

平成23年 5月 10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592139

研究課題名 (和文) FGF23 シグナルを分子標的とした歯・骨疾患治療のための基盤研究

研究課題名 (英文) A basic study on FGF23 for molecular targeted therapy of bone/tooth diseases

研究代表者

吉子 裕二 (YOSHIKO YUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20263709

研究成果の概要 (和文)：

線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) と循環型 Klotho (sKL) の骨における協調作用を FGF23 高発現マウスモデルにて確認した。sKL は骨特異的に FGF23 特異的シグナル・ERK のリン酸化が促進された。Klotho 欠損マウス (血中カルシウム、リン、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、FGF23 が高値) に sKL を負荷すると、血中パラメーターの変動なく、骨に ERK のリン酸化と石灰化障害を認めた。これらの所見は培養モデルでも確認され、FGF23-Klotho の新基軸が示された。

研究成果の概要 (英文)：

Fibroblast growth factor 23 (FGF23) acts as a phosphaturic hormone upon $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) stimulation, and the truncated form (sKL) of Klotho, a coreceptor for FGF23 in kidney, is released into the circulation. Here, we show that an intravenous injection of sKL rapidly increases ERK phosphorylation as FGF23 signaling in bone but not in kidney in mice, when preloaded with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The unique activity of sKL in bone is mimicked in *Klotho*-deficient mutant (*kl/kl*) mice, in spite of the *kl/kl* high serum concentrations of phosphate, calcium, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and FGF23. These mice exhibit selective accumulation of FGF23 and sKL and subsequent hypomineralization in parietal bone, without changes in serum parameters examined. sKL in serum is necessary for complex formation with FGF23 and the corresponding hypomineralization effects in osteoblast/osteocyte cultures, when FGF23 levels are increased by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. These data define a novel bone-kidney axis in which sKL acts as a cofactor for FGF23 in parietal bone, and the unique bone milieu mediates the local actions of FGF23.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：骨代謝

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：FGF23, Klotho, 石灰化, マップキナーゼ(ERK)

1. 研究開始当初の背景

リン酸代謝の破綻は歯・骨形成の障害や異所性の石灰化の原因となることから、その調節機構が注目されてきた。2000年の線維芽細胞増殖因子(FGF)23の発見(*Nat Genet* 26, 345)を始めとし、sFRP-4(*J Clin Invest* 112, 758, 2003)、DMP1、MEPE(*Genomics* 67, 54, 2000)など、近年リン酸代謝関連因子が相次いで発見されている。とりわけ、FGF23の発見は、リン酸代謝調節の新機軸を提供した点で極めて注目度が高い。本件は、申請者らが発見したFGF23の新たな機能(後述)を基盤とし、歯・骨疾患の新規治療法の開発を目的とした基盤研究である。

FGF23は遺伝性、腫瘍性低リン血症の原因因子であり、主として骨組織から分泌され、腎臓を標的としてホルモン様作用を示す(後述)。一方、私たちは、骨芽(軟骨)細胞あるいは骨器官培養を用い、FGF23が局所因子として骨形成を抑制することを明らかにした(*Bone* 40, 1565, 2007; *J Biol Chem* 281, 5120, 2006; *J Bone Miner Res* 23, 939, 2008)。さらに、関連成果として、基質石灰化の機能的ナトリウム依存性リン酸トランスポーター(NPT)としてPit1を同定した(*Mol Cell Biol* 27, 4465, 2007)。

多くのFGFファミリーのうち、FGF23がリン酸代謝調節という特別な機能を獲得するためには、老化関連遺伝子産物klothoとFGF受容体(FGFR)との複合体形成が必須であると推察されている(*Nature* 444, 770, 2006)。骨芽細胞にはFGF2をはじめとする数種のFGFが増殖・分化を調節することが知られている。私たちの結果は、骨芽細胞におけるFGF23の機能発現がそれらと区別されることを示唆している。

2. 研究の目的

分泌されたFGF23は血流を介して腎尿細管を標的とし、II型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター(NPT2)の発現を抑制し、リン酸の再吸収を阻害する。同様に、腎1 α 水酸化酵素の発現を抑制し、1 α , 25-dihydroxy-vitamin D₃ (1, 25(OH)₂D₃)の産生を低下させる。その結果、低リン血症を引き起こし、石灰化が障害されると考えられている。したがって、これまで、FGF23の骨形成における直接作用は明らかにされていなかった。

このように、骨芽細胞自身のFGF23に対する細胞応答に注目し、骨形成を理解しようとする試みは、本件の特筆すべき特色である。骨芽細胞におけるFGF23の産生から基質石灰化の抑制までのブラックボックスを明らかにす

ることで、骨形成、とりわけ分子基盤の不明な石灰化機構に迫る。ここで得られる情報は新しい骨形成の標的分子を提供する。

一方、私たちは、慢性腎疾患等による血管平滑筋の石灰化モデルにおけるFGF23の有効性を課確認している(特許出願の項参照)。したがって、本件の成果は、血管石灰化機構の解明や治療法の開発にも役立つ。

3. 研究の方法

- (1) ヒト FGF23 組換えアデノウイルス (Adv-hFGF23) の作製と骨芽細胞における過剰発現モデルの作製
 - ① Tet-OFF アデノウイルスシステムによるテトラサイクリン依存性の発現制御系 (BD Bioscience s 社製)。
 - (2) FGF23 過剰発現のラット骨芽細胞における変動遺伝子の網羅的解析
 - ① マイクロアレイ (Affymetrix 社ラットゲノム 230 2.0 アレイ) による変動遺伝子の解析
 - ② アレイで有意な変動の見られた遺伝子を選択し、リアルタイム PCR にて変動の再現性を確認する。
 - (3) 骨芽細胞における FGF23 のシグナル伝達機構の免疫組織、免疫沈降、ウェスタンブロットティング、PCR 解析
 - ① FGF23 特異的シグナル伝達機構の検証
 - A) FGF23-FGFR-Klotho 複合体形成の有無の検証
 - B) Early growth response gene (Egr)-1 の発現応答
 - C) MAP キナーゼのリン酸化反応
 - D) FGF23 中和抗体、MAPK 阻害剤などによるシグナル抑制
 - (4) FGF23 プロモーター領域の解析と発現調節因子の特定
 - ① FGF23 のプロモーター領域の検索
ビタミン D 応答配列の特定
 - ② レポーターコンストラクトの作製と、骨芽細胞株における 1, 25(OH)₂D₃ のプロモーター促進活性の解析
 - ③ CHIP (Chromatin immunoprecipitation) アッセイによるビタミン D 受容体結合部位の検索。
 - ④ リアルタイム PCR による 1, 25(OH)₂D₃ による FGF23 発現応答の骨芽細胞分化段階の特定
 - (5) 正常マウス骨における FGF23 シグナル応答: 可溶化型 KLotho (sKL) の影響
 - ① 1, 25(OH)₂D₃ 皮下投与における FGF23 の発

現応答

- ② ①の条件における可溶化型 Klotho (sKL) の尾静単回投与による FGF23 シグナルの検出
- A) MAP キナーゼのリン酸化応答
 - B) FGF23 標的遺伝子の発現動態
 - C) 血中パラメーターの変動

(6) Klotho 変異 (*kl/kl*) マウスにおける FGF23 シグナル応答

① 器官培養(頭頂骨)の石灰化障害モデルにおける sKL 効果

- A) MAP キナーゼのリン酸化応答
- B) Early growth response (Egr)-1 の発現動態
- C) FGF23 の発現動態

② *kl/kl* マウスにおける sKL 皮下投与の影響

- A) MAP キナーゼのリン酸化応答
- B) FGF23 標的遺伝子の発現動態
- C) 血中パラメーターの変動
- D) 骨芽細胞、骨細胞マーカーの発現動態
- E) 骨形態計測

4. 研究成果

(1) 培養骨形成モデルにおいて、FGF23 組換えアデノウイルス (Adv-hFGF23) を骨芽細胞、骨細胞に特異的に発現する系を作製した。

(2) (1) のモデルにおいて、FGF23 シグナルによって変動する遺伝子を複数同定した。

(3) 培養骨芽細胞・骨細胞における FGF23 のシグナル伝達機構

① FGF23 特異的シグナル: Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化および Egr-1 の発現増加には FGF 受容体 (FGFR) 1 ならびに Klotho 複合体形成が不可欠である。

② Klotho は骨芽細胞・骨細胞に発現を求めず、血清 (牛胎児血清、マウス血清) 中の sKL がこの複合体形成に関与した。

③ FGF23/sKL は基質石灰化を抑制したが、この作用に、Wnt、TCRP-1、VGFR-2 などの Klotho 結合蛋白が関与する可能性は否定された。

(4) ラット FGF23 遺伝子の 5' 上流に少なくとも 3 カ所のビタミン D 応答配列 (VDRE) が認められ、このうち最も上流の VDRE は 1, 25 (OH)₂D₃ 依存性の FGF23 発現増加に関与することが、レポーターアッセイ、ChIP アッセイにより確認された。

(5) 正常マウス骨における FGF23 シグナル応答

① 1, 25 (OH)₂D₃ 皮下投与により、骨における FGF23 の発現が促進された。

② 腎臓における FGF23 標的遺伝子の発現は 1, 25 (OH)₂D₃ 皮下投与により抑制された。

③ ERK1/2 のリン酸化は腎臓でのみ促進された。

④ sKL 単回尾静注により、骨において ERK1/2 のリン酸化が促進されたが、腎臓に変動はみられなかった。

⑤ sKL 投与による腎臓の FGF23 標的遺伝子の変動はみられなかった。

⑥ sKL 投与による血中パラメーターの変動はみられなかった。

(6) Klotho 変異 (*kl/kl*) マウスにおける FGF23 シグナル応答

① 器官培養(頭頂骨)において、ERK1/2 のリン酸化、Egr-1 の発現増加がみられた。

② *kl/kl* マウスは FGF23 の血中濃度が高い一方、高リン、高ビタミン D 血症を示した。

③ *kl/kl* マウス皮下に sKL を持続投与すると、骨において ERK1/2 のリン酸化が増強されたが、腎臓、血清パラメーターに変動はみられなかった。これに伴い、骨の石灰化障害が確認された。

以上の結果より、FGF23 は sKL の協調下、血中リン濃度依存的に骨の石灰化を調節していることが示唆された。この結果は、骨から腎臓へのシグナル (FGF23) と対局に、腎臓から骨へのシグナル (sKL) が存在し、これらのバランスはリン代謝調節に必須であると推定された。

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 6 件)

(1) Iizuka S, Kudo Y, Yoshida M, Tsunematsu T, Yoshiko Y, et al. Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase via cross talk between integrin $\beta 1$ and CD63. *Mol Cell Biol* 32(4), 783-792, 2011. 査読有

(2) Yoshiko Y, Oizumi K, Hasegawa T, Minamizaki T, et al. A subset of osteoblasts expressing high endogenous levels of PPAR γ switches fate to adipocytes in the rat calvaria cell culture model. *PLoS One* 26, 5(7), e11782, 2010. 査読有

(3) Yamamoto R, Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ acts predominately in mature osteoblasts under conditions of high extracellular phosphate to increase fibroblast growth factor 23 production in vitro. *J Endocrinol* 206(3), 279-286, 2010. 査読有

(4) Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, Aubin JE, Maeda N. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways

underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. Bone 44(6), 1177-1185, 2009. 査読有

- (5) 低リン血症にみる歯の形成の分子基盤. 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽, 鈴木清香, 前田憲彦. 広島歯誌(36), 1-12, 2008. 査読無
- (6) Yoshiko Y, Minamizaki T, Maeda N. New Insights into the Roles of Fibroblast Growth Factor 23. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 6, 17-23, 2008. 査読有

[学会発表] (計13件)

- (1) Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, et al. Overexpression of the type III sodium-dependent phosphate transporter Pit1 markedly perturbs enamel formation during tooth development. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Oct 17, 2010.
- (2) Minamizaki T, Yoshiko Y, Konishi Y, Yoshioka H, et al. Soluble Klotho Acts as a Coactivator of FGF23 in Bone but not in Kidney to Regulate Mineralization. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Toronto, Oct 15-16, 2010.
- (3) 錦織亜矢, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子他. III型ナトリウム依存性リン酸トランスporter Pit1の過剰発現は歯のエナメル質形成に影響し, 骨・ミネラル代謝異常の発症とともに増悪する. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 東京, 9月22日, 2010年.
- (4) 南崎朋子, 吉子裕二, 吉岡広陽, 前田憲彦. PTHと活性型ビタミンD₃は骨芽細胞におけるFGF23の発現とシグナル伝達に相反的に関与し, 基質石灰化を調節する. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月23日, 2009年.
- (5) 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子他. III型ナトリウム依存性リン酸トランスporter Pit1の過剰発現は骨・ミネラル代謝に先行して歯のエナメル質形成に障害をきたす. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 7月21日, 2010年.
- (6) 小西有希子, 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽他. 老化関連タンパクKlothoによる骨の石灰化調節機構. 第43回広島大学歯学会総会, 広島, 6月12日, 2010年.
- (7) Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, Aubin JE, Maeda N. A Parathyroid Hormone-1 α , 25-dihydroxy -vitamin D₃-FGF23 Loop Regulating Bone Mineralization in Cultured Rat

Calvaria Osteoblasts. The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, USA, Sep 14, 2009.

- (8) 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 前田憲彦. III型Na/Pi共輸送担体Pit1過剰発現ラットはエナメル質の形成不全をきたす. 第51回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 9月10日, 2009年.
- (9) 南崎朋子, 吉子裕二, 吉岡広陽, 前田憲彦. PTHと活性型ビタミンD₃は骨芽細胞におけるFGF23の発現とシグナル伝達に相反的に関与し, 基質石灰化を調節する. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月23日, 2009年.
- (10) 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 鈴木敦詞, 伊藤光泰, 前田憲彦. III型Na/Pi共輸送担体Pit1過剰発現ラットはエナメル質の形成不全を来す. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月23日, 2009年.
- (11) 小間義朗, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子他. III型Na/Pi共輸送担体Pit1過剰発現ラットはエナメル質の石灰化不全を来す. 第42回広島大学歯学会総会, 広島, 6月, 2009年.
- (12) 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子他. III型Na/Pi共輸送担体Pit1過剰発現ラットはエナメル質の形成不全を来す. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月, 2009年.
- (13) Minamizaki T, Yoshiko Y, Suzuki S, et al. FGF23 and FGF2 share a common but also have distinct signaling pathways for negative regulation of bone nodule mineralization in cultured osteoblasts. The 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Montreal, Sep 13, 2008.
- (14) 南崎朋子, 吉子裕二, 前田憲彦. 1, 25(OH)₂D₃, PTHおよびKlothoはFGF23の基質石灰化抑制作用を直接調節する. 第50回歯科基礎医学会, 東京, 9月23日, 2008年.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 石灰化組織における可溶性Klotho、FGF23およびFGFR複合体形成機構を利用した用途

発明者: 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽他

権利者: 広島大学, ラフィーネインターナショナル

種類: 特許

番号: 特願2010-136637

出願年月日: 2010年6月15日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉子 裕二 (YOSHIKO YUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20263709

(2) 研究分担者

南崎 朋子 (MINAMIZAKI TOMOKO)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30452593

内田 宗志 (UCHIDA SOSHI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60330990

[H20のみ]

吉岡 広陽 (YOSHIOKA HIROTAKA)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50523411

[H21-H22]

(3) 連携研究者

()

研究者番号：