

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20363

研究課題名(和文) FGF23-klotho axisをメディエーターとした骨細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of osteocyte function included FGF23 - klotho axis

研究代表者

佐々木 宗輝 (SASAKI, Muneteru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10706336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は骨細胞と血中リン濃度の関係を解明することを目的とした。kl/klマウスは、低リン食によって表現型が改善され、klotho^{-/-}マウスでは、表現型の改善が認められなかった。従って、klotho^{-/-}マウスの表現型の発現には血中リン濃度以外の因子の存在が考えられた。次に、野生型マウスの頭蓋骨から骨細胞を単離し、様々なリン濃度で培養を行い、各濃度における骨細胞産生蛋白の発現を調べた。その結果、リン濃度の変化に応じて発現する蛋白質の変化を認めた。従って、骨細胞はリン濃度を直接感知すると考えられ、そのためには klotho蛋白の存在が必要な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate that relationship between osteocyte and phosphorous serum level. Low phosphorous diet improved the phenotype of kl/kl mice, but this diet did not improved the phenotype of klotho^{-/-} mice. Our finding suggests that not only phosphorous serum level but also other factors may be associated with the phenotype of klotho^{-/-} mice. Next, expression levels of osteocyte-related genes and proteins were investigated using osteocytes derived from mouse calvariae under various phosphorous conditions. The expression level of an osteocyte-related protein was changed in a phosphorous dose dependent manner. Hence, osteocyte may directly detect the phosphorous serum levels in the presence of klotho protein.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：骨細胞 klotho リン濃度

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨組織に存在する細胞の中で最も多く存在する細胞であり、骨細胞の細胞突起と骨細管を介した骨細胞・骨細管系が、骨基質のミネラル代謝・調節を行う可能性が提唱されている。骨細胞は Sclerostin を産生し骨芽細胞活性を調節する一方、dentin matrix protein-1(DMP-1)産生による周囲骨基質の石灰化への関与、そして、FGF23 を産生し腎臓に作用することで血中リン濃度を調節することが知られている(EMBO J, 2003, J Biol Chem, 2003, Nature Genet, 2000, PNAS, 2001, J Clin Invest, 2004)。従って、骨細胞・骨細管系は、腎臓とともにリンをはじめとしたミネラル代謝調節を行う細胞と考えられる。申請者は、FGF23-klotho axis が破綻した *kl/kl* マウスを用いて、骨基質ミネラルが流出する現象を報告しており(Sasaki M et al., Bone 2013)、骨細胞はミネラルセンシングおよびレギュレーターとして機能する可能性を示唆してきた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の申請者の研究をさらに発展させ、FGF23-klotho axis をメディエーターとした骨細胞の機能解析を行い、(1)細胞に対して FGF23-klotho axis が直接作用す

るのか、(2)骨細胞が血中リン濃度を感知し基質ミネラル調整を行うのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

【平成27年度実験計画】

(1)骨細胞に対して FGF23/klotho axis が直接作用する可能性

実験1 *kl/kl* マウスも *klotho*^{-/-}マウスも同じ骨組織異常を示し、その病理機序は骨細胞の機能破綻であることを確認している(Sasaki M et al., Bone. 2013)。従って、ターゲットを骨細胞に絞り、これらのマウスに通常食(Ca:1.17%、P:0.69%)または低リン食(Ca:1.17%、P:0.415%) + 3%塩酸セベラマーを与えて、血中リン濃度が低下した状態で、骨組織異常の回復および *klotho* 蛋白発現上昇の有無を解析する。この場合、*klotho*^{-/-}マウスでは *klotho* 蛋白の発現上昇は誘導されないが、*kl/kl* マウスはプロモーター領域の変異であり、*klotho* 蛋白発現上昇の可能性はある。従って、低リン食で *kl/kl* マウスも *klotho*^{-/-}マウスも回復する場合は、血中リン濃度が主たる因子である可能性が高い。一方、*kl/kl* マウスが回復し、*klotho*^{-/-}マウスが回復しない場合は、リン濃度以外の原因が考えられる。つまり低リン

状態で klotho 蛋白産生そのものが上昇し、骨細胞に autocrine 的に作用した結果回復した可能性が高い。その場合、(2)の検索を進める。の解析方法としては、組織非特異的アルカリフォスファターゼ、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ、また、石灰化結晶に結合する DMP-1, オステオポンチン、オステオカルシン、matrix Gla protein (MGP)の免疫組織化学の他、透過型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡での解析を進める。

(2) 骨細胞が血中リン濃度を感知し FGF23 産生および基質ミネラル調節を行う可能性

実験2 骨細胞から産生された FGF23 が autocrine 的に骨細胞に作用するためには、骨細胞に klotho および FGFR1c が発現する必要があり、野生型マウス、*kl/kl* マウス、*klotho*^{-/-}マウスの大腿骨・脛骨において *klotho*, *FGF23*, *FGFR1c* などの *in situ* hybridization および real time PCR を行う。また、骨細胞に直接、FGF23-klotho シグナルが作用するのか、あるいは、周囲の骨芽細胞などからの影響を受けての結果なのかを明らかにするため、平成28年度の培養系 (osteoblast-rich fraction, osteocyte-rich fraction) を用いて、詳細に検討する。

【平成28年度実験計画】

道上らの方法に基づいて、マウス頭蓋骨から骨細胞(osteocyte-rich fraction)と骨芽細胞(osteoblast-rich fraction)を採取する。本実験で重要な点は、骨芽細胞と骨細胞とを分離し、以下に述べる因子に対する反応を明らかにすることである。生体内の骨細胞は骨芽細胞と細胞突起で結合しており、骨芽細胞のシグナルが gap junction を介して骨細胞へと伝わることから、平成27年度の *in vivo* の解析だけではなく、平成28年度には、*in vitro* 解析を行う。その方法として、単離した骨細胞または骨芽細胞を、培養液中にリン濃度を 0.1mg/dl ~ 20mg/dl (血清リン濃度の標準値を4ないし6 mg/dl とした場合)までの範囲で培養し、*FGF23*, *klotho*, *sclerostin*, *DMP-1*, *FGFR1c* などの発現を real time PCR にて定量的に検索する。また、骨細胞に *klotho* 遺伝子導入し、*klotho* 蛋白を産生させた状態で、同様に、各種の遺伝子の発現を real time PCR を中心に解析する予定である。その結果、リン濃度の変化、あるいは、*klotho* 蛋白過剰産生のどちらで、骨細胞が上記の遺伝子発現を大きく変化させ、また、*kl/kl* マウスまたは *klotho*^{-/-} マウスで認められた現象を説明する結果と

なるか検索を進める。さらに、骨細胞は細胞突起を介したネットワークを形成しており、全ての骨細胞が同一の挙動を示す訳ではない。従って、*klotho*, FGF23, DMP-1, sclerostin (SOST)などについては、蛍光抗体法による免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡解析を進める。

4. 研究成果

Kl/Kl マウスも *klotho*^{-/-} マウスも同じ骨組織異常を示し、その病理機序は骨細胞の機能破綻であることを確認している。*Kl/Kl* マウスは、低リン食の給餌によって表現型の改善が認められた。一方、*klotho*^{-/-} マウスでは、低リン食の給餌による表現型の改善は認められなかった。従って、*Kl/Kl* マウスで認められる表現型の原因は血中のリン濃度が多く関与していると考えられた。*Kl/Kl* マウスはプロモーター領域の変異のため、血中のリン濃度の低下によって、*klotho* 蛋白の発現が誘導されたと考えられた。そのため、*klotho*^{-/-} では表現型の改善が認められなかった原因として、*klotho* 蛋白が血中のリン濃度が低下したにもかかわらず、*Kl/Kl* マウスのように *klotho* が誘導されなかったことが原因と考えられた。このことから、*klotho*^{-/-} マウスにおける表現型の発現には血

中のリン濃度以外の原因が考えられる。そこで、リン濃度に対する骨細胞の反応性を確かめるために、野生型マウスの頭蓋骨から骨細胞を単離し、様々なリン濃度の培養液で培養を行った。その結果、通常のリン濃度で培養を行った細胞と比較すると、骨細胞が産生する蛋白の発現量に有意差を認めた。この結果から骨細胞が血中のリン濃度を直接感知している可能性が示唆された。

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0件)

なし

〔学会発表〕(計0件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 宗輝 (SASAKI, Muneteru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・

助教

研究者番号：10706336

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

黒嶋 伸一郎 (KUROSHIMA, Shinichiro)

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)