

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16193

研究課題名（和文）血中リン濃度の感知機構とFGF23発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of sensing blood phosphorus levels and regulation of FGF23 expression

研究代表者

三浦 裕（Miura, Yutaka）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20823678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：生体は血中リン濃度の恒常性を主に腎臓からの排泄によって適切に維持している。血中リン濃度の上昇は骨が感知してリン利尿ホルモン、FGF23の発現を上昇、血中に分泌し腎臓に作用させることでリン排泄が促進されるが、骨によるリン感知メカニズムとFGF23発現上昇の機序は未解明である。本研究では、申請者らが見出した、骨はリン自体ではなく、リン濃度の上昇に伴って形成されるリン酸カルシウムを感知してFGF23の発現を上昇させているという新知見に基づき、骨によるリン（リン酸カルシウム）感知メカニズムの解明と、それに続くFGF23発現上昇に至るまでの分子基盤を解明することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内のリン感知機構についてはリン代謝異常をきたす動物モデルや、関連すると考えられる遺伝子を欠損させた培養細胞などを用いてこれまで多くの研究がなされてきたが、その受容体などそのメカニズムの実態解明には至っていない。本研究では骨においてリン酸カルシウムのシグナルを検討するという点において独創的であり、最先端の研究と位置付けることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The body maintains proper blood phosphorus homeostasis mainly through renal excretion.

Elevated blood phosphorus concentrations are sensed by bone, which increases expression of the phosphorus diuretic hormone, FGF23, which is secreted into the blood and acts on the kidneys to promote phosphorus excretion, but the mechanism of phosphorus sensing by bone and the mechanism of increased FGF23 expression is not yet understood.

In this study, we aim to elucidate the phosphorus sensing mechanism by bone and the molecular basis for the subsequent increase in FGF23 expression, based on the new finding by the applicants that bone senses calcium phosphate, which is formed when phosphorus levels increase, rather than phosphorus itself, and upregulates FGF23 expression. The objective of this project is to elucidate the phosphorus sensing mechanism by bone and the molecular basis for the subsequent increase in FGF23 expression.

研究分野：リン代謝

キーワード：リン FGF23

1. 研究開始当初の背景

生体は血中リン濃度の恒常性を腸管吸収、骨からの動員、そして腎排泄によって適切に維持している。通常、健常者では食事などによる一過的な血中リン濃度の上昇を骨が感知し、リン利尿ホルモンである FGF23 (fibroblast growth factor-23) を分泌、その腎臓への作用により余剰なリンは排泄され、血中リン濃度の恒常性が維持される。申請者らは、Klotho 蛋白質 (以下、Klotho) の発現が著しく減弱することで高リン血症を含む老化様表現型を呈する Klotho マウスを報告 [Nature 390: 45 (1997)]、このマウスの性状を解析する中で、Klotho と FGF 受容体の複合体が腎臓においてリン利尿因子、FGF23 の受容体として機能することを示し、世界に先駆けて生体のリン恒常性維持機構に関する新たな機序を解明した [J Biol Chem. 281: 6120 (2006)]。Klotho マウスと同様に、腎臓からのリン排泄能に障害がある慢性腎臓病患者や腎機能を喪失している透析患者では、食事などからのリンの摂取は血中リン濃度の上昇につながる。そしてこのとき、過剰となった血中リンは、カルシウムと結合しリン酸カルシウムを形成、このリン酸カルシウムの過剰な蓄積による細胞傷害は、炎症反応やその反応に引き続く血管石灰化を誘発し、その後の心血管イベントリスクの発症・進展の一因になると考えられている。生体は、このリン酸カルシウムによる直接的な細胞毒性に対して、血液中に大量に存在する Fetuin-A 蛋白質 (以下、Fetuin-A) によりリン酸カルシウムを吸着し Calciprotein Particle (以下、CPP) というコロイド粒子として分散させるという防御機構を備えている。実際に Fetuin-A を欠損したマウスへの過剰なリン負荷は、全身での血管石灰化を誘発することが示されている [J Clin Invest. 112: 357 (2003)]。申請者は、リン酸カルシウムを特異的に認識し結合するビスホスホネートの特性を応用し、ヒトだけでなく様々な動物種の血中 CPP の高感度測定を可能にする方法を開発し、その報告の中で、健常者においても CPP が存在すること、透析患者ならびに血中リン濃度の高い CKD 患者の血中において CPP が顕著に上昇しており、またその CPP の性質が異なるものが存在すること、申請者らが世界に先駆けて報告したリン代謝恒常性破綻マウスである Klotho マウスにおいて異常上昇している血中 CPP が、低リン食 (0.1% リン含有) を与えることで、血中リン濃度の低下とともに減少することを明らかにした [Sci Rep. 8: 1256 (2018)]。さらに CPP の性質を研究していく過程で、形成過程のごく早期の微小なリン酸カルシウムと Fetuin-A の複合体 (CPP の一種である、Calciprotein Monomer : CPM) が強力に FGF23 を誘導していることを明らかにした [Kidney Int. 97(4): 702 (2020)]。

2. 研究の目的

これまで、骨は血中リン濃度上昇を何らかの機構で感知し、FGF23 発現を上昇させると考えられてきたが、その詳細は不明であった。申請者は骨はリン濃度の上昇ではなく、それに伴って起きる、リン酸カルシウムの形成を感知していることを明らかにした。この機構により、FGF23 を分泌してリン排泄を促し、リン濃度の上昇を抑えることで、リン酸カルシウムをこれ以上形成させないようにしていると考えられる。しかしながら、血中リン酸カルシウムを骨がどのように感知しているのか、そのメカニズムは不明である。このメカニズムの解明は生理学的観点だけでなく、リン代謝破綻に起因する疾患の発症と重篤化を予防・治療する手法を開発するという医学・薬学的観点からも重要な研究課題と考えられる。それゆえ、本研究課題の目的は、申請者が見出した予備的知見などに基づき、これまで未解明であった、リン (リン酸カルシウム) 感知と FGF23 発現制御機構の解明である。

3. 研究の方法

- 1) CRISPER スクリーニングによる骨芽細胞におけるリン酸カルシウム感知メカニズムの解析
これまでの検討により、骨芽細胞の形質を有する細胞株 UMR106 細胞は適切なリン酸カルシウム刺激によって FGF23 を発現上昇させることを確認している。この細胞を用いて、CRISPER/Cas9 システムを用いたゲノムワイドスクリーニングによりリン酸カルシウム刺激による FGF23 発現上昇の分子メカニズムに関与するものを同定する。具体的には、既に樹立済みである C 末端が GFP で蛍光標識された変異型 FGF23 を発現する UMR106 細胞株に対して、リン酸カルシウム刺激によって GFP の蛍光が細胞内で増加することを確認し、リン酸カルシウムシグナルを評価可能な系を構築した。その細胞を Cas9 を恒常的に発現するよう改変した後に、gRNA ライブラリーを導入、リン酸カルシウム刺激後に GFP の蛍光が誘導されていない細胞を FACS で検出、ソートする。ソートされた細胞のノックアウトされた遺伝子は gRNA ごとにバーコード配列がラベルされているため、次世代シーケンス解析によって同定可能となっている。この解析によって、リン酸カルシウム刺激を感知する機構、FGF23 発現上昇のシグナル伝達機構に関する遺伝子の候補をスクリーニングする。
- 2) スクリーニング結果の検証

CRISPER スクリーニングによって得られた情報をもとにリン酸カルシウム刺激を感知する機構、FGF23 発現上昇のシグナル伝達機構の詳細を検討する。具体的には、ヒットした遺伝子を個別に再度デザインした複数の gRNA を用いて再現性等を確認する。また、リン酸カルシウムが特定の受容体を介して作用していれば、その受容体を同定することも期待される。受容体が同定された場合には受容体を精製し、分子間相互作用解析装置などによりその特性を解析する。

4 . 研究成果

スクリーニングによって得られた情報をもとにリン酸カルシウム刺激を感知する機構、FGF23 発現上昇のシグナル伝達機構の詳細を現在解明中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shiizaki Kazuhiro, Tsubouchi Asako, Miura Yutaka, Seo Kinya, Kuchimaru Takahiro, Hayashi Hirosaka, Iwazu Yoshitaka, Miura Marina, Battulga B, Ohno N, Hara T, Kunishige R, Masutani M, Negishi K, Kario Kazuomi, Kotani Kazuhiko, Yamada T, Nagata D, Komuro Issei, Itoh Hiroshi, Kurosu Hiroshi, Murata Masayuki, Kuro-o Makoto	4. 巻 131
2. 論文標題 Calcium phosphate microcrystals in the renal tubular fluid accelerate chronic kidney disease progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI145693	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 Anzai Fumiya, Karasawa Tadayoshi, Komada Takanori, Yamada Naoya, Miura Yutaka, Sampilvanjil Ariunaa, Baatarjav Chintogtokh, Fujimura Kenta, Matsumura Takayoshi, Tago Kenji, Kurosu Hiroshi, Takeishi Yasuchika, Kuro-O Makoto, Takahashi Masafumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Calciprotein Particles Induce IL-1 / ?Mediated Inflammation through NLRP3 Inflammasome-Dependent and -Independent Mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 602 ~ 614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2100066	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 Hashimoto Yusaku, Kato Sawako, Kuro o Makoto, Miura Yutaka, Itano Yuya, Ando Masahiko, Kuwatsuka Yachiyo, Maruyama Shoichi	4. 巻 27
2. 論文標題 Impact of etelcalcetide on fibroblast growth factor 23 and calciprotein particles in patients with secondary hyperparathyroidism undergoing haemodialysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 763 ~ 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nep.14081	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 Nakamura Kimihiko, Isoyama Naohito, Nakayama Yuki, Hiroyoshi Toshiya, Fujikawa Koki, Miura Yutaka, Kurosu Hiroshi, Matsuyama Hideyasu, Kuro-o Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between amorphous calcium-phosphate ratios in circulating calciprotein particles and prognostic biomarkers in hemodialysis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-17405-7	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 Akiyama Ken-ichi, Moriyama Takahito, Hanafusa Norio, Miura Yutaka, Seki Momoko, Ushio Yusuke, Kawasoe Kentaro, Miyabe Yoei, Karasawa Kazunori, Sugiura Hidekazu, Uchida Keiko, Okazaki Masayuki, Komatsu Mizuki, Kawaguchi Hiroshi, Kuro-o Makoto, Nitta Kosaku, Hoshino Junichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Citric acid-based bicarbonate dialysate attenuates aortic arch calcification in maintenance hemodialysis patients: a retrospective observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 367 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40620-022-01470-2	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 Mukai Hideyuki, Miura Yutaka, Kotani Kazuhiko, Kotoda Atsushi, Kurosu Hiroshi, Yamada Toshiyuki, Kuro-o Makoto, Iwazu Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 The effects for inflammatory responses by CPP with different colloidal properties in hemodialysis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26166-2	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 Battulga Batpurev, Shiizaki Kazuhiro, Miura Yutaka, Osanai Yasuyuki, Yamazaki Reiji, Shinohara Yoshiaki, Kubota Yoshiyuki, Hara Toru, Kuro-o Makoto, Ohno Nobuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Correlative light and electron microscopic observation of calcium phosphate particles in a mouse kidney formed under a high-phosphate diet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28103-3	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------