

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462816

研究課題名(和文) ビタミンD応答性新規リン感知システムによる生体内石灰化制御機構の解明

研究課題名(英文) The roles of vitamin D dependent novel phosphate sensing-system on calcium metabolism and local calcification.

研究代表者

増山 律子 (MASUYAMA, Ritsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：60297596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外リンを感知しカルシウム輸送を調節する新規システムを検討した。カルシウム吸収が低下した小腸VDRKOマウスにリン制限食を投与したところ、カルシウム吸収と骨量の増加を確認し、リン濃度変化に応答するATP-ピロリン酸代謝分子のENPP1の関与を確認した。さらに、腸上皮細胞輸送評価系の外液リン濃度を変化させたところ、リン濃度の低下によりENPP1の管腔側膜局在は減少し、ATPが外液に蓄積した結果、P2X受容体に作用してカルシウム流入は増加した。本研究の結果から、ENPP1によるATP代謝系が細胞外液リンに応答するセンサーであり、局所カルシウム輸送を調節する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The impaired calcium absorption in intestinal Vdr null mice was improved by dietary phosphate restriction and resulted in increased bone mass, indicating that intestinal luminal phosphate levels influenced calcium absorption. Accordingly, transcellular calcium transport in cultured polarized intestinal epithelial cells was increased when apical side of cells were exposed to low extracellular phosphate levels (0.5 mM phosphate) compared to normal or high phosphate levels (1.0 and 5.0 mM). Mechanistically, low phosphate levels increased ATP contents at the apical extracellular side which stimulated the apical ATP receptor to promote calcium entry. The luminal ATP levels were regulated by the apical abundance of the ATP metabolizing enzyme, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP1). Sub-cellular localization of ENPP1 was reduced when apical side of intestinal epithelial cells were exposed to low extracellular phosphate, and led to the increase in luminal ATP levels.

研究分野：骨代謝学、栄養学

キーワード：カルシウム輸送 リン 小腸 骨 ビタミンD

1. 研究開始当初の背景

腎機能が著しく障害されリン排泄能が低下する慢性腎臓病の患者数は、現在国内で1000万人超と推計され、新たな国民病として対策が急がれている。リン代謝に異常をきたすと、血管等、骨以外の軟組織に石灰化も多く出現するため、心血管系の機能も著しく障害され重篤な病態に陥る。しかしながら、リン代謝機構には不明な点が数多く残されており、リン代謝異常に対する薬物治療の成果が得られる例は少ない。さらに、加工食品が多用される近年の食習慣では食品添加物由来のリン過剰摂取も懸念され、日常の食生活にはリン恒常性を破綻させる危険性が潜んでいる。

リンの恒常性維持は、骨組織から分泌されるリン代謝因子 FGF23 が中心的にはたらき、腎臓での尿中リン排泄を促進する。このようにリン代謝調節因子の役割は徐々に確定されつつある。しかしながら、骨組織由来のリン代謝因子には細胞外液のリン濃度の変化を感知するはたらきはない。しかも、リン代謝因子を発現する骨細胞は、骨の中に埋め込まれているという解剖学的な特殊性から、これまでその機能を解析することさえ困難であった。このような背景から、生体内のリン動態を感知するしくみは、現時点では全く解明されていない。

したがって、生体リン動態変化の感知機構がどのような代謝制御を導くのか、特にカルシウム輸送への影響について、適切な評価系を構築してそのしくみを明らかにすることは、リン恒常性維持機構の全貌の理解につながる重要な課題である。

2. 研究の目的

本申請研究では、“細胞外液リン濃度の変化を感知しリン酸代謝や組織の石灰化を誘導するカルシウム輸送を調整するしくみは、細胞膜上のピロリン酸代謝系によるものではないだろうか”という作業仮説を提唱し、生体内リン感知・カルシウム輸送調節機構を解明することを目的とした。

- (1) 全身ならびに小腸特異的 VDRKO マウスへリン制限食を投与する栄養実験により、細胞外液リン濃度変化に応じて組織内での発現や細胞内局在が変化するリンセンサー候補因子を同定する。
- (2) リンセンサーがはたらく組織でリン濃度変化が感知されると、カルシウムやリンの代謝、局所輸送はどのように変化し、この変化はビタミンD作用によりどのように制御されるか、組織化学的な解析を行う。
- (3) 培養細胞を用いてリンセンサー候補の機能、特にカルシウム輸送への影響を評価し、そのしくみを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ビタミンD作用下ではたらくリンセンサー候補の絞り込み
小腸特異的 VDRKO マウスにリン制限食を投与し、カルシウムやリンの吸収量、血液や組織中のカルシウム、リンを測定し、カルシウム、リンの代謝を把握する。組織のピロリン酸代謝酵素群の発現量を比較し、変化率の大きなものをリンセンサー候補として絞り込む。特にカルシウムやリンの動態が変化した組織を中心にリンセンサーの評価を行う。
- (2) ビタミンDシグナルによるリンセンサー候補機能制御の評価
野生型マウスと小腸特異的 VDRKO マウスの小腸組織を用いて、(1)で絞り込まれたリンセンサーの発現を比較し、組織内・細胞内局在の変化を調べる。また、カルシウムやリンの動態が導かれた場合、骨量の変化を伴うかについて、マイクロCT解析を行い評価する。
- (3) 小腸粘膜上皮細胞培養系による評価
小腸上皮細胞は初代培養が困難であるため、アポトーシスが抑制された p53 欠損マウス由来の腸上皮細胞を用いて、培養輸送評価系を確立する。培養にはトランスウェルシステムを用い、消化管管腔側と基底膜側の腸上皮の極性が再現されることを確認し、さらに、トランスウェル上の細胞のタイトジャンクション形成がリン濃度により影響されないことを確認する。外液リン濃度の変化に応じたリンセンサー分子の発現や局在を検討し、カルシウム輸送への影響を評価する。
(図1)

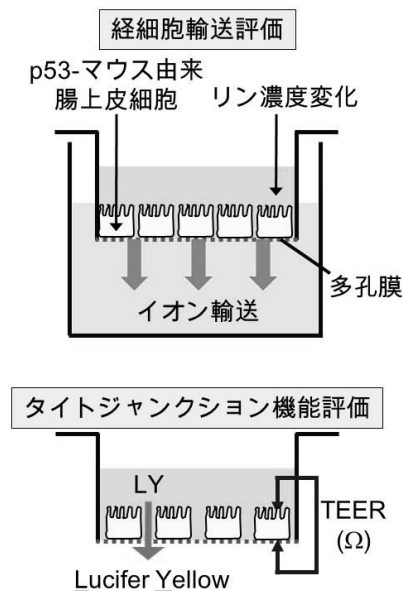


図1 p53 欠損マウス由来細胞を用いた経細胞輸送評価系の構築

4. 研究成果

- (1) 食事リン制限は、小腸 VDRKO マウスのカルシウム吸収を増加し、カルシウム代謝を改善する。

小腸 VDRKO マウスは、ビタミン D 依存的な能動カルシウム輸送が低下しているため、カルシウム吸収が減少し、カルシウム欠乏状態となる。したがって、血中カルシウム濃度を正常化するために、骨破壊が進行し、重篤な骨量減少が現れる¹⁾。既に全身 VDRKO マウスを用いた実験によりカルシウム吸収増加作用が確認されたリン制限食²⁾を小腸 VDRKO マウスに投与したところ、予想通りカルシウム吸収は増加し、小腸 VDRKO マウスに特徴的な骨破壊が抑制され、骨量が増加した。(図 2)

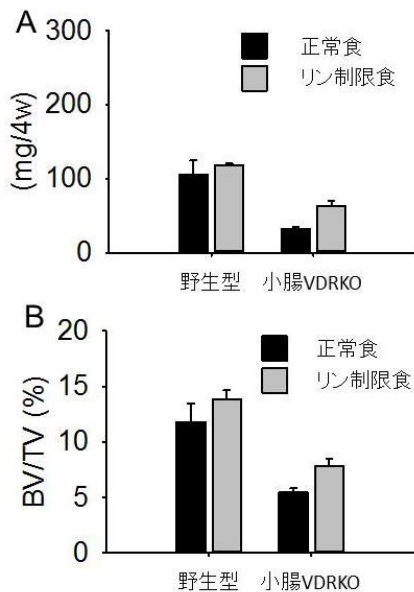


図 2 食事リン制限によるカルシウム吸収増加作用(A)と、骨量改善作用(B)

- (2) リン濃度の低下は ENPP1 分子の発現量、膜局在を減少する。

リン制限食を投与したマウスより血液を採取し、小腸、骨組織、筋、腎臓を摘出、血液と各組織内のカルシウム・リン量を測定したところ、リン量に大きな変化が認められたのは、消化管と骨組織のみであった。そこで、消化管および、骨組織の ATP-ピロリン酸代謝分子群の発現量をウェスタンブロットにより評価したところ、ENPP1 分子の発現量が大きく変化した。さらに、小腸組織を免疫染色したところ、ENPP1 だけでなく、ATP 代謝分子群の膜局在の変化が確認された。(図 3) この変化はビタミン D シグナルの変化にも応答し、ENPP1 はビタミン D シグナル欠失と、リン制限食の投与により発現低下した。

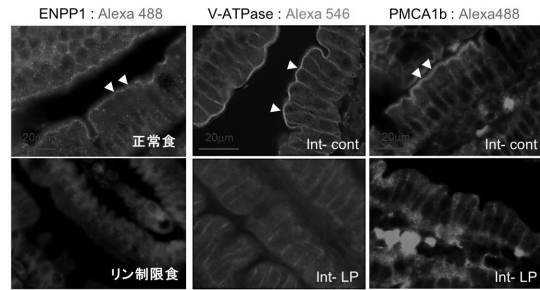


図 3 食事リン制限による ATP-ピロリン酸代謝分子の組織内局在変化

- (3) 細胞外液リン濃度の低下は、ENPP1 膜局在を抑制し、ATP 依存的なカルシウム輸送を増加する。

p53 欠損マウス由来腸上皮細胞を用いて、輸送評価系を確立し、消化管内腔側 (apical 側) 培養液中のリン濃度を変化させ、消化管内リン濃度変化を培養系で再現した。apical 側リン濃度の低下により、経細胞カルシウム輸送は増加した。さらに、リン濃度低下にともない、apical 側培養液中の ATP 濃度上昇が確認された。(図 4)

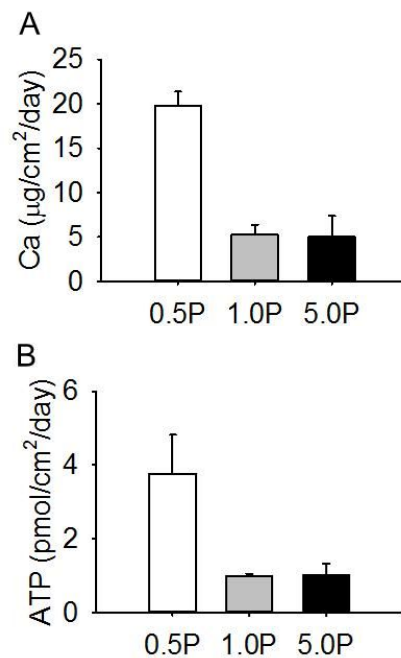


図 4 apical 側リン濃度の低下は、カルシウム輸送 (A)と、ATP 濃度(B)を上昇させた。

- (4) 外液リン濃度に応じて apical 側細胞膜上での ATP 分解が変化する。

外液リン濃度の変化に応じた ENPP1 分子の局在を評価したところ、リン濃度低下時には apical 側細胞膜の ENPP1 局在が消失した。そこで、ENPP1 作用と ATP 分解の程度を ENPP1 の阻害剤を用いて評価したところ、apical 側の ENPP1 の作用が ATP 量を変化し得ることを確認した。

つまり、外液リン濃度の低下により ENPP1 が減少したため ATP 分解が減少し、内腔側培養液中に ATP が蓄積したと考えられる。さらに、ATP が細胞膜へのカルシウム流入を増加する事をカルシウムイメージングにより確認し、その際、細胞膜に局在する ATP 受容体 P2X7 を介したカルシウム流入を促進することを確認した。(図5)

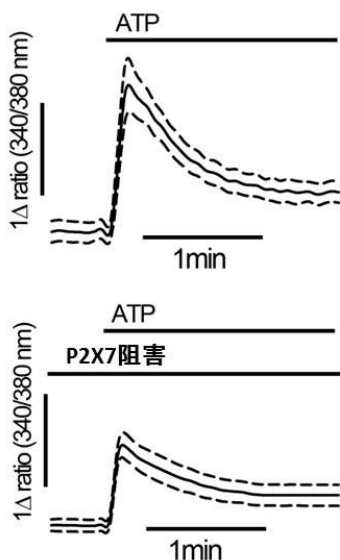


図5 P2X7 阻害による腸上皮細胞へのカルシウム流入抑制

参考文献

- 1) Lieben L, Masuyama R, Torrekens S, Van Looveren R, Schrooten J, Baatsen P, Lafage-Proust MH, Dresselaers T, Feng J, Bonewald L, Meyer M, Pike JW, Bouillon R, Carmeliet G. Vitamin D secures serum calcium by controlling skeletal expression of mineralization inhibitors in mice. *J Clin Invest* 122:1803-1815 2012
- 2) Masuyama R, Nakaya Y, Katsumata S, Kajita Y, Uehara M, Tanaka S, Sakai A, Kato S, Nakamura T, Suzuki K. Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J Bone Miner Res* 18:1217-1226 2003

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8件)

Kanagawa H, Masuyama R, Morita M, Sato Y, Niki Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Saya H, Miyamoto T. Methotrexate inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL-induced calcium influx into osteoclast progenitors. *J Bone Miner Metab* 34:526-531 2016 (査読有)

Lieben L, Verlinden L, Masuyama R, Torrekens S, Moermans K, Schoonjans L, Carmeliet P, Carmeliet G. Extra-intestinal calcium handling contributes to normal serum calcium levels when intestinal calcium absorption is suboptimal. *Bone* 81:502-512 2015 (査読有)

Masuyama R. Bone and Nutrition. Vitamin D independent calcium absorption. *Clin. Calcium*. 25:1023-1028 2015 (査読無)

Suda T, Masuyama R, Bouillon R, Carmeliet G. Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies. *Curr Opin Pharmacol* 22:87-99 2015 (査読有)

Yamanaka H, Nakanishi T, Takagi T, Ohsawa M, Kubo N, Yamamoto N, Takemoto T, Ohsawa K. Helicobacter sp. MIT 01-6451 infection during fetal and neonatal life in laboratory mice. *Exp Anim* 64:375-382 2014 (査読有)

Yamanaka H, Takagi T, Ohsawa M, Yamamoto N, Kubo N, Takemoto T, Sasano S, Masuyama R, Ohsawa K: Identification and characterization of vancomycin-resistant Enterococcus species frequently isolated from laboratory mice. *Exp Anim* 63:297-304 2014 (査読有)

Christakos S, Lieben L, Masuyama R, Carmeliet G: Vitamin D endocrine system and the intestine. *Bonekey Rep* 3:496.1-7 2014 (査読有)

Akasaka K, Maeno A, Murayama T, Tachibana H, Fujita Y, Yamanaka H, Nishida N, Atarashi R. Pressure-assisted dissociation and degradation of "proteinase K-resistant" fibrils prepared by seeding with scrapie-infected hamster prion protein. *Prion* 8:314-318 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 7件)

増山律子、1,25(OH)2D3-VDR シグナルと骨・カルシウム恒常性 第 119 回 日本小児科学会 分野別シンポジウム ビタミン D 新時代～多彩な作用と欠乏症～北海道、札幌市、ロイトン札幌、2016年 5 月 13 日

増山律子、細胞外液リン量に应答する ATP 依存的カルシウム吸収機構の検討、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、兵庫県、神戸市、神戸ポートピアホテル、2016年 5 月 14 日

増山律子、ビタミン D とカルシウム代謝、第 2 回 neo vitamin D workshop、東京都、港区、TKP ガーデンシティ品川、2016年 8 月 27 日

増山律子、腸管カルシウム吸収と骨石灰化とを連携する新たなシグナル、第 98 回 日本栄養・食糧学会関東支部大会シンポジウム、東京都、世田谷区、東京農業大学、2016年 10 月 22 日

増山律子、活性型ビタミン D の生理作用と骨・カルシウム恒常性 第 33 回日本骨代謝学会シンポジウム、東京都、新宿区、京王プラザホテル、2015年 7 月 25 日

増山律子、骨の発達と機能を支えるビタミン D の役割 第 69 回日本体力医学会シンポジウム 長崎県、長崎市、長崎大学、2014年 9 月 20 日

増山律子、小腸上皮 ATP 分解系によるカルシウム吸収調節機序の検討、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、北海道、札幌市、北海道大学、2014年 5 月 31 日

〔図書〕(計 4件)

増山律子、ビタミン D によるカルシウム代謝調節 The Bone 2016 in press (研究代表者は筆頭著者で責任著者、査読無)
増山律子、VDR 『骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典』 179-180. 2015 (査読無)

増山律子、ビタミン D によるカルシウム恒常性調節と骨代謝制御 『骨代謝 つくり、壊し、変える - そのメカニズムと最新治療』 実験医学増刊号, 32: 152-157, 2014 (査読無)

増山律子、ビタミン D と小腸カルシウム吸収 『ビタミン D と疾患～基礎と臨床からの考察～改訂版』 医薬ジャーナル社 70-77, 2014 (査読無)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0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 0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

増山 律子 (MASUYAMA, Ritsuko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号：60297596

(2)研究分担者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：00252677

山中 仁木 (YAMANAKA, Hitoki)
長崎大学・先導生命科学研究支援センタ
ー・助教
研究者番号：30533921

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし