

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510068

研究課題名 (和文) 生体の恒常性維持機構に着目したカドミウム毒性発現の分子機構解明

研究課題名 (英文) Research for effect of cadmium induced-toxicity on FGF23 signaling

研究代表者

黒須 洋 (Kurosu Hiroshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40468690

研究成果の概要 (和文) : カドミウム摂取 (曝露) によって発症するイタイタイ病は骨の病気と考えられているが、その直接の標的となる臓器は腎臓である。本研究課題では、標的臓器と発症臓器の関連性からカドミウム曝露が腎臓においてビタミン D₃ 代謝に及ぼす影響の解析を試み、腎臓由来の培養細胞において FGF23 によって制御されるビタミン D₃ 代謝に関連する遺伝子の発現がカドミウム曝露の影響を受けることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Cadmium is an important occupational and environmental pollutant. It has a biological half-life exceeding 20 years, and may accumulate in various organs such as kidney. The present results showed that cadmium exposure affected FGF23 induced-gene expression which was related with vitamin D metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内分泌代謝

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：カドミウム

1. 研究開始当初の背景

申請者は、短命で老化様の表現系を示す Klotho マウスの原因遺伝子であり、発見以来長らくその機能が不明であった *klotho* 遺伝子産物を過剰に発現したマウスの平均寿命が、野生型マウスと比較し 20%ほど延びることを明らかにした [*Science* 309: 1829-1833, 2005]。また、そのメカニズムを解析する過程で、膜型 Klotho が FGF 受容体と複合体を形成し FGF23 に特異性を持たせる共受容体として機能することを初めて明らかにした [*J Biol Chem* 281: 6120-6123, 2006]。さらに、申請者は Klotho とアミノ酸レベルにおいて

約 40%の相同性を示す β Klotho が FGF 受容体タイプ 4 ならびにタイプ 1c と複合体を形成し、他の循環性 FGF である FGF19 ならび FGF21 に特異性を持たせる共受容体として機能することも見出した [*Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7432-7437, 2007, *J Biol Chem* 282: 26687-26695, 2007]。これらの知見により、上述の重要な生体の恒常性維持機構を制御する 3 つの循環性 FGF の生体内での作用機序の特異性が Klotho ならびに β Klotho と FGF 受容体のタイプの組み合わせによって臓器特異的に享受されるという新しい概念を提示している。

一方、カドミウムはその非腐食性のため電気メッキや塗料など様々な用途に使用され、我々はカドミウムに汚染された飲料水や食物を摂取することでカドミウムに曝露される環境にある。とりわけ、体内に吸収されたカドミウムは腎臓や肝臓に蓄積し、これらの臓器が担う生体の恒常性維持機構に影響を与え、健康障害を引き起こすものと考えられる。カドミウムに関しては、カドミウムに曝露された細胞がメタロチオネインやヘムオキシゲナーゼなどのストレス応答遺伝子の発現を促し、その毒性を抑制することが知られているが、標的臓器へのカドミウムの蓄積がその臓器に固有の生体の恒常性維持機構に影響を及ぼすことに着目した毒性発現機構の解明はなされていない。すなわち、カドミウム摂取（曝露）によって発症するイタイタイ病とカドミウムの標的臓器である腎臓での機能障害とを関連づける研究は行われていなかった。そこで、本研究課題では、標的臓器と発症臓器の関連性からカドミウム曝露が腎臓において産生されるいくつかのホルモンの中で腎臓においてビタミン D₃ 代謝及ぼす FGF23 の機能に着目しカドミウム毒性の影響を解析することを試みた。

2. 研究の目的

繊維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor: FGF) ファミリーに属す FGF23、FGF21、および FGF19 は他の FGF ファミリー分子とは異なり血液中を循環する因子(循環性 FGF)として機能し、それぞれが固有の生体の恒常性維持機構を制御していることが近年明らかになりつつある。中でも FGF23 は腎臓に作用し血液中のリン酸・カルシウム濃度の恒常性維持を、また、FGF19 は肝臓に作用しコレステロール代謝の恒常性維持を制御するという重要な生体機能を担っている。

一方、これら2つの循環性 FGF が作用を発現する腎臓と肝臓は体内へ吸収されたカドミウムが蓄積する臓器であり、その毒性作用はこれらの臓器が本来担う生体の恒常性維持機構を障害し、二次的な症状として骨軟化症や高血圧症を引き起こす。また、これらの症状は FGF23 と FGF19 による腎臓と肝臓での恒常性維持制御の異常に起因する疾患症状と酷似している。このように生体における循環性 FGF の作用不全とカドミウム毒性には共通の特徴があるにもかかわらず、これらの循環性 FGF が制御する生体の恒常性維持機構に対するカドミウム曝露の影響を詳細に検討した研究はあまりない。そこで本研究では、申請者がその作用機序の詳細を明らかにした循環性 FGF による恒常性制御機構[*J Biol Chem* 281: 6120-6123, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7432-7437, 2007, *J Biol Chem* 282: 26687-26695, 2007]を細胞応答として

誘導しうる培養細胞ならびに実験用動物を用いて、循環性 FGF、とりわけ作用臓器が腎臓である FGF23 を介したシグナル伝達機構と生理応答へのカドミウム毒性発現機構の関連性を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

本研究では、カドミウムの標的臓器と上述の循環性 FGF (FGF23 と FGF19)の作用臓器がともに腎臓と肝臓であること、また、カドミウムの蓄積が誘因となる骨軟化症や高血圧症が循環性 FGF に遺伝的に変異を持つ患者で認められる症状と酷似しているという点に着目し、カドミウム曝露が循環性 FGF による生体の恒常性維持制御に及ぼす影響を分子レベルで解明を試みた。すなわち、FGF23 によって機能的な細胞応答が誘導される培養細胞を用いて、① FGF によって活性化されるシグナル伝達機構、特に MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) ファミリーの活性化機構へのカドミウム曝露の影響を解析した。② FGF23 シグナルに依存した蛋白質の量ならびに質的变化の網羅的な解析とそれらへのカドミウム曝露の影響を解析した。③ FGF23 によるビタミン D₃ 代謝へのカドミウム曝露の影響を定量的リアルタイム PCR 法により解析した。

4. 研究成果

① FGF23 によって活性化されるシグナル伝達機構へのカドミウム曝露の影響: 腎臓由来の培養細胞を FGF23 で刺激すると、刺激後 15 分をピークに、その後 60 分後には消失する一過的な ERK の活性化が検出された。一方で、この細胞へのカドミウム曝露は、曝露 5 分後から 3 時間に渡り持続する ERK の活性化を誘導した。さらに、FGF23 刺激とカドミウム曝露を同時に行うと FGF23 による一過的な ERK の活性化の特徴が消失し、カドミウムによる持続的な ERK 活性化が起きることが明らかになった。また、他の MAPK ファミリーである JNK と p38 の活性化に関しても同様の結果を得た。これらの結果は、本来 FGF23 が誘導する細胞応答には一過的な細胞内シグナルの活性化で十分であるが、カドミウムはこのシグナルに影響を及ぼすことで FGF23 の細胞応答に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

② FGF23 シグナルに依存した蛋白質の量ならびに質的变化の網羅的な解析とそれらへのカドミウム曝露の影響: 腎臓由来の培養細胞を FGF23 で刺激、刺激後 1、3、6、および 12 時間の点において細胞を回収し蛋白質の発現量の変動の有無を CBB 染色ならびに銀染色を行うことで検出を試みた。しかしながら、刺激時間に依存してその発現量が有意に

変動する蛋白質を検出することはできなかった。原因として、蛋白質の発現レベルの変動が検出限界レベル以下の範囲で起こっていることが考えられた。

③定量的リアルタイム PCR 法を用いた FGF23 によるビタミン D₃ 代謝へのカドミウム曝露の影響の解析：項目②結果を受け FGF23 による遺伝子発現変化を定量的リアルタイム PCR 法で検出し、変動の認められた遺伝子に対してカドミウム曝露の効果を検討した。

FGF23 によって制御される主な生理機能は、腎臓でのリン酸再吸収の抑制と活性化型ビタミン D₃ 合成の制御と考えられている。リン酸再吸収の制御において重要な役割を担う分子はリン酸・ナトリウム共輸送担体 (NaPi2a) である。定量的リアルタイム PCR による解析から、腎臓由来の培養細胞に対してカドミウム曝露を行うと NaPi2a mRNA の発現が抑制されることが明らかとなった。一方、ビタミン D₃ の代謝制御に関しても、活性化型ビタミン D₃ の分解を促進する律速酵素 CYP24A の mRNA の発現がカドミウム曝露により抑制されることが明らかとなった。すなわち、FGF23 によって制御される恒常性維持機構に対して、カドミウム曝露が影響を及ぼす可能性が細胞レベルにおいて示唆された。

上述の腎臓由来の細胞へのカドミウム単独曝露の影響を受け、この細胞に対して FGF23 からのシグナルが誘導された状態でのカドミウム曝露の影響を評価するために、培養細胞系での FGF23 刺激単独による遺伝子発現誘導に関して、その濃度依存性および経時変化を詳細に検討した。同時に、本研究に使用している培養細胞が腎臓由来の細胞であるという特徴を考慮し、遺伝子発現作用が期待されるビタミン D₃ についても FGF23 と同様の検討を行った。

FGF23 に関しては、刺激後 1 時間という早い段階で一過的な *Egr-1* 遺伝子の発現を誘導すること、また、刺激後 3 時間から活性化型ビタミン D₃ の分解を促進する律速酵素 CYP24A の mRNA の発現を増強することが明らかになった。一方で、活性化型ビタミン D₃ の合成を促進する律速酵素 CYP27B1 の mRNA の発現には大きな影響を示さなかった。さらに、これらの FGF23 による遺伝子発現制御に対して低濃度のビタミン D₃ の添加効果を解析したところ、ビタミン D₃ は *Egr-1* および CYP27B1 の発現には影響を示さなかったが、CYP24A mRNA の発現には単独刺激による発現上昇に加え、FGF23 との共刺激において相乗的な発現上昇を誘導することが明らかになった。この結果より、FGF23 によるシグナルと核内受容体を介するビタミン D₃ によるシグナルが協調的に制御するビタミン D₃ の恒常性維持機構が

存在することが示された。

これらの遺伝子変化に対してカドミウム曝露の影響を解析したところ、FGF23 刺激によって誘導される遺伝子発現変化のなかで、刺激後 1 時間という早い段階で一過的な発現上昇が誘導される *Egr-1* 遺伝子の発現はカドミウム曝露による影響を受けなかったが、FGF23 刺激後 3 時間から誘導が認められる活性化型ビタミン D₃ の分解を促進する律速酵素 CYP24A の mRNA の発現上昇はカドミウム曝露により、その濃度依存的に発現促進が抑制された。また、活性化型ビタミン D₃ の合成を促進する律速酵素 CYP27B1 の mRNA の発現はカドミウム曝露によって FGF23 刺激の有無にかかわらず減弱していた。さらに、これらの FGF23 による遺伝子発現制御に対して低濃度のビタミン D₃ の添加効果を解析したところ、昨年度の解析で明らかになった FGF23 とビタミン D₃ の共刺激によって誘導される CYP24A mRNA の相乗的な発現上昇は、カドミウム曝露により FGF23 単独刺激時と同様完全に抑制された。

一連の結果は、腎臓における FGF23 によるビタミン D₃ の恒常性維持機構がカドミウム曝露により破綻していることを示唆している。また、実際にカドミウム摂取によって発症するイタイイタイ病の原因が腎臓障害によることを考慮すると、培養細胞系で認められるビタミン D₃ の恒常性維持機構の破綻が腎臓で起きることによって二次的な骨代謝の異常を誘導している可能性を推測させるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

1. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, Klierer SA (2010) Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 24:2050-2064.
2. Goetz R, Nakada Y, Hu MC, Kurosu H, Wang L, Nakatani T, Shi M, Eliseenkova AV, Razzaque MS, Moe OW, Kuro-o M, Mohammadi M (2010) Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation.

- Proc Natl Acad Sci U S A* 107:407-412.
3. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M (2009) NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells, *J Dent Res* 88: 461-465.
 4. Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-o M, Moe OW, Huang CL (2009) Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K⁺ excretion by klotho. *Mol Pharmacol* 76: 38-46.
 5. Kurosu H, Kuro-o M (2009) Endocrine FGFs as regulators of metabolic homeostasis. *Biofactors* 35: 52-60. *Review*
 6. Kurosu H, Kuro-o M (2009) The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 299: 72-78. *Review*
 7. 黒須 洋、黒尾 誠 (2009) Klotho と FGF19 サブファミリー, 季刊 腎と骨代謝 22: 113-126.
 8. Kurosu H, Kuro-o M (2008) The Klotho gene family and the endocrine fibroblast growth factors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 368-372. *Review*
 9. Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-o M, Huang CL (2009) Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9805-9810.
 10. 黒須 洋、黒尾 誠 (2008) *Klotho* 遺伝子からみた老化, *Surgery Frontier* 5: 387 - 393.
 11. 黒須 洋、黒尾 誠 (2008) *Klotho* ファミリーとエンドクライン FGF による生体の恒常性維持制御, 内分泌・糖尿病科 26: 527 - 535.

[学会発表] (計 5 件)
 第 79 回 日本衛生学会
 フッ化ナトリウム曝露による象牙芽細胞様細胞株のアポトーシス
 軽部 裕代、西躰 元、黒須 洋、松岡 雅人

第 82 回日本生化学会大会
 リゾホスファチジン酸によるミクログリア活性化と ATP 遊離を介する間接的 BDNF 産生機構
 植村 朋香、藤田 亮介、黒須 洋、植田 弘師

第 62 回日本薬理学会西南部会
 プロサイモニン α ミクログリア活性化機構の解析
 黒須 洋、植村 朋香、藤村 一輝、黒須 洋、植田 弘師

第 27 回日本薬学会九州支部会
 モルヒネ鎮痛耐性を制御するアンチオピオイド機能の解明
 三浦 裕、西 建也、荒木 康平、内田 仁司、黒須 洋、植田 弘師

第 27 回日本薬学会九州支部会
 オピオイド受容体欠損マウスへの脳領域特異的遺伝子レスキューと疼痛モダリティーとの関連
 西 建也、三浦 裕、荒木 康平、内田 仁司、黒須 洋、植田 弘師

[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]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒須 洋 (Kurosu Hiroshi)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号: 40468690

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

松岡 雅人 (Matsuoka Masato)
 東京女子医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 50209516