様 式 C－１９、F－１９、Z－１９ （共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年 　６ 月 ２８ 日現在

機関番号：３３４０３
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2015
課題番号：２５５６００５２

研究課題名（和文）疾患特異的な腸管トランスポーターの制御機構の解明と保健機能食品の開発基盤の確立

研究課題名（英文）Analysis of the regulation mechanism of disease-specific intestinal transporter genes and establishment of clarification and development foundation of functional food

研究代表者
山本　浩範（YAMAMOTO, HIRONORI）

仁愛大学・人間生活学部・教授

研究者番号：６０３１４８６１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸管トランスポーターを分子標的とした疾患特異的な保健機能食品（特定保健用食品）の開発を目的として、腎不全時または糖尿病時の腸管変動遺伝子の網羅的解析により、腸管における鉄、亜鉛、カルシム、ペプチド・アミノ酸などの栄養素の吸収に関与するトランスポーター遺伝子の発現データベースを作成した。また、疾病予防または治療の標的となる疾患特異的な栄養素センサー遺伝子群の同定として、いくつかの核内受容体や時計遺伝子を見出した。さらに、腎不全時における食事性リンの制限が、血管石灰化の予防だけでなく、腸管の鉄のトランスポーター遺伝子の発現を制御し、腎性貧血の改善に寄与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop the disease-specific functional food as the molecular target of intestinal transporter, the analysis of the intestinal gene using some disease animals including renal failure and diabetes etc has been observed. We gained that the expression database of transporter genes involved in the absorption of nutrients such as iron, zinc, calcium, peptides and amino acids. Further, the identification of disease-specific nutrient sensors genes targeted disease prevention or treatment, was found to some nuclear receptors and clock genes. In addition, restriction of dietary phosphorous during renal failure indicated the improvement of renal anemia as well as prevention of vascular calcification, and controls the expression of the intestinal iron transporter genes.

研究分野：臨床分子栄養学

キーワード：腸管トランスポーター　保健機能食品

１．研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームなど生活習慣病の治療法として、近年、特定保健用食品の寄与が重要となってきている。特に腎不全疾患においては腸管での栄養素や薬物の吸収および代謝のコントロールが重要と考えられるが、疾患時における腸管機能の変化は十分把握されてなく、治療効果や進展予防効果の予測が困難である。

我々は、これまでに不動化ストレスモデル動物において腸管遺伝子の網羅的発現解析およびミネラル吸収の分子メカニズムの解析(JBMM 2006, Toxicology 2006, Biochemical J.2010, Biochemical J.2010)およびヒト試験を行い食品成分の腸管での消化吸収機能の調節を報告した(Metabolism 2004, 2007)。さらに最近、腎不全モデルラット腸管組織の網羅的発現解析により栄養素・薬物の吸収、排泄に重要な新たな変動トランスポーター遺伝子群を見出すことに成功した。しかし、これらの遺伝子の変動メカニズムは不明のままであり、疾患特異的な腸管トランスポーターの制御機構の解明は、新しい保健機能食品を開発する上で重要な基盤となると考えた。

２．研究の目的

腎不全や糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病では、様々な代謝変動を伴うため、多種多様な薬剤を用いた治療アプローチが先行しているが、各疾患別に特定栄養素の制限や補給など栄養療法や運動などが薬物治療の効率化を考える上でも重要であることから、栄養と薬物の併用療法が推奨されている。実際、疾患時においては健常時と比して摂取する栄養や薬物の量や内容が大きく変動するが、疾患時における腸管機能が全体的にどのように変動しているのか理解されておらず、摂取した栄養素や薬物がどの程度、消化吸収され、代謝されるのか不明である。その結果、治療効果は予測困難となるだけでなく、下痢や嘔吐などを生じ、さらに病態を悪化するケースも少なくない。国内、国外の研究報告によると生活習慣病時における糖質やアミノ酸、リン酸など一部の栄養素の吸収評価やその消化吸収阻害剤の開発が行われているが、疾患時における腸管全体の総合的な機能評価は報告されていない。

そこで、我々独自の研究戦略として、１）疾患時の腸管サンプルの DNA マイクロアレイ法による網羅的発現解析とメタボロミクス手法を取り入れた代謝出納実験により疾患時の腸管トランスポーター遺伝子データベースを構築し、ソフトウェアを用いた予測計算により腸管全体の機能変動を把握する。２）標的とする腸管遺伝子を発現する腸管上皮系細胞を用いて消化吸収の機能性調節因子あるいは阻害剤のスクリーニングを行い、治療候補となる栄養素群あるいは薬剤の効果を疾患モデル動物で投与試験により検証する。３）その結果、新規機能性食品成分素材や薬剤の開発が可能となり、腸管遺伝子を標的とした新しい治療法開発に展開できると考えている。

本研究は、生活習慣病時の腸管栄養代謝の機能評価を把握するために、腸管遺伝子の網羅的発現解析とメタボロミクス解析を融合させた栄養代謝統合的データベース構築を行い、疾患特異的な腸管トランスポーター遺伝子群の制御可能な保健機能食品の開発と生活習慣病の発症・進展予防への寄与をめざした極めてチャレンジ性のある斬新な研究課題である。

３．研究の方法

（１）　論文報告に従い、アデニン誘導性腎不全モデルおよび５／６腎摘出腎不全モデルを作成、また、２型糖尿病を呈する Zucker ラット、動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスを購入飼育し、血中、尿中の生化学検査により病態解析を行う。さらに、正常および疾患動物の腸管粘膜組織より全 RNA を抽出し、DNA マイクロチップ（Affymetrix 社）を用いトランスクリプトーム解析を行い、さらにパスウエイ解析、Gene Ontology 解析を行い栄養代謝に重要な変動遺伝子群を同定する。また、腸管 cDNA を用いて定量的 PCR により抽出された遺伝子の変動を再確認する。

（２）　トランスクリプトーム解析で得られた遺伝子発現情報データと生化学検査データより相関性を検討し、疾患時の腸管トランスポーター遺伝子発現機能情報データベースを作成する。次に、データ計算による栄養素または薬物の消化吸収、代謝変動のシミュレーション解析を行う。さらに、腸管上皮細胞株（Caco-2, IEC-6）を用いて変動遺伝子群、特に栄養素の輸送や代謝に関わる遺伝子 SLC family、Channel family および代謝酵素などの活性測定および活性型ビタミン D やインスリンなどの内分泌ホルモンによる調節機構の解析、強制発現法や siRNA 法を用い機能解析を行う。

（３）　同定した疾患特異的に変動する腸管トランスポーター遺伝子群の発現機能情報データベースをもとに、同定した疾患時に有意に変動する SLC family、Channel family 遺伝子を腸管上皮系細胞株(Caco-2, IEC-6)に発現させ、細胞取り込み試験を 96 well 培養プレートを用いハイスループット解析により行う。さらに、候補となった栄養素材食品や薬剤、ホルモンなどは腎不全モデル動物を用いて治療の有効性や安全性について評価する。また、動物投与試験により栄養因子や薬剤の腸管応答性を腸管遺伝子データベースとの比較により検討し、生化学検査データと合わせて治療効果の評価を行う。

４．研究成果

（１）アデニン誘導性腎不全ラットの腸管に

いては、鉄や亜鉛、ビタミンCの吸収や代謝やペプチド・アミノ酸の輸送に関するトランスポーター遺伝子の変動が明らかになり、それら遺伝子が、疾患時に著しく低下または上昇することを確認した。また、糞中のミネラルを測定した結果、亜鉛および鉄の排泄量が有意に増加したことから、腎性貧血の原因とされるエリスロポエチン低下だけでなく、腸管での鉄および亜鉛吸収率の低下が考えられた。一方、腎不全では血中BUN値の増加よりタンパク制限食が腎保護に有効であるが、腸管ではタンパク代謝産物のペプチドやアミノ酸の吸収はむしろ増加することが示唆され、腎疾患におけるアミノ酸代謝系の悪循環の原因が腸管組織の栄養素吸収機構の障害によることが考えられた。また、疾患特異的な腸管トランスポーター遺伝子の変動に関与する栄養センシング遺伝子として幾つかの時計遺伝子を同定した。

（２）糖尿病モデルにおいては、血中活性型ビタミンD値の低下に伴う腸管カルシウム吸収に重要なTRPV6発現が低下し、副甲状腺機能の亢進が生じた。一方、骨から産生されるリン・ビタミンD代謝調節因子のFGF23の血中濃度には変化が見られなかった。糖尿病においては糖新生を促進するグルココルチコイド系が活性化するため、腎臓でのビタミンD異化酵素CYP24a1遺伝子の発現亢進により、血中活性型ビタミンD濃度の低下が生じる分子機構を明らかにした。さらに、選択的スプライシングにより産生されるデコイ型CYP24タンパクが増加することも見出した。

（３）腎疾患時のリン制限食は、高リン血症および二次性副甲状腺機能亢進による血管石灰化を予防するだけでなく、腸管鉄吸収関連遺伝子の発現上昇させることで腎性貧血の悪化を防ぐ可能性を見出した。

（４）　以上のことから、本課題研究である腎不全および糖尿病などの疾患モデル動物を用いた腸管トランスポーター研究は、疾患特異的な保健機能食品の開発につながることを確認した。

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３件）
Taketani Y, Masuda M, Yamanaka-Okumura H, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K, Takeda E, Yamamoto H. Niacin and Chronic Kidney Disease. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 61 (Suppl):S173-175. 2015 査読有 doi: 10.3177/jnsv.61.S173.

Takeda E, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. Increasing dietary phosphorus intake from food additives: potential for negative impact on bone health. Adv Nutr. 5(1):92-97. 2014 査読有 doi:10.3945/an.113.004002.

Wanjihia VW, Ohminami H, Taketani Y, Amo K, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, Takeda E. Induction of the hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 gene in offspring after isocaloric administration of high fat sucrose diet during gestation. J Clin Biochem Nutr. 53(3):150-157. 2013 査読有 doi:10.3164/jcbn.13-48.

〔学会発表〕（計４件）
山本浩範：小腸および腎臓におけるカルシウム輸送機構とCKD、第56回日本腎臓病学会、2013年5月10-12日、東京国際フォーラム、（東京）

阿部航太郎、山本浩範、中尾真理、中橋乙起、神戸大朋、竹谷豊、武田英二：慢性腎不全における亜鉛代謝異常の分子機構の解明、第17回日本病態栄養学会、2014年1月11-12日、大阪国際会議場、（大阪）

山本浩範、中尾真理、岡村友理香、池田涼子、岩野正之、武田英二：腎不全時における腸管鉄吸収異常の分子機構の解明とリン制限食の効果について、第9回日本栄養改善学会北陸支部学術総会、2014年2月23日、福井県繊協ビル、（福井）

中尾真理、山本浩範、福田詩織、竹谷豊、武田英二：食餌性リンによる鉄欠乏性貧血の進展および鉄代謝に及ぼす影響、第33回日本骨代謝学会、2015年7月23日- 25日、京王プラザホテル、（東京）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
山本　浩範（YAMAMOTO Hironori）
仁愛大学・人間生活学部・教授
　研究者番号：６０３１４８６１

(2)研究分担者
　　　　　　　　(　　　)

　研究者番号：

(3)連携研究者
　　　　　　　　(　　　)

　研究者番号：