

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791788

研究課題名 (和文) Klotho を標的とした局所的硬組織再生法の基礎的研究

研究課題名 (英文) A basic study of Klotho as a local factor of hard tissue reproduction

研究代表者

南崎 朋子 (MINAMIZAKI TOMOKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30452593

研究成果の概要 (和文)：

Klotho は腎臓、副甲状腺などで膜タンパクとして発現し、FGF 受容体と複合体を形成して FGF23 のリン代謝調節作用に協働するが、FGF23 が直接石灰化抑制作用を示す骨組織に Klotho は発現していない。そこで、血中を循環する切断された Klotho の細胞外ドメイン (可溶型/KLe) が骨において、ERK シグナルを介した FGF23 の作用に協働することを培養ラット頭頂骨由来骨/骨芽細胞、Klotho 変異 (*kl/kl*) マウス等を用いて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Klotho forms a complex with FGF23-FGF receptor (FGFR), which is necessary for FGF23-mediated mineralization defects, whereas Klotho is not expressed in bone. We therefore tested the hypothesis that the extracellular domain of Klotho (KLe), which is truncated and secreted into the circulation, contributes to FGF23 action in bone using rat calvaria-derived osteoblasts/osteocytes *in vitro* and Klotho-mutant mice *in vivo*. In conclusion, we demonstrated that KLe forms a complex with FGF23-FGFR in bone, resulting in hypomineralization through an FGF23-dependent ERK signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

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

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：歯学・口腔解剖学 (含組織学・発生学)

キーワード：細胞・組織、骨代謝、リン代謝、カルシウム代謝、Klotho、FGF23、石灰化、骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

1997年、挿入突然変異によって早期老化症状を呈する *klotho* 変異マウス (*kl/kl* マウス) が樹立された。*kl/kl* マウスは3-4週齢で成長が止まり、寿命の短縮、骨密度低下など

頭著な老化症状を呈する。*klotho* 遺伝子は、これまでヒトの腎臓、中枢神経系や卵巣、精巣などで発現が確認されているが、*kl/kl* マウスで強い変異症状のみられる骨・皮膚などでの発現が観察されていない。

その後、さまざまな腎疾患患者において Klotho の変異が確認され、腎疾患と Klotho との関連性が注目されるようになった。一方、2000 年に遺伝性・腫瘍性骨軟化症の原因因子として同定された線維芽細胞増殖因子 (FGF)23 のノックアウトマウスが *kl/kl* マウスとよく似た表現形を呈することが明らかとなり、2006 年には Klotho が FGF23 のシグナル伝達に必須であると報告された (Urakawa et al, Nature 2006)。FGF23 は近位尿細管においてリンの再吸収を抑制する作用がある低リン血症因子であり、FGF23 の同定以降、これまで 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> と副甲状腺ホルモン (PTH) のみでは説明できなかったリン酸代謝調節機構への FGF23 の深い関連性が次々と報告されているが、その機能発揮に Klotho が不可欠という事実は、Klotho もまた重要なリン酸代謝調節因子であることを示している。これらのことから、骨で Klotho の発現が認められないことも踏まえ、*kl/kl* マウスで確認されている骨密度低下は腎臓でのリン再吸収促進による高リン血症の影響であるという考えが主流となりつつあった。

一方、同年、私たちのグループはアデノウイルスによる過剰発現モデルを用いて、FGF23 が培養骨芽細胞の石灰化を抑制することを報告していた (Wang et al, J Bone Miner Res, 2007)。これまで腎臓でのシステミックなリン代謝調節によって骨軟化症を発症すると考えられていた FGF23 が、骨で発現して骨で石灰化を直接抑制するという私たちの報告は多大な注目を集めた。

## 2. 研究の目的

私たちは既に、培養骨芽細胞においても近位尿細管と同様、FGF23・FGFR 受容体 (FGFR)・Klotho の 3 者によって複合体を形成することが FGF23 のシグナル伝達に必須であることを確認している。また、無血清培養下ではこの複合体形成がみられず、リコンビナントタンパク FGF23 (rFGF23) による石灰化抑制作用も rKlotho の添加が必要であることを確認した。これらの結果から、骨で Klotho の発現が確認されていないことを鑑みても、腎臓など他組織で発現する膜型 Klotho の細胞外ドメインが切断されて骨組織へ循環してくる可能性があるかと推察できる。このホルモン様の働きをする可溶性型 Klotho (KLe) の発現動態、KLe の下流のシグナル・機能発揮のメカニズム解明が、今後硬組織再生方法を築く上で重要な役割を担うものと考えた。

## 3. 研究の方法

- ① ラット頭蓋冠由来培養骨芽 (RC) 細胞に KLe および rFGF23 を添加し、免疫沈降および Western blotting により KLe-FGFR-FGF23 の複合体形成の有無、Western blotting により FGF23 の特異的シグナルである ERK のリン酸化を確認した。また、野生型または *kl/kl* マウスの血清を用いて培養した RC 細胞に FGF23 および KLe を添加し、石灰化への影響をアルカリフォスファターゼ/Von Kossa 染色によって解析した。野生型または *kl/kl* マウス頭蓋骨より骨芽細胞を回収し、通常培地で培養した際の増殖・分化・石灰化の違いを検討した。野生型または *kl/kl* マウス頭蓋骨を器官培養し、無血清下で rFGF23 単独または rFGF23 と KLe 併用投与し、rFGF23 のシグナル伝達を調べた。
- ② *kl/kl* マウス (d10, ♂) に 2 日おきに KLe を皮下注射し (途中 2 度のカルセイン腹腔内投与)、d22 にサンプリングして血中リン、カルシウム、1, 25D および FGF23 濃度を測定した。また、腎臓におけるナトリウム依存性リン酸トランスポーター (NaPi2a, 2c) および 1, 25D 合成酵素 (Cyp27b1) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にて調べた。また、頭頂骨を H&E 染色および Electron Probe Micro Analysis により組織学的に解析し、カルセイン二重標識で新生骨形成を比較した。大腿骨は 3 次元  $\mu$ CT により解析を行った。また、頭頂骨および腎における ERK のリン酸化を Western blotting と蛍光免疫染色を用いて確認した。

## 4. 研究成果

- ① rFGF23 と KLe の併用時においてのみ KLe-FGFR-FGF23 の複合体形成が確認され、ERK のリン酸化が認められた。また、*kl/kl* マウス由来血清および免疫沈降による KLe 欠失血清培養下では、rFGF23 による石灰化抑制作用がみられず、そこに KLe を添加すると rFGF23 の作用が回復した。しかし、通常培地培養下において、野生型および *kl/kl* マウス頭蓋骨由来骨芽細胞の増殖・分化・石灰化に有意な差はみられなかった。*kl/kl* マウス頭蓋骨器官培養において、rFGF23 のシグナル伝達には KLe 投与が不可欠であった。
- ② *kl/kl* マウスは血中リン、カルシウム 1, 25D および FGF23 濃度のいずれも高値を示したが、KLe 投与による変動はみられなかった。腎臓の各 mRNA 発現も KLe

投与で差はみられなかった。*kl/kl*マウスにKLeを投与すると、頭頂骨では新生骨石灰化が抑制され、類骨の拡大が確認された。さらに、大腿骨では海綿骨、皮質骨の骨量減少および骨端軟骨の劣成長を認めた。また、KLeによるERKのリン酸化は頭頂骨でのみ確認された。

以上の結果から、KLeは発育過程において骨の石灰化に直接関与するホルモンと考えられ、頭蓋骨形成と腎機能に密接に関連すると示唆された。現在腎臓での作用が主に報告されているKlothoの骨組織における機能を追求した今回の研究成果は、骨を含む硬組織石灰化一般だけでなく、病的石灰化機構の解明へと応用が期待される。

#### 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3件)

1. Yoshiko Y, Oizumi K, Hasegawa T, Minamizaki T, Tanne K, Maeda N, Aubin JE. A subset of osteoblasts expressing high endogenous levels of PPAR $\gamma$  switches fate to adipocytes in the rat calvaria cell culture model. PLoS One 26, 5(7), e11782, 2010. 査読有
2. Yamamoto R, Minamizaki T, Yoshiko Y, Yoshioka H, Tanne K, Aubin JE, Maeda N.  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D $_3$  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
3. 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

[学会発表] (計11件)

1. Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, Nobukiyo A, Sotomaru Y, Suzuki A, Ito M, Maeda N. 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, Canada, Oct 17, 2010.
2. Minamizaki T, Yoshiko Y, Konishi Y, Yoshioka H, Kozai K, Aubin JE, Maeda

N. 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, Canada, Oct 15-16, 2010.

3. 錦織亜矢, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 前田憲彦. III型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター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. 可溶性Klothoは骨におけるFGF23の作用発現にリクルートされる. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 7月23日, 2010年.
5. 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型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター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, 北島聖子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦. 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- $1\alpha, 25$ -dihydroxy -vitamin D $_3$ -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D $_3$ 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, 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石灰化不全を来す 第42回広島大学歯学会総会, 広島, 6月20日, 2009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, 香西克之, 渡邊和晃, 前田憲彦

権利者: 広島大学, ラファイ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

南崎 朋子 (MINAMIZAKI TOMOKO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号: 30452593

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし