

令和元年6月12日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09650

研究課題名(和文) Hypマウス骨組織でのFGF-23分泌亢進機構—X連鎖性疾患組織解析法での検討

研究課題名(英文) FGF23 overexpression in bone in Hyp mice

研究代表者

今西 康雄 (Imanishi, Yasuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50326253

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)：X連鎖低リン血症性くる病(XLH)は、X染色体上のPHEXの不活性化変異が原因であり、骨からのFGF-23分泌亢進により低リン血症を生じる。骨芽細胞由来のUMR-106細胞株において、siRNAを用いた遺伝子抑制実験を行った。dentin matrix protein-1 (DMP-1)の発現を抑制によりはFGF-23発現が抑制された。以上より、PHEX-Integrin complexからFGF-23に至るシグナル情報伝達経路にDMP-1が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X連鎖低リン血症性くる病(XLH)は、本国における遺伝性くる病のなかでも頻度が非常に高く、その病態を研究することは、新規治療法開発においても非常に重要である。

今回の研究では、XLHの遺伝子異常によりリン利尿因子であるFGF-23が分泌されるまでの機序の一部にdentin matrix protein-1 (DMP-1)が関与していることを明らかにした。DMP-1の抑制によりFGF-23が上昇し、低リン血症を来すため、このDMP-1を介する細胞内情報伝達機構のさらなる検討を進めることで、新規治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：X-linked hypophosphatemic rickets (XLH) is a disease caused by inactivating mutation of PHEX gene, however, precise pathway from PHEX to FGF23, a phosphaturic factor, was unknown. In this study, the role of dentin matrix protein-1 (DMP-1) was promoted for the signal pathway from PHEX to FGF23.

研究分野：内分泌学

キーワード：X連鎖低リン血症性くる病

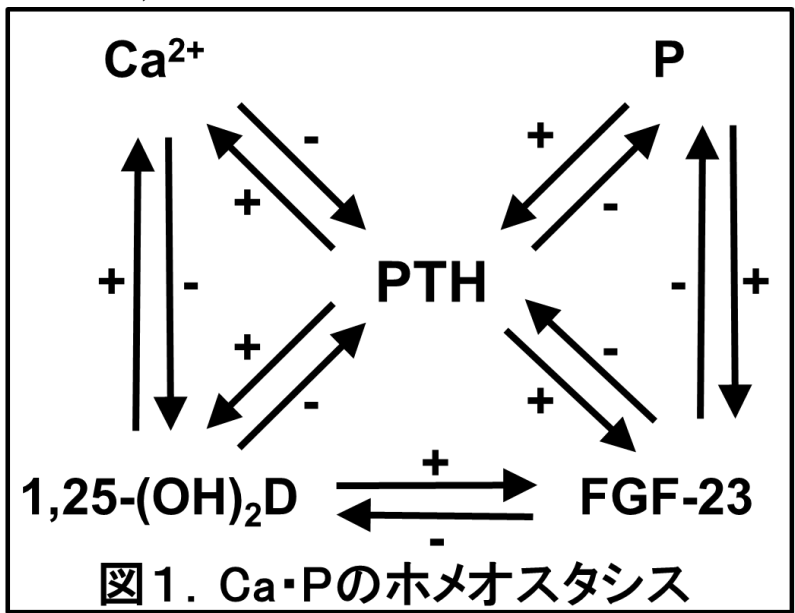
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞増殖因子 23 (FGF-23) に対する ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法の開発より、X 連鎖低リン血症性くる病 (XLH)、腫瘍性低リン血症性骨軟化症 (TIO) 患者の血清中の FGF-23 濃度が高値を示す事を、ハーバード大学との共同研究で報告した (Jonsson KB, Imanishi Y. N Engl J Med 2003)。

維持透析患者 (Imanishi Y. Kidney Int 2004)、原発性副甲状腺機能亢進症 (PHPT) 患者 (Kobayashi K, Imanishi Y. Eur J Endocrinol 2006)、そして副甲状腺組織特異的サイクリン D 1 過剰発現により副甲状腺腫瘍を形成する PHPT モデルマウス (Kawata T, Imanishi Y. J Am Soc Nephrol 2007) での検討を経て、骨組織における副甲状腺ホルモン (PTH) 依存性 FGF-23 分泌亢進機構を明らかにした (Imanishi Y. Hemodialysis 2013)。

経口リン負荷を行っても、血清 FGF-23 濃度が上昇することで血清リン濃度 (P) が抑制されるが、糖尿病ではその作用が減弱した (Yoda K, Imanishi Y. J Clin Endocrinol Metab 2012)。

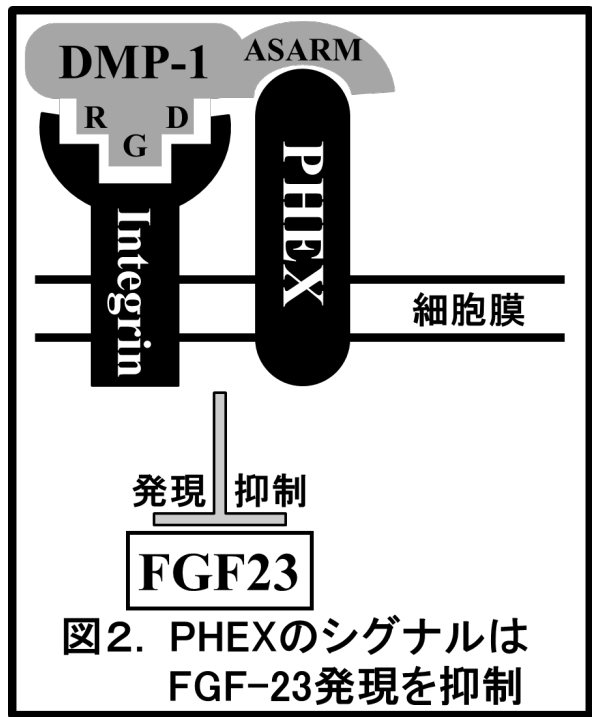


以上の知見や、既報を包括的に考察すれば、血清カルシウム (Ca)、P の恒常性は、PTH、活性型ビタミン D (1,25-(OH)₂D)、FGF-23 の 3 種類のホルモンにより維持されていると考えられている (図 1) (Imanishi Y, et al., 2013 Hemodialysis, Croatia: InTech)。これら PTH、1,25-(OH)₂D、FGF-23 は、Ca、P とフィードバックループを形成する。さらに、PTH、1,25-(OH)₂D、FGF-23 の相互間でもフィードバックループを形成している。以上より、これ

らのホルモンは相互に作用することで、血清 Ca・P 濃度の恒常性に重要な役割を担っていると考えられている。

次に副甲状腺を中心に考えると、PTH の分泌は、細胞外の Ca、1,25-(OH)₂D、FGF-23 等の因子により調節されており、それぞれカルシウム感知受容体 (calcium-sensing receptor; CaSR)、ビタミン D 受容体 (vitamin D receptor; VDR)、維芽細胞増殖因子受容体-Klotho 複合体が副甲状腺細胞内への情報伝達することで調節されていると考えられる。一方、血清 P 濃度も、直接副甲状腺細胞に作用することで PTH 分泌の調節に寄与すると考えられているが、副甲状腺における受容体については未だ同定されていない。

このように、生理的条件下では血清 Ca、P の恒常性が保たれているにもかかわらず、XLH においては骨組織において FGF-23 が過剰に発現し、そして分泌されている (図 2)。そしてこの骨組織から分泌される過剰な FGF-23 が腎に作用することでリン利尿を呈し、結果として低リン血症を来すことが知られている。持続的な低リン血症は骨組織においては石灰化を抑制し、小児においては本病態が発生した場合には、低リン血症性くる病を発症するに至る。X 染色体上に位置する PHEX 遺伝子の不活性化変異により XLH が発生することが知られているが、その詳細な機序については明らかではない。



2. 研究の目的

骨・骨芽細胞における PHEX に関連するシグナル情報伝達経路の探索による XLH 骨組織における FGF-23 過剰発現機序の解明

3. 研究の方法

X 連鎖低リン血症性くる病(XLH) は、X 染色体上の PHEX の不活性化変異が原因である。XLH 患者の血清 FGF-23 濃度上昇が報告されているが、その機序は未だ十分に解明されていない。

FGF-23 の上昇により低リン血症性くる病・骨軟化症を来す XLH の関連疾患として、腫瘍性低リン血症性骨軟化症(TIO)が報告されている。本疾患の原因腫瘍に対し、網羅的遺伝子発現プロファイリングを施行することにより PHEX のシグナル情報伝達経路に関連する遺伝子群を同定する。

次に網羅的遺伝子発現プロファイリングにより同定された、PHEX のシグナル情報伝達経路に関連する遺伝子群と PHEX 間のシグナル情報伝達経路を、UMR-106 細胞株において、候補遺伝子に対する siRNA による遺伝子抑制法などを用いて検討する。

4. 研究成果

TIO 腫瘍における遺伝子発現プロファイリングを、非 TIO 間葉系腫瘍を対照として、DNA チップを用いて行った (図 3)。

Type of gene	Gene name	Gene Symbol	Ratio of gene expression
Phosphate Metabolism	fibroblast growth factor 23	FGF-23	49.5
	secreted frizzled-related protein 4	sFRP4	18.1
	dentin matrix acidic phosphoprotein	DMP1	14.2
	matrix, extracellular phosphoglycoprotein with ASARM	MEPE	14.0
	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	11.4
	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets)	PHEX	11.1
Osteoblast phenotype	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I)	OPN	14.2
	fibroblast growth factor receptor 3	FGFR3	12.2
	integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)	BSP	11.6
	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	BGP	9.5
	matrix Gla protein	MGP	9.2

図3. TIO原因腫瘍における遺伝子プロファイリング

FGF-23 のみならず、osterix、BGP、DMP-1、BMP-2、PHEX といった骨・骨芽細胞系列において特異的な遺伝子の発現を見だし、免疫染色・ウエスタンブロッティング法でも確認した。

骨組織で発現される Dentin matrix protein 1 (DMP1)がノックアウトされると、FGF-23 発現が亢進し、低リン(P)血症性くる病を発症することが知られている。しかし、PTH の FGF-23 上昇機構における DMP1 の役割については報告がない。今回、原発性副甲状腺機能亢進症の骨組織における、PTH の FGF-23 発現上昇機構に対する DMP1 の関与について検討した。

マウスに対し PTH を浸透圧ポンプで持続投与したところ、頭蓋骨組織における遺伝子及びタンパク発現は PTH 非投与マウスと比較し、FGF-23 では上昇し、DMP1 では低下した。免疫組織化学染色法においても、PTH 投与マウスにおいて FGF-23 陽性細胞数は増加し、DMP1 陽性細胞数は減少した。骨組織培養系、骨芽細胞初代培養系、および UMR-106 細胞系において、PTH 添加により FGF-23 の遺伝子及びタンパク発現は上昇し、

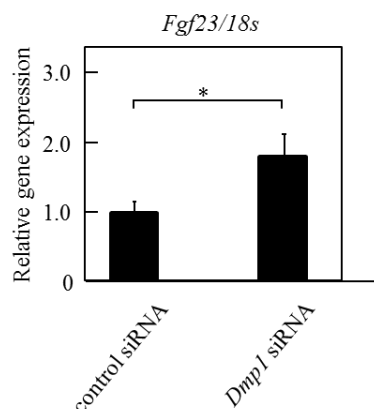


図4. UMR-106細胞において siRNAによるdmp1発現抑制は、fgf23発現を上昇させた

DMP1では低下した。UMR-106細胞系において、PTHは濃度依存的にfgf23発現を上昇させ、dmp1発現を低下させた。PKA作動薬であるforskolinは、濃度依存的にfgf23発現を上昇させ、dmp1発現を低下させた。PTHにより上昇したfgf23発現は、PKA阻害剤であるH89により一部低下し、PTHにより低下したdmp1発現はH89により一部回復した。さらにsiRNAによるdmp1発現抑制は、相加的にfgf23発現を上昇させた(図4)。

以上より、DMP1の発現抑制はfgf23発現を増加させることが明らかとなった。また、PTHもまたDMP1発現抑制を介したfgf23発現調節機構に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Portale AA, Carpenter TO, Brandi ML, Briot K, Cheong HI, Cohen-Solal M, Crowley R, Jan De Beur S, Eastell R, Imanishi Y, Imel EA, Ing S, Ito N, Javaid M, Kamenicky P, Keen R, Kubota T, Lachmann R, Perwad F, Pitukcheewanont P, Ralston SH, Takeuchi Y, Tanaka H, Weber TJ, Yoo HW, Zhang L, Theodore-Oklota C, Mealiffe M, San Martin J, Insogna K 2019 Continued Beneficial Effects of Burosumab in Adults with X-Linked Hypophosphatemia: Results from a 24-Week Treatment Continuation Period After a 24-Week Double-Blind Placebo-Controlled Period. *Calcif Tissue Int*, 査読有、*in press*
2. Miyaoka D, Imanishi Y, Ohara M, Hayashi N, Nagata Y, Yamada S, Mori K, Emoto M, Inaba M 2019 Impaired residual renal function predicts denosumab-induced serum calcium decrement as well as increment of bone mineral density in non-severe renal insufficiency. *Osteoporos Int*, 査読有、30(1):241-249.
3. Insogna KL, Briot K, Imel EA, Kamenicky P, Ruppe MD, Portale AA, Weber T, Pitukcheewanont P, Cheong HI, Jan de Beur S, Imanishi Y, Ito N, Lachmann RH, Tanaka H, Perwad F, Zhang L, Chen CY, Theodore-Oklota C, Mealiffe M, San Martin J, Carpenter TO, Investigators A 2018 A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial Evaluating the Efficacy of Burosumab, an Anti-FGF23 Antibody, in Adults With X-Linked Hypophosphatemia: Week 24 Primary Analysis. *J Bone Miner Res*, 査読有、33(8):1383-1393.
4. Hayashi N, Imanishi Y, Ohara M, Miyaoka D, Nagata Y, Emoto M, Inaba M 2018 Increased Bone Mineral Density and Improved Metabolic Bone Markers in Patients with Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia Treated with the Calcimimetic, Cinacalcet. *J Orthop Ther*, 査読有、2018(05):1.
5. Miyaoka D, Imanishi Y, Ohara M, Hayashi N, Nagata Y, Yamada S, Mori K, Emoto M, Inaba M 2017 Effects of Teriparatide and Sequential Minodronate on Lumbar Spine Bone Mineral Density and Microarchitecture in Osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 査読有、101(4):396-403.

[学会発表](計 4 件)

1. Yuki Nagata, Yasuo Imanishi, Tomomi Maeda, Daichi Miyaoka, Noriyuki Hayashi, Masanori Emoto, Andrew Arnold, Masaaki Inaba: Decrement of Dentin Matrix Protein 1 caused by Excessive Parathyroid hormone is one of the pathogenesis in elevating Fibroblast Growth Factor 23 expression in Bone Tissue on Primary Hyperparathyroidism Model, *ASBMR 2018 Annual Meeting*, OCT 1, 2018, Palais des Congrès de Montréal, Montreal, Quebec, Canada
2. Yasuo Imanishi: Hypophosphatemic rickets and osteomalacia -Pathogenesis, diagnosis, and treatments, *11th Edition of International Conference on Endocrinology and Diabetology*, KeyNote presentation, Aug 9, 2018, Madrid, Spain
3. 今西康雄: 低リン血症性くる病・骨軟化症 - その過去・現在・未来 -, *イブニングセミナー* 3, 第38回日本骨形態計測学会, 2018年6月22日, 大阪国際交流センター, 大阪府
4. 林幸祐, 今西康雄, 小林郁江, 宮岡大知, 林礼行, 永田友貴, 森克仁, 絵本正憲, 稲葉雅章: 骨軟化症合併間質性腎炎において、ステロイド治療は尿細管におけるナトリウム依存性リントランスポーター-IIc およびメガリンの発現低下を回復し、低リン血症性骨軟化症を改善する, 第91回日本内分泌学会学術総会, O2-7-19, 2018年4月27日, フェニックス・シーガイア・リゾート, 宮崎県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/interm2/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮岡 大知

ローマ字氏名：(MIYAOKA, daichi)

研究協力者氏名：林礼行

ローマ字氏名：(HAYASHI, noriyuki)

研究協力者氏名：前田朋美

ローマ字氏名：(MAEDA, tomomi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。