

<令和元年度助成>

過剰摂取したリンを排出する中枢機構：老化の減速における役割

吉田 匡秀

(自治医科大学 医学部 生理学講座 神経脳生理学部門)

緒言と目的

リンは哺乳類の生存に必須な元素の一つである。しかし、早老症の病態を示す Klotho 遺伝子欠損マウスではリンが体内に過剰に貯留していることが判っている。一方で、この Klotho 遺伝子欠損マウスの老化は低リン食の摂取によって減速する。これらの結果は、過剰なリン摂取が老化を加速することを示唆している。

リンは生体内において大部分がリン酸として存在しており、通常、血液中ではリン酸は飽和している。リン過剰が生じた場合、血液中ではリン酸カルシウムが析出するが、Fetuin-A 蛋白質に吸着されて Calciprotein particle と呼ばれるコロイド粒子となり、血液中に分散する。Calciprotein particle の形成はリン酸カルシウム結晶の成長を防ぐ役割がある。しかし慢性的な過剰リン摂取は血液中や原尿中でリン酸カルシウム結晶を成長させ、血管石灰化や尿細管閉塞・障害のリスクを高めることになる。その結果、動脈硬化や腎機能低下といった老化を加速させる。

成人でのリンの必要量は 1 日当たり約 600 mg と概算されている。我々は肉類や野菜といった食品から 1 日およそ 1,600 mg のリンを摂取している。食物中のリンの存在形態によって吸収率が異なるため、およそ 40～60% 程度が腸から吸収される。しかし、それ以外に、加工食品、スナック菓子、清涼飲料水には食品添加物として大量の無機リン酸が含まれており、これらは腸から 100% 吸収される。例えば、酸味料としてリン酸を使用しているコーラなどの清涼飲料水では 350 mL 当たり 40～70 mg のリン酸塩が含まれている。現時点では、日本を含む

世界の国々においてリン酸の使用基準や食品表示の義務はないため、我々がどれだけのリンを摂取しているのか個々人が正確に把握することは難しい。しかし、現代の食生活ではリンを過剰摂取している可能性が極めて高い。

著者は予備的な実験から、①過剰リン摂取によりマウスは飲水量と尿量を増やすことで、原尿中のリン酸カルシウム結晶が成長するリスクを抑えながら、過剰リンを排出する機構を持つこと、②この飲水量の増加は中枢を介していることを示唆する結果を得た。本研究では、過剰リンを感知した感覚性脳室周囲器官が飲水量を増加させ、それに伴う尿量増加がリンを尿として排出するために重要であり、この機構が老化の加速を抑制するという仮説を証明することを目指した。

方法と結果

実験① 高リン食摂取による体重、飲水量への影響

野生型 C57BL6/J マウスを用いた。このマウスに 0.35% リン含有食（通常食）または 2% リン含有食（高リン食）を餌として与え、体重変化と飲水量の変化を観察した。体重は、高リン食群では通常食群と比べ体重増加が少なく、体重が有意に少なかった（図 1）。飲水量は高リン食負荷を開始 1 週間で有意に増加しており、およそ 2 倍に増加していた。また高リン食負荷 5 週間後ではその差は顕著となり、およそ 3 倍に増加していた（図 2）。これらの結果は、高リン食を摂取すると飲水行動が促進されることを示している。

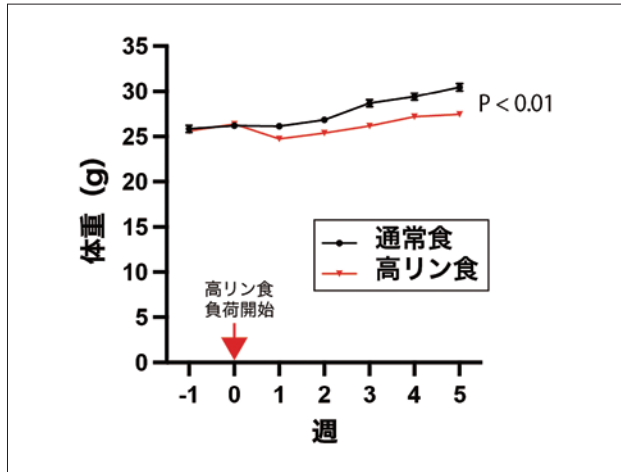


図1 高リン食摂取による体重変化

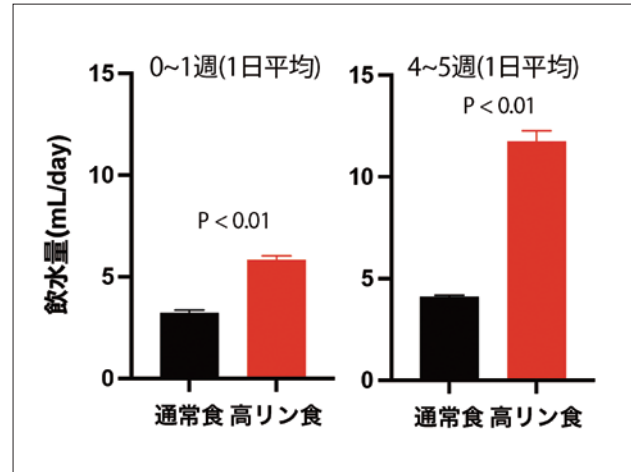


図2 高リン食摂取による飲水量の変化

実験② 高リン食摂取による尿量、尿浸透圧への影響

野生型 C57BL6/J マウスを代謝ケージで飼育し、通常食での飼育後、高リン食を餌として与えた。通常食摂取時および高リン食摂取開始 1 週間後に 24 時間分の尿を採取し、尿量と尿浸透圧の変化を観察した。尿量は、高リン食摂取開始 1 週間後では、通常食摂取時と比較して、およそ 3 倍に増加していた。また、高リン食を 1 週間摂取したマウスに対して 24 時間飲水を行わせない脱水処置を行った。高リン

食を 1 週間負荷したマウスは脱水処置によって、脱水処置前と比較して尿量が減少した（図 3 左）。尿浸透圧は、高リン食摂取開始 1 週間後では、通常食摂取時と比較して、およそ 1/3 に低下していた。一方で高リン食を 1 週間負荷したマウスは脱水処置によって、脱水処置前と比較して尿浸透圧が上昇した（図 3 右）。これらの結果は、高リン食を摂取すると低張尿を大量に排出することを示している。また、少なくとも高リン食摂取 1 週間では、脱水によって尿を濃縮することが可能であったことから、この尿

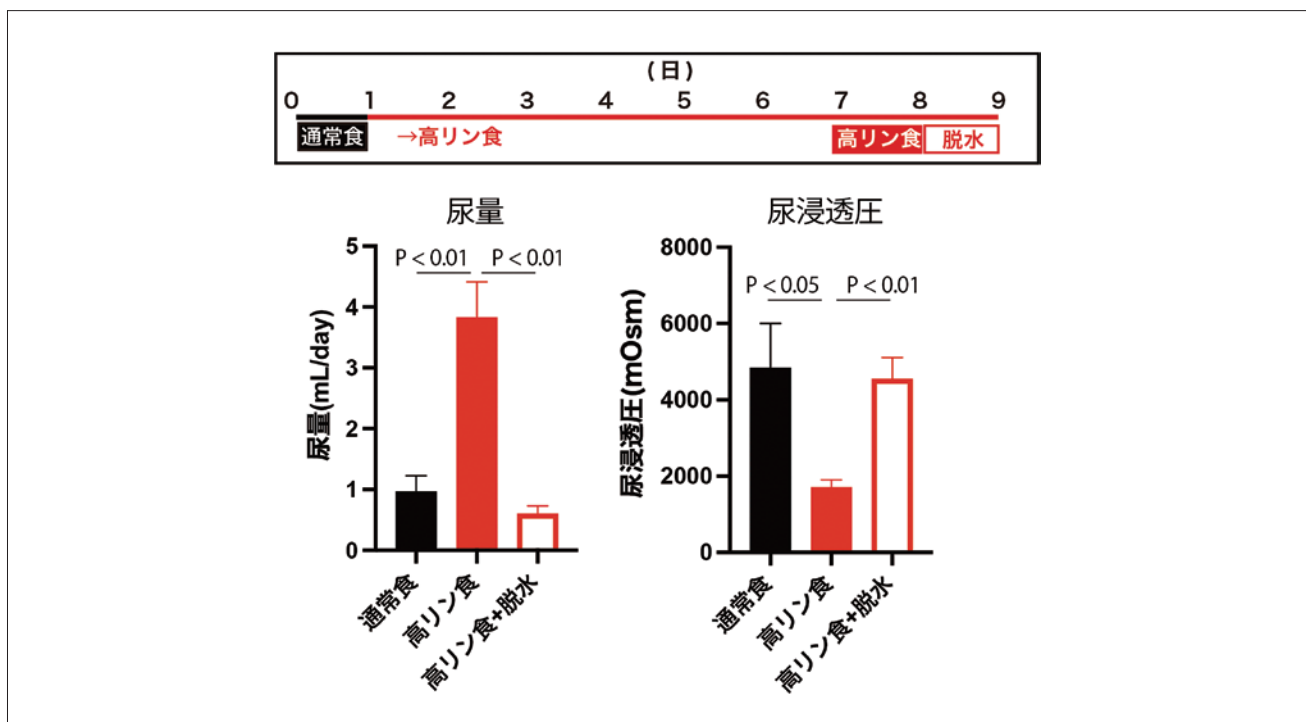


図3 通常食摂取時、高リン食摂取時、脱水時の尿量、尿浸透圧

量の増加は腎機能の障害ではなく、中枢を介した作用であることを示唆している。抗利尿ホルモンであり、腎臓での水の再吸収に関わるバゾプレシンは脳から末梢血中に放出される。このバゾプレシン産生ニューロンの機能は正常であるように考えられた。

実験③ Fibroblast growth factor21 (FGF21) による脳室周囲器官の活性化への効果

FGF21 は主に肝臓、膵臓で発現しており、エネルギー消費を亢進させることが知られている。また、栄養条件の変化によって血液中の濃度が変化することが知られている。著者らは高リン食負荷によって血液中の FGF21 濃度が亢進することを報告している (Nakano 2019)。そこで、FGF21 の脳室内投与によって飲水中枢が存在する脳室周囲器官のニューロンが活性化されるかを解析した。ニューロンの活性化は免疫組織化学染色法を用いて、神経活動のマーカーである Fos タンパク質の発現を指標に終板脈管器官、脳弓下器官、延髄弧束核、最後野の活

性を解析した。終板脈管器官、脳弓下器官では、FGF21 投与群、vehicle 投与群の間で Fos 陽性細胞数の顕著な増加は認められなかった。一方で延髄弧束核、最後野においては FGF21 投与群では Fos 陽性細胞が増加し、Fos 陽性細胞の一部は視床下部に投射することが知られているチロシン水酸化酵素発現ニューロンであった (表 1)。これらの結果は、FGF21 は延髄弧束核、最後野を活性化することを示唆している。

実験④ FGF 受容体の共受容体である β -Klotho の脳内における局在

FGF 受容体の共受容体である β -Klotho は、FGF21 が生理的な濃度で受容体に結合するために必要である。著者は in situ hybridization 法を用いて延髄弧束核、最後野における β -Klotho の mRNA の局在を解析した。その結果、 β -Klotho mRNA は、延髄弧束核、最後野において検出され、その一部はチロシン水酸化酵素発現ニューロンであった (図 4)。延髄弧

表 1 FGF21 脳室内投与によるチロシン水酸化酵素ニューロンの活性化

FGF21	0ng	10ng	100ng	1000ng
延髄弧束核	9.3 $\pm$ 2.9	6.0 $\pm$ 2.5	15.3 $\pm$ 5.2	48.6 $\pm$ 7.8*
最後野	1.7 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 1.5	7.2 $\pm$ 2.9	86 $\pm$ 11.2*

Fos 陽性チロシン水酸化酵素ニューロン数 *P < 0.05

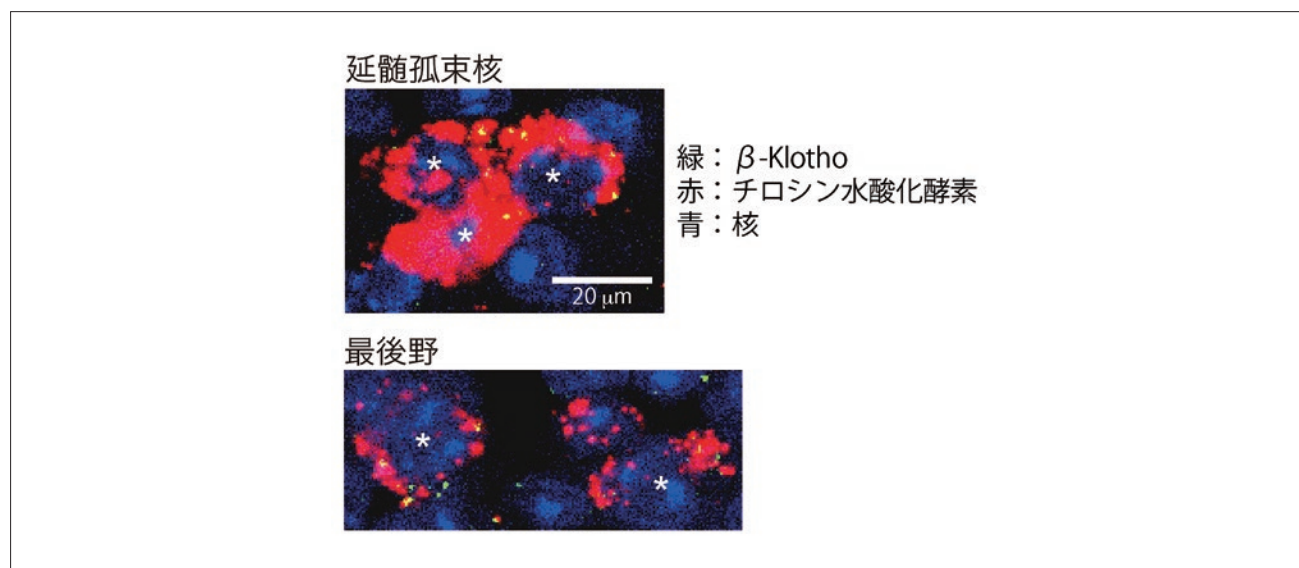


図 4 延髄弧束核、最後野における β -Klotho の発現

束核では、チロシン水酸化酵素陽性細胞の 11% が β -Klotho 陽性であり、 β -Klotho 陽性細胞の 41% がチロシン水酸化酵素陽性であった。最後野では、チロシン水酸化酵素陽性細胞の 22% が β -Klotho 陽性であり、 β -Klotho 陽性細胞の 60% がチロシン水酸化酵素陽性であった。これらの結果は FGF21 が延髄弧束核、最後野に直接作用することを示唆している。

実験⑤ FGF21 過剰発現による飲水行動への効果

外因性に血液中の FGF21 濃度を上昇させることで、飲水行動が促進されるかを解析した。アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた実験を計画した。コントロールとして AAV-hrGFP (1×10^9 vg/0.5 mL 腹腔内投与) 投与群を用いて、AAV-FGF21 (1×10^9 vg/0.5 mL) 投与群と比較した。血液中の FGF21 濃度は、AAV-hrGFP 群において 34.7 pg/mL、AAV-FGF21 群では 6,437.8 pg/mL であり、有意な上昇が確認された。AAV 投与 3 週間後に飲水量を測定したところ、飲水量の有意な増加が認められた (図 5)。この結果は、FGF21 には飲水行動を促進する効果があることを示唆している。

考 察

本研究では、①高リン食摂取によって飲水量が増加すること、②低張尿の量が増加すること、③バゾ

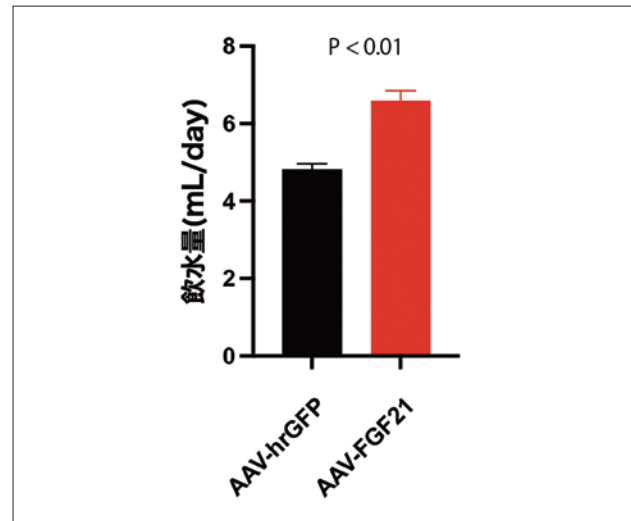


図 5 FGF21 過剰発現による飲水量の変化

プレシン反応には異常がないこと、④高リン食摂取によって血液中の濃度が上昇する FGF21 は、延髄弧束核、最後野においてチロシン水酸化酵素ニューロンを含む細胞を活性化すること、⑤ β -Klotho は延髄弧束核、最後野に局在し、その一部はチロシン水酸化酵素ニューロンであること、⑥ FGF21 の血中濃度を外因性に上昇させると、飲水行動が促進されること、を明らかにした。これらの結果は、高リン食摂取によって FGF21 濃度が上昇することで、延髄弧束核、最後野を活性化し、飲水行動を促進させている可能性を示している (図 6)。

マウスが高リン食を負荷されると速やかに飲水が増加することは、リン酸カルシウム結晶の成長により尿細管閉塞・障害が発生するリスクがあるため、

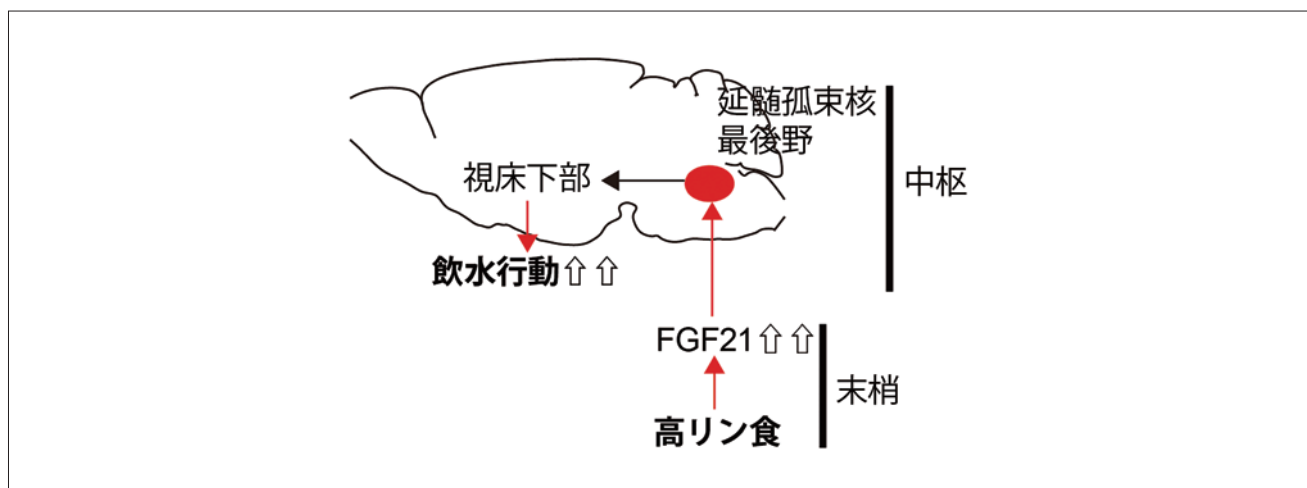


図 6 まとめ

腎臓においてリンを濃縮して排出することには限界があることを意味している。そのため、生体は飲水量を増加させることで尿量を増やし、リン酸カルシウム結晶の成長を抑え、腎障害を起こさないようにリンを排出する機構を備えた可能性がある。

本研究では生体に備わる抗老化の脳機構を解明することを目指しているが、一方でこの機構が働いたとしてもマウスでは過剰なリンを摂取し続けると、腎臓間質の繊維化が起こり、慢性腎臓病が起こる。慢性腎臓病は日本人成人の8人に1人が患い、糖尿病、高血圧の合併症や老化現象の一環として起こる場合が多い。本研究が更に発展し、過剰なリン摂取

が老化を加速する証拠を得られれば、食品添加物等に用いるリン酸の使用基準の作成や食品表示の義務化を通じて過剰なリン摂取を減らし、加齢によって増加する心血管疾患や慢性腎臓病の予防を推進できる可能性がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深く御礼を申し上げます。また、研究に関するアドバイスを頂きました自治医科大学分子病態治療研究センター抗加齢医学研究部 黒尾誠先生に感謝申し上げます。

Central mechanisms to excrete excess phosphorus: Roles in the deceleration of ageing

Masahide YOSHIDA

*Division of Brain and Neurophysiology, Department of Physiology,
Jichi Medical University*

Phosphorus is one of the essential elements for the survival of organisms. On the other hand, studies of *Klotho* gene-deficient mice, which exhibit the pathology of premature ageing, suggest that the accumulation of phosphorus in the body accelerates ageing. In addition, ageing in these mice is slowed by a low-phosphorus diet. These results suggest that excess phosphorus intake accelerates ageing. Phosphate is normally saturated in the blood. Thus, chronic excess phosphorus intake can cause calcium phosphate crystals to form in the blood and primary urine, increasing the risk of vascular calcification and tubular obstruction and damage, and consequently accelerating ageing.

This study was conducted to test the hypothesis that when the sensory circumventricular organs sense excess phosphorus, they increase the amount of water consumption, resulting in an increase in urine volume which is important for the excretion of phosphorus as urine, and that this mechanism inhibits the acceleration of ageing.

In the present study, a high phosphorus diet increased the amount of water consumption and hypotonic urine. FGF21, whose concentration in the blood is increased by a high phosphorus diet, activated cells including tyrosine hydroxylase neurons in the nucleus tractus solitarius and the area postrema. β -*Klotho* expressing cells are localized in the nucleus tractus solitarius and the area postrema, and some of these were tyrosine hydroxylase neurons. Exogenously increasing the blood concentration of FGF21 promoted drinking behavior. These results suggest that an increase in FGF21 levels due to a high phosphorus diet can activate the nucleus tractus solitarius and the area postrema, and promote drinking behavior.