

リン過剰摂取によるラット腎臓における遺伝子発現変動の網羅的解析

中井雄治

東京大学大学院農学生命科学研究科 特任准教授

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、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る。網羅的解析はほとんど行われていない。

そこで、本研究では、DNA マイクロアレイを用い、

高リン食摂取時のラット腎臓における遺伝子発現変動を網羅的に解析することにより、高リン食摂取時の生体応答を遺伝子レベルで解明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。1つの群はAIN93G食(リン含量として0.3%)摂取群(C群)、もう1つの群は高リン食(リン含量1.2%)摂取群(HP群)として、代謝ケージで24日間飼育した。飼料の組成は表1に示した。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、ネンブター麻酔下で頸動脈より採血を行い、安楽死させた。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

表1 飼料組成

	Control diet (P: 0.3%)	High-phosphorus diet (P: 1.2%)
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	397.486	357.936
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_2PO_4	0.0	39.55
Total	1000	1000

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組織より TRIzol (Invitrogen) にて 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、Affymetrix 社の 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 Distribution free weighted method (DFW) アルゴリズム⁴⁾ 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。C 群と HP 群で発現に差がある遺

伝子の選抜は、DFW と相性がよいとされている Rank products 法^{5,6)}で行った。次に、HP 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、DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) の gene functional enrichment analysis によって、Gene Ontology (GO) に基づいて解析した。

結 果

24 日間飼育した結果、C 群と HP 群の間に、体重・摂餌量・摂水量いずれも有意差は認められなかった (表 2)。一方、当然のことながら、摂餌量から計算されたリン摂取量は HP 群で有意に高かった。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、リンの吸収量、尿排泄ともに HP 群で有意に高い値を示した。しかし、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。

解剖時に腎臓を体軸方向に切断し、断面を観察した結果、HP 群において、皮質と髄質の境界付近に明確な石灰化が認められた (データ示さず)。図 1 に示したように、腎臓中のリンおよびカルシウム濃度は HP 群で有意に高く、解剖時の所見が裏付けられた。

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。階層的クラスタリングの結果、C 群、HP 群それぞれが明確なクラスタを形成し (図 2)、C 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

表 2 体重、摂餌量、摂水量

	C 群	HP 群
最終体重 (g)	243.38 ± 4.67	236.75 ± 5.31
体重増加 (g / day)	4.87 ± 0.16	4.57 ± 0.11
摂餌量 (g / day)	15.75 ± 0.40	15.11 ± 0.21
P 摂取量 (mg / day)	47.26 ± 1.20	181.27 ± 2.57*
摂水量 (g / day)	19.00 ± 2.24	23.26 ± 0.80

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

	C 群	HP 群
A. 摂取量 (mg / day)	53.94 ± 1.81	197.95 ± 3.51*
B. 糞排泄 (mg / day)	18.82 ± 0.87	30.89 ± 1.04*
C. 吸収量 (mg/day)	[A - B] 35.13 ± 1.39	167.06 ± 2.62*
D. 尿排泄 (mg / day)	4.68 ± 1.10	133.11 ± 3.08*
E. 体内保留量 (mg / day)	[C - D] 30.45 ± 0.74	33.95 ± 2.53
吸収率 (%)	[C / A] 65.10 ± 1.19	84.41 ± 0.30*
体内保留率 (%)	[E / A] 56.59 ± 1.49	17.16 ± 1.24*

データは平均±標準誤差 (n=5) で示した。*: $p < 0.05$

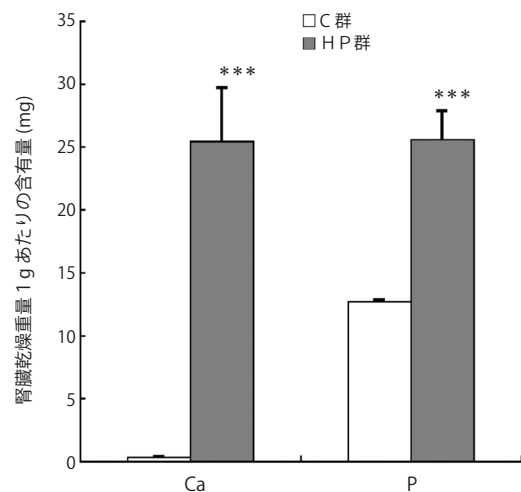


図 1 腎臓中のカルシウムおよびリン含有量

***: $p < 0.001$

ことが明らかとなった。

次に、Rank products 法によって C 群と HP 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、HP 群で発現が高い遺伝子は 981 個、HP 群で発現が低

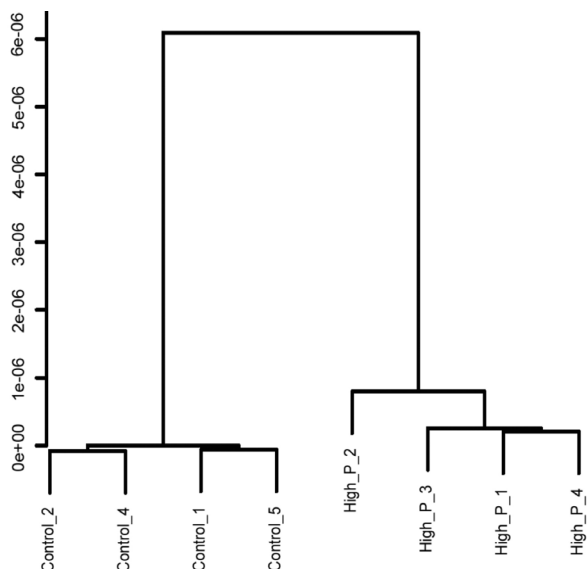


図2 DNA マイクロアレイの階層的クラスタデンドログラム
スケールはクラスタ間の距離を表す。

い遺伝子は 646 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 functional 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、オステオポンチンを含む Ossification (骨化)、炎症・免疫関連の GO term など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は、カルボン酸代謝に関わる GO term が濃縮されていたが、具体的な機能を示す GO term はほとんど抽出されなかった。

考 察

通常飼料の 4 倍量のリンを含む高リン食で 24 日間飼育しても、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、今回の条件 (リン含量・飼育期間) は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いえる。このことは、リン体内保留量に有意差が認められなかったことからわかる。しかしながら、HP 群では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。保留量に差が認められなくとも、多くのリンが体内を通過することによって、顕著な石灰化は認められた。従って、今回の条件でも、高

表 4 発現変動遺伝子中に有意に濃縮された主な GO term ($p < 0.05$)

高リン食で高発現		
GO-ID	GO term	FDR-corrected p-value
0002376	Immune system process	2.09E-27
0007165	Signal transduction	1.83E-04
0007249	I-kappa B kinase / NF-kappa B cascade	3.26E-02
0019882	Antigen processing and presentation	1.05E-06
0006955	Immune response	1.32E-23
0006958	Complement activation, classical pathway	1.60E-03
0050896	Response to stimulus	9.43E-18
0002526	Acute inflammatory response	5.68E-08
0006953	Acute-phase response	8.38E-03
0051674	Localization of cell	1.71E-05
0006817	Phosphate transport	2.14E-06
0032502	Developmental process	1.10E-12
0001503	Ossification	8.37E-03
高リン食で低発現		
GO-ID	GO term	FDR-corrected p-value
0019742	Carboxylic acid metabolic process	1.16E-03

リン食摂取による表現型の変化は確認できており、高リン食摂取が遺伝子発現に及ぼす影響は十分解析可能であると考えた。

事実、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、C 群と HP 群はそれぞれ明確なクラスタを形成し、両者の遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示された。Rank products 法によって抽出された発現変動遺伝子には、これまで報告のあったオステオポンチン¹⁾や NaPi-IIa²⁾などが含まれ、本実験系の妥当性が示唆されている。また、GO term として骨化が抽出され、オステオポンチン以外にも多くの遺伝子が協調して石灰化に寄与している可能性が示唆された。炎症・免疫に関わる遺伝子群も抽出された。石灰化に起因する炎症が起きていることも考えられるが、詳細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。

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、現代の食生活で起こりうるリン過剰摂取状態をラットモデルで解析することができた。今後、他の組織についても精度の高いマイクロアレイ解析を行うことにより、高リン食摂取時の新たな生体応答の発見が期待できる。また、個々の遺伝子発現変動を詳細に解析中であるが、将来的にはリン過剰摂取状態を早期に診断できるようなバイオマーカーの開発につながることも期待できる。食生活の質的变化によるリンの過剰摂取などは自覚症状として現れないことが考えられ、このようなバイオマーカーによる

診断は今後重要となってくるであろう。

要 約

ラットに高リン食を 24 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。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ことが明らかとなった。高リン食摂取群では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、高リン食摂取群の腎臓において、石灰化に関わる遺伝子群だけでなく、炎症・免疫に関わる遺伝子群が顕著に発現上昇していることが明らかとなった。摂餌量や体重に影響を与えない程度の高リン食でも、遺伝子発現プロファイルには変化を与えることが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成金を賜りました財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

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) Z. Chen, et al., : *Bioinformatics*, **23**, 321-327, 2007.
- 5) R. Breitling, et al., : *FEBS Lett.* **573**, 83-92, 2004.
- 6) K. Kadota, et al., : *Algorithms Mol. Biol.* **4**: 7, 2009.