

高リン食起因の腎機能障害リスクを軽減する ホエータンパク質の効果の検討

東京大学大学院農学生命科学研究科

ILSI Japan 寄付講座 機能性食品ゲノミクス：中井 雄治

林 ちひろ

要 約

ラットにタンパク質源をカゼイン、ホエーとした2種類の高リン食を21日間投与し、腎臓における遺伝子発現プロファイルの変化を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。いずれの群も高リン食摂取によって体内のリン保留量は増大しなかったが、吸収量・排泄量ともに顕著に増大し、生体内を大量のリンが通過していた。解剖学的所見では、いずれの群も腎臓に明確な石灰化が認められた。DNAマイクロアレイによる解析では、タンパク質源をホエーとした高リン食摂取群の腎臓において、タンパク質源をカゼインとした群と比べて炎症・免疫に関わる遺伝子群が顕著に発現低下していることが明らかとなった。このことから、食餌中のタンパク質源をホエーとすることにより、高リン食に起因する腎臓における炎症反応が抑制されることが示唆された。

緒 言

リンは、生体内でカルシウムに次いで2番目に多く含まれるミネラルであり、骨などを形成するのに必須である。食品中にも植物性食品、動物性食品ともに豊富に含まれている。生物の体液中にもリン酸イオンとして存在し、その多くは HPO_4^{2-} の形をとっている。ほぼ全ての食品に含まれているため、欠乏症状がでることはほとんどない。その一方で、近年、インスタント食品や清涼飲料水などに含まれるリンによる過剰摂取が問題となっている。過剰摂取による症状としては骨成長不良や副甲状腺機能の異常亢進などが知られている。しかしながら、意外なことにリン過剰摂取時の生体応答については、遺伝子発現レベルでの解析は腎臓におけるオステオポンチンの発現上昇¹⁾、ナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Npt / NaPi) IIaの発現低下²⁾、大腿骨におけるreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) の発現上昇³⁾など数例の報告があるのみであり、網羅的解析はほとんど行われていなかった。われわれはこれまでに、高リン食の摂取時の腎臓における遺伝子発現変動を、DNAマイクロアレイを用いて解析し、炎症や免疫関連の遺伝子の発現上昇を認めている (未発表データ)。

一方、牛乳は人乳に比べてリンを多く含みながら、多飲しても生体はリン過剰摂取の影響を受けにくい。一つの理由として、牛乳中のリンの多くは主要タンパク質であるカゼインのセリンと結合した形で存在し、消化途上で生じるリン酸化セリンペプチドが牛乳中のカルシウム吸収を助け、カルシウム-リンバランスが崩れにくいためであると考えられる。われわれは、牛乳ホエータンパク質には肝炎に対する保護効果が報告されている⁴⁾ことに着目した。牛乳を多飲してもリンの影響が出にくい要因には、腎臓における炎症抑制効果が寄与しており、結果としてリンの排出

に働く腎機能が保持されているという仮説を立てた。

本研究はラットに通常食にリン酸塩を添加した高リン食を投与した群と、タンパク質源をホエータンパク質とした高リン食投与群の生化学パラメータ、解剖所見、遺伝子発現プロファイルを比較することにより、上記仮説を検証することを目的として行った。

実験方法

1. 動物実験

4週齢のWistar系雄性ラット10匹を7日間の予備飼育後、平均体重がほぼ等しくなるように2群（各群n=5）に分けた。いずれの群もAIN93G食をベースとした高リン食（リン含量1.2%）であるが、1つの群はタンパク質源として20%カゼインを含む高リン食摂取群（HPC群）、もう1つの群はタンパク質源として20%ホエーを含む高リン食摂取群（HPW群）とした。HPC群、HPW群ともに代謝ケージで21日間飼育した。飼料の組成は表1に示した。ベースとなる飼料はあらかじめタンパク質をカゼイン、ホエーとした2種の飼料をリサーチダイエツト社から購入した。カゼインは単位重量あたりホエーの約10倍のリンを含んでいるため、HPC群とHPW群でリン含量が等しくなるように、添加するリン酸2水素カリウムとコーンスターチの量を調整した。体重、摂餌量を測定するとともに、尿および糞を採取し、リンの出納試験を行った。糞は湿式灰化を行うことでミネラルを抽出し、尿はそのまま希釈し、サンプルとして用いた。リン定量はホスファC-テストワコーを用いて行った。飼育終了後、ネブタール麻酔下で頸動脈より採血を行い、安楽死させた。動物実験では、また、採血後直ちに腎臓を採取し、右腎はリンおよびカルシウムの測定、左腎はDNAマイクロアレイ解析（後述）に供した。腎臓中のミネラルの測定は、糞同様湿式灰化を行った後、リンは糞と同様に、カルシウムはICP発光分光法で行った。動物実験は、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認のもと、東京大学動物実験実施規則に従って行った。

2. マイクロアレイ解析

凍結保存しておいた左腎を、凍結したままクライオプレス（マイクロテックニチオン）にて破砕した。破砕した組織に組織重量の10倍量のTRIzol（Invitrogen）を加え、ポリトロンホモジナイザー（キネマティカ）を用いてホモジナイズした。TRIzolのマニュアルに従いtotal RNAを抽出し、RNeasy mini kit（QIAGEN）にてtotal RNAを精製した。得られたtotal RNAをもとに、3' IVT Express Kitを用いてターゲットの調製を行った。GeneChip Rat Genome 230 2.0にハイブリダイズを行い、Hybridization, Wash and Stain Kitにて染色・洗浄後、スキャンしてDNAマイクロアレイデータを取得した。DNAマイクロアレイ解析に供した検体は、腎臓中のリン含量を基に平均に近い4個体を選抜した。

スキャンして得られたマイクロアレイデータ（CELファイル）は、統計解析言語環境「R」（フリーソフトウェア）およびBioconductor (<http://www.bioconductor.org/>)よりダウンロードしたマイクロアレイデータ解析用パッケージ群を用いて解析を行った。データはFactor analysis for robust microarray summarization (FARMS)アルゴリズム⁵⁾で正規化を行った後、サンプル間の階層的クラスタリングを行った。HPC群とHPW群で発現に差がある遺伝子（発現変動遺伝子）の選抜は、FARMSと相性がよいとされているRank products法^{6,7)}で行った。次に、HPW群で有意に発現上

昇あるいは発現低下する遺伝子群においてどのような機能を持った遺伝子が多く濃縮されているかについて、Gene Ontology (GO) のBiological Processに基づいてDAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)のgene-annotation enrichment analysisによって解析した。

結 果

21日間飼育した結果、HPC群とHPW群の間に、最終体重・摂餌量・リン摂取量・腎湿重量のいずれも有意差は認められなかった(表2)。1日あたりのリン摂取量は、われわれのグループが以前に行った高リン食投与(タンパク質源はカゼイン)実験の結果とほぼ同じであった。一方、体重増加はHPW群で有意に低値を示した。また、解剖直前3日間の糞と尿を採取し、リンの出納試験を行った(表3)。その結果、リン摂取量、糞中リン排泄量、リン吸収量、尿中リン排泄量すべての項目において、HPC群とHPW群の間に有意差は認められなかった。吸収量から尿排泄を差し引いたリンの体内保留量については、HP群でわずかに高い値を示したものの、有意な差としては認められなかった。今回は通常のリン濃度(0.3%)の飼料を投与した群を設定していないため、直接比較はできないが、これまでわれわれが行った通常のAIN93G食を用いたリン出納試験の結果(表3、参考データ)と比較すると、いずれの群も大量のリンが飼育期間中にラット体内に吸収され、かつ排泄されていたことがわかる。

解剖時に腎臓を体軸方向に切断し、断面を観察した結果、HPC群、HPW群両群ともに、皮質と髄質の境界付近に明確な石灰化が認められた(図1、矢印)。また、図2に示したように、腎臓中のリンおよびカルシウム濃度はHPC群とHPW群間で有意差はなかった。一方、これまでの検討より通常のリン濃度(0.3%)の飼料を投与した場合、腎臓中に検出されるリンは腎臓乾重量1gあたり15 mg以下、カルシウムは同1 mg以下であり、今回の両群はリン含量、カルシウム含量ともに高値を示した。

腎臓中のリン含量を指標に、各群から平均に近い4個体ずつを選抜し、DNAマイクロアレイ解析を行った。FARMSによる正規化データを用いた階層的クラスタリングの結果、HPC群、HPW群それぞれが明確なクラスタには分離しなかったものの、HPW群は一つのクラスタを形成した(図3)。このことから、HPC群とHP群で腎臓における遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることが明らかとなった。

次に、Rank products法によってHPC群とHPW群で発現の異なる遺伝子を抽出した。False discovery rate(抽出した遺伝子セットにおける擬陽性の割合)が0.05未満である遺伝子を有意に発現が異なるとした。その結果、HPW群で発現が有意に高い遺伝子は1009個、HPW群で発現が有意に低い遺伝子は1111個であった。これら発現変動遺伝子について、GO Biological Processのアノテーションに基づきgene-annotation enrichment analysisを行った結果は表4に示した。発現上昇した遺伝子セットには、脂肪酸 β -酸化、グルタチオン代謝、酸化還元、アセチル-CoA代謝などのGO termが顕著に濃縮されていた。一方、発現低下した遺伝子セットで濃縮されたGO termは、急性炎症応答、外来抗原のプロセッシングおよび呈示、補体の活性化、免疫グロブリンによる免疫応答、食食反応の制御等、ほとんどが免疫や炎症に関わるGO termであった。免疫・炎症と直接関連はないものの、コラーゲン線維化も発現低下遺伝子に有意に濃縮されていた。

発現上昇していた遺伝子セットに濃縮されたGO termに、脂肪酸 β -酸化が含まれていたことか

ら、PPARシグナルの関与が予想された。そこで、DAVIDのKEGGアノテーションを用い、同様に発現上昇遺伝子中に濃縮されたKEGGパスウェイを検討した結果、やはりPPARシグナルのパスウェイが有意に濃縮されていた。発現上昇した遺伝子セットに含まれるPPARシグナル関連遺伝子を抽出した結果を表5に示した。これらの遺伝子中には、アシルCoAのミトコンドリア内膜通過に働くCpt1、Cpt2やアシルCoAの β -酸化を触媒するAcox1、Ehhadhなどの遺伝子が含まれており、脂肪酸 β -酸化経路全体が亢進していることが示唆された。また、Slc27a2 (脂肪酸トランスポーター)やFabp3など、脂肪酸の輸送に関わる遺伝子も含まれていた。

考 察

今回行った実験は、われわれのグループが以前に行ったラットへの高リン食（タンパク質源はカゼイン）投与実験の結果（未発表データ）に基づくものである。リン濃度の設定は、通常飼料の4倍量（1.2%）のリンを含む高リン食で約3週間飼育しても、最終体重や摂餌量・摂水量はコントロール食と有意差がなかったことから、ラット全体の代謝に大きな影響を及ぼすほど厳しいものではなかったと考え、今回もほぼ同条件で行った。HPC群、HPW群いずれも飼育期間中に大量のリンが吸収され、かつ排泄されていたことから、大量のリンがラット体内を通過したことになる。この点はベースとなる実験結果の再現ができています。従って、本研究で目指す「高リン食摂取時のタンパク質源の違いが腎臓における遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響」を解析する系は成立していると考えられる。実際に多くのリンが体内を通過することによって、両群において解剖学的所見から石灰化は認められており（図1）、また腎臓中のリンおよびカルシウム量からも石灰化によるリン酸カルシウムの蓄積が示唆され、解剖時の所見が裏付けられた（図2）。

DNAマイクロアレイデータの階層的クラスタリングの結果、高リン食中のタンパク質源の違いによって遺伝子発現プロファイルが異なることが示唆されたことから、HPC群とHPW群の間での発現変動遺伝子を選抜し、それらの機能的特徴を解析した。Rank products法によって抽出された発現変動遺伝子のうち、発現低下した遺伝子セットに顕著に濃縮されていたのは炎症・免疫応答に関わるGO termがほとんどであった。われわれが本研究のベースとしたカゼインをタンパク質源とした高リン食を投与した際に炎症関連遺伝子の発現亢進が認められたが、この結果はホエーをタンパク質源とすることによってそれらの遺伝子の発現亢進が軽減されたと考えられる。解剖学的な所見、腎臓中のミネラル測定の結果からは、HPC群、HPW群ともに石灰化は認められており、炎症関連遺伝子のホエータンパク質による発現低下は石灰化を抑制したことによる訳ではないと考えられる。これまで、高リン食投与ラット腎臓における炎症に関する報告は意外にも少なく、高リン食投与時に腎臓組織中におそらくマクロファージ等と考えられる炎症性細胞の浸潤が認められるという報告⁸⁾などがあるのみであり、遺伝子発現レベルで詳細に解析された例はほとんどない。そういった意味では、本研究は大変貴重な知見を提供できたといえる。遺伝子発現レベルでは高リン食摂取時におこる線維化の抑制も予想されるが、実際に炎症反応や線維化が抑制されているかどうかについては、今後個々の遺伝子レベルや組織学的な解析で明らかにしたい。

一方、発現上昇した遺伝子群には、PPARシグナルの活性化が起こっていると考えられる遺伝

子群が有意に濃縮されていた。PPARがNF- κ Bシグナルと拮抗して炎症を抑えるという報告もいくつかあり^{9,10}、ホエータンパク質は何らかのメカニズムでPPARの活性化を通じて炎症の抑制を行っている可能性がある。また、グルタチオン代謝、酸化還元などのG0 termも発現上昇遺伝子に有意に濃縮されていたが、これらについても、ホエータンパク質の摂取によってグルタチオンレベルが上昇することにより創傷治癒を促進する¹¹、ホエータンパク質の摂取がやけどにおける酸化ストレスを抑制するなどの報告¹²があり、これらの現象を裏付けていると考えられる。

本研究では、われわれがこれまで構築してきたニュートリゲノミクス的手法を適用することによって、現代的食生活で起こりうるリン過剰摂取状態において、摂取するタンパク質の種類によってリスクを軽減できる可能性を示すことができた。今回の実験系では通常のリン濃度の群の設定をしなかったため、ホエータンパク質の効果が高リン食を摂取した際に初めて起こる現象なのか、高リン食でなくても起こることなのかについては不明である。今後、通常リン濃度の系についても同様の実験を行い、明らかにしていきたいと考えている。

まとめ

高リン食摂取時に腎臓で起こる炎症関連遺伝子の発現亢進が、タンパク質源をホエータンパク質とすることで抑制することが可能であるかどうか検討するため、Wistar系ラットにタンパク質源をカゼイン、ホエーとした2種類の高リン食を21日間投与し、腎臓における遺伝子発現プロファイルの変化を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。その結果、G0 termレベルで炎症・免疫応答に関する遺伝子の顕著な抑制が認められ、またNF- κ Bシグナルと拮抗すると考えられるPPARシグナルに関わる遺伝子の発現上昇も認められた。以上のことから、mRNAレベルでの遺伝子発現においては、ホエータンパク質により全体として炎症を抑制する方向に生体応答が変化していることが示唆された。

文献

- 1) H. Matsuzaki, *et al.*, : *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 41, 179-183, 2007.
- 2) Y. Tani, *et al.*, : *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40, 221-228, 2007.
- 3) S. Katsumata, *et al.*, : *Br. J. Nutr.*, 94, 666-674, 2005.
- 4) H. Kume, *et al.*, : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1281-1285, 2006.
- 5) S. Hochreiter, *et al.*, : *Bioinformatics*, 22, 943-949, 2006.
- 6) R. Breitling, *et al.*, : *FEBS Lett.* 573, 83-92, 2004.
- 7) K. Kadota, *et al.*, : *Algorithms Mol. Biol.* 4: 7, 2009.
- 8) L. L. Haut, *et al.*, : *Kidney Int.* 17: 722-731, 1980.
- 9) X. Wen, *et al.*, : *J. Biol. Chem.* 285: 29981-29988, 2010.
- 10) C-F. Cheng, *et al.*, : *PPAR Res.* 2010: 345098, 2010.
- 11) O.A. Velioglu, *et al.*, : *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 78: 70-73, 2008.
- 12) O. Z. Oner, *et al.*, : *Surg. Today* 36: 376-381, 2006.

表 1. 飼料組成

	High-phosphorus casein (HPC) diet (P: 1.2%)	High-phosphorus whey (HPW) diet (P: 1.2%)
Casein	200	0
Whey	0	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	358.006	352.486
Maltodextrin 10	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	70	70
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
Mineral Mix S10022G	35	35
Vitamin Mix V10037	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
KH ₂ PO ₄	39.48	45.00
Total	1000	1000

表 2. 体重、摂餌量、腎湿重量

	HPC 群	HPW 群
最終体重 (g)	208.0±2.8	197.6±3.7
体重増加 (g / day)	4.9±0.1	4.5±0.1*
摂餌量 (g / day)	13.82±0.18	13.29±0.31
P 摂取量 (mg / day)	160.35 ± 2.34	152.16 ± 3.96
腎湿重量 (g / g BW)	0.00468±0.000145	0.00452±0.000072

データは平均±標準誤差(n=5)で示した。*: $p < 0.05$

表 3. リン出納試験 (解剖直前 3 日間)

	HPC 群	HPW 群	AIN93G 投与ラット (リン含量 0.3%、参考データ)
A, 摂取量 (mg / day)	178.68±3.64	167.00±8.35	53.94±1.81
B, 糞排泄 (mg / day)	26.18±2.54	21.83±2.04	18.82±0.87
C, 吸収量 (mg/day)	[A-B] 152.50±3.04	145.17±6.46	35.13±1.39
D, 尿排泄 (mg / day)	118.22±4.05	114.59±6.76	4.68±1.10
E, 体内保留量 (mg / day)	[C-D] 34.28±4.49	30.59±5.52	30.45±0.74
吸収率 (%)	[C / A] 85.39±1.27	87.03±0.64	65.10±1.19
体内保留率 (%)	[E / A] 19.23±2.50	18.20±2.86	56.59±1.49

データは平均±標準誤差(n=5)で示した。

表 4. 発現変動遺伝子中に有意に濃縮された主な GO term

(HPW 群で高発現)

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
0006631	Fatty acid metabolic process	1.32E-05
0009062	Fatty acid catabolic process	3.79E-04
0006635	Fatty acid beta-oxidation	1.08E-03
0006575	Cellular amino acid derivative metabolic process	2.21E-06
0006749	Glutathione metabolic process	2.60E-02
0055114	Oxidation reduction	1.62E-21
0006732	Coenzyme metabolic process	9.84E-12
0006084	Acetyl-CoA metabolic process	2.57E-03

(HPW 群で低発現)

GO-ID	GO term	FDR-corrected <i>p</i> -value
0009611	Response to wounding	6.96E-13
0006954	Inflammatory response	5.65E-08
0002526	Acute inflammatory response	1.09E-06
0019882	Antigen processing and presentation	1.97E-12
0019884	Antigen processing and presentation of exogenous antigen	9.11E-11
0006955	Immune response	2.90E-10
0006956	Complement activation	5.13E-04
0019274	B cell mediated immunity	1.70E-05
0016064	Immunoglobulin mediated immune response	9.19E-06
0006909	Phagocytosis	9.67E-04
0050766	Positive regulation of phagocytosis	2.00E-04
0030199	Collagen fibril organization	1.63E-02

表 5 HPW 群で発現上昇した PPAR シグナルに関わる遺伝子

ID	Gene Name	Gene Symbol
1370310_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	Hmgcs2
1370939_at,		Acsl1
1388153_at	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	
1367680_at	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Acox2
1370009_at	Apolipoprotein C-III	Apoc3
1386946_at	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a
1367742_at	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	Cpt1b
1386927_at	Carnitine palmitoyltransferase 2	Cpt2
	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2; cytochrome	Cyp4a3
1370397_at	P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3	
	Enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A	Ehhadh
1368283_at	dehydrogenase	
1367660_at	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Fabp3
1391661_at,		GK
1387491_at	Glycerol kinase	
1370067_at,		Me1
1370870_at	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	
	Similar to stearoyl-coenzyme A desaturase 3; stearoyl-Coenzyme A	-
1370355_at	desaturase 1	
1368150_at	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	Slc27a2
1387033_at	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	Ucp1

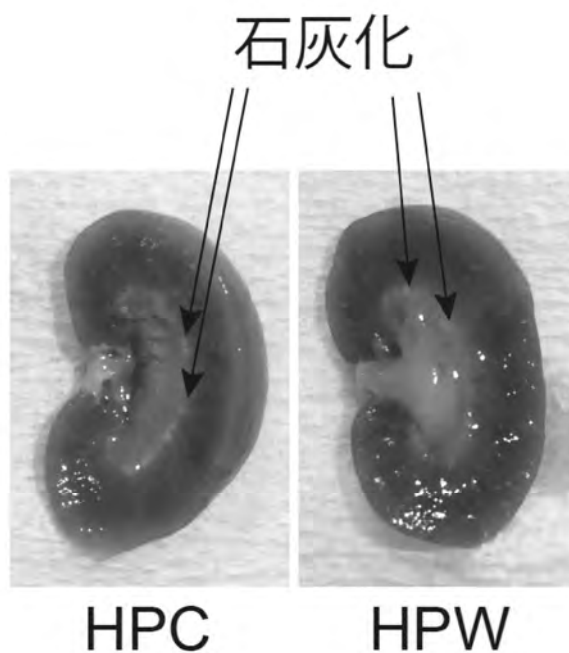


図1 HPC、HPW 両群の腎臓断面

右腎を体軸方向に切断し、断面を観察した。矢印は典型的な石灰化の像（白い粒状のもの）を示す。髓質と皮質の境界に明確な石灰化が認められる。

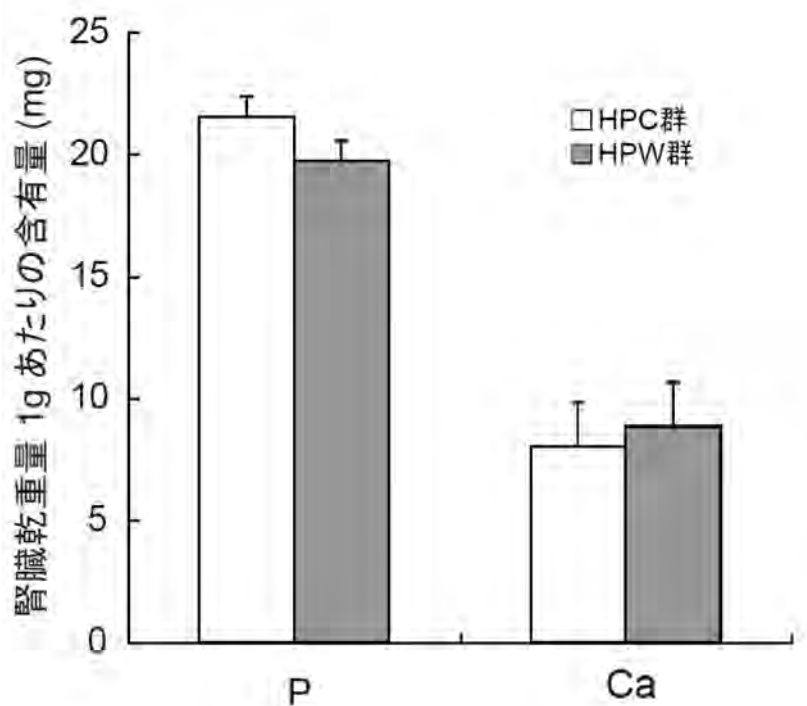


図2 腎臓中のリン (P) およびカルシウム (Ca) 含有量

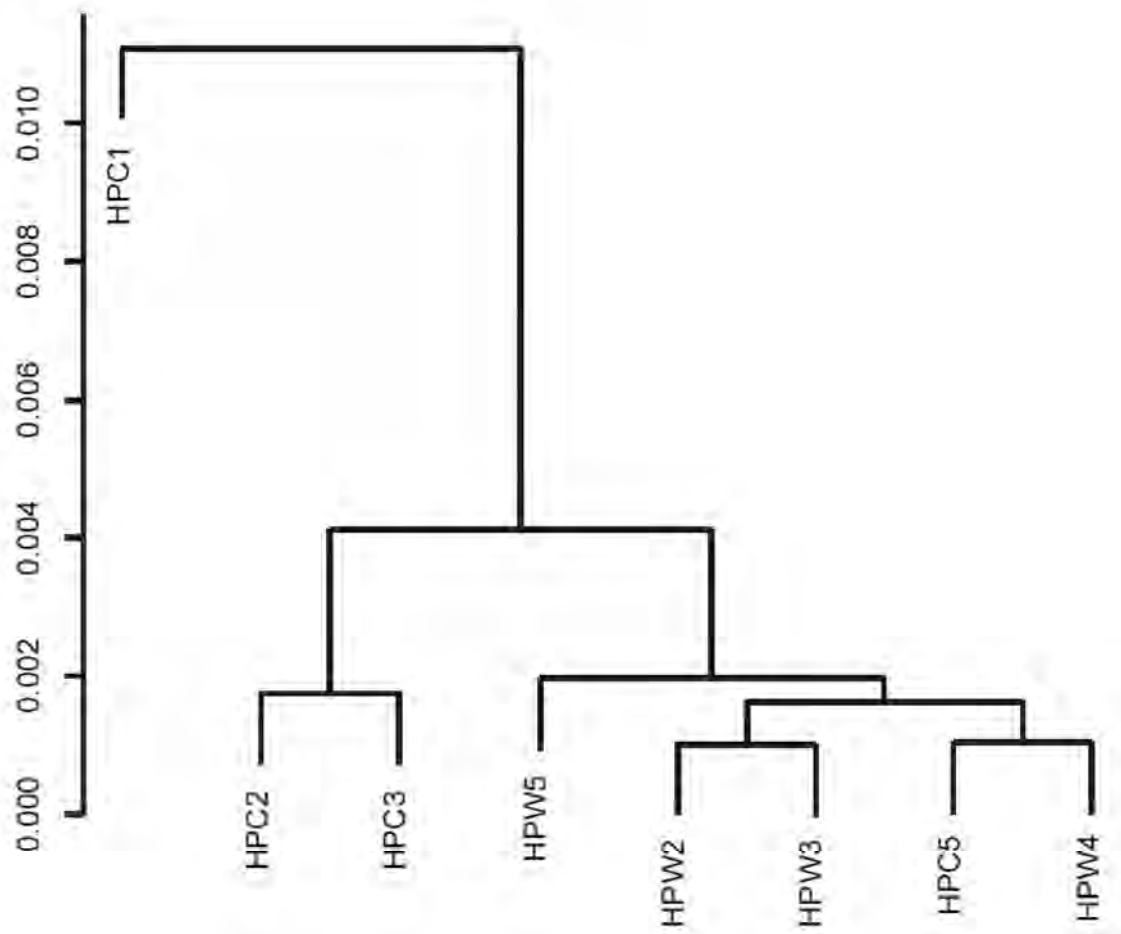


図3 FARMSによって正規化したDNAマイクロアレイデータの階層的クラスタデンドログラム

スケールはクラスタ間の距離を表す。