

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10092

研究課題名(和文)mTORC1を標的とするX連鎖性低リン血症性くる病に対する新たな治療戦略の構築

研究課題名(英文)mTORC1 as a therapeutic target for XLH

研究代表者

川井 正信 (Masanobu, Kawai)

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・主任研究員

研究者番号：50598117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Fibroblast growth factor 23 (FGF23)はリン代謝の中心的役割を果たしているが、骨細胞における制御機構は不明な点が多い。また、近年インスリンシグナルとFGF23制御機構の関連性が報告されてきている。そこで、本研究では、インスリンシグナルの下流で作用するPTENに着目し検討を行った。PTENを骨細胞特異的に欠損するマウスでは、骨細胞および血清中のFgf23の発現および濃度が低下し、その結果に一致して、高リン血症を認めた。In vitroの実験系を用いた検討から、mTORC1の阻害薬であるラパマイシンはインスリンによるFgf23の発現抑制を部分的にレスキューした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、リン代謝制御機構が明らかとなっており、インスリンシグナルによるFGF23制御機構が注目されている。臨床的には、インスリン抵抗性をきたすような肥満患者では、FGF23濃度が増加しており、肥満の病態形成におけるFGF23の役割が明らかになってきているが、その分子機序は不明であった。本研究は、インスリンによるFGF23制御機構の分子機序を明らかにしたものであり、骨細胞におけるインスリンシグナルが肥満症の病態形成に与える影響を理解する上で、重要な意味があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 23 (FGF23) has been centric to the regulation of phosphate (Pi) metabolism; however, the regulatory network of FGF23 in osteocytes has not yet been defined in detail. In addition, accumulating evidence demonstrates the role for insulin signaling in the regulation of Fgf23 in bone. We herein investigated the role of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) in this regulation. We created mice lacking Pten expression mainly in osteocytes by crossing Pten-flox mice with Dmp1-Cre mice. The lack of Pten in the osteocytes of these mice was associated with decreased serum Fgf23 levels, which, in turn, resulted in reductions of urinary Pi excretion and elevations of serum Pi levels. Mechanistically, the insulin-induced suppression of Fgf23 expression was reversed in cells treated with the mTORC1 inhibitor, rapamycin.

研究分野：小児内分泌、骨代謝

キーワード：リン インスリン PTEN mTORC1 FGF23

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の成長は種々の因子により規定されるが、中でも栄養素は重要な因子の1つである。無機リン酸(Inorganic phosphate: Pi)は、重要な食事性栄養素で、骨の成長過程で重要な役割を果たしており、申請者はこれまで Pi と成長・骨代謝の関連性に関して研究を行ってきた(Kawai M et al. J Biol Chem, 2013、Kawai M et al. J Biol Chem 2014)。近年 Pi 自身がシグナル伝達物質として作用し、細胞内へシグナルを伝えることが判明している。そこで申請者は、Pi により惹起されるシグナル伝達経路の解析を行い、細胞外 Pi 刺激が PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)の形質膜における局在を減少させ、その結果下流の AKT/mTORC1(mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1)シグナルを活性化することを見出し報告した(Kawai M et al. J Am Soc Nephrol,2016)。Pi の制御の中心は骨細胞が産生・分泌する FGF23 であり、体内のリンの過不足は骨細胞の FGF23 の発現を規定する。すなわち、高リン血症では FGF23 は増加し、低リン血症では低下する。しかし、体内のリンの過不足をどのように骨細胞が感知しているかは不明である。

2. 研究の目的

骨細胞における Pi/PTEN シグナルの FGF23 発現制御機構における役割を解析すること。

3. 研究の方法

1)骨細胞特異的 PTEN 欠損マウスの解析

Dmp1-Cre マウスと PTEN-flox マウスを交配させ、骨細胞特異的 PTEN ノックアウトマウスを作出し(PTEN-CKO マウス)、リン代謝の表現型の解析を行う。

1-a)骨細胞における FGF23 発現の解析:免疫染色による評価

1-b)血清を用いた評価。血清の Pi、FGF23 の測定。FGF23 は ELISA 法で測定。

1-c)尿を用いた評価。メタボリックケージを用いて、24 時間尿を採尿。リン排泄率の評価。

1-d)腎臓の組織を用いた解析。尿細管におけるリン再吸収にかかわる Slc34a1、Slc34a3 の発現を定量 PCR で評価。腎尿細管の刷子縁の Npt2a の発現をウェスタンブロット法で評価。

2)PTEN による FGF23 制御機構の分子機序の解明

骨芽細胞系の細胞株である UMR106 細胞を用いた検討。

2-a)PTEN のノックダウンによる AKT/mTORC1、AKT/FoxO1 シグナルの評価:ウェスタンブロット法を用いて、AKT、pAKT、S6K、pS6K、FoxO1、pFoxO1 の発現を評価

2-b)PTEN のノックダウンによる FGF23 発現制御機構の解明:ラパマイシンを用いた検討
定量 PCR 法で FGF23 の発現を解析。インスリン刺激による FGF23 の発現抑制が、ラパマイシンによって阻害されるかウェスタンブロット法を用いて評価。

4. 研究成果

1) 骨細胞特異的 PTEN 欠損マウスの作出

Pten^{flox/flox} マウスと *Dmp1-Cre* を交配し、骨細胞特異的 PTEN 欠損マウス (*Pten*_{ocy}^{-/-} mice) を作出した。マウス大腿骨を用いた免疫組織学的検討から、*Pten*_{ocy}^{-/-} mice の骨細胞では PTEN が欠損していることを確認した(図1)。リン代謝にかかわる骨以外の組織(腎臓、小腸)では、PTEN の発現に変化はなかった。*Pten*_{ocy}^{-/-} マウスとコントロールマウス (*Pten*^{flox/flox} マウス)の間に、体重、尾長の差を認めなかった。

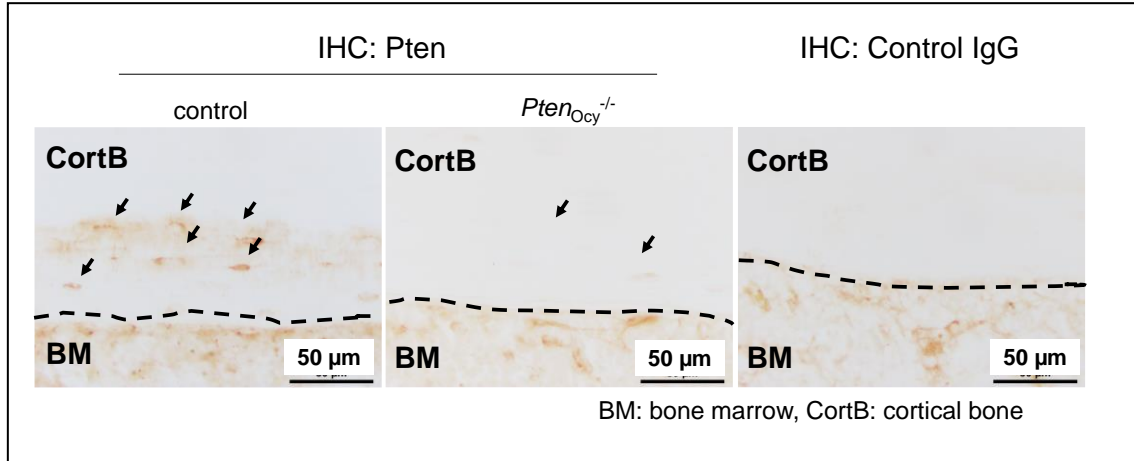


図1: 16週令雄マウス大腿骨における PTEN の免疫染色。*Pten*_{ocy}^{-/-} マウスでは、PTEN の染色性が減弱している。

2) 骨細胞における FGF23 発現の検討

骨細胞における PTEN 欠損が FGF23 発現に与える影響を検討した。*Pten*_{ocy}^{-/-} マウスとコントロールマウスの大腿骨を採取し、抗 FGF23 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、*Pten*_{ocy}^{-/-} マウスでは FGF23 の染色性が減弱していた(図2a)。この結果に一致して、血清中 FGF23 濃度も *Pten*_{ocy}^{-/-} マウスで低下していた(図2b)。次に血清リン濃度を測定したところ、FGF23 濃度の低下に一致して、血清リン濃度は増加していた(図 2c)。血清カルシウム濃度に変化を認めなかった(図2d)。

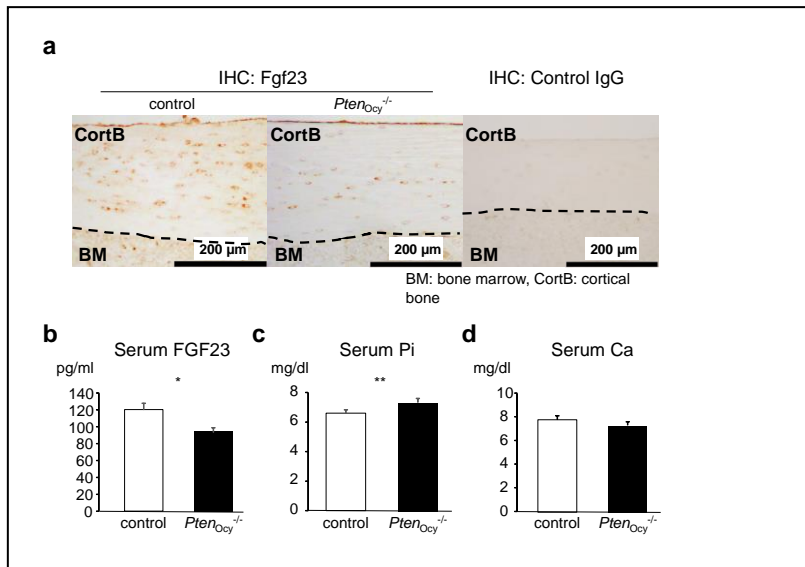


図2:a, 6週令の雄マウスをもちいた FGF23 の免疫染色。*Pten*_{ocy}^{-/-} マウスでは、FGF23 の染色性が減弱している。b.-d. 16週令の雄マウス血清を用いた検討。血清 FGF23 濃度の低下およびリン濃度の上昇を *Pten*_{ocy}^{-/-} マウスで認め

た。*: 有意差あり。

3) 尿を用いたリン代謝の評価

FGF23 の作用点は腎におけるリン再吸収の制御であるため、24 時間尿を用いてリンの再吸収率を評価したところ、*Pten_{Ocy}^{-/-}* マウスではリンの再吸収が増加していた(図3)。

この結果に一致して、リンの再吸収をつかさどる Npt2a の腎尿細管刷子縁でのタンパク発現が増加していた(図4)。RNA レベルでは変化を認めなかった。

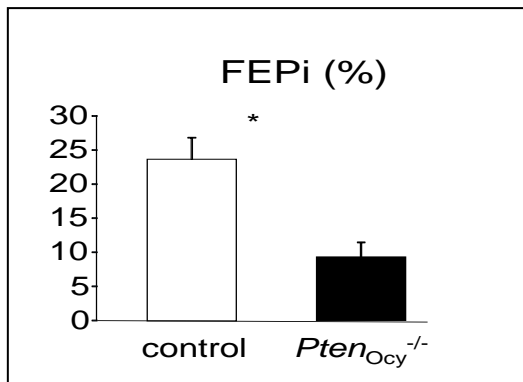


図3

16 週雄マウスを用いて、24 時間蓄尿を行い、リン排泄率を計算した。*Pten_{Ocy}^{-/-}* マウスでは、尿中リン排泄が低下していた。

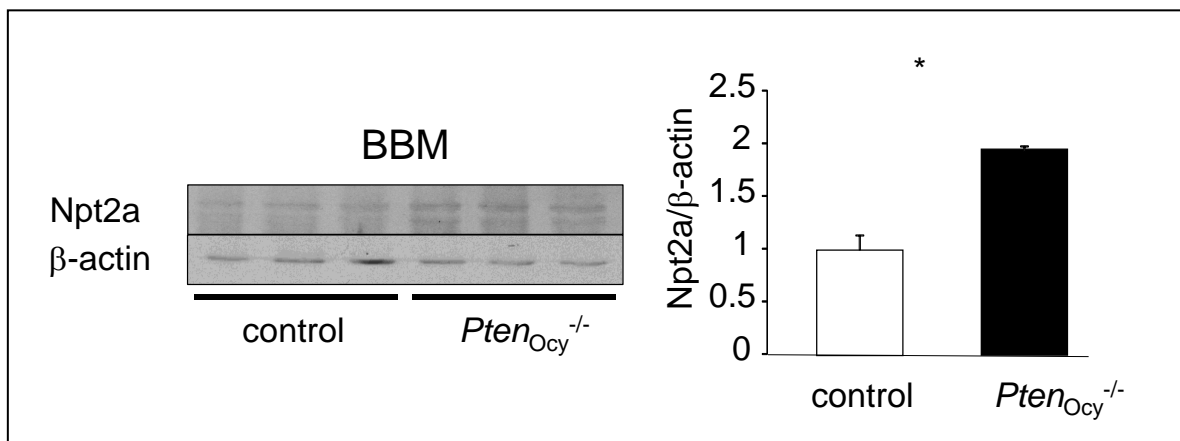


図 4: 腎臓尿細管の刷子縁タンパクを回収し、Npt2a の発現をウェスタンブロットで評価した。右図は、ウェスタンブロットバンドを定量化したものである。*Pten_{Ocy}^{-/-}* マウスでは Npt2a の発現が増強していた。

4) In vitro 実験系における解析

PTEN による FGF23 発現制御機構の分子機序を解析するために、骨芽細胞系の UMR106 細胞を用いて検討を行った。UMR106 細胞において PTEN の発現をノックダウンしたところ、AKT のリン酸化、および mTORC1 の基質である S6K のリン酸化が亢進していた。FoxO1 シグナルに変化を認めなかった。このことから、PTEN のノックダウンにより AKT/TORC1 シグナルが活性化することが判明した。次に、PTEN をノックダウンした細胞において FGF23 の発現を評価したところ、FGF23 の発現は低下していた(図5)。そこで、FGF23 の発現抑制に AKT/mTORC1 シグナルが関与しているか、mTORC1 阻害薬のラパマイシンを用いて検討したところ、ラパマイシンはインスリンシグナルによって引き起こされる FGF23 の発現抑制を部分的にレスキューした(図6)。これらの結果は、PTEN による FGF23 制御機構に mTORC1 が

関与していることを示唆する。

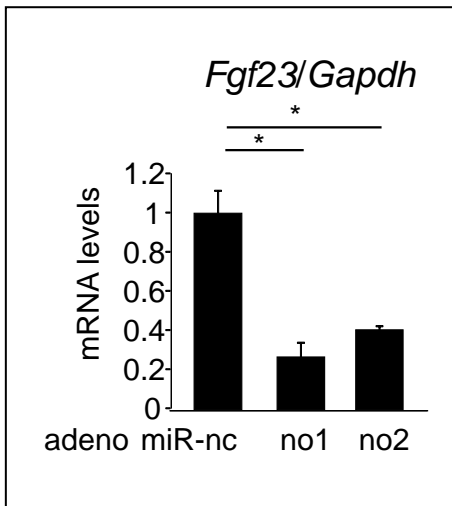


図5: アデノウイルスを用いてPTENの発現をUMR106細胞でノックダウンし、FGF23の発現を定量PCRで評価した。ノックダウン細胞ではFgf23の発現が低下していた。*:有意差あり。

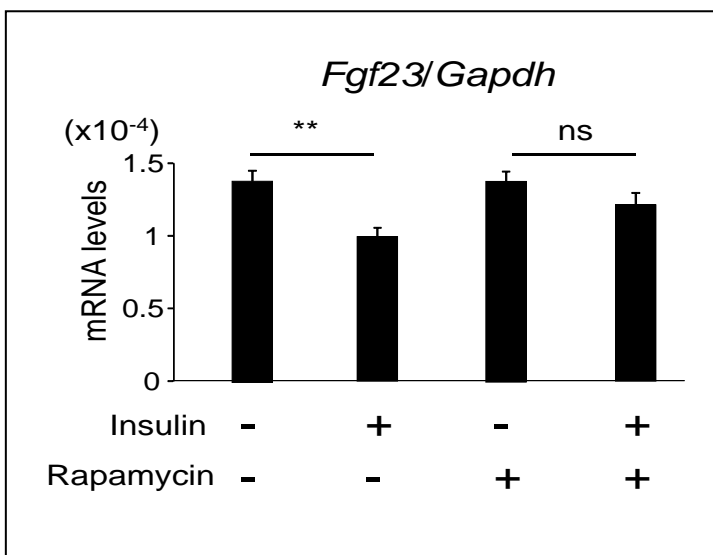


図6: UMR106細胞をラパマイシンで前処理し、インスリンで刺激した。インスリンによるFgf23発現の抑制はラパマイシン存在下で部分的に解除された。*:有意差あり。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masanobu Kawai	4. 巻 16
2. 論文標題 For Debate: When is Selenium Deficiency Suspected and When is Its Measurement Indicated?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Endocrinol Rev.	6. 最初と最後の頁 307-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17458/per.vol16.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai M, Kinoshita S, Yamazaki M, Yamamoto K, Rosen CJ, Shimba S, Ozono K, Michigami T	4. 巻 Mar 7;4(5)
2. 論文標題 Intestinal clock system regulates skeletal homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto K, Kawai M, Yamazaki M, Tachikawa K, Kubota T, Ozono K, Michigami T.	4. 巻 28
2. 論文標題 CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet	6. 最初と最後の頁 1183-1198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/hmg/ddy428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koizumi M, Ida S, Shoji Y, Nishimoto Y, Etani Y, Kawai M	4. 巻 65
2. 論文標題 Visceral adipose tissue increases shortly after the cessation of GH therapy in adults with Prader-Willi syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 1127-1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Y, Kawai M, Bessho K, Yasuda K, Ueno T, Satomura Y, Konishi A, Kimura T, Ikeda K, Tachibana M, Miyoshi Y, Michigami T, Kondou H, Ozono K	4. 巻 49
2. 論文標題 CYP7A1 expression in hepatocytes is retained with upregulated fibroblast growth factor 19 in pediatric biliary atresia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 314-323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michigami T, Kawai M, Yamazaki M, Ozono K	4. 巻 98
2. 論文標題 Phosphate as a Signaling Molecule and Its Sensing Mechanism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol Rev	6. 最初と最後の頁 2317-2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00022.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai M, Shoji Y, Onuma S, Etani Y, Ida S	4. 巻 27
2. 論文標題 Thyroid hormone status in patients with severe selenium deficiency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.27.67	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T	4. 巻 18
2. 論文標題 Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor in Osteoblasts.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 1151-1163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.25742.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai M, Shoji Y, Onuma S, Etani Y, Ida S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Thyroid hormone status in patients with severe selenium deficiency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Pediatr Endocrinol	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.27.67.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 3. 川井正信、木下さおり、山崎美和、山本景子、大園恵一、道上敏美
2. 発表標題 腸管生物時計はVDR依存性カルシウム吸収を制御し、その破綻は骨量減少を引き起こす
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 セレンの生物学
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 腸管生物時計はVDR依存性カルシウム吸収を制御し、その破綻は骨量減少を引き起こす
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 生活リズムと健やかな成長
3. 学会等名 第51回日本小児内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 ビタミンD欠乏症
3. 学会等名 第44回 日本小児栄養消化器肝臓学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 生活リズムと健やかな成長
3. 学会等名 第37回マグネシウム学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川井正信
2. 発表標題 アンドロゲン不応症
3. 学会等名 第6回DSDセミナー in 大阪
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----