

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09651

研究課題名(和文) FGF23-Klothoシグナルの電解質代謝と免疫における生物学的役割の比較検討

研究課題名(英文) Biological role of FGF23-Klotho signal in Ca-P metabolism and immunology

研究代表者

美馬 亨 (Mima, Toru)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30373517

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)：FGF23はカルシウム代謝に重要な役割を果たすことが知られている。本研究によって、それに加えて腎尿細管細胞ではエリスロポエチンとの相互作用について世界で初めて明らかにした。さらに、FGF23のリガンドであるKlothoがリンパ球に発現していること報告してきたが、感染症が予後に重要な問題となっている末期腎不全、特に透析患者の末梢血B細胞が減少している原因としてその細胞上のKlotho発現低下が関与している可能性を見出した。その発現低下は透析患者の末梢血中で活性化しているADAM17であることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGF23とエリスロポエチンは腎不全病態において重要な役割を果たしている。その両者が腎尿細管細胞で相互作用していることは、新たな治療法の開発や創薬のシーズとなる。さらに、B細胞に発現するKlothoの低下が透析患者の易感染性に結びつく可能性は、透析患者の死因の多くを占める感染症について新たな治療法や創薬のシーズとなり医学的意義は大きい。これらを基に、透析患者の易感染性を完全できれば感染症に費やす医療費の削減も期待でき社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It has been that FGF23 has played an important role in Ca-P metabolism. Newly, We found that FGF23 were crosstalk with erythropoietin in renal epithelial cells. Moreover, number of Klotho positive B cells was decrease in patients with hemodialysis. This may be caused for immunocompromised host of the patients with hemodialysis. We found that One of the causes for decrease of Klotho positive B cells was digested by ADAM17, which was activated in the patients with hemodialysis.

研究分野：医学

キーワード：FGF23 Klotho エリスロポエチン B細胞 ADAM17

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

1. 研究開始当初の背景

1) Fibroblast growth factor (FGF) 23 は FGF ファミリーに属するが、他の FGF ファミリーメンバーが有する胎生期における形態形成への関与はなく、FGF23 もしくはそのリガンドである Klotho を欠失したマウスでは老化が進むことからアンチエイジングに関わることが報告されてきた。

2) FGF23 は主に骨細胞で産生され Klotho を発現している腎尿細管細胞に働きカルシウム (Ca) の再吸収とリン (P) の排泄を促し Ca-P 代謝に働くことが報告されてきた。一方、我々は、骨組織以外に脾臓の形質細胞様樹状細胞に FGF23 の産生とそのリガンドである Klotho が成熟した B 細胞に発現し FGF-Klotho シグナルが免疫系に関与していることを報告してきた。

3) 末期腎不全である透析患者の死因の多くを感染症が占め、易感染性であることが知られているが、その病態については明らかにされていない。末期腎不全患者では血清中の FGF 濃度が高いを示していることと FGF23 - Klotho シグナルが B 細胞に関与していることから、末期腎不全患者の B 細胞において FGF23-Klotho シグナル系に異常がある可能性が示唆され、このことを解析することから免疫系における FGF23-Klotho シグナルの生物学的役割を明らかにできる可能性がある。

以上、FGF23-Klotho シグナルはこれまで報告されてきたアンチエイジングや Ca-P 代謝以外にも生物学的役割を果たしている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FGF23-Klotho シグナルの Ca-P 代謝以外の生物学的役割を明らかにすることである。具体的には以下のことを明らかにする。

1) マウス尿細管細胞株 mIMCD3 を FGF23 で刺激し発現変動が誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイと生体情報解析を用いて腎尿細管細胞におけるリン利尿以外の生物学的役割を明らかにする。

2) マウス脾臓細胞の解析から示唆される FGF23-Klotho シグナルの B 細胞への関与についてヒト B 細胞を用いてその生物学的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) マウス腎尿細管細胞株 mIMCD3 を用いた研究

I) マウス腎尿細管細胞株 mIMCD3 を FGF23 10ng/mL で 4 時間刺激した後、RNA を抽出する。

II) 無刺激の細胞から抽出した RNA をコントロールとして用いる。

III) FGF23 刺激した細胞から抽出した RNA とコントロールの RNA をそれぞれ別の色素で標識する。

IV) 標識した RNA をアジレント社製 DNA マイクロアレイ (Agilent Whole Mouse Genome oligo microarrays 8x60K; ID 028005) に競合ハイブリダイズし遺伝子の発現を測定する。

V) 測定値から FGF23 刺激で遺伝子発現が増強する遺伝子と低下する遺伝子を特定する。

VI) 発現量が増強する遺伝子と低下する遺伝子をそれぞれ生体情報解析法である pPOSSUM version 3.0 (<http://opossum.crserg.ca/opossum3>) を用いてその遺伝子発現を調節する転写因子の候補を見出す。

VII) 見出された転写因子の候補から腎尿細管細胞とかわりの深い転写因子を特定し、その転写因子を細胞内シグナルとして用いる因子を特定する。

VIII) 特定した因子と FGF23 との腎尿細管細胞における相互作用を解析する。

2) ヒト B 細胞における FGF23-Klotho シグナル系の生物学的意義の解明

ヒト B 細胞において、FGF23-Klotho シグナル系の異常が考えられる末期腎不全である透析患者の B 細胞で Klotho 発現を解析することを通して、このシグナルの B 細胞、免疫系における生物学的役割を明らかにする。

I) 和歌山県立医科大学倫理委員会の承認後、透析患者と健常者より末梢血を採集する。

II) 採取した検体について、末梢血リンパ球、B 細胞、Klotho 陽性 B 細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

III) B 細胞の klotho 発現に異常がみられたら、Klotho 発現を確認しているマウス B 細胞株 A20 を透析患者もしくは健常者の血清を加えて 24 時間培養する。

IV) 培養後、フローサイトメトリーを用いて A20 の Klotho 発現に変化がみられないかフローサイトメトリーで解析する。

V) 患者血清中の Klotho 発現に変動を誘導した物質を特定する。

4. 研究成果

1) マウス尿細管細胞株 mIMCD3 を用いた研究

mIMCD3 細胞株を FGF23 刺激で発現変動がみられた分子は 26 であった。そのうち 8 遺伝子に発現が増強し、18 遺伝子に発現低下が見られた。発現増強した遺伝子のうち蛋白をコードする遺伝子は *Reg16*、*Krt17*、*Akt1st1* の 3 つであった。発現が低下した遺伝子については、*Brip3*、*AK4*、*Mt1*、*Mt2*、*Pdk1*、*Slc16a3*、*Cadps2*、*Tmprss6*、*Selenbp1*、*Ankrd37*、*Cadps2*、*Mgarp1*、蛋白が同定されていない理研の遺伝子 2010300C02Rik、953009N15Rik、1700026L06Rik の 15 であ

った。次に、転写因子が明らかにされている遺伝子、増強した 3 遺伝子と低下した 12 遺伝子を用いて生体情報解析をおこなった。その結果、増強した遺伝子の転写因子の候補として、Zfp423、RORA_1、PPARG:PXRA に加えて Stat3、ELK1 など 16 の転写因子が見出された。このうち、これまで研究から、腎尿細管細胞に関わる可能性があるのは PPARG:PXRA、ELK1、Stat3 であった。一方、低下した遺伝子を用いた解析結果では、HOXA5、Pdx1、ZEB1 などに加えて Egr1、STAT1 が見出された。このうち、ELK1 と Egr1 は FGF23 の細胞内シグナルの下流に位置することから、PPARG:PXRA、STAT3、STAT1 が候補と考えた。このうち STAT1 と STAT3 はエリスロポエチンの細胞内シグナル系であるので、エリスロポエチンとの相互作用について、次に解析することとした。mMICD3 をエリスロポエチン 1U/mL 単独、FGF23 10ng/mL 単独と両者を添加して培養した。その結果、FGF23 で増強した遺伝子では Rgs16 でエリスロポエチンでも発現が増強したが、明らかな相加効果は認めなかった。低下した遺伝子については、*Brip3*、*Mt1*、*Mt2*、*Pdk1*、*Slc16a3*、*Cadps2*、*Selenbp1*、*Ankrd37*、*Cadps2*、*Mgarp1* の 10 遺伝子の発現がエリスロポエチンで誘導された。このうち、*Brip3*、*Mt1*、*Mt2*、*Pdk1*、*Slc16a3* は参加ストレスに関係するものであった。これらの遺伝子について、FGF23 は発現抑制が確認された。さらに、エリスロポエチンによる発現増強も抑制された。このことから、FGF23 はエリスロポエチンに遺伝子発現誘導を調節している可能性が示唆された。この発現抑制に機序について、エリスロポエチンの細胞内シグナル系である STAT1 のリン酸化について解析した。その結果、FGF23 存在かでも STAT1 のリン酸化の減弱は認めなかった。次に、FGF23 で誘導される分子の関与を解析するため、FGF23 が細胞内シグナル系である ERK を阻害した。その結果、ERK 阻害薬により FGF23 による発現抑制が回復した。このことから、FGF23 で発現する分子もしくは non-coding RNA によりエリスロポエチンによる発現誘導を抑制していることが示唆された。さらに、FGF23 が発現抑制した 5 遺伝子については酸化ストレスに関係するものであることから、その遺伝子発現を抑制することは細胞に保護的働いている可能性が考えられる。このように、腎尿細管細胞で FGF23 とエリスロポエチンは相互作用していると考えられる。

2) ヒト B 細胞における FGF23-Klotho シグナル系についての研究

透析患者の末梢血を解析したところ、健常人に比べ透析患者でリンパ球数の低下を認めた。さらに、フローサイトメトリーの解析により B 細胞数の低下と Klotho 陽性 B 細胞数の低下を認め、透析患者の易感染性の原因の一つとしてリンパ球数、B 細胞数、Klotho 陽性細胞数の低下が考えられた。次に、血清中に B 細胞の Klotho 発現を低下させる物質がないか検討するために Klotho 発現が確認されているマウス B 細胞を患者もしくは健常人の血清を加えて培養した。その結果、透析患者の 16 人中 8 人の血清を加えると、A20 の Klotho 発現量が低下した。低下の原因としては発現抑制と切断によることが考えられるので、血清を加えて培養した上清を抗 Klotho 抗体を用いてウェスタンブロットしたところ、低下の見られた患者の血清を加えた培養上清で切断された Klotho を認めた。このことから、B 細胞の Klotho 低下は主に切断によると考えられた。Klotho 切断酵素としては蛋白分解酵素である BACE、メタロプロテアーゼである ADAM10 と ADAM17 が報告されている。そこで、血清に蛋白分解酵素阻害薬を加えて培養したが、低下した発現は回復しなかった。一方、EDTA を加えて培養したところ、低下が回復し Klotho 発現低下の原因としてメタロプロテアーゼである ADAM10 もしくは ADAM17 の可能性が示唆された。ADAM17 特異的に阻害する...を加えて培養したところ、Klotho 発現低下が回復し透析患者で Klotho 陽性 B 細胞数の低下は ADAM17 によることかが示唆された。次に、患者の末梢血 ADAM17 を ELISA を用いて測定したところ、健常人と優位な増加は認めなかった。ADAM17 には不活性型と活性型があり、末期腎不全では ADAM17 が活性化していることが考えられた。

本研究で、FGF23-Klotho シグナルの新たな生物学的役割を明らかにすることができた。

さらに、腎不全では重要な役割を果たしているエリスロポエチンと FGF23 が相互作用していることは、今後の腎不全病態を考える上で重要な知見であり、新たな創薬、治療法のシーズとなる。また、B 細胞の FGF23-Klotho シグナルの異常を是正することが新たな感染症の創薬、治療法開発のシーズとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yashiro M, Ohya M, Mima T*, Ueda Y, Nakashima Y, Kawakami K, Ishizawa Y, Yamamoto S, Kobayashi S, Yano T, Tanaka Y, Okuda K, Sonou T, Shoshihara T, Iwashita Y, Iwashita Y, Tatsuta K, Matoba R, Negi S, Shigematsu T. FGF23 modulates the effects of erythropoietin on gene expression in renal epithelial cells. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 11:125-136, 2018.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. FGF23 のリン Ca 代謝以外の腎尿細管細胞における Erythropoietin (EPO) 作用系への関与の検討 屋代 充、美馬 亨、中島悠里、園生智広、所司原友弘、大矢昌樹、根木茂雄、重松 隆 第 60 回日本腎臓学会学術集会、2017 年 5 月 28 日、仙台国際センター
2. 腎と骨外性の脾臓発現性 FGF23-Klotho 軸の生理的および機能的意義の解析 中島悠里、美馬 亨、屋代 充、大矢昌樹、根木茂雄、重松 隆 第 60 回日本腎臓学会学術集会、2017 年 5

月 27 日、仙台国際センター

3. FGF23-Klotho axis involving B cell immune response and possibly causing for ESRD patients as immunocompromised hosts. Toru Mima, Yuri Nakashima, Masaki Ohya, Mitsuru Yashiro, Kazuki Kawakami, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu. ISN Frontiers Meeting 2018, Tokyo.

4. Crosstalk between FGF23 and erythropoietin signaling in renal tubule epithelial cells. Mitsuru Yashiro, Toru Mima, Masaki Ohya, Yuri Nakashima, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu. ISN Frontiers Meeting 2018, Tokyo.

〔図書〕(計 0)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：重松 隆

ローマ字氏名：Takashi Shigematsu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：腎臓内科学

職名：教授

研究者番号(8桁): 30187348

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：屋代 充

ローマ字氏名：Mitsuru Yashiro

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。