

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09738

研究課題名（和文）骨発現Klothoによるミネラル代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the bone Klotho-mediated regulation of mineral metabolism

研究代表者

深川 雅史（FUKAGAWA, Masafumi）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00211516

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）：骨細胞においてFGF受容体がFGF23分泌を調節する機序は明らかではない。われわれはKlothoがFGF受容体の共受容体としてFGF23分泌調節に関与するという仮説を立て、骨組織特異的Klotho過剰発現マウスを作製した。本遺伝子改変マウスはFGF23産生が著しく亢進することが示され、その機序としてFGF23産生を刺激するpositive feedback loopが形成されたためと考えられた。しかし、2～3日で大部分が死亡するため、骨代謝への長期的な影響は十分には解析できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討結果より、Klothoが骨細胞におけるFGF23分泌制御に深く関与していることが明らかとなった。FGF23はリン代謝、ビタミンD代謝において中心的な役割を担う重要な因子である。本研究成果はFGF23の分泌制御の理解を大きく前進させるものであり、腎臓病に代表されるリン代謝異常の新たな治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms through which the FGF receptor regulates FGF23 synthesis in osteocytes is unknown. To test the hypothesis that Klotho is involved in this process as a coreceptor for the FGF receptor, we generated mice with bone-specific Klotho overexpression. These mice showed markedly increased FGF23 synthesis, presumably through a positive autocrine feedback loop. However, almost all mice died at day 2 or 3, making it difficult to determine the long-term impact on bone metabolism.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：骨細胞 FGF23 Klotho

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体のカルシウム、リン代謝の恒常性維持は、尿生成と活性型ビタミン D 産生のある腎臓、副甲状腺ホルモン (PTH) を産生する副甲状腺、さらにカルシウム、リンの貯蔵庫である骨を中心とする精緻な制御システムによって成り立っている。近年、このシステムに關与する新たな因子として発見されたのが線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) である。

FGF23 は骨細胞により産生されるホルモンで、腎臓を主な標的臓器とし、尿中へのリン排泄および活性型ビタミン D 産生を抑制する。FGF23 がその生理作用を発揮するためには、標的細胞に FGF 受容体とともに膜蛋白 Klotho が共受容体として必要となる。FGF23 は副甲状腺にも作用し PTH 分泌を抑制するが、腎不全患者では異常高値を示す FGF23 によっても PTH 分泌は抑制されない。われわれは腎不全患者では FGF 受容体とともに Klotho の発現が低下していることを発見し、これによる FGF23 抵抗性のため、異常高値を示す FGF23 によっても PTH 分泌が抑制されないという病態をこれまで明らかとしてきた。

しかしながら、骨細胞における FGF23 分泌調節機構の詳細は未だ明らかではない。これまでの検討でリン、PTH、活性型ビタミン D が FGF23 分泌を促すことが示されているが、これに加え、骨細胞に発現する FGF 受容体も FGF23 産生調節に關与していることが相次いで報告されている。しかし、この機構における FGF 受容体のリガンドは明らかでない。このような状況の中、近年、骨細胞に Klotho が発現していることが明らかとなった。また遺伝子転座により Klotho 発現が顕著に増加した患者において、FGF23 が過剰に産生され、低リン血症性くる病をきたしたことが報告された。

以上の知見より、われわれは FGF23 が FGF 受容体と Klotho の複合体を介し骨細胞に作用し、FGF23 分泌を刺激するという positive feedback 仮説を着想するに至った。そこで本プロジェクトでは FGF23 分泌調節における Klotho の役割を解明することを目的に、骨組織特異的に Klotho を過剰発現するマウスの作製を目指した。

2. 研究の目的

骨組織特異的に Klotho を過剰発現するマウスを作製し、FGF23 分泌調節における Klotho の役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) Klotho-loxP マウスの作成

骨組織特異的に Klotho 過剰発現マウスを、Cre-loxP 部位特異的組換え法を用いて作製するため、PITd 法を用いて Klotho-loxP マウスを作製した。本マウスは、ROSA26 領域に CAG-loxP-STOP-loxP-Klotho をノックインした遺伝子改変マウスである。本マウスの作製には、研究分担者として参画する大塚正人氏が作製した TOKMO-3 マウスを使用した。TOKMO-3 マウスは、ROSA26 遺伝子座の第一イントロンに変異 loxP attP 配列や変異 FRT 配列が挿入されたノックインマウスで、目的遺伝子とともに attB や変異 FRT 配列等が付加されたドナーベクターと PhiC31o mRNA, FLPo mRNA を同時にマウス受精卵に注入することにより、顕微注入法を介して目的遺伝子のノックインマウスを作製することが可能となる (Ohtsuka et al. BMC Genomics 2015)。本手法を用いて、Klotho-loxP マウスを作製した。

すべての実験動物は、当大学の定める拡散防止措置 (P1A) を遵守し、倫理面においては年度毎に更新が必要な「東海大学動物実験委員会」の承認を得た上で実施した。遺伝子組み換えを伴う実験系については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、当大学の定める「東海大学遺伝子組換え実験安全委員会」の承認を得た上で実施した。

(2) 骨特異的 Cre 発現マウスの入手

骨特異的に遺伝子組換えを起こすための Cre マウスとして、理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた Col1a1-Cre マウス (B6.FVB-Tg(Col1a1-cre)1Kry マウス) を使用した。本マウスは、骨芽細胞および骨細胞特異的に Cre を発現することが示されており (Dacquin R et al. Dev Dyn 2002)、骨組織特異的な遺伝子改変を目指す本プロジェクトの目的に合致したマウスである。

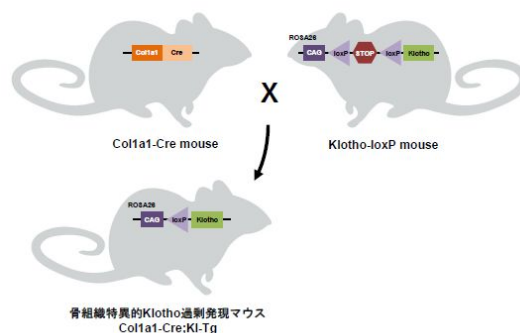
(3) 骨特異的 Klotho 過剰発現マウスの作製

上記の Klotho-loxP マウス、Col1a1-Cre マウスを交配させ、骨特異的 Klotho 過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg) を作製した (図 1)。

(4) 骨特異的 Klotho 過剰発現の確認

骨特異的 Klotho 過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg)、および対照マウス (KI-Tg) から大腿骨、脛骨、頭蓋骨を採取し、10%ホルマリンで固定後、EDTA で脱灰した。このサンプルを用い

図1. 骨組織特異的Klotho過剰発現マウスの作製



て、骨組織におけるKlotho過剰発現を免疫染色により評価した。抗体は KM2076 抗体(TransGenic 社) を用いた。一部の骨組織は、骨髄と結合組織を除去した後、凍結粉碎の上、total RNA を回収し、リアルタイム PCR で Klotho 発現を評価した。同時に腎臓、副甲状腺を含むさまざまな臓器においても、免疫染色、リアルタイム PCR で Klotho 発現を評価し、Klotho 過剰発現が骨組織特異的であることを確認した。

(5) 骨特異的 Klotho 過剰発現マウスの解析

骨特異的 Klotho 過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg), および対照マウス (KI-Tg) から血液を採取し、血清カルシウム、リン、1,25(OH)₂D、PTH、FGF23 を測定した。さらに骨組織より回収した total RNA を用いて、リアルタイム PCR で FGF23 mRNA 増幅を確認した。次いで骨以外の臓器 (心臓、大動脈、腎臓、肝臓、大脳、筋肉、小腸) における FGF23 発現も real-time RT-PCR で評価した。さらに FGF23 の腎臓への影響を検討するため、腎臓における Napi-2a 発現、Cyp27b1 発現をリアルタイム PCR で評価した。

4. 研究成果

骨特異的 Klotho 過剰発現マウスを Cre-loxP 部位特異的組換え法を用いて作成するため、われわれはまず Klotho-loxP マウスの作製を試みた。PITd 法を用いて、目的通りに Klotho-loxP マウスを作製し得た。さらにこの Klotho-loxP マウスを Col1a1-Cre マウスと交配させ、骨組織特異的 Klotho 過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg) を得ることに成功した (図 2)。

図2. 生後2日における外観



本マウスは対照マウス (KI-Tg) と比較し、骨組織の Klotho 発現が著しく亢進していることを免疫染色、リアルタイム PCR により確認した (図 3)。さらにさまざまな臓器における Klotho 発現を網羅的に解析し、Klotho 過剰発現が骨組織に特異的であることを確認した (図 4)。

図3. 骨組織におけるKlotho発現

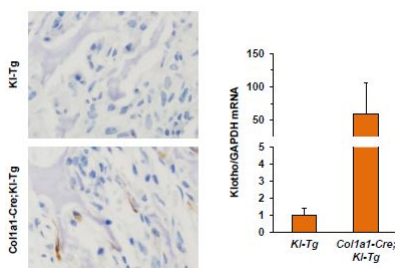
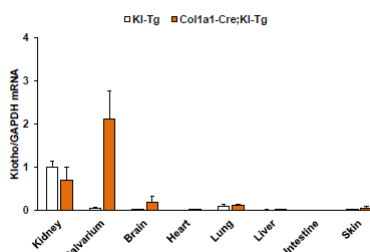
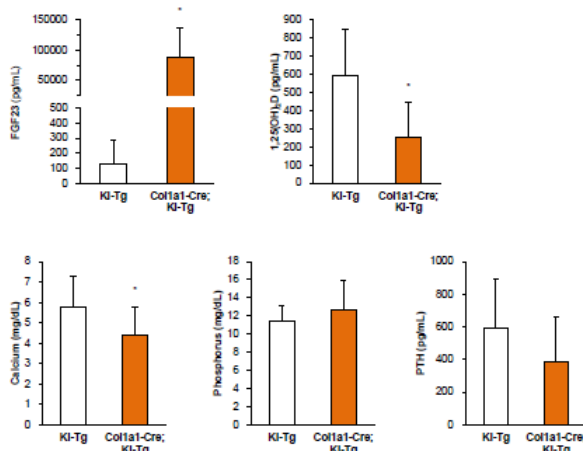


図4. さまざまな組織におけるKlotho発現



次いで骨組織特異的 Klotho 過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg) と対照マウス (KI-Tg) の血清生化学データを比較した。Col1a1-Cre;KI-Tg は仮説通り、FGF23 値が著しく上昇していることが観察された (図 5)。これに付随し、1,25(OH)₂D 低下、低カルシウム血症を認めた。

図5. 生化学データ



骨組織の FGF23 発現を確認したところ、こちらも著しい上昇を認めた（図 6）。さらに腎臓の遺伝子発現を解析したところ、Napi2a 発現低下も観察された（図 7）。

図6. 骨組織における遺伝子発現

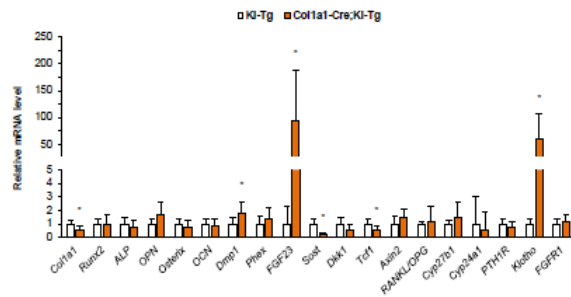
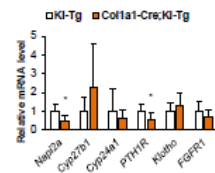


図7. 腎臓における遺伝子発現



以上の所見より、骨特異的な Klotho 過剰発現により、FGF23 産生が著しく亢進することが明らかとなった。その機序として、FGF23 産生を刺激する positive feedback loop が形成されたためと考えられた。

しかしながら、大部分が生後 3 日以内に死亡したため、骨・ミネラル代謝に及ぼす長期的な影響を解析するおとは不可能であった。そこで今後、タモキシフェン誘導型の Col1a1-CreER-DsRed マウスと交配し、より成長した段階で骨組織特異的 Klotho 過剰発現を誘導する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 駒場 大峰 (KOMABA Hirotaka) (60437481) | | |
| 研究協力者 | 大塚 正人 (OHTSUKA Masato) (90372945) | | |