胞を RANKL

にて破骨細胞に分化させた破骨細胞様細胞を主に用いる。また、正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) を用いて、リンチャンネルと異所性石灰化の検討を行う。*in vivo* として高リン食、低リン食で飼育したマウスの骨髄から構築した primary 破骨細胞を用いて、リンチャンネルの検討を行う。また、CKD および透析患者の血清を用いて、血清リン濃度、リン調節ホルモンや食事内容によるリンチャンネルの機能制御について検討することで、CKD 早期からの血管石灰化抑制を目指す栄養療法の開発を目指す。

#### (1) 破骨細胞リンチャンネルの同定

##### 探索アプローチ

本分子は、分化後に発現する分子であることから、DNA microarray の結果から分化前後で発現の上昇した solute carrier protein (SLC) ファミリーの中から候補を探す。SLC はゲノム配列解析後、その機能・相同性から分類・命名されたトランスポーター、チャンネルなどの輸送分子ファミリーであるが、機能が未知の分子や、追加機能が見つかる分子も多く存在する。これらの推定機能と、阻害剤を用いた検討結果から焦点を絞り、候補分子を探索する。さらに、食事性リン濃度を変えたマウスの骨髄由来 primary 破骨細胞の分化・前後での DNA microarray を行い、さらに候補分子を検討する。

##### 機能からの検討

これら候補分子を分化前の RAW264.7 細胞に過剰発現させてリンチャンネルとしての機能を検討するとともに、分化後の破骨細胞に RNAi もしくは抗体 (市販) を用いて、阻害実験を行うことでリンチャンネル分子を明らかにする。

#### (2) リンチャンネル分子とリン調節ホルモンとの関連解析

新規リン調節ホルモン計 FGF23/Klotho に注目して、リン調節ホルモンとリンチャンネル分子との関連を明らかにする。破骨細胞様細胞を用いて、これらホルモンを直接添加し、リンチャンネルに対する効果を検討する。

#### (3) 血管平滑筋細胞を用いたリンチャンネルの機能解明

正常ヒト大動脈由来血管平滑筋細胞 (AoSMC) を用いる。血管平滑筋細胞に、-glycerophosphate 存在下で培養し、石灰化を誘導する。石灰化は ALP 染色、カルシウムの沈着を von kossa 染色で、リンの沈着を alizarin red 染色にて評価する。

石灰化過程におけるリンチャンネルの発現変化と、リン取り込み能について検討する。

血管平滑筋細胞におけるリンチャンネルの発現を、遺伝子レベル、タンパク質レベルで検討を行う。局在を免疫染色により明らかにし、石灰化調節を検討する。

各種リン調節ホルモン (FGF23, ビタミン D

など)による調節機構を明らかにし、骨と血管の臓器相関の点から石灰化におけるリンチャンネルの役割を明らかにする。

#### (4)CKD ならびに透析患者血清を用いたリンチャンネルの作用

CKD のステージ3～5ならびに透析患者血清を破骨細胞様細胞、ならびに血管平滑筋細胞に添加し、リンチャンネルへの影響を、その機能、発現(遺伝子レベル、タンパク質レベル)において健常人の血清添加時と比較検討し、患者血中の関連分子を探索する。対象者の食事状況調査を行い、血清リン値、eGFR、石灰化のレベルは診療録から情報を得る。

#### 4. 研究成果

破骨細胞への分化有無における DNA マイクロアレイを用いて、20,845 個の遺伝子を解析した。その結果、分化に伴って発現が2倍以上増加した遺伝子が406 個確認された。その中から、膜タンパク質である solute carrier (SLC) family, ANK, XPR に注目した。SLC family に属する分子はその機能が推定されている物が多く、先行研究で得られたリン輸送の性質と一致しないことから、ANK, XPR について検討を行った。

ANK は、分化に伴って約 20 倍の遺伝子発現増加を示すが、western blotting(WB)にて細胞内局在を検討したところ、分化の有無に関わらず、発現は細胞質に局限していた。免疫染色による検討でも、その発現は細胞膜には見られなかった。さらにその発現は、細胞外リン濃度の変化並びに骨添加によっても影響を受けなかったことから、目的とする分子ではないと考えられた。XPR は分化後に3～4倍の発現増加を示し、WB 解析により細胞質、細胞膜での発現を認め、リン濃度の変化により発現が上昇した。また、骨添加により発現量が増加したことから、破骨細胞においてリン代謝に関わる可能性がある分子であることが考えられた。

リン調節ホルモンである、FGF23、Klotho、FGF23+Klotho、PTH 添加による発現の明らかな変化は認められなかった。これらに関しては今後のさらなる検討が必要である。

血管石灰化との関連を明らかにするために、正常ヒト大動脈平滑筋細胞(AoSMC)にリンを添加して石灰化を誘導させた石灰化細胞と、非石灰化細胞による発現を検討した。その結果、石灰化細胞においてXPR 遺伝子発現の上昇が認められた。たんぱくの発現並びに経時的変化など継続して検討を行っている。

透析患者における血管石灰化との関連に関しては、血管石灰化を評価する機器の不足のため実施できなかった。しかしながら透析患者 52 名の食事調査によるリン摂取状況ならびに、採血は実施済みである。また、食事調査ならびに FGF23、Klotho を含むリン代謝調節因子と骨折の有無については検討を行

っており、研究データを蓄積しているところである。今後の課題として検討していきたい。

骨、血管におけるリン代謝調節を明らかにしていくためには、リン調節の調節臓器である腎臓におけるリン代謝調節の分子メカニズムや、リンの消費臓器である肝臓における調節を明らかにしていく必要があることから、共同研究としてこれらの研究に関しても進めた。

破骨細胞におけるリン調節に関しては、その性質や機能についての報告が少なく、これら分子の機能を明らかにしていくことは重要であると考えている。破骨細胞に存在するリン代謝調節分子を同定し、リン調節ホルモンを含めたリン代謝調節機構を明らかにする事は、骨あるいは生体内全体でのリン代謝調節機構の解明に重要である。骨・血管・腎におけるリン代謝の臓器相関を明らかにし、異所性石灰化のメカニズムを解明することはCKD 早期からの異所性石灰化、それに付随する心血管病変の抑制や新たな治療薬のターゲットの開発につながると考えている。

#### 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 7 件)

Nomura K, Tatsumi S, Miyagawa A, Shiozaki Y, Sasaki S, Kaneko I, Ito M, Kido S, Segawa H, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K, Miyamoto KI.(2014) Hepatectomy-Related Hypophosphatemia: A Novel Phosphaturic Factor in the Liver-Kidney Axis. J Am Soc Nephrol. 25(4):761-72 査読有 doi: 10.1681/ASN.2013060569.

Yamada F, Horie D, Nakamura A, Tanimura A, Yamamoto H, Segawa H, Ito M, Miyamoto K, Taketani Y, Takeda E. (2013) Role of Serine 249 of Ezrin in the Regulation of Sodium-Dependent Phosphate Transporter NaPi-IIa Activity in Renal Proximal Tubular Cells. J Med Invest. 2013; 60(1-2): 27-34 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60\\_27/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60_27/_pdf)

Furutani J, Segawa H, Aranami F, Kuwahara S, Sugano M, Bannai K, Yamato H, Ito M, Miyamoto KI. (2013) Dietary Inorganic Phosphorus Regulates the Intestinal Peptide Transporter PepT1. J Ren Nutr. 23(2) e11-20 査読有 doi: 10.1053/j.jrn.2012.02.006.

Kuwahara S, Aranami F, Segawa H, Onitsuka A, Honda N, Tominaga R, Hanabusa E, Kaneko I, Yamanaka S, Sasaki S, Ohi A, Nomura K, Tatsumi S, Kido S, Ito M, Miyamoto K. (2012) Identification and functional analysis of a splice variant of mouse sodium-dependent phosphate transporter Npt2c. *J Med Invest.* 59 (1-2):116-26. 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/59/1%2C2/59\\_1%2C2\\_116/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/59/1%2C2/59_1%2C2_116/_pdf)

Haito-Sugino S\*, Ito M\*, Ohi A, Shiozaki Y, Kangawa N, Nishiyama T, Aranami F, Sasaki S, Mori A, Kido S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI.(2012) Processing and stability of type IIc sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(9):C1316-30 同列筆著者、査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00314.2011.

Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto KI, Tsuji A, Kawai Y, Terao J.(2011) Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radic Biol Med.* 2011 Oct 1;51(7):1329-36 査読有 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017

Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H.(2011) Sodium-dependent phosphate cotransporters: Lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci.* 100(9), 3719-3730 査読無 (Review) doi: 10.1002/jps.22614.

[学会発表](計 11件)

市川早紀、津本佳奈、神村和仁、伊藤美紀子、坂上元祥(2014) 血液透析患者におけるリン摂取量の季節変動第17回日本病態栄養学会年次学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014.1.11~12

河村弘美、埴田理沙、津本佳奈、安住祐一、神村和仁、坂上元祥、伊藤美紀子 透析患者におけるリンに着目した食環境評

価方法の検討 第17回日本病態栄養学会年次学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2014.1.11~12

河村弘美、坂上元祥、伊藤美紀子(2013) 透析患者におけるバイオマーカーとリンを取り巻く食環境との関連、第60回日本栄養改善学会総会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2013.9.12~14

伊藤美紀子(2013) リン摂取と寿命(シンポジウム) 第67回日本栄養・食糧学会大会 5/24~5/26 名古屋大学(愛知県名古屋市)

津本佳奈、伊藤美紀子、神村和仁、坂上元祥 (2013) 糖尿病末期腎症で透析を受ける患者のリン摂取量の季節変動 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 5/17 熊本市民会館(熊本県熊本市)

荒木祐佳子、伊藤美紀子、加藤陽二、菊崎泰枝、北元憲利、松本大樹、室田佳恵子 (2013) 酵素グルコシダーゼや腸管モデル細胞を用いた配糖体Leptosinの代謝研究 日本農芸化学会 2013年度大会 東北大学(宮城県仙台市) 3/24~3/28

津本佳奈、茶木田真唯、伊藤美紀子、神村和仁、坂上元祥(2013) 血液透析患者のリン摂取量に影響する加工食品の利用頻度と食意識の調査 第16回日本病態栄養学会年次学術集会 1/12,13 国立京都国際会館(京都府京都市)

塩崎雄治、木戸慎介、辰巳佐和子、伊藤美紀子、杉野紗貴子、大井彰子、瀬川博子、宮本賢一(2012) Cell density regulates expression of type II Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporter Npt2a and Npt2c in Proximal Tubule Epithelial Cell. 第35回日本分子生物学会年会 12/11 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

古戎なな恵、新納英実、神村和仁、伊藤美紀子、坂上元祥 (2012) 血液透析を受ける糖尿病性末期腎症患者のリン摂取量調査 第49回日本糖尿病学会近畿地方会 11/17 国立京都国際会館(京都府京都市)

Akiko Ohi, Sakiko Haito Sugino, Mikiko Ito, Yuji Shiozaki, Kengo Nomura, Yuri Kusaka, Shohei Sasaki, Saori Ohnishi, Seiichi Yamaguchi, Shinsuke Kido, Sawako Tatsumi, Hiroko Segawa,

Ken-ichi Miyamoto, (2011) Molecular Consequences of the SLC34A3 Mutations of Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria (HHRH), The American Society of Nephrology (ASN), Pennsylvania Convention Center Philadelphia (U.S.A.), Nov8-13

塩崎雄治, 杉野紗貴子, 大井彰子, 辰巳佐和子, 伊藤美紀子, 宮本賢一 (2011) 高カルシウム尿を伴う遺伝性低リン血症性腎臓病の原因遺伝子リン酸トランスポーターNPT2cの変異体解析. 第54回日本腎臓学会学術総会, 6/15~17 パシフィコ横浜, (神奈川県横浜市).

〔図書〕(計 8件)

伊藤美紀子 (2014) 第30章 マグネシウム (翻訳) 最新栄養学第10版 建帛社 p406-418 (総 p1,144)

伊藤美紀子 (2014) 第8章 リン摂取と老化制御、ミネラル摂取と老化制御 宮本賢一・新井英一編集 建帛社 p105-122 (総 p176)

伊藤美紀子 (2013) CKD (慢性腎臓病) 臨床栄養学 (栄養科学シリーズ NEXT) 武田英二/中坊幸弘/竹谷豊編 講談社サイエンティフィック p132-134 (総 p178)

伊藤美紀子 (2012) 血中ミネラル (Fe, Ca, Mg, P) の定量、6.6 尿中ミネラル (Na, P, Ca) の定量 栄養生理学・生化学実験 (栄養科学シリーズ NEXT) 加藤秀夫/木戸康博/桑波田雅士・編 講談社サイエンティフィック p76-80, 91-92 (総 p176)

伊藤美紀子, 辰巳佐和子, 宮本賢一 (2011) 第2章-2 栄養不良の定義、腎不全医療における栄養管理の基礎知識 加藤明彦, 市川和子編集 日本メディカルセンター p71-81 (総 p177)

伊藤美紀子 (2011) 第10章 カルシウム・リンのトランスポーター、栄養・食品機能とトランスポーター 竹谷豊, 薩秀夫, 伊藤美紀子, 武田英二 編集 建帛社 p199-233 (総 p291)

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, 創薬応用研究の最新成果

- 金井好克 編集 メディカルドゥ p244-248 (総 p280)

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- 金井好克, 竹島浩, 森泰生, 久保義弘 編集 p230-239 京都廣川書店 (総 p471)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

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・准教授  
研究者番号: 50314852

(2) 研究分担者  
坂上 元祥 (SAKAUE Motoyoshi)  
兵庫県立大学・環境人間学部・教授  
研究者番号: 20283913