

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09736

研究課題名(和文) 胎児期特異的なリン恒常性維持分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism for phosphate homeostasis in fetus

研究代表者

道上 敏美 (MICHIGAMI, TOSHIMI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・環境影響部門・部長

研究者番号：00301804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期には、急速な骨格の形成と成長に適応するため、胎児血の血清リン値は母体血に比べて著明な高値を示すが、胎児期のリン恒常性維持機構には不明な点が多い。本研究においては、胎児のリン恒常性に関わる分子を同定するため、低リン血症を呈するHypマウスの妊娠母体由来WT胎仔胎盤およびWT妊娠母体由来胎仔胎盤の間でAgilent Expression Array解析を行い、発現に差のある遺伝子を抽出した。現在、同定された遺伝子について解析を進めている。また、骨芽細胞株を用いて細胞外無機リン酸濃度の上昇が及ぼす影響を検討し、リン濃度の感知にFGF受容体が関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To adapt to the rapid formation and growth of fetal skeletons, the serum levels of phosphate is maintained to be much higher in the fetus than in the pregnant mothers. However, the mechanisms underlying the phosphate homeostasis in fetus remain obscure. In the current study, to identify the molecules involved in phosphate homeostasis in fetus, we performed Agilent Expression Array analysis using the placentas of wild-type fetuses from hypophosphatemic Hyp mouse mothers and those from WT mouse mothers. Functional analyses are undergoing on the molecules whose expression was different between the groups. In addition, we investigated the effects of elevated extracellular inorganic phosphate on osteoblasts and revealed the possibility that FGF receptor might be involved in phosphate sensing.

研究分野：小児科学

キーワード：リン恒常性 胎児 リン感知 胎盤 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

リンはカルシウム(Ca)と並んで骨格の形成や成長に必須のミネラルであり、生体にはその恒常性を維持するための機構が備わっている。出生後のリン代謝調節には、副甲状腺ホルモン(PTH)、1,25 水酸化ビタミン D (1,25(OH)₂D)、fibroblast growth factor 23 (FGF23)が重要な役割を担っている。

胎児期には急速な骨格の成長に対応するため、多量のCaおよびリンが必要となる。特にリンはCaと共に骨石灰化に寄与するのみならず、cyclin D1の発現誘導を介して骨芽細胞や軟骨細胞の増殖を促進する(Kimata, et al. *Bone* 2010)。胎児における高いリン需要に適應するため、胎盤は妊娠後期、リンを大量に取り込んで胎児へと送りこむ。従って、胎児の血清リン値は母体血に比して高い濃度に維持され、濃度勾配を生じる。すなわち、胎児においては母体よりもはるかに高い血清リン値が正常値となる。このように、胎児期のリンの恒常性には、出生後とは異なる機序が関与している可能性がある。

研究代表者はこれまで、自身が主催する研究室において、一貫してビタミンDやリンの作用および代謝に関する研究を行ってきた。特に、所属施設が周産期センター附属の研究所であるところから、周産期のミネラル代謝に関しても研究を進め、例えばビタミンD 活性化機構が腎発生の初期から準備されていることなどを報告してきた。しかしながら、胎児のリン代謝調節や経胎盤リン輸送制御の分子機構についてはほとんど解析されていないのが現状であり、関わる分子群も同定されていないのが現状である。また、血清リンの正常値は胎児が最も高く、出生後、成長とともに低下する。血清リン値を年齢に応じた正常値に維持するためには、リンの過不足を感知して適應する必要があるが、哺乳類におけるリン感知のしくみは明らかになっていない。

2. 研究の目的

- (1)胎児期特異的なリン恒常性維持機構の分子基盤の解明をめざす。
- (2)リンの過不足を感知するメカニズムを解析し、年齢依存的に血清リンの正常値が低下する機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)遺伝性低リン血症のうちで最も頻度が高い、X連鎖性低リン血症くる病(X-linked hypophosphatemic rickets; XLH)のモデルである *Hyp* マウスを解析に用いた。低リン血症を呈する *Hyp* 妊娠マウスにおいては、野生型(WT)妊娠マウスと比べて、胎児—母体間の血清リン濃度勾配が増大している。このことから、*Hyp* 妊娠母体の胎児の胎盤においては、胎児が *Hyp*、WT のいずれの場合においても、リンの経胎盤輸送に関わる

分子の発現が変化している可能性が推察される。そこで、E18.5 の *Hyp* 妊娠母体および WT 妊娠母体より胎仔および胎盤を摘出した。胎仔の genotyping 後、*Hyp* 妊娠母体由来 WT 雌胎仔、および WT 妊娠母体由来雌胎仔の胎盤から RNA を抽出した。これらの胎仔においては母体環境のみが異なる。Real-time PCR により、リンの輸送に関わる遺伝子の発現を検討した。さらに、Agilent Array 解析により、*Hyp* 母体由来 WT 胎仔の胎盤において発現が変化している遺伝子を網羅的に解析した。

(2)研究代表者らはこれまで、種々の哺乳類細胞において、細胞外の無機リン酸濃度の上昇が FGF 受容体を介して細胞内にシグナルを惹起し、遺伝子発現を変化させることを報告してきた。骨芽細胞や骨細胞には遺伝性低リン血症の責任遺伝子が多く発現しているところから、これらの細胞がリンの過不足を感知して、血清リンの恒常性を維持している可能性がある。そこで、マウス骨より単離した初代骨芽細胞および骨芽細胞株を用いて、細胞外無機リン酸濃度の変化が遺伝子発現やシグナルに及ぼす影響およびそのメカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1)リンの輸送に関わる Na⁺/Pi 共輸送単体をコードする遺伝子のうち、胎盤には *Slc34a2*、*Slc20a1* および *Slc20a2* が発現しているが、*Hyp* 妊娠母体由来 WT 胎仔胎盤および WT 妊娠母体由来胎仔胎盤の間で、これらの遺伝子の発現に差を認めなかった。また、リンの exporter をコードする *Xpr1* の発現についても検討してみたが、同様に *Hyp* 母体由来胎仔胎盤と WT 母体由来胎仔胎盤との間で差を認めなかった。このことから、低リン血症を示す *Hyp* 妊娠マウスにおける胎仔—母体間の血清リン濃度勾配の増大は、これらのリン輸送体の発現変化によるものではないことが示唆された。

さらに、*Hyp* 妊娠母体由来 WT 胎仔胎盤および WT 妊娠母体由来胎仔胎盤から抽出した RNA を用いて Agilent Expression Array 解析を行った。群間比較解析では、信頼性の低いデータをフィルタリングにて除去した後、有効プローブを用いて統計検定(t-test)を行い、p.value<=0.05 を満たす 8073 プローブを抽出した。これらについて、シグナル平均値から発現比を算出し、発現比>=±2 倍以上の変化を示したプローブを抽出した。その結果、*Hyp* 妊娠母体由来 WT 胎仔胎盤で発現が2倍以上に上昇していたプローブの数が 677、1/2 以下に低下していたプローブの数が 282 であった。研究代表者らが以前、*Hyp* 妊娠母体由来 WT 胎仔胎盤で発現増加していることを報告したビタミン D-24 水酸化酵素コード遺伝子 *Cyp24a1* のプローブ発現が、今

回の array 解析においても、5.5 倍に増加しており、データの信頼性が確認された。発現が変動していたプローブの中に、既知のリン輸送体は含まれていなかった。現在、抽出された遺伝子について、解析を進めている。

(2)マウス長管骨から単離した初代骨芽細胞や骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を 1 mM あるいは 4 mM のリン酸存在下で 24 時間培養したところ、4 mM のリン酸刺激により骨細胞のマーカーである dentin matrix protein 1 (Dmp1) の発現が強く誘導されることを見出した。このことから高濃度のリン酸刺激は Dmp1 の発現誘導を介して、骨芽細胞から骨細胞への分化を促進する可能性が示唆された。胎児においては骨局所におけるリンの濃度も血清同様に高いことが推察され、リンは遺伝子発現制御を介して骨格の成熟に寄与している可能性がある。さらに、30 分間の 4 mM リン酸刺激は ERK1/2 やその上流に存在する FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α) の、リン酸化をもたらした。また、MEK 阻害剤である U0126 や FGFR 阻害剤である SU5402 の添加によって、4 mM リン酸刺激で誘導される Dmp1 の発現増加が消失した。これらの結果から、骨芽細胞において、細胞外無機リン酸濃度の急速な上昇は、FGFR を介して細胞内にシグナルとして伝えられ、Dmp1 などの遺伝子の発現誘導を介して細胞の分化を促進することが示唆される。このように、骨芽細胞が細胞外の無機リン酸濃度の変化に対して応答性を示すことから、骨芽細胞はリンの過不足を感知している可能性が推察される。また、以前、研究代表者らは、低リン血症を示す *Hyp* マウスの骨芽細胞および骨細胞における遺伝子発現を詳細に検討し、リン酸利尿因子である FGF23 のほか、Dmp1 や FGFR1 の発現が増加していることを報告している (Miyagawa, et al. *PLoS One* 2014)。このことと、今回の研究で明らかになった、骨芽細胞において細胞外無機リン酸濃度の上昇が FGFR1 を介して細胞内にシグナルを惹起し Dmp1 の発現を誘導することとを合わせて考えると、*Hyp* の骨芽細胞・骨細胞においては FGFR1 の発現が増加しているためにリン酸で惹起されるシグナルが増強し、低リン血症が存在するにもかかわらず高リン状態であると感知され、その結果 Dmp1 や FGF23 の発現増加をきたしている可能性が推察される。すなわち、リンの過不足は骨芽細胞や骨細胞によって感知されていると考えられる。これらの結果を踏まえ、研究代表者らは、成長過程で血清リン値の正常値が低下するのは骨の成熟と関連しているのではないかと推察しており、今後検討を進める。

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 5 件)

Michigami T, Kawai M, Yamazaki M, Ozono K. Phosphate as a signaling molecule and its sensing mechanism. *Physiol Rev*. 2018. 印刷中. 査読有
Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor in Osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2017 118:1151-1163. 査読有、doi: 10.1002/jcb.25742.

Kawai M, Kinoshita S, Ozono K, Michigami T. Inorganic phosphate activates the AKT/mTORC1 pathway and shortens the life span of an α -Klotho-deficient model. *J Am Soc Nephrol*. 2016. 27: 2810-2824. 査読有、doi: 10.1681/ASN.2015040446

Ohata Y, Ozono K, Michigami T. Current concepts in perinatal mineral metabolism. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2016. 25:9-17. 査読有、doi: 10.1297/cpe.25.9

Yamazaki M, Kawai M, Miyagawa K, Ohata Y, Tachikawa K, Kinoshita S, Nishino J, Ozono K, Michigami T. Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. *J Bone Miner Metab*. 2015 33:342-354. 査読有、doi: 10.1007/s00774-014-0598-2

[学会発表](計 4 件)

山崎美和, 川井正信, 大園恵一, 道上敏美. 骨芽細胞の細胞外無機リン酸応答性における型ナトリウム/リン酸共輸送担体の役割: Pit2 欠損細胞を用いた解析. 第 35 回日本骨代謝学会. 2017.7.27-29: 福岡

Michigami T, Yamazaki M, Kawai M, Ozono K. Role of type III Sodium/Phosphate Co-transporters in the Responsiveness of Osteoblasts to Extracellular Inorganic Phosphate. 8th International Conference on Children's Bone Health. 2017. 6. 10-13. Würzburg, Germany

山崎美和, 川井正信, 立川加奈子, 西野仁, 大園恵一, 道上敏美. 骨芽細胞の細胞外無機リン酸惹起シグナル受容における Pit-1 の関与: CRISPR/Cas システムを用いた解析. 第34回日本骨代謝学会学術集会. 2016.7.21-23. 東京

MIWA)

Michigami T. Hypophosphatemic Rickets: Current Status and Future Perspectives. Joint Meeting of the 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society and the 50th Annual Meeting of the Japanese Pediatric Endocrine Society. 2016.11.16-20. 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔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

道上 敏美 (MICHIGAMI, TOSHIMI)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
母子医療センター(研究所)・環境影響部
門・部長
研究者番号: 00301804

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山崎 美和 (若林 美和) (YAMAZAKI,