

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461254

研究課題名(和文)CKD-MBD治療戦略における新しい腸管リン制御の展開

研究課題名(英文)Development of new intestinal phosphorus control in CKD-MBD treatment

研究代表者

瀬川 博子(SEGAWA, Hiroko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：70325257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、腸管リン代謝に腸型アルカリホスファターゼ(IAP)が関与すると仮定し、その役割を解明するために腸ALPノックアウトマウスの解析を行った。腸ALPノックアウトマウス小腸上部におけるALP活性の低下を確認した。IAPノックアウトマウスは野生型マウスと比較し、腎臓24水酸化酵素の発現が減少し、血中の活性型ビタミンD濃度は上昇していた。更に、腎臓NaPi発現及びびリンの取り込みは両マウスで変化は認められなかったが、腸管Npt2bはIAPノックアウトマウスで有意に減少、小腸でのリンの取り込みも低下していた。本研究において、腸ALPが腸管リン代謝に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In patients with chronic kidney disease (CKD), inorganic phosphate (Pi) retention leads to secondary hyperparathyroidism, uremic bone disease, cardiovascular calcification, and progression to end-stage renal disease. Inorganic phosphate (Pi) homeostasis is primarily regulated by the small intestine functions in Pi absorption, the kidney functions in Pi excretion, and bone acts as a Pi reservoir. The mechanism of intestinal Pi absorption, however, is still unknown. Previous reports suggested that Intestinal Alkaline phosphatases (IAP) regulate gut homeostasis and health. It is not clear that IAP is involved in the gastrointestinal Pi homeostasis. In the present study, we examined Pi homeostasis in IAP null mice. Intestinal Pi transport activity and transporter expression levels were significantly lower in IAP KO mice than WT mice. Furthermore, IAP KO mice showed higher levels of blood 1,25(OH)2D3 levels than WT mice. In conclusion, IAP may involve the gastrointestinal Pi homeostasis.

研究分野：分子腎臓栄養学

キーワード：リン 腸 腎臓

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease : CKD) は糖尿病性腎症の著しい増加や社会の高齢化により、年々増加の一途をたどっている。更に人工透析及び腎移植が必要な末期腎不全患者数は、全世界的に増加し続けていることから、世界的な大問題である。CKD では骨病変が起こるのみならず、血管を含んだ全身の石灰化を介して生命予後に影響することが明らかとなり、近年、全身性疾患としての CKD に伴う骨ミネラル代謝異常 (mineral and bone disorder : MBD) (CKD - MBD) が提唱されている。特に高リン血症は、副甲状腺細胞を刺激して副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を亢進させ、二次性副甲状腺機能亢進症の発症、骨の繊維化をもたらすこと、血管石灰化に關与することから、CKD 患者における生体内リン管理は重要視されており、生体内におけるリン代謝調節系の解明が待たれている。リン吸着剤は使用されているが、未だ、より良い対処法が望まれている。一方、早期発見、治療を行う事により、CKD への進行をいかに遅らせることも重要である。腎臓病患者においてリンの恒常性は破綻しており、いかに食事からのリンを制限するかが大切となっているが、食品中には多くのリンが含まれており、非常に困難である。

現在正常、CKD の様々な段階において、リン代謝調節機構が示され、対処が説かれているが、リン代謝そのものが未だ明らかとなっていないことが現実である。リンは骨の重要な構成要素であるだけでなく、細胞内で ATP などの高エネルギーリン化合物の構成成分としてエネルギー代謝の維持に必須の役割を演じている。また細胞膜のリン脂質を構成し、細胞膜機能の維持のうえでも重要な役割を果たしている。多くの生理機能を担うリンの生体濃度は厳密にコントロールされており、この恒常性の破綻は生命の危険をも招く。これまでリン代謝調節は副甲状腺ホルモン (PTH)、ビタミン D、カルシトニンなどカルシウム調節ホルモンの付随的な作用として行われていると考えられてきた。しかしながら近年、新規リン代謝調節因子 (フォスファトニン ; FGF23, MEPE, PHEX, klotho, FRP4) などの関与が明らかとなりリン代謝調節機構の複雑さ、カルシウムとは独立した調節系の存在が考えられ始めている。

-リン代謝調節に関わる臓器のクロストーク-

生体内リン代謝調節に大きな関わりをもつ臓器は入り口となる腸管 (感知・調節)、最終調節をする腎臓、貯蔵する骨である。それに加えリン利尿因子 PTH を分泌する副甲状腺や FGF23 を分泌する骨は生体内リン濃度を感知する臓器とも考えられる。腸は体内にリンを取り入れる臓器であるが、真っ先にリンを認識する臓器であるとも考えられる。そこで我々は、腸 (消化管) は栄養素であるリンを取り入れる臓器であるた

けでなく、食事性のリンを感知する臓器であると提唱する。

-現代人の食生活における生体の高リン暴露-

食生活の変化より、個人差はあるものメタボリックシンドロームのようなこれまでの日本人において見られなかった様々な疾病が現れている。リン酸が複数結合しているポリリン酸塩は、様々な用途で食品に添加され加工食品に使用されている。加工食品摂取の増加、つまりリン添加物含有摂取の増加により、これまでの日本人において見られなかった高リン暴露状態が子供から成人までの長期にわたり持続されている。CKD の主な現疾患は糖尿病が第一位であり、患者数は増加の一途をたどる。糖尿病から CKD ステージ早期段階では、リン利尿因子である PTH や FGF23 などの増加により血中リン濃度は見かけ上昇していない。しかしながら、リン利尿因子の上昇は生体内のリン感知機構が応答している現象である。よって、血中リン濃度が上昇する前段階からリン摂取に注意すべきであると考えられる。しかしながら、消化管のリン吸収機構の全てが明らかにされていない。

(2) 消化管におけるリン吸収機構の解明

食事に含まれるリンは無機リンおよび、タンパク質に含まれる有機リンの形態で存在するが、腸管では無機モノリン酸の形態で吸収されると考えられている。これまでの基礎研究から経細胞輸送と細胞間隙を介する受動輸送が想定されている。我々は、これまでの研究で、ノックアウトマウスやモデル動物等を用いて腸管トランスポーター分子の重要性を証明した。しかしながら、細胞間隙を介する分子機序を含め多くの事柄は明らかとなっていない。更に食事タンパク質に含まれる有機リンから無機モノリン酸を遊離する機構すら明らかにされていない。これまでに、齧歯類において食事性リン含量が等しいにも関わらず有機リン源の違いでラット腸管アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が異なることが報告されている。ALP には複数のアイソザイムが存在しており、大きく組織非特異的、胎児性、腸特異的に分類される。

(3) 腸管 (消化管) は生体への栄養素としてのリンの入り口である。我々は、栄養素であるリンを取り入れる臓器であるだけでなく、食事性のリンを感知する臓器であると提唱する。しかしながら、無機モノリン酸を遊離する機構、腸管吸収の詳細、感知機構等明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) (消化管) は栄養素であるリンを取り入れる臓器であるだけでなく、食事性のリンを感知する臓器であると提唱する。最終的にはこの場でリンを感知し体内へシグナルを出す第一の感知器官であることを証明する。(2) 無機モノリン酸を遊離す

る機構と、腸管吸収機構のつながりを中心に検討する。

3. 研究の方法

動物実験は 徳島大学動物管理規則に従い、委員会の承認手続きを行い、許可のもと実験を行った。

腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスのリンカルシウム代謝解析

腸管特異的アルカリフォスファターゼノックアウトマウスの個体復元および解析。受精卵で納入し、徳島大学動物実験施設にて個体復元を行った。また、個体復元後はそれぞれを交配し、解析に必要な交配を繰り返した。リンカルシウム代謝解析を行う。

(1) 血中 Pi, iCa 測定、(2) 活性型ビタミン D, FGF23, PTH 等のリン代謝調節因子の影響は市販されている ELISA を用いて測定する。(3) 尿中 Pi, Ca 排泄測定、(4) 腸管、腎臓 NaPi 解析、(5) 急速膜濾過法を用いた腎、腸刷子縁膜小胞における Pi 輸送測定、(6) everted-sac 法を用いた小腸 Pi 輸送活性。(7) 腸管を分割し、管腔内を生理的食塩水で洗浄、溶液を回収した。また、腸管上皮細胞をスクラップして回収した。管腔洗浄液および上皮細胞を検体とし、アルカリホスファターゼ活性を測定した。

(1) マウスより血漿および尿を採取し、以下のキットを用いて測定した。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, Osaka, Japan)、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)、クレアチニン濃度はクレアチニンキナーゼ・HMPS 法を用いた L タイプワコー CRE/M Kit (Wako) により測定した。血中イオン化カルシウムはラピットラボ 348 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Munich, Bavaria, BRD) を用いて測定した。

(2) 血中 PTH 濃度は PTH ELISA Kit (Immutopics International, Clemente, California)、血中 FGF23 濃度は FGF-23 ELISA Kit (KAINOS laboratories, Inc., Tokyo, Japan) により測定した。血中 Vit.D 濃度は 1,25(OH)2D3 ELISA Kit (Immundiagnostik AG, Germany) により測定した。

(3) マウスを CE-2 (日本クレア) の餌と蒸留水を自由摂取で 3 日間代謝ゲージにて飼育し、24 時間蓄尿と糞を回収した。

(4) 小腸粘膜、腎臓の採取と刷子縁膜小胞 (Brush border membrane vesicles; BBMV) 精製

動物はエーテル麻酔下で開腹し、小腸と腎臓を摘出した。腸管は生理食塩水を通して除去したのち、2 つの部位 (上部と下部) に分け、それぞれを氷冷したガラス板上で長軸方向に開き、カミソリを用いて粘膜を回収した。腎臓と小腸の BBMV はカルシウム沈殿法を用いて調整した。腎臓と小腸粘膜に complete

EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim, Germany) を添加した Homogenate buffer を加え、ワーリングブレンダーを用いて 2 分間ホモジナイズ後、この Homogenate buffer の 1/10 倍容の 1 M CaCl₂ を加え、氷冷しながら 15 分間攪拌した。そのサンプルを 5,000 rpm、4 で 15 分遠心し、上清を濾過して、さらに 18,000 rpm、4 で 30 分遠心した。遠心で生じた沈殿に Suspension buffer を加え、ポッターホモジナイザーで 10 ストロークして、18,000 rpm、4 で 45 分遠心した。得られた沈殿に Suspension buffer を加えて、注射針を用いて懸濁し腎臓および小腸 BBMV とした。

(5) everted-sac 法を用いたリン輸送

麻酔下で摘出したマウス小腸を、上部および下部に 2 分割し、各部分から 4 cm の腸を 2 つずつ切り取り、反転小腸を作成した。作成した反転小腸を、外側は Na⁽⁺⁾ solution および Na⁽⁻⁾ solution を、内側は Na⁽⁻⁾ solution を入れて 95% O₂、5% CO₂ の条件下において 37 で 0.5 時間反応させた。その後、反転小腸から solution を取り出し、液体シンチレーションカウンタ (ALOKA, Tokyo) で外側および内側 solution の放射活性を測定した。測定結果より、Na⁽⁻⁾ solution での結果をナトリウム非依存性の輸送とし、Na⁽⁺⁾ solution での結果と Na⁽⁻⁾ solution での結果の差をナトリウム依存性の輸送とした

(6) 急速膜濾過法を用いたリン輸送

BBMV を用いた Pi 輸送活性は急速膜濾過法を用いて測定した。BBMV 標品に放射標識された Pi を加えた uptake solution を加えて混ぜ、30 秒、60 秒、120 秒それぞれ反応させた後、氷冷した生理食塩水を加えて反応を停止した。これにニトロセルロース膜を用いて吸引濾過し、ニトロセルロース膜を INSTAGEL Plus (Perkin Elmer, MA, USA) で溶解させた後、液体シンチレーションカウンタ (ALOKA, Tokyo, Japan) で放射活性を測定した。

(7) Bessey-Lowry 法による小腸粘膜 BBMV ALP 活性測定

慢性腎臓病モデルマウス作製

マウスにアデニン 100 mg/kg BW を 1 日おきに計 7 回ゾンデで経口投与し、解剖した。

4. 研究成果

腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスのリンカルシウム代謝解析

基本解析

まず野生型マウス腸管の ALP 活性を測定した。ALP 活性は小腸近位において著しく高く、遠位になるにつれ活性が低くなることを確認した。腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスでは小腸近位で減少傾向を示し、小腸遠位では差がみられなかった。腸管アルカリフォスファターゼノックアウト

トマウス野生型マウスと比較して体重や摂食量に変化は見られなかった

生化学データ

腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスと野生型マウスと比較して血中イオン化カルシウム濃度、糞中、尿中カルシウム排泄量に変化はなかった。さらに血中リン濃度、尿中リン排泄量、および糞中リン排泄量にも変化は見られなかった。

血中 FGF23 濃度や血中 PTH 濃度に変化は見られなかったが、血中活性型ビタミン D 濃度は腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスで有意な増加を示した

腎臓におけるリン輸送活性と Npt2a および Npt2c 発現

腎臓 BBMV を用いて Na 存在下におけるリン輸送活性を検討したところ、変化は認められなかった (Fig. 4A)。また、ウエスタンブロット解析でリン酸トランスポーターである Npt2a および Npt2c のタンパク質発現を検討したところ、変化は見られなかった。

小腸におけるリン輸送活性と Npt2b 発現

小腸下部 BBMV を用いて Na 存在下におけるリン輸送活性を検討したところ、腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスで著しい減少を示した (Fig. 5A)。また、ウエスタンブロット解析でリン酸トランスポーターである Npt2b のタンパク質発現を検討したところ、野生型マウスと比較して腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスで Npt2b タンパク質発現が有意な減少を示した

アデニン誘発性腎臓病モデルマウス

アデニン投与群の野生型マウスはコントロール群の野生型マウスと比較し、有意に血中リン濃度が上昇したが、アデニン投与群の腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスはコントロール群の腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスと比較し血中リン濃度の上昇傾向は見られたものの、有意差はなかった。アデニン投与群の野生型マウスはアデニン投与群の腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスと比較して、血中リン濃度が有意な上昇を示した。また、血中クレアチニン濃度も同様の傾向が示された

本研究において、腸管アルカリフォスファターゼノックアウトマウスでは腸管でのリン吸収の減少及び腎臓病誘発時における腎障害の進行抑制が明らかになり、腸管アルカリフォスファターゼが CKD における高リン血症は正のターゲット分子になりえる可能性が示唆された。

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 11 件)

Kaneko, I., Tatsumi, S., Segawa, H., Miyamoto, K. I. *Clinical and experimental nephrology*, 21: 21-26, 2017. 査読有

Tatsumi, S., Miyagawa, A., Kaneko, I., Shiozaki, Y., Segawa, H., Miyamoto, K. *Journal of bone and mineral metabolism*, 34: 1-10, 2016 査読有

Segawa, H., Shiozaki, Y., Kaneko, I., Miyamoto, K. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 61 Suppl: S119-121, 2015. 査読有

Shiozaki, Y., Segawa, H., Ohnishi, S., Ohi, A., Ito, M., Kaneko, I., Kido, S., Tatsumi, S., Miyamoto, K. *The journal of medical investigation : JMI*, 62: 209-218, 2015. 査読有

Taketani, Y., Masuda, M., Yamanaka-Okumura, H., Tatsumi, S., Segawa, H., Miyamoto, K., Takeda, E., Yamamoto, H. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 61 Suppl: S173-175, 2015. 査読有

Kido, S., Fujihara, M., Nomura, K., Sasaki, S., Mukai, R., Ohnishi, R., Kaneko, I., Segawa, H., Tatsumi, S., Izumi, H., Kohno, K., Miyamoto, K. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 139: 301-316, 2014. 査読有

Kuwahara, M., Bannai, K., Segawa, H., Miyamoto, K., Yamato, H. *Biochimica et biophysica acta*, 1842: 1433-1443, 2014. 査読有

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, K. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25: 761-772, 2014. 査読有

Ohnishi, R., Segawa, H., Ohmoto, T., Sasaki, S., Hanazaki, A., Mori, A., Ikuta, K., Furutani, J., Kawakami, E., Tatsumi, S., Hamada, Y., Miyamoto, K. *The journal of medical investigation : JMI*, 61: 162-170, 2014. 査読有

Segawa, H., Ikuta, K., Miyamoto, K. *Clinical calcium*, 24: 1793-1799, 2014. 査読無

Ikeda, S., Yamamoto, H., Masuda, M., Takei, Y., Nakahashi, O., Kozai, M., Tanaka, S., Nakao, M., Taketani, Y., Segawa, H., Iwano, M., Miyamoto, K., Takeda, E. *American journal of physiology Renal physiology*, 306: F744-750, 2014. 査読有

[学会発表](計 9 件)

Kayo Ikuta, Hiroko Segawa, Shihoko Yuki, Ichiro Kaneko, Ai Hanasaki, Toru Fujii, Aoi Kushi, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto. Salivary Pi Handling May Be under the Control of Gastrointestinal Pi Sensing. American Society of Nephrology, Kidney Week 2016, 2016/11/16, Chicago, IL (米国)

Sawako Tatsumi, Atsumi Miyagawa, Osamu Fujii, Mao Ogata, Ichiro Kaneko, Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto. Hepatectomy-Induced Hypophosphatemia: Mechanisms Underlying Downregulation of Phosphate Transport in the Small Intestine. American Society of Nephrology, Kidney Week 2016, 2016/11/16, Chicago, IL (米国)

Ichiro Kaneko, Rimpi K. Saini, G. Kerr Whitfield, Mikiko Ito, Hiroko Segawa, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto, Mark R. Haussler, Peter W. Jurutka. FGF23: A Nurr-1 dependent phosphaturic hormone gene that is transcriptionally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D. 2016/4/19 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Ai Hanasaki, Hiroko Segawa, Kayo Ikuta, Toru Fujii, Ichiro Kaneko, Shihoko Yuki, Shirori Nishiguchi, Yuji Shiozaki, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto. Genetic Deletion of NaPi-2c Rescue Phenotype of klotho knockout mice without Improving Severe Hyperphosphatemia. American Society of Nephrology, Kidney Week 2015, 2015/11/6 San Diego, CA (米国)

Ichiro Kaneko, Jui-Cheng Hsieh, G. Kerr Whitfield, Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto, Mark R. Haussler, Peter W. Jurutka. 1,25-Dihydroxyvitamin D enhances human tryptophan hydroxylase gene expression through vitamin D responsive elements in human brain cells. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 2015/5/16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Haruna Sakaguchi, Sawako Tatsumi, Mao Ogata, Osamu Fujii, Tomohiro Arakaki, Atsumi Miyagawa, Kenta Nagamoto, Wako Takahama, Yukiko Hirobata, Akihiro Yasui, Ichiro Kaneko, Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto. Bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis: Study of osteocyte-ablated mice. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 2015/5/16 パシフィコ横浜(神奈川県横

浜市)

Shihoko Yuki, Hiroko Segawa, Shohei Sasaki, Kayo Ikuta, Ichiro Kaneko, Toru Fujii, Ai Hanasaki, Shiori Nishiguchi, Keiji Notsu, Eriko Aki, Yuji Shiozaki, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto. Disruption of intestinal alkaline phosphatase (Akp3) affects the phosphate homeostasis. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 2015/5/16 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Hiroko Segawa, Ichiro Kaneko, Yuji Shiozaki, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto.

The role of Na⁺-dependent Phosphate transporters in the body. ACN2015 Asian Congress of Nutrition. 2015/5/15 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Kayo Ikuta, Hiroko Segawa, Shohei Sasaki, Ichiro Kaneko, Yuji Shiozaki, Sawako Tatsumi, Ken-ichi Miyamoto, Inorganic Phosphate Handling in Salivary Glands. American Society of Nephrology, Kidney Week 2014, 2014/11/11, Philadelphia, PA (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 博子 (SEGAWA, Hiroko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：70325257