

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：23791216

研究課題名(和文) 型ナトリウム - リン酸共輸送担体 Pit-1 のリン酸再吸収への関与

研究課題名(英文) Involvement of the type III sodium phosphate cotransporter Pit-1 in phosphate reabsorption

研究代表者

山崎 美和(若林美和)(Yamazaki, Miwa)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：50455549

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): 型ナトリウム リン酸共輸送担体であるPit-1は、ユビキタスに発現しており、無機リン酸の細胞内輸送に関わる共輸送担体であるが、その機能については不明な点が多い。筆者らは、細胞外無機リン酸シグナルとリン酸利尿因子であるFGF23により惹起されるシグナルが、Pit-1とFGF受容体を介して下流のカスケードを共有することを明らかにした。今回、ヒトのX染色体優性低リン血症性くる病のモデルであるHypマウスから骨芽細胞、骨細胞を単離し、Hypマウスにおける骨芽細胞、骨細胞における出生後のPit-1の発現レベルの増加は、血清リン値の低下に伴った代償的作用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Type III sodium phosphate cotransporter, Pit-1, is ubiquitously expressed in mammalian tissues and plays a role as intracellular phosphate transporter, although the function of Pit-1 remains unclear. We have reported that extracellular phosphate and FGF23, a phosphaturic hormone, trigger the signal transduction via Pit-1 and FGF receptor and the signaling shares the same downstream cascade and interacts. In the current study, we have isolated the cells of osteoblasts and osteocytes lineage from Hyp mice, a murine model for X-linked hypophosphatemia, and wild type mice, and obtained the Fgf23 and Pit-1 expression profiles. Increased Pit-1 expression in osteoblasts and osteocytes from adult Hyp mice may be a compensatory mechanism to adapt to the decrease in extracellular Pi levels after birth.

研究分野：小児科学

キーワード：Pit-1 リン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類においては三つのクラスのナトリウム-リン酸 (Na^+/Pi) 共輸送担体が同定されている。I型は有機イオンの輸送に関わっており、IIa型 (*Npt2a*) と IIc型 (*Npt2c*) は腎臓におけるリン酸再吸収を担っており、IIb型は小腸でのリン酸吸収に関わっている。III型の Na^+/Pi 共輸送担体である *Pit-1*、*Pit-2* はユビキタスに発現しており、細胞における無機リン酸の輸送を担い、細胞のリン恒常性を維持するハウスキーピング的な役割を担うと考えられてきた。

FGF23は骨で産生され、腎臓で作用するリン酸利尿因子であり、*Npt2a* と *Npt2c* の腎臓での発現を低下させ、リン再吸収を抑制するが、*Pit-1* との関係については明らかでない。また FGF23は 1α 位水酸化酵素の発現抑制を介して $1,25$ 位水酸化ビタミン D の血中濃度を低下させることにより、腸管からのリンの吸収を減少させ、その結果血中リン濃度を低下させる。

Npt2a と *Npt2c* のダブルノックアウトマウスにおいては、重篤な低リン血症をおよび石灰化障害をきたすが、腎臓でのリン酸再吸収能が残存しており、これは他の Na^+/Pi 共輸送担体が関与していることを示唆する。*Pit-1* は *Npt2a* や *Npt2c* と異なり、広い範囲の pH で作用することができ、高リン血症、低リン血症のような病的状態においても *Npt2a* や *Npt2c* が作用できないときでも *Pit-1* が代償的な役割を担う可能性がある。

リン恒常性維持に関わる種々の Na^+/Pi 共輸送担体の機能分担や代償機構の存在を明らかにするため本研究を計画した。

2. 研究の目的

Pit-1 のリン恒常性維持機構への関与について、動物を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

X連鎖性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets; XLH) のモデルで、*Phex* 遺伝子に変異を有し、高 FGF23 血症を呈する *Hyp* マウスを解析に用いた。20週齢の野生型マウスおよび *Hyp* マウスの長管骨を微細化し、コラゲナーゼによる消化と EGTA による脱灰を反復することにより骨芽細胞と骨細胞を単離し、RNA を回収した。また単離した骨芽細胞、骨細胞を I 型コラーゲンにて包埋し $1, 10$ mM リン酸刺激下で 24 時間培養し RNA を回収した。マウス骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 は 10% FBS を含む α -MEM を使用し培養した。

各リン代謝関連遺伝子の発現は total RNA 抽出後 cDNA を合成し Applied 社の TaqMan Gene Expression assay を使用し real-time PCR により検討した。また血清 FGF23 値の測定には Kainos 社の FGF23 ELISA キットを使用した。

4. 研究成果

XLH のモデルである *Hyp* マウスの 20 週齢の雄性ヘミ個体および雌性ヘテロ個体を用いて血清 FGF23 値の測定を行ったところ、野生型マウスと比較して著明に上昇しており、低リン血症を認めた。ヘミ個体とヘテロ個体の間で血清リン値と FGF23 値の間に差は認めなかった。野生型マウスおよび *Hyp* マウスの長管骨より骨芽細胞と骨細胞を単離し、Real-time PCR により *Fgf23* の発現を解析したところ、どちらのマウスにおいても骨細胞での発現が骨芽細胞と比較し有意に上昇していた。また *Hyp* マウス骨細胞では野生型マウス骨細胞より *Fgf23* の発現が増加してはいたが、血清 FGF23 値の増加ほどではなかった。*Pit-1* の発現は、*Hyp* マウスにおいて骨芽細胞、骨細胞ともに野生型マウスより有意に上昇していた。同じく III 型の Na^+/Pi 共輸送担体である *Pit-2* は野生型マウス、*Hyp* マウスの骨芽細胞、骨細胞において発現が低かった。また IIa, IIb, IIc 型の Na^+/Pi 共輸送担体の発現も検討したが、野生型、*Hyp* マウスとも骨芽細胞、骨細胞において発現が低かった。

Hyp マウスの骨における *Fgf23* や *Pit-1* の発現上昇がいつ生じるのかを確認するため、胎生 18.5 日の野生型および *Hyp* マウス胎児より骨と血清を回収し、血清 FGF23 値とリン値を測定した。血清 FGF23 値は *Hyp* マウス胎児にて著明に上昇していたが、血清リン値は野生型胎児と *Hyp* マウス胎児において差はなかった。*Hyp* 胎児骨においては *Fgf23* の発現が野生型マウス胎児骨より上昇しており、骨における *Fgf23* の発現上昇が出生前に起こることが示された。しかし *Pit-1* は野生型および *Hyp* マウスにおいて胎生 18.5 日では発現量に差はなく、4 週齢で *Hyp* 胎児骨において野生型マウス胎児骨よりわずかに上昇していた。

次に、単離した初代骨芽細胞、骨細胞をタイプ I コラーゲンゲルで包埋し、 $1, 10$ mM リン酸刺激下で 24 時間培養し、細胞外無機リン酸の直接的な影響を検討した。*Fgf23* と *Pit-1* の発現を検討した結果、*Hyp* マウス由来の骨細胞では *Pit-1* の発現が野生型マウス由来の骨細胞より 24 時間培養後も発現が上昇していたが、*Fgf23* の発現は 24 時間後には *Hyp* マウス由来の骨細胞と WT マウス由来の骨細胞で差がなかった。高濃度のリン酸刺激において *Pit-1* と *Fgf23* は、野生型マウス、*Hyp* マウスどちらにおいても、また骨芽細胞、骨細胞においても発現の変化は見られなかった。よって次に、マウス骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 を使用し、より長期的なリン酸刺激による影響を検討した。MC3T3-E1 細胞を $0.5, 4$ mM リン酸存在下で 14 日間培養後、RNA を回収した。*Pit-1* の発現は、 0.5 mM リン酸刺激と比較し 4 mM リン酸刺激では有意に発現が低かった。

今回の検討から 20 週齢の *Hyp* マウスにおける骨芽細胞と骨細胞における *Pit-1* の発現レベルの上昇は、出生後の血清リン値の低下に伴って代償的に増加したことが示唆された。今後、ゲノム上の任意の位置に遺伝子改変を誘導するゲノム編集技術を使用し、*Pit-1* を完全にノックアウトした骨芽細胞株を樹立し、骨芽細胞、骨細胞におけるリン代謝関連遺伝子の発現制御における *Pit-1* の役割について検討していく予定である。

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 5 件)

- ① Yamazaki M, Kawai M, Miyagawa K, Ohata Y, Tachikawa K, Kinoshita S, Nishino J, Ozono K, Michigami T. Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. *J Bone Miner Metab.* 2015 May;33(3):342-54. 査読有 doi:10.1007/s00774-014-0598-2.
- ② Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. *PLoS One.* 2014 Apr 7;9(4):e93840. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0093840. eCollection 2014.
- ③ Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res.* 2014 Jul;29(7):1627-38. 査読有 doi:10.1002/jbmr.2186.
- ④ Kondou H, Kawai M, Tachikawa K, Kimoto A, Yamagata M, Koinuma T, Yamazaki M, Nakayama M, Mushiake S, Ozono K, Michigami T. Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 functions as a regulator of protein synthesis during liver development. *Hepatol Res.* 2013 Nov;43(11):1211-23. 査読有 doi:10.1111/hepr.12069.

- ⑤ Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T. FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble α -Klotho both in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2414-27. 査読有 doi:10.1074/jbc.M112.410043.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Koshimizu T, Nishino J, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Activation of FGF/FGF receptor signaling in the primary osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2014.9.12-15. Houston, USA.
- ② Nishino J, Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Extracellular inorganic phosphate functions as a potent inducer of the *Dmp1* expression. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2014.9.12-15. Houston, USA.
- ③ Nishino J, Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Activation of FGF/FGF receptor signaling in Hyp osteocytes. The 24th Annual Meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. 2014.9.7-10. Queenstown, New Zealand.
- ④ 西野仁, 宮川和晃, 山崎美和, 川井正信, 大幡泰久, 立川加奈子, 高垣裕子, 古郷幹彦, 大藪惠一, 道上敏美. Hyp マウス骨細胞における FGF/FGF receptor シグナルの活性化. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会. 2014.7.24-26. 大阪,
- ⑤ Yamazaki M, Miyagawa K, Ohata Y, Kawai M, Ozono K, Michigami T. Osteoclastic Bone Resorption might be Involved in the Secretion of FGF23 into Circulation. The 34th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2012.10.12-15 : Minneapolis, USA.
- ⑥ 山崎美和, 宮川和晃, 大幡泰久, 川井正

信, 大藪恵一, 道上敏美. FGF23 の血中
分泌過程における破骨細胞性骨吸収の関
与の可能性. 第 30 回日本骨代謝学会.
2012.7.19-21. 東京

〔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：
出願年月日：
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

山崎 美和(若林美和) (YAMAZAKI, Miwa)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立母子保健総合医療センター (研究
所)・環境影響部門・流動研究員
研究者番号：50455549

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし