

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15980

研究課題名(和文) 骨の血中リン濃度感知によるリン代謝恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Homeostasis of phosphate metabolism via phosphate-sensing mechanisms in the bone

研究代表者

高士 祐一 (Takashi, Yuichi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：50803524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リンは生体に必須の元素である。低リン血症ではくる病・骨軟化症が、高リン血症では老化類似症状が惹起される。血中リン濃度は、骨の分泌する線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor: FGF)23を介した骨腎連関により制御されている。しかし、骨がいかに血中リン濃度の変化を感知し、FGF23の産生を調節しているのかは未解明であった。本研究では、骨芽細胞様細胞を用いたプロテオミクスにより、リン感知分子としてFGF受容体1(FGF receptor 1: FGFR1)を同定した。さらに、骨特異的FGFR1欠失マウスの解析により、生体におけるFGFR1の意義について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体のリン感知機構は未解明の課題である。本研究は、世界に先駆けて骨のリン感知機構の分子基盤を明らかにするものである。本邦に1330万人もの罹患患者がいるとされる慢性腎臓病患者において、慢性の高リン血症により惹起される血管石灰化は、罹患患者の死因に直結している。本研究は、慢性腎臓病患者の二次性副甲状腺機能亢進症や血管石灰化に対する新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Phosphate plays essential roles in many biological processes. Serum phosphate level needs to be regulated because hypophosphatemia and hyperphosphatemia cause rickets/osteomalacia and ectopic calcification, respectively. Fibroblast growth factor (FGF) 23 is the principal hormone to regulate serum phosphate level. However, it has been unclear how the bone senses the changes of serum phosphate level and how the bone regulates the production of FGF23. In this study, we indicated that high extracellular phosphate activates FGF receptor (FGFR) 1 via phospho-proteomic approach. In addition, we analyzed the bone-specific FGFR1-deficient mice and showed the significance of FGFR1 in the regulation of FGF23 and phosphate level in vivo.

研究分野：骨代謝学

キーワード：リン 線維芽細胞増殖因子23 線維芽細胞増殖因子受容体1 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨の特に骨芽細胞・骨細胞より分泌されるホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23: FGF23) は、腎臓の近位尿細管で作用し腎臓からのリン排泄を促進することで、生理的な血中リン濃度の制御因子として機能している (Shimada T et al. J Clin Invest, 2004)。これまでに、FGF23 の過剰により FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症が惹起されることや (Hori M et al. Endocrinology, 2011)、慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 患者では高リン血症に対して代償的に血中 FGF23 濃度が上昇することが報告されてきた (Weber TJ et al. J Bone Miner Res, 2003)。以上のように、骨は FGF23 を介して腎臓と連関することで、血中リン濃度の恒常性を維持しており、その破綻は低リンあるいは高リン血症性疾患を惹起することが既に分かっていた。ここから我々は、骨はどのように血中リン濃度の変化を感知して、腎臓からのリン排泄を調節する FGF23 の産生を制御しているのかという新たな問いを得た。すなわち、骨のリン感知機構の解明を目指した本研究計画を立案するに至った。この問いに応えることができれば、前述の低リンあるいは高リン血症を招く疾患の詳細な病因の解明に基づいて、新規創薬研究につながる可能性を見出した。特に、本邦における 1,320 万人の CKD 患者に向けて、リン・FGF23 管理の向上に基づいた生命予後の改善に寄与することが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、骨に備わる未知のリン感知機構の解明を目的とした。特に、骨芽細胞・骨細胞のリン感知因子の存在を明らかにし、その同定を目指した。

リン濃度変化に応じた FGF23 の産生調節を再現できる *in vitro* 系がなかったことが、リン感知機構が未解明である一因と考えた。我々は、FGF23 の産生異常を惹起する遺伝性疾患から、FGF23 の産生制御に関与することが予想される遺伝子 (*Phex*, *Dmp1*, *Enpp1*, *Fam20c*, *Galnt3*) を発現している骨芽細胞様細胞株 UMR106 をモデル細胞とした。本細胞を用いた先行研究から、リンは O 型糖鎖修飾酵素である *Galnt3* 遺伝子産物を介して FGF23 の産生を調節していることを見出していた。そこで、*Galnt3* がリン応答遺伝子であると考え、*Galnt3* 遺伝子の発現を指標として、新規のリン応答を評価できる系を確立した。本研究では、この系を用いて骨に備わるリン感知機構を分子レベルで探索することとした。

我々は、本研究計画の立案に至るまでの予備実験において、細胞外リン濃度の上昇は ERK のリン酸化を惹起し、その下流の転写因子である EGR1 および ETV5 を介して *Galnt3* 遺伝子が誘導されることを明らかとしていた。本研究で明らかにすべきは、リンがいかなる機序を介して、ERK のリン酸化を惹起するのかであった。

3. 研究の方法

(1) ERK の上流のリン感知因子のプロテオーム解析

一般的に、ERK は細胞膜受容体の細胞内シグナル伝達を担っている (McKay MM et al. Oncogene, 2007)。そこで我々は、ERK の上流のリン感知因子として、受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase: RTK) に着目した。前述の UMR106 細胞を用いて、細胞外リン濃度を上昇させたときにリン酸化される RTK について、リン酸化プロテオーム解析により同定することを試みた。5 mM と高濃度のリン濃度で処理した UMR106 細胞から蛋白を抽出し、ペプチドに消化した。抗リン酸化チロシン抗体を用いて抽出したペプチドを精製し、細胞外リン濃度の上昇によりチロシンリン酸化が惹起されるペプチドを LC-MS/MS により解析した。

(2) 骨特異的 FGFR1 欠失マウスの解析

(1) に示したプロテオーム解析により、リン感知因子の候補分子として FGF 受容体 1 (FGF receptor 1: FGFR1) が抽出された。FGFR1 のリン感知因子としての生体における意義を検証するために、*Fgfr1*-floxed マウスと *Osteocalcin-Cre* マウスの交配により、骨芽細胞・骨細胞特異的 FGFR1 欠失マウスを作出した。本マウスに高リン食負荷を行い、血中 FGF23 濃度および大腿骨中における *Galnt3* 遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞外リン濃度の上昇は、FGFR1 のリン酸化を惹起する

UMR106 細胞を用いたリン酸化プロテオーム解析により、細胞外リン濃度の上昇によってチロシンリン酸化が惹起されるペプチドを網羅的に探索した。ラベルフリー定量の結果、リンによりチロシンリン酸化ペプチドの相対量が増加した蛋白を抽出した。予備実験の中で、リンによりリン酸化されることが既に分かっていた ERK1 および ERK2 は、リン酸化される蛋白の最上位に認められた。これら抽出した蛋白の中で RTK としては、チロシン 583 および 585、チロシン 653 および 654 がリン酸化された FGFR1 が同定された。

このうち、チロシン 653 および 654 は FGFR1 の活性化に最も重要なチロシンリン酸化部位であることが報告されていた (Ornitz DM et al. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2015)。そこでさらに、このチロシンリン酸化部位を含むペプチドを parallel reaction monitoring (PRM) 法を用いたターゲット MS 解析により精密定量した (図 1)。Area 値を積算し、統計処理をする

と、リンは有意に FGFR1 のリン酸化を惹起していることが判明した。

次に、FGFR の阻害薬である PD173074 を用いた実験を行った。PD173074 はリンによる *Galnt3* 遺伝子の発現亢進を抑制した。さらにこの阻害薬は、リンによる ERK のリン酸化も抑制した。これらの結果は、リンが FGFR1 のリン酸化を介して *Galnt3* 発現亢進および ERK のリン酸化を惹起していることを示しているものと考えられた。

(2)リンと FGF2 とでは FGFR1-ERK 経路の活性化の様式が異なる

前述の(1)の成果を受け、リンと FGFR1 の古典的リガンドである FGF2 との細胞内シグナル伝達の様式の違いを比較検討することとした。まず興味深いことに、FGF2 はリンと異なり、*Galnt3* 遺伝子の発現を亢進しないことが判明した。そこで、リンと FGF2 とでは FGFR1 を介したシグナル伝達経路になんらかの違いがあるものと考えた。FGFR substrate 2 (FRS2) のリン酸化部位を観察してみると、FGF2 はチロシン 196 および 436 の双方のリン酸化を惹起したのに対して、リンはチロシン 196 のみをリン酸化した。さらに、その下流の ERK について検討すると、FGF2 では速やかで持続的な ERK のリン酸化を惹起したのに対して、リンは遅れて一過性の ERK のリン酸化を惹起した(図2)。すなわち、リンと FGF2 とでは FGFR1-ERK 経路の活性化様式が異なることが明らかとなった。

(3)骨特異的 FGFR1 欠失マウスは高リン食負荷に対する血中 FGF23 濃度の上昇がキャンセルされる

Fgfr1-floxed マウスと *Osteocalcin-Cre* マウスの交配により、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを作出し、解析を行った。まず本マウスはコントロールマウスに比して、体長や体重、骨密度などの表現型に違いは認められなかった。次に、本マウスにコントロール食に比して2倍量のリンを含有する高リン食を負荷したところ、コントロールマウスで認められるような高リン食応答性の血中 FGF23 濃度の上昇および大腿骨中における *Galnt3* 遺伝子の発現亢進が有意に抑制されていることが明らかになった。したがって、FGFR1 が生体においてもリン感知因子として機能していることが支持される結果となった。

さらに、本マウスをコントロール食で飼育したところ、コントロールマウスに比して血中 FGF23 濃度が有意に低値、血中リン濃度が有意に高値であった。このとき、大腿骨中の *Galnt3* 発現に違いを認めなかったが、*Fgf23* 発現が有意に低下していた。FGFR1 の骨における *Fgf23* 発現への関与についての詳細な検討は、今後の研究課題としたい。

<参考文献>

Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra MK, Nangaku M, Abe M, Matsuhisa M, Kato S, Matsumoto T, Fukumoto S, Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation, Proc Natl Acad Sci U S A, 116(23), 2019, 11418-11427

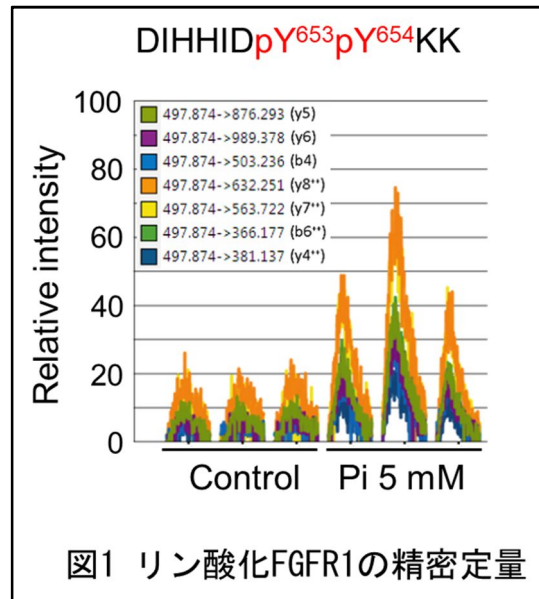


図1 リン酸化FGFR1の精密定量

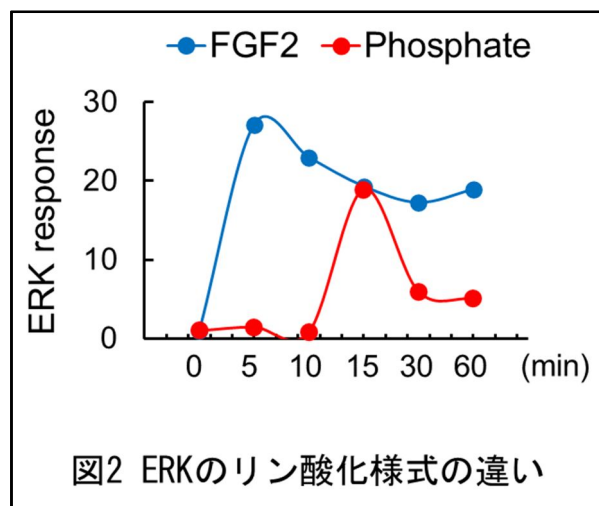


図2 ERKのリン酸化様式の違い

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takashi Yuichi, Kosako Hidetaka, Sawatsubashi Shun, Kinoshita Yuka, Ito Nobuaki, Tsoumpra Maria K., Nangaku Masaomi, Abe Masahiro, Matsuhisa Munehide, Kato Shigeaki, Matsumoto Toshio, Fukumoto Seiji	4. 巻 116
2. 論文標題 Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11418 ~ 11427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1815166116	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 Takashi Yuichi, Fukumoto Seiji	4. 巻 29
2. 論文標題 FGF23 beyond Phosphotropic Hormone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 755-767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tem.2018.08.006	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 Fukumoto Seiji, Takashi Yuichi, Tsoumpra Maria K., Sawatsubashi Shun, Matsumoto Toshio	4. 巻 38
2. 論文標題 How do we sense phosphate to regulate serum phosphate level?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-019-01066-0	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 Takashi Y., Fukumoto S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Phosphate-sensing and regulatory mechanism of FGF23 production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinological Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40618-020-01205-9	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 Takashi Yuichi, Fukumoto Seiji	4. 巻 29
2. 論文標題 Fibroblast growth factor receptor as a potential candidate for phosphate sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Nephrology & Hypertension	6. 最初と最後の頁 446 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MNH.0000000000000618	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高土祐一、小迫英尊、沢津橋俊、木下祐加、伊東伸朗、安倍正博、松久宗英、加藤茂明、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 FGFR1はFGF23濃度調節を媒介するリン感知受容体である
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Yuichi, Kinoshita Yuka, Ito Nobuaki, Sawatsubashi Shun, Kosako Hidetaka, Abe Masahiro, Matsuhisa Munehide, Matsumoto Toshio, Fukumoto Seiji
2. 発表標題 FGF Receptor 1c Works as a Phosphate-Sensor to Regulate FGF23 Production
3. 学会等名 ASBMR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高土祐一、木下祐加、伊東伸朗、沢津橋俊、小迫英尊、松久宗英、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 FGFR1はFGF23濃度を制御する骨におけるリン感知分子である
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高土祐一、沢津橋俊、遠藤逸朗、安倍正博、松久宗英、松本俊夫、福本誠二
2. 発表標題 FGFR1は血中FGF23濃度を制御するリン感知受容体である
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----