

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791782

研究課題名（和文） Fgf23 遺伝子の発現を制御する新規遺伝子の検索と機能解析

研究課題名（英文） The regulation of Fgf23 gene expression by inorganic phosphate

研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA YOSHIHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70431963

研究成果の概要（和文）：骨組織は、血中無機リン濃度変化に反応して、Fgf23 遺伝子発現を調節することが判明した。Fgf23 遺伝子発現の変化は、長管骨より頭蓋骨において著明であり、高リン負荷3時間後に反応がみられた。また、Fgf23 遺伝子発現の調節は、無機リンが骨組織に直接作用するのではなく、全身性因子を介したものであると考えられた。今後は、血中リン濃度の変化に応答して、Fgf23 遺伝子発現の調節を行う細胞群の同定が必要である。

研究成果の概要（英文）：The expression of Fgf23 was regulated in bone in response to the change of serum concentration of inorganic phosphate. Calvaria was more sensitive than long bone to induce the expression of Fgf23. The expression of Fgf23 might not be regulated by direct effects of serum phosphate but by in concert with systemic factors. Cell types in bone should be elucidated in response to the change of the serum concentration of inorganic phosphate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Fgf23、骨細胞、無機リン、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

血中リン濃度は、主に腎尿細管での再吸収と尿中への排泄により調節される。この調節に異常をきたすと、高リン血症または低リン血症となり、石灰沈着症や骨軟化症を引き起こす。近年、ほぼ全ての遺伝性リン代謝疾患において、Fgf23 遺伝子発現の異常や血中Fgf23 濃度の異常が報告されている。すなわち、Fgf23 はリン代謝疾患において中心的な役割を果たすと考えられる。Fgf23 は骨細胞から分泌され、ホルモンとして腎臓に到達し、

腎尿細管でのリン再吸収を阻害することで血中リン濃度を低下させると考えられている。しかし骨組織におけるFgf23 遺伝子発現の調節機構は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、特定の因子に注目するのではなく、血中リン濃度の変化に反応してFgf23 遺伝子発現を調節する分子機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

血中リン濃度の変化による Fgf23 遺伝子発現機構を検討するために、マウスに普通食もしくは高リン食を摂取させ、骨組織における Fgf23 遺伝子発現の変化を経時的に検討した。次に、無機リンが骨組織に直接作用して Fgf23 遺伝子発現を調節するかどうか調べるために、*in vitro* で培養液のリン濃度を変化させ Fgf23 遺伝子発現の変化を検討した。また普通食もしくは高リン食摂取マウスの骨組織における Fgf23 タンパク質の局在を免疫組織化学法により検討した。

### 4. 研究成果

(1) 生後 4 週齢雄マウスに普通食 (Ca 0.5%、Pi 0.6%) もしくは高リン食 (Ca 0.5%、Pi 1.2%) を摂取させ、頭蓋骨および脛骨における Fgf23 mRNA 発現の変化を real-time PCR 法により経時的に検討した。頭蓋骨では、高リン食摂取 3 時間後には、普通食摂取マウスと比較して Fgf23 mRNA 発現の上昇がみられた。Fgf23 mRNA 発現上昇は 6 時間後に最も顕著となり、普通食マウスと比較して約 6 倍であった (図 1 上)。脛骨では、24 時間後に約 2 倍の発現上昇がみられた (図 1 下)。以上の結果より、骨組織は血中リン濃度の変化に反応して Fgf23 遺伝子の発現を調節し、長管骨より頭蓋骨の方が鋭敏に発現を調節すると考えられた。

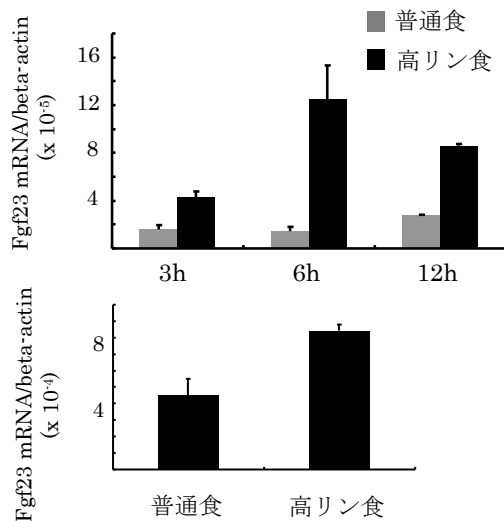


図 1 普通食もしくは高リン食摂取後の頭蓋骨 (上) および脛骨 (下) における Fgf23 mRNA 発現変化

(2) 次に、無機リンが直接骨組織に作用して Fgf23 遺伝子発現を調節するかどうか調べる。生後 1 日齢の頭蓋骨を 20mM の無機リン (NaPO<sub>4</sub>) を含む培養液中で 3 日間器官培養し、Fgf23 mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。無機リン添加または非添加

群で、Fgf23 mRNA 発現に差は認められなかった (図 2)。

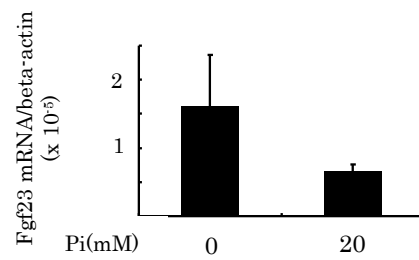


図 2 頭蓋骨器官培養における無機リンの Fgf23 mRNA 発現に対する作用

(3) さらに、無機リンの Fgf23 遺伝子発現に対する作用を調べるために、同様の実験を細胞培養系で行った。VitaminD 処理等により Fgf23 発現が上昇することが知られる osteosarcoma 由来骨芽細胞株 UMR-106 細胞の培養液中の無機リン濃度を変化させ、培養 2 日後に Fgf23 mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。培養液中の無機リン濃度を 5~20mM まで変化させても、Fgf23 遺伝子発現に差は認められなかった (図 3)。

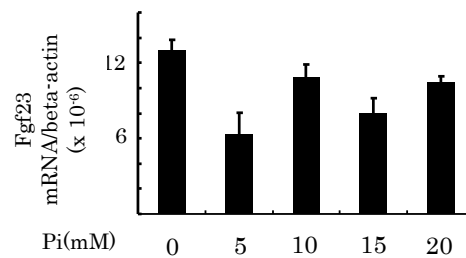


図 3 UMR-106 細胞における無機リンの Fgf23 mRNA 発現に対する作用

逆に、細胞内への無機リン輸送を阻害する Fosarnet で 2 日間 UMR-106 細胞を処理し、Fgf23 mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。高濃度の Fosarnet 処理では、Fgf23 遺伝子発現が上昇した (図 4)。

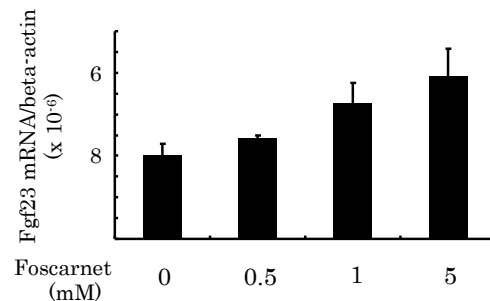


図 4 UMR-106 細胞において細胞内への無機リン輸送を阻害した場合の Fgf23 mRNA 発現の変化

以上の結果より、無機リンによる Fgf23 遺伝

子発現の調節は、骨芽細胞もしくは骨細胞に対する直接的な作用を介するものでないことが示唆された。

(4) これまでに、Vitamin D receptor (VDR) ノックアウトマウスに高リン食を摂取させても Fgf23 mRNA 発現が上昇しないことが報告されている。そこで、血中無機リンが VDR 遺伝子発現を調節するか検討した。高リン食摂取マウスの頭蓋骨における VDR mRNA 発現の変化を real-time PCR 法により経時的に調べた。高リン食摂取による VDR mRNA 発現の上昇は認められなかった (図 5)。この結果より、血中無機リンによる Fgf23 遺伝子発現の調節は、Vitamin D シグナリングに直接作用するのではなく、何らかの全身性因子と Vitamin D シグナリングのクロストークを介した機構であると予想された。

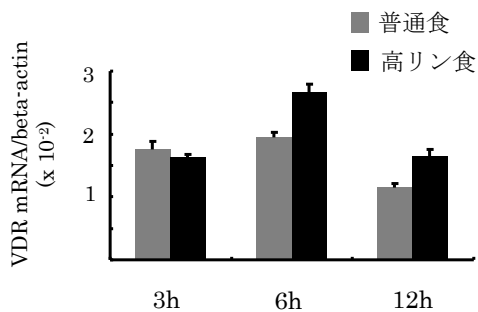


図 5 高リン負荷による VDR mRNA 発現の変化

(5) 普通食および高リン食摂取マウスの骨組織における Fgf23 タンパク質の発現を免疫組織化学法により検討した。高リン食摂取マウスの頭蓋骨では、Fgf23 陽性細胞数がやや増加していた (図 6 A)。脛骨では、Fgf23 陽性細胞数の差は両者で認められなかった (図 6 B)。

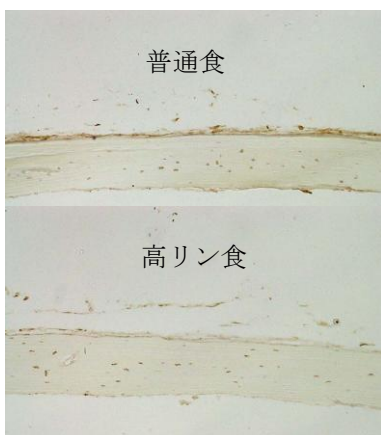


図 6 A 頭蓋骨における Fgf23 タンパク質の局在

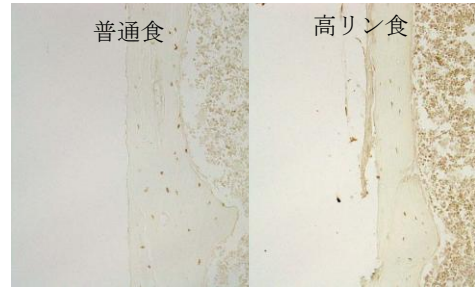


図 6 B 脛骨における Fgf23 タンパク質の局在

今後は、高リン食摂取マウス頭蓋骨の連続切片を用いて、Fgf23 タンパク質の局在を免疫染色によって詳細に検討し、その結果を 3 次元的に再構築することで、血中リン濃度変化に応答する細胞群を同定する必要があると考える。

#### 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 2 件)

① Katsube K, Tamamura Y (他 2 名、3 番目) Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. *Dev. Growth Differ.* 51, 2009, 55-67, 査読あり

② Katsube K, Tamamura Y (他 9 名、7 番目) CCN3 and bone marrow cells. *J. Cell Commun. Signal* 3, 2009, 135-45, 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA YOSHIHIRO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・口腔病理学講座・特任助教  
研究者番号：70431963

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：