

## 腸管ナトリウム依存性リン酸トランスポーターのリンセンサーとしての分子動態

辰巳 佐和子

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

**概要** 無機リン酸(以下、リン)は生体内の全ての組織や細胞に存在する。そしてリンはエネルギー代謝、細胞膜や骨の構成成分、アデニン三リン酸、DNA や RNA などの核酸物質の構成成分でもある。このことから、リンはカルシウムと同様に多数の細胞内反応や生理的作用に必要であり、生体機能維持に必須のイオンである。リンは食事より体内に入り腸管から吸収される。腸管からのリン吸収機構には腸管上皮細胞を介した 1) 経細胞輸送(能動輸送)経路と 2) 上皮細胞間のタイトジャンクションを介した細胞間隙輸送(受動輸送)経路の二つがある。腸管でのリン吸収の約 70% を占める主要経路はナトリウム依存性リン酸トランスポーターである NaPi-IIb を介した能動輸送である。そして腸管リン吸収は食事性リン含量、活性型ビタミン D、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)により活性化され、主に骨細胞より分泌されリン利尿因子としての働きをもつ FGF-23(Fibroblast growth factor-23)を介した活性型ビタミン D の低下に伴い抑制される。一方、慢性腎臓病では腎機能の低下や腎臓廃絶により尿中リン排泄量が著しく低下するため、容易にリンの体内貯留が高まり、高リン血症を呈する。高リン血症は異所性石灰化を引き起こし、生命予後の危険因子となる。

今回我々がアデニン投与による腎不全モデルラットを解析したところ、慢性腎臓病患者と同様に血中リン濃度の著しい上昇が認められた。腎機能の低下に伴い尿中リン排泄量が著しく低下しており、血中リン濃度が高まっているにもかかわらず、腸管リン吸収は抑制されず、NaPi-IIb の発現量も低下しないことを明らかにした。このことから、慢性腎臓病では体内でのリンセンシングの破綻が起こっている可能性が示唆された。腸管から吸収されたリンが、本来なら各臓器代謝を経て、腎臓から排泄されるはずが、腎臓が障害されると、摂取したリンは、骨に移行できず、むしろ血管や軟組織にカルシウムと共に蓄積し、異所性石灰化が生じる。しかしながら、そのメカニズムは不明のままである。そこで、次に腸管リン吸収と骨との関わりを検討した。申請者は骨細胞を任意の時期に死滅させる事の出来るマウスを樹立している(Tatsumi S *et al. Cell Metabolism* 5, 464-475 (2007))。本マウスを用いて NaPi-IIb の変動を解析した。骨細胞は上述した FGF-23 を含め Phex、MEPE、DMP1 とリン代謝調節因子を発現することから生体内リン濃度の恒常性を維持するためには重要な内分泌細胞でもある。骨細胞を死滅させたトランスジェニックマウスでは、血中リン濃度は正常マウスと比して差は認められないが、著しい尿中リン排泄が示された。骨細胞死滅により著しい FGF-23 濃度の減少が認められた。一方、腸管リン吸収は増加していた。腎臓での尿中リン排泄、および骨量減少にともなうカルシウム/リンの遊離を生体内で感受する事により NaPi-IIb 発現量の増加を伴いリン吸収が増加したと予測された。つまりリンプールの低下を NaPi-IIb 自身が感受している可能性をさらに検討する予定である。また NaPi-IIb は腸管以外にも肺、腎臓、副甲状腺など様々な臓器に微量であるが発現していることからさらなる NaPi-IIb 分子動態を解明し、慢性腎臓病患者のリン吸収阻害剤のターゲットとして創薬の開発の分子基盤となる研究を進める必要がある。

### 1. 研究背景と目的

無機リン酸(以下、リン)はエネルギー代謝、細胞膜の構成成分、カルシウムと共に生体機能維持に必須のイオ

ンである。リンは食事より体内に入り腸管から吸収される。腸管からのリン吸収機構には腸管上皮細胞を介した 1) 経細胞輸送(能動輸送)経路と 2) 上皮細胞間のタイトジ

ヤンクションを介した細胞間隙輸送(受動輸送)経路の二つがある。腸管でのリン吸収の約 70% を占める主要経路はナトリウム依存性リン酸トランスポーターである NaPi-IIb を介した能動輸送である。腸管でのリン吸収は食事性リン含量はもとより、活性型ビタミン D、リン調節ホルモンである PTH により活性化され、リン利尿因子でもある FGF-23 により抑制される。吸収されたリンの 90% は糸球体で濾過され、そのうちの 80% 以上が近位尿細管で再吸収され残りが尿中へ排出され、血中のリン恒常性は維持されている<sup>(1, 2)</sup>。しかしながら、糸球体濾過率の低下に伴い進行する慢性腎臓病(chronic kidney disease: 以下、CKD)では尿中リン排泄量の低下により容易にリンの体内での貯留が高まり、高リン血症を発症する。現在日本における CKD 患者数は約 1,330 万人と推計される。このことは成人の 8 人に 1 人は CKD であることを示し、「新たな国民病」と言われている。CKD 患者におけるミネラル代謝異常のうちの血管石灰化は心・血管系死亡の重要な危険因子であることが明らかにされてきている<sup>(3, 4)</sup>。さらに二次性副甲状腺機能亢進症(secondary hyperparathyroidism: 以下 2°HPT)は、CKD の代表的な合併症である。2°HPT を促進させる因子は高リン血症である。透析導入患者の生命予後への寄与度を調べたところ、相対危険度の上昇は血清リン、血清カルシウム、血清 PTH の順で高いことが知られている。そのため血中リン濃度の正常化は CKD の悪化を防ぐために必須であり、腸管からのリン吸収抑制が重要である。しかしながら、慢性腎臓病では腎臓廃絶により高リン血症を呈しているにもかかわらず、腸管でのリン吸収は抑制されない。そこで腎不全時の NaPi-IIb の変動やリンセンシングについて詳細に解析することで腎不全時のリン代謝について検討した。

また我々のグループは NaPi-IIb の生体内での役割をより詳細に解明するため、NaPi-IIb ノックアウトマウスを作成したが、胎生致死となった。NaPi-IIb が近位内胚葉や、胎盤にも発現していたことから、母胎間のナトリウム依存性リン輸送に関与し発育過程で重要な役割を担っている可能性を明らかにした<sup>(5)</sup>。NaPi-IIb は腸管以外にも肺、腎臓、副甲状腺など様々な臓器に微量であるが発現していることから NaPi-IIb が腸管でのリン吸収以外の役割を担っていると予測している。

次に、申請者が開発した任意の時期に誘導的に作製

できる骨細胞のないマウスは骨粗鬆症を呈する<sup>(6)</sup>。さらにリン利尿効果のある血清 FGF23 は半分以下に低下するにもかかわらず、通常このような状態では高リン血症となると想定されるが血清リン濃度には何ら変化が見られないことから、腸管でナトリウム依存性リン吸収の違いやリンセンシング機能が低下している可能性が示唆される。

本マウスの食事性リン負荷時の腸管におけるナトリウム依存性リン輸送機構の解析を行なう。そこで公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団より平成22年度に受けた助成金(助成番号:1032)により NaPi-IIb のリンセンサーとしての分子動態を解明することを目的とした。

解析としては 1)腎不全時および正常ラットの食事性リン含量の変動による NaPi-IIb の発現について、2)リン代謝異常を呈する骨細胞死滅マウスのリン吸収 NaPi-IIb の変動についてを詳細に調べた。

## 2. 研究方法

### 2.1 動物モデル作成

#### 腎不全モデルラット作成

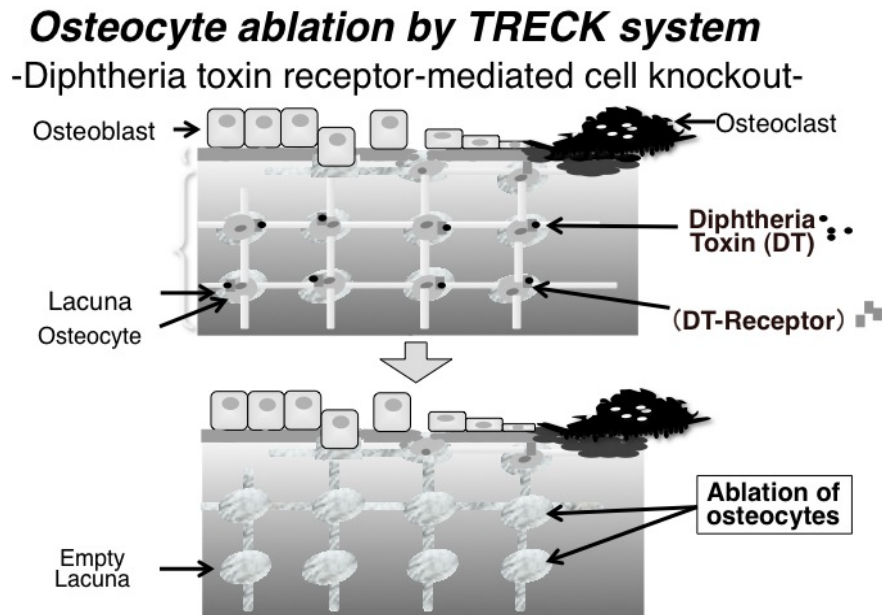
日本チャールズリバー株式会社より、6 週齢のオスの Wister Rat(体重 260~290 g)を購入した。ラットは実験期間中、実験動物用固形飼料 MF(オリエンタル酵母)と水道水の自由摂取により飼育した。

ラットは最初無作為にコントロール群とアデニン投与群に分けた。まず、0.2% カルボキシメチルセルロース液(以下、CMC 液)を作成した。アデニンを CMC 液に 12.5 mg/ml の割合でよく溶かした後、ゾンデを用い経口投与にて、アデニンが体重(kg)あたり、250 mg の割合になるように与えた。コントロール群には同量の CMC 液を与えた。投与は週 5 回行った。アデニン投与開始後、週 1 回定刻に尾静脈採血を行った。アデニン投与 20 回後に体重、血漿リン濃度を参考に、腎不全進行具合を予測した。室温 23°C の恒温の飼育室で、暗明サイクル(8:00~20:00)のもと飼育した。

#### 骨細胞死滅マウス

本研究では、申請者らが樹立した、ジフテリア毒素(DT)投与により任意の時期に骨細胞を特異的に死滅させることができるトランスジェニックマウス(Tg マウス)の系統を使用した<sup>(1)</sup>(Fig. 1)。

8~12 週齢の Tg マウスおよび野生型マウスは DT 投



**Fig. 1.** TRECK system による骨細胞死滅マウス。骨細胞特異的にジフテリア毒素レセプターを発現させ任意の時期にジフテリア毒素を投与する事で骨細胞のみを死滅させることが出来る。

後 9 日間(投与量 25~30 ng/kg, 1 回投与)、室温 23°C の恒温の飼育室で、暗明サイクル(8:00~20:00)のもと飼育した。高リン負荷試験に対しては DT 投与後 5 日間飼育し、残りの 4 日間は高リン水(25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を自由摂取させた。

## 2. 2 血漿および尿中測定項目

各マウスおよびラットより得た血漿および尿を以下の各種キットを用いて測定した。無機リン濃度は 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, Osaka, Japan)、クレアチニン濃度は Jaffe 法を用いたクレアチニンテスト Kit(Wako, Osaka, Japan)により測定した。血漿活性型ビタミン D 濃度は、ラジオレセプターアッセイ(SRL, Inc., Tokyo, Japan)により測定した。血漿 FGF23 濃度は、FGF-23 ELISA Kit(KAINOS Laboratories, Inc., Tokyo, Japan)を用いて測定した。

## 2. 3 腸管刷子縁膜における NaPi-IIb の発現

腎臓及び小腸上部・下部の刷子縁膜画分 (Brush border membrane vesicle: BBMV) の調整は Ca 沈降法を用いて行った。BBMV の蛋白濃度は BCA Protein Assay Kit(Thermo)を用いて測定した。

各ラットおよびマウスの小腸下部 BBM(20 μg/lane)を用

いて NaPi-IIb の発現量の動態を Western blotting 法にて検討した。

## 2. 4 Na<sup>+</sup> 依存性リン輸送活性測定

小腸BBMVの<sup>32</sup>P輸送活性は急速膜濾過法により測定した。蛋白量を 20 μg に調整した BBMV サンプルに uptake solution (<sup>32</sup>P 20 μCi/ml, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 100 mM Mannitol, 20 mM HEPES/Tris pH 7.5)を加えて混ぜ、30 秒及び 60 秒反応させた後、氷冷した生理食塩水を加えて反応をとめた。反応液をニトロセルロース膜に加えて吸引濾過を行い、BBMV をニトロセルロース膜に吸着させた。そして、ニトロセルロース膜をアクアゾル II α で溶かした後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、BBMV へのリン取り込み活性を測定した。

## 3. 結果および考察

### アデニン誘発性腎不全モデルラットの NaPi-IIb の変動

アデニン誘発性腎不全モデルラットを作成した(以下、アデニンラット)。腎不全の進行を把握するために毎日の摂食量、飲水量を計った。また週に一度尾静脈採血を行ない血漿リン濃度を測定した。またデータには示していないが、腎機能の低下を示すマーカーである血中尿素窒素(BUN)及び、血中クレアチニン濃度が増加した。さらに腎

機能の低下により尿中リン排泄量は減少した。結果血中リン濃度は著しく上昇し高リン血症を呈した。腎機能低下、血中リン濃度の上昇に伴い血中PTH濃度リン濃度は上昇する。このことから、二次性副甲状腺機能亢進症を呈していることが分かる(Fig. 2A, 2B)。血中リン濃度の上昇は通常腎臓からのリン排泄が促進するため速やかに是正される。しかしながら、アデニンラットでは腎機能の廃絶により血中リン濃度が著しく上昇した。さらに、アデニンラットでは腸管リン吸収は全く低下しておらず、また NaPi-IIb 発現量の減少は認められなかった(Fig. 2C)。よって NaPi-IIb の血中リン濃度の上昇に対する応答は腎機能が低下している状況では、破綻する事が明らかとなった。

### 骨細胞死滅マウスのリン代謝の検討

次に腸管リン吸収と骨細胞との関わりを検討するために、骨細胞死滅マウスを用いて解析を行なった。

Tg 及び野生型マウス群の、DT 投与 2 日前(-DT)、DT 投与後 9 日目(+DT)の血漿リン、カルシウム濃度及び尿中リン、カルシウム濃度を測定した結果、血漿リン及びカルシウム濃度、尿中カルシウム濃度においてDT投与による有意な差はみられなかった(Fig. 3A, B, D)。一方で、Tg マウスに対しDT投与後9日目の尿中リン排泄は、DT投与前のTgマウスと比較して有意な増加がみられた(Fig. 3C)。次に骨細胞死滅マウスではリン利尿が促進していたことより、腎臓でのリン再吸収、腸管からのリン吸収の変動を検討した(Fig. 4, Fig. 5)。

腎臓のパラフィン薄切切片を用いて免疫化学染色を行った結果、骨細胞死滅マウス(Tg+DT 群)では腎臓でリン

再吸収を担う NaPi-IIa、NaPi-IIc の近位尿細管腔側での膜局在量の著しい減少が見られた(Fig. 4A)。また腎臓BBMを用いたウェスタンブロッティング解析においても同様に NaPi-IIa、NaPi-IIc の蛋白量の減少がみられた(Fig. 4B)。また、ナトリウム依存性リン輸送活性を測定した結果、DT投与したTgマウス群における腎臓でのリンの取り込み量が有意に減少していた(Fig. 4C)。これらの個体では骨細胞の死滅によるFGF23の低下が認められ、またPTHの濃度変化はなかった。またFGF23と共に作用してリン利尿効果を示すKlotho蛋白発現量の低下も認められた。これはFGF-23/Klothoシグナル経路の抑制を示唆する。以上より、FGF23/KlothoやPTH経路とは異なる骨と腎臓をつなぐ新しいリン代謝系の存在が示唆された。

次に、腸管リン吸収については、野生型マウスと比較してTgマウスにDTを投与したマウスではリン取り込みの有意な増加を示した(Fig. 5A)。また小腸下部BBMを用いたWestern Blot解析で、NaPi-IIbの発現量を検討した結果、DT投与したTgマウスにおいてNaPi-IIb発現の増加がみられた(Fig. 5B)。尿中リン排泄増加によるリンプール低下により、NaPi-IIbの発現増加が起こったと考えられる。通常リン含量の少ない低リン食を継続的に摂餌させるとNaPi-IIbの発現量は増加することが知られている。このことから、NaPi-IIb自身が食事のリン感受に関与している可能性が考えられる。NaPi-IIbコンディショナルノックアウトマウスと本マウスの掛け合わせにより両表現型を持つマウスを解析する事で、NaPi-IIbのセンサーとしての役割をさらに解析する必要があると考える。

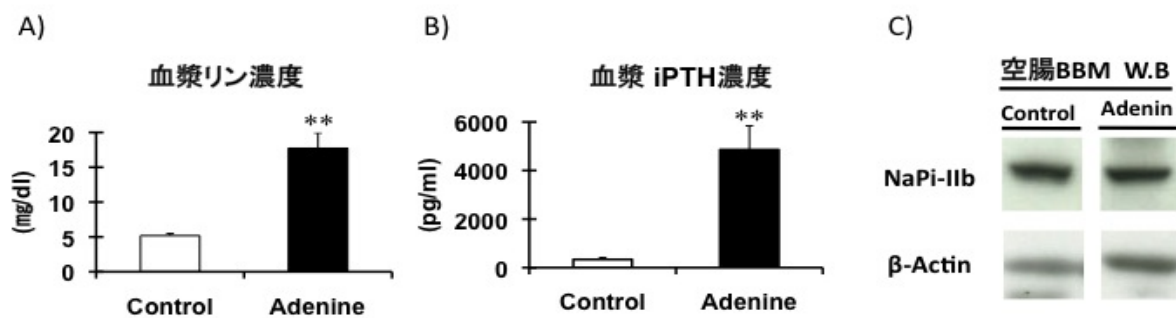
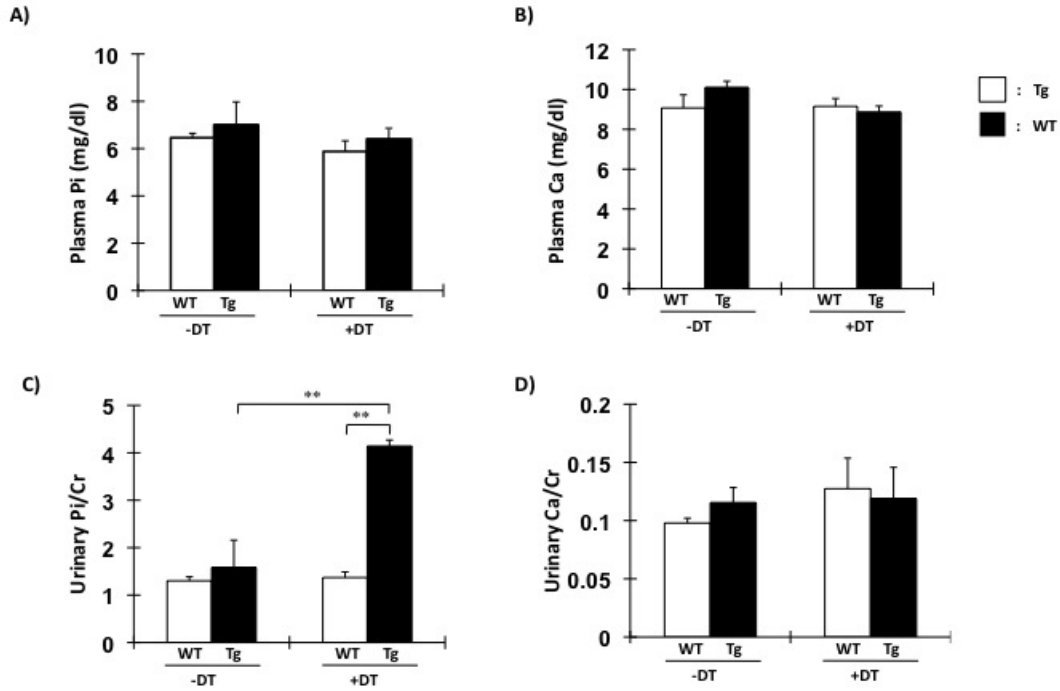
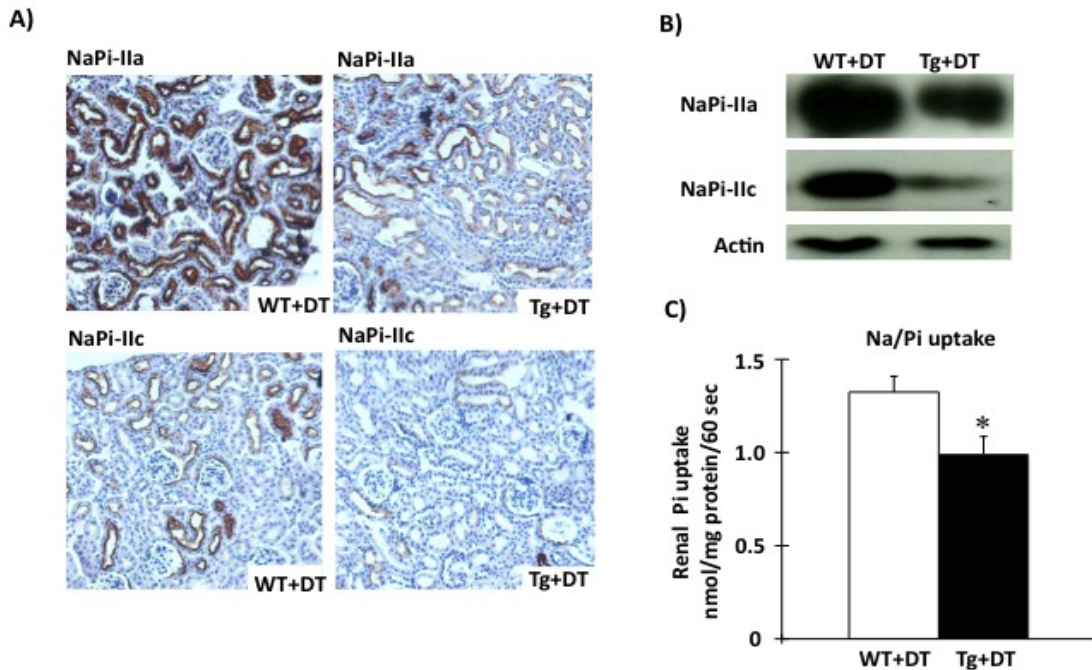


Fig. 2. アデニン誘発性腎不全モデルラットにおけるNaPi-IIbの発現。雄のWister Ratに対してメチルセルローズに溶解したアデニンを250 mg/Kg(体重)あたりで1日1回の経口投与を行なった。コントロール群はメチルセルローズ液を経口投与した。A)経口投与後、3週間の血漿リン濃度。B)経口投与後、3週間の血漿iPTH濃度。C)空腸BBM(blush border membrane)を用いたNaPi-IIbのwestern blotting解析。

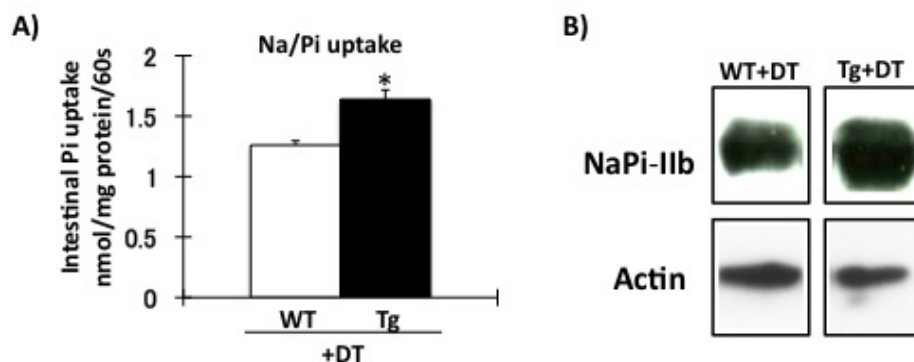


**Fig. 3.** 血液尿生化学データ。野生型、Tg マウスそれぞれに対してDT 投与2 日前およびDT 投与後9 日目に採決及び24 時間蓄尿にて尿を採取し、血漿リン、カルシウム濃度および尿中リン、カルシウム濃度の測定した結果である。□:野生型マウス+DT(♀)14 週齢 n=6。■:Tg マウス+DT(♀)14 週齢 n=6。\*\*P<0.01。



**Fig. 4.** 腎臓におけるNaPi-IIa、NaPi-IIcの発現検討およびナトリウム依存性リン輸送活性の測定。A)DT 投与後9 日目の野生型、Tg マウスの腎臓を摘出し、パラフィン薄切片による免疫組織染色。B)腎臓BBMを蛋白量20 μg/レーンに調製しWestern Blot法にて解析。C)腎臓BBMVのナトリウム依存性リン輸送活性。□:野生型マウス+DT(♂)9-10 週齢 n=4。■:Tg マウス+DT(♂)9-10 週齢 n=4 \*P<0.05。





**Fig. 5.** 骨細胞死滅マウスにおけるNaPi-IIb発現の検討。DT投与後9日目の野生型、Tgマウスの小腸下部BBMVを分離した。A)小腸下部BBMVを用いたリン輸送活性測定。□:野生型マウス+DT(♂)9-10週齢 n=4。■:Tgマウス+DT(♂)9-10週齢 n=4 \*P<0.05。B)小腸下部BBMVを用いたwestern blotting解析。蛋白量は20 μg/レーンである。□:野生型マウス+DT(♀)14週齢 n=4。■:Tgマウス+DT(♀)14週齢 n=4。

## 文献

1. Miyamoto KI, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. Sodium -dependent phosphate cotransporters: Lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci.* in press.
2. Marks J, Debnam ES, Unwin RJ. Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299: F285-296, 2010.
3. Kestenbaum B. Phosphate metabolism in the setting of chronic kidney disease: significance and recommendations for treatment. *Semin Dial.* 20(4): 286-94, 2007.
4. Kestenbaum B. Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ and Andress DL. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidneydisease. *J.Am.Soc.Nephrol.* 16, 520-528, 2005.
5. Shibasaki Y, Etoh N, Hayasaka M, Takahashi MO, Kakitani M, Yamashita T, Tomizuka K, Hanaoka K. Targeted deletion of the tybe Iib Na(+)-dependent Pi-co-transporter, NaPi-IIb, results in early embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun.* 381(4):482-6, 2009.
6. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 5(6):464-75, 2007.

## Molecular Dynamics as Phosphate Sensor in the Intestinal Na<sup>+</sup> Dependent Phosphate Transporter

Sawako Tatsumi

Department of Molecular Nutrition, Institute of Health Biosciences,  
University of Tokushima Graduate School

### Summary

Body phosphate homeostasis is maintained via intestinal absorption and renal excretion and bone metabolism. Hyperphosphatemia is associated with ectopic calcification, cardiovascular disease, and increased mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is a phosphaturic factor which is produced by the osteocytes. Intestinal inorganic phosphate (Pi) absorption is a key determinant of plasma Pi and FGF23 levels in CKD patients. Dietary Pi is efficiently absorbed (60-70%) through the small intestine by both active and passive Pi transport mechanisms. Active transport of Pi is mediated primarily via the type IIb Na/Pi cotransporter (Slc34a2/NaPi-IIb). Recently, we suggest that intestinal NaPi-IIb functions as Pi sensor in body Pi homeostasis. To investigate the role of NaPi-IIb on Pi sensor in chronic renal failure (CRF) rats, we assessed the NaPi-IIb expression. Adenine-induced CRF rats showed hyperphosphatemia, the elevation of plasma PTH and FGF23 concentrations and the reduction of plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels. In the comparison of intestinal NaPi-IIb function in normal and CKD rats, we suggested the disruption of Pi sensing mechanism in CRF rats.

Alterations in function of osteocyte occur in very early stages of chronic renal disease (CKD). FGF23 and DMP1 are made primarily in the osteocytes. These are suggesting that the osteocyte plays the total systemic Pi regulation. We have established "osteocyte-ablated" mice exhibited excessive osteoporosis. To analysis the role of osteocyte in Pi homeostasis, we investigated renal and intestinal Pi handling in the osteocyte-ablate mice. Plasma Pi concentration were not changed in the osteocyte-ablated mice. Plasma FGF23 levels were significantly decreased and plasma PTH levels were not changed in the osteocyte ablated mice. Urinary Pi excretion was markedly increased and renal NaPi-IIa and NaPi-IIc protein levels were significantly decreased in the ablated mice. Intestinal NaPi-IIb protein levels were significant increased and Pi absorption increased. In conclusion, the present study suggested the disruption of Pi sensing mechanism in CRF rats and osteocyte ablated mice.