

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390406

研究課題名(和文)骨細胞を中心としたFGF23-klothoシステムによる骨基質石灰化の調節機構

研究課題名(英文)Regulation of bone minerals by FGF23/klotho axis related to osteocytic function

## 研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30242431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：FGF23/klotho軸が破綻し血中リン濃度が上昇したkl/klマウスおよび klotho<sup>-/-</sup>マウスを解析したところ、骨基質石灰化が亢進するのではなく、骨細胞周囲の骨基質ミネラルが流失していた。低リン食飼育したkl/klマウスでは、骨組織異常が改善されたが、klotho<sup>-/-</sup>マウスでは骨組織の改善は認められなかった。さらに、低リン食を与えたkl/klマウスでは、腎臓の klothoの発現がある程度、回復していた。よって、FGF23/klotho軸の破綻で生じる骨細胞周囲の基質石灰化異常は、血中リン濃度異常によるものではなく、別の要因で生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Signaling linked to klotho/FGF23 is predominantly found in the proximal renal tubules, where it inhibits Pi reabsorption and 1 $\alpha$ -hydroxylase activity. Therefore disrupted function of FGF23/ klotho in kl/kl mice and klotho-deficient ( klotho<sup>-/-</sup>) mice results in hyperphosphatemia and hypercalcemia. Despite of elevated concentration of serum Pi, bone minerals around several osteocytes were disappeared. Kl/kl mice fed with low Pi diet showed improved bone matrix, but, klotho<sup>-/-</sup> mice still demonstrated patched unmineralized areas in the periphery of the osteocytes. In the kidney of kl/kl mice fed with low Pi diet showed increased expression of klotho. Therefore, it seems likely that improved histology in bone in kl/kl mice may be due to increased expression of klotho, but not normalized concentration of serum Pi.

研究分野：細胞組織学、骨代謝学

キーワード：骨細胞 FGF23 klotho 骨基質 石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

骨細胞が産生する因子として、骨芽細胞を抑制する sclerostin、石灰化結晶(結晶性カルシウム)と結合する DMP-1、血中リン濃度を調節する FGF23 が報告されている。特に、FGF23 は近位尿細管の受容体である FGFRc1/klotho 複合体に結合し、尿細管における NaPi IIa/IIc および 1 $\alpha$ -hydroxylase を制御することでリンの再吸収と 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  産生を抑制する。リン濃度調節については、骨細胞から分泌された FGF23 が循環系を介して、血中リン・カルシウムを調節するといった臓器としての骨の役割が想定されてきた。その一方で、我々は、成熟骨(皮質骨)における規則的な幾何学配列を示す骨細胞・骨細管系がより機能的であり、多量の FGF23 や sclerostin を分泌することを報告してきた(Hirose, Amizuka et al., 2007, Ubaidus, Amizuka et al., 2009; Masuki, Amizuka, et al., 2010, Haga, Amizuka et al., 2011, Sagawa, Amizuka et al., 2009)。このことは、FGF23 を産生する骨細胞は、無秩序に FGF23 を産生するのではなく、骨基質あるいは骨細胞の状態などに影響されることを示唆していると考えられる。このような FGF23/klotho における骨への影響は、全身のリン調節だけによるものか、あるいは、FGF23/klotho の別の作用経路があるのかが不明のままであり、特に、リンを材料としている骨基質石灰化(リン酸カルシウム)との関連性に興味を持たれたため、以下の研究目的・計画を立てた。

## 2. 研究の目的

FGF23/klotho 軸の破綻により、骨組織ではどのような機序で石灰化異常が生じるのか明らかにすることを目的として、主に *in vivo* の系を用いて、以下にあげる3つの点について組織化学、微細構造学的に検索した。

その解析方法として、*klotho*<sup>-/-</sup>マウス(*kl/kl* マウス:klotho 遺伝子のプロモーター領域に変異が生じたため転写活性が著しく低下したマウス)や *aklotho*<sup>-/-</sup>マウス(gene targeting 法により *aklotho* 遺伝子そのものを排除したマウス)などを用いて、正常食および低リン・低カルシウム食などを与えることで、組織化学的に検索することとした。以下、研究申請書を提出したときの、研究計画を示めす。

平成24年度: FGF23/klotho システムが血中リン濃度を介して骨基質石灰化を調節する機序

平成25年度: FGF23/klotho システムが骨細胞に直接作用して骨基質石灰化を調節する機序

平成26年度: 骨細胞が周囲の石灰化基質ミネラルを調節する機序

## 3. 研究の方法

上記の目的に応じて、以下の方法にて研究を行った。

### (1) 平成24年度

血中リン濃度上昇が骨基質石灰化を直に調節する可能性を検索した。特に、*kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup>マウスを通常食飼育した状態で血中リン・カルシウム濃度が上昇した場合の骨基質石灰を解析した。さらに、*kl/kl* マウスにおいて高頻度で発症する血管石灰化について、骨組織だけでなく付随的に検索を行った。

### (2) 平成25年度

*kl/kl* マウスや *aklotho*<sup>-/-</sup>マウスの骨基質石灰化異常は、FGF23/klotho の破綻による血中リン濃度の上昇ではなく、それ以外の要因による可能性について検索を行う計画を立てた。それを施行するには、様々なリン・カルシウム含有餌を企業委託で調整してもらい、*kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup>マウスに与えて、血中の正常または低リン状態を誘導した状況で、骨基質石灰化をはじめとする異常を解析した。また、血管石灰化についても付随的に組織化学解析を行った。血中リン濃度が高い値を示さないにもかかわらず、骨基質石灰化に異常が発症すれば、血中リン濃度の影響である可能性が大きく低下すると考えられる。

### (3) 平成26年度

FGF23/klotho 軸の破綻による骨基質石灰化の異常における機序が、平成24年度または25年度に掲げた細胞外リン濃度あるいは FGF23/klotho の直接作用のいずれかであったとしても、骨細胞・骨細管系が骨基質ミネラル流出・流入を調節する能力があるのかを明らかにする必要がある。特に、骨細胞周囲の骨基質が溶解する現象を認めており(Tatsumi, Amizuka et al., 2007; 本郷ら, 2011 年)、他のグループも同様

の結果を報告している(Teti A et al., 2008; Bonewald et al., 2009; Nakano, Toyosawa et al., 2004; Tazawa et al., 2004)。この検索は、Belanger の報告に基づいて PTH 投与などで、骨細胞の基質ミネラル調節の有無を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup> マウスの正常飼育および低リン・低カルシウム飼育における骨組織の異常について

平成24年度では、生後 6-7 週齢の *kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup> マウスの骨組織では、血中リン濃度・カルシウム濃度が上昇していたが、骨基質石灰化は亢進するのではなく、骨基質において局所的な石灰化ミネラルの消失が観察された。興味深いことに、石灰化している領域の骨細胞は正常な細胞構造を示していたが、石灰化ミネラルが流出してしまった領域の骨細胞自体は石灰化を受け、そこには多量の DMP-1 の蓄積が認められた(Sasaki, Amizuka et al., 2013: 図1)。

そこで、平成25年度において、低リン・低カルシウム食を与えた同週齢(生後 3.5 週以降から開始:石灰化骨基質の広範な異常は認められない)の野生型マウス、*kl/kl* マウス、*aklotho*<sup>-/-</sup> マウスに、Control 精製飼料、低リン餌・低カルシウム餌、低リン餌、低カルシウム餌、Control 精製飼料+塩酸セベラマー(3.0%)を4週間、与えた。

その結果、野生型マウスは、低リン・低カルシウムでも骨組織には異常は認めないことを確認した。通常食を与えた *kl/kl* マウスの骨組織を解析すると、前述のように、骨基質ミネラルが流出した領域が観察され、そのような領域における骨細胞は DMP-1 を過剰発現するとともに、その周囲および骨細胞自体が石灰化を受けていた。一方、低リン食群と低リン・低カルシウム食群の *kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup> マウスは、依然として骨基質異常を示した。ところが、*aklotho*<sup>-/-</sup> マウスでは全く改善傾向が認められなかったのに対して、ごく一部の *kl/kl* マウスでは改善傾向を示すものもみられた。従って、平成25年度の段階では、FGF23/*klotho* 軸の崩壊による骨基質の改善は、低リン食では完全に改善することがないと判断し、可能性としては、FGF23/*klotho* の直接的な作用も存在する可能性が示唆された。しかし、

その一方で、何故、*aklotho*<sup>-/-</sup> マウスでは、改善することがなく、*kl/kl* マウスではごく一部であるが、改善傾向を示したのか、疑問が残った。

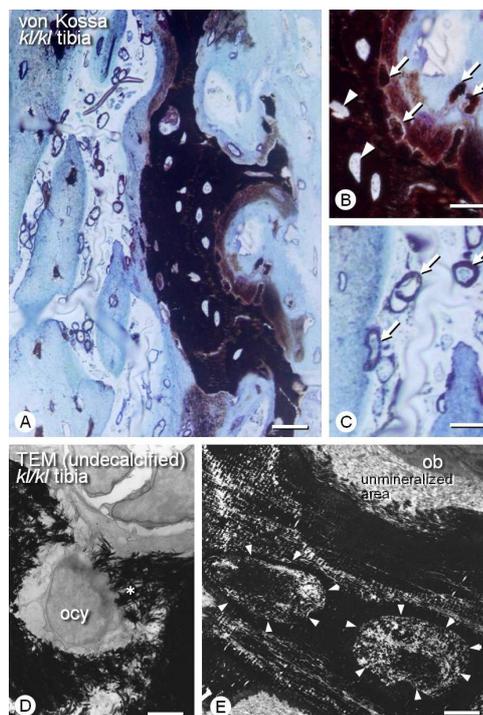


図1

平成26年度では、平成25年度の疑問を受けて、血中リン濃度低下が不十分であった可能性を考えて追加実験を行った。その方法として、生後 3,5 週齢の野生型マウス、*kl/kl* マウスおよび *aklotho*<sup>-/-</sup> マウスに 1.17%カルシウム,0.69%リン含有の通常食、または、1.17%カルシウム,0.415%リンおよびリン吸着剤である塩酸セベラマーを 3%含有した低リン食を与え、3週間飼育した。その結果、*kl/kl* マウスの多くが骨基質異常の改善を示したのに対して、*aklotho*<sup>-/-</sup> マウスでは、改善を示す傾向が認められないという差異を見出すことに成功した(図2)。



図2

具体的には、*kl/kl* マウスは正常な骨基質を示したのに対して、*aklotho*<sup>-/-</sup> マウスの骨組織では、骨細胞は多量の DMP-1 を産生していた。ただし、

その原因を明らかにするため、腎臓におけるFGFR1cおよびklothoの発現を半定量的に検索すると、低リン食を与えた $kl/kl$ マウスでは、klothoの発現が野生型マウスの約25%まで回復していたのに対して、 $\alpha klotho^{-/-}$ マウスでは、klotho発現は認められない、ということが明らかになった(図3)。

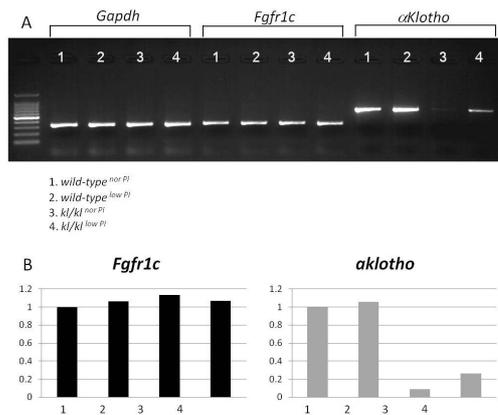


図3

以上の解析から、低リン食を与えると、血中リン濃度が低下する一方、 $kl/kl$ マウスでは、klotho産生も上昇することが推測された。また、 $\alpha klotho^{-/-}$ マウスでは低リン食による骨組織異常の改善が認められなかったことは、血中のリン濃度低下だけでは組織異常の回復につながらないこと、すなわち、FGF23/klotho 破綻は、血中リン濃度上昇だけでなく、FGF23/klotho の別の影響も存在することが示唆された。

## (2) FGF23/klotho 軸の破綻における血管石灰化について

本研究は、 $kl/kl$ マウスおよび $\alpha klotho^{-/-}$ マウスにおける付帯的実験として検索した。平成24年の解析では、 $kl/kl$ マウスの大動脈では、中膜(平滑筋層)の石灰化が von Kossa 染色および電顕観察でも認められ、それは、従来、考えられていた dystrophic な石灰化であるほか、基質小胞様の小胞構造物が観察され、その内部には石灰化結晶が含有されていた。中膜の血管平滑筋細胞はアルカリフォスファターゼ陽性、ENPP1 陽性を示した。さらに、血管石灰化が重度に発症した部位では、骨基質様の基質が形成されており、その内部には骨細胞にきわめて類似した細胞が小腔内に局在したこと、さらに、TRAP 活性陽性、かつ、cathepsin K 陽性の破骨細胞様細

胞を観察した。(図4)。

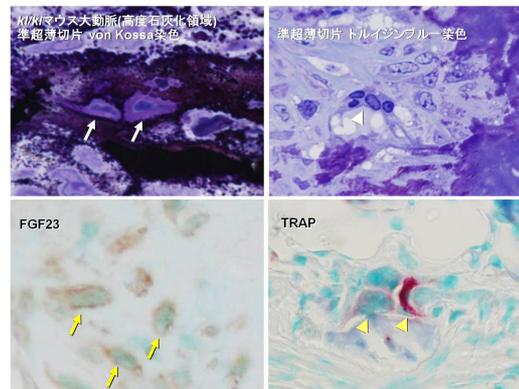


図4

そこで、低リン食を与えた  $kl/kl$  マウスの大動脈、を解析したところ、コントロール群の  $kl/kl$  マウスに比べて、大動脈の石灰化領域が減少していたものの、やはり、 $kl/kl$  マウスでは血管石灰化を観察するに至った。よって、 $kl/kl$  マウスにおける骨組織異常と血管石灰化を誘導する原因は同じではないことが考えられた。

## (3) 骨細胞が周囲の骨基質のミネラル調整を行う可能性について

骨細胞が周囲の骨基質ミネラルの調整を行うか否かについて解析を行うことを目的とした。解析方法としては、野生型マウス、 $kl/kl$  マウス、 $\alpha klotho^{-/-}$ マウス、さらに  $Rankl^{-/-}$ マウスに PTH 投与を行った。その結果、 $kl/kl$  マウスに PTH を投与しても、既に、骨細胞周囲の石灰化基質が流れ出ているため、骨細胞が周囲の骨基質ミネラルの調整を行いうる直接的な証拠を得ることは難しいと判断された。そこで、野生型マウスおよび  $Rankl^{-/-}$ マウスに PTH を投与すると、野生型マウスにおいて、一部の骨細胞注意の骨基質が流出している所見を得ることができた。この現象は、 $Rankl^{-/-}$ マウスでも同様の所見を得ることができている。

以上のことから、骨細胞は、PTH など血中のカルシウムやリン濃度に影響を与えるホルモンに反応して、周囲の骨基質ミネラルの調節を行うことが示唆された。

## 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 20 件)

1. Liu H., Guo J., Wei S., Lv S., Feng W., Cui J., Hasegawa T., Hongo H., Yang Y., Li X., Oda K., Amizuka N., Li M.: Expression of matrix Gla protein and osteocalcin in the developing tibial epiphysis of mice. *Histology and Histopathology*. 30(1):77-85, 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24956112> ( 査読有 )
2. Shiba S., Ikeda K., Azuma K., Hasegawa T., Amizuka N., Horie-Inoue K., Inoue S. : Gamma-Glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 24;453(3):350-355, 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.091. ( 査読有 )
3. Nakagawa K., Sawada N., Hirota Y., Uchino Y., Suhara Y., Hasegawa T., Amizuka N., Okamoto T., Tsugawa N., Kamao M., Funahashi N., Okano T.: Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS ONE*. 15;9(8):e104078, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0104078 ( 査読有 )
4. Sasaki M., Hasegawa T., Yamada T., Hongo H., Freitas PHL., Suzuki R., Yamamoto T., Tabata C., Toyosawa S., Yamamoto T., Oda K., Li M., Inoue N., Amizuka N.: Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in klotho-deficient mice. *Bone*. 57(1): 206-219, 2013. doi:10.1016/j.bone.2013.08.008 ( 査読有 )
5. Hasegawa T., Amizuka N., Yamada T., Liu Z., Miyamoto Y., Yamamoto T., Sasaki M., Hongo H., Suzuki R., Freitas PHL., Yamamoto T., Oda K., Li M.: Sclerostin is differently immunolocalized in metaphyseal trabeculae and cortical bones of mouse tibiae. *Biomed Res*. 34(3):153-159, 2013. doi:org/10.2220/biomedres.34.153 ( 査読有 )
6. Hasegawa T., Sasaki M., Liu Z., Yamada T., Yamamoto T., Hongo H., Suzuki R., Miyamoto Y., Yamamoto T., Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Medial vascular calcification: a new concept challenging the classical paradigm of dystrophic calcification. *Hokkaido Journal of Dental Science*. 34(1): 2-10, 2013. <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/53319> ( 査読無 )
7. Hasegawa T., Sasaki M., Yamada T., Ookido I., Yamamoto T., Hongo H., Yamamoto T., Oda K., Yokoyama K., Amizuka N.: Histochemical examination of vascular medial calcification of aorta in klotho-deficient mice. *J Oral Biosci*. 55(1):10-15, 2013. doi:10.1016/j.job.2012.12.003 ( 査読有 )
8. Kojima T., Hasegawa T., Freitas PHL., Yamamoto T., Sasaki M., Horiuchi K., Hongo H., Yamada T., Sakagami N., Saito N., Yoshizawa M., Kobayashi T., Maeda T., Saito C., Amizuka N.: Histochemical aspects for vascular invasion at the erosion zone of epiphyseal cartilage in MMP-9 deficient mice. *Biomedical Res*. 34(3):119-128, 2013. doi:10.2220/biomedres.34.119 ( 査読有 )
9. Li M., Hasegawa T., Hongo H., Tatsumi S., Liu Z., Guo Y., Sasaki M., Tabata C., Yamamoto T., Ikeda K., Amizuka N.: Histological examination on osteoblastic activities in the alveolar bone of transgenic mice with induced ablation of osteocytes. *Histology and Histopathol*. 28(1):327-335, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348386> ( 査読有 )
10. Hiramatsu R., Ubara Y., Hayami N., Yamanouchi M., Hasegawa E., Sumida K., Suwabe T., Hoshino J., Sawa N., Amizuka N., Takaichi K.: Occurrence of new bone-like tissue formation in uremic tumoral calcinosis. *Bone*. 52(2): 684-688, 2013. doi: 10.1016/j.bone.2012.10.030. ( 査読有 )
11. Amizuka N., Hongo H., Sasaki M., Hasegawa T., Suzuki R., Tabata C., Ubaidus S., Masuki H., Guo Y., Freitas PHL., Oda K., Li M.: The distribution of osteocytic lacunar-canalicular system, and immunolocalization of FGF23 and sclerostin in osteocytes. *J Oral Biosci*. 54(1):37-42, 2012. doi:10.1016/j.job.2011.06.002 ( 査読有 )
12. Amizuka N., Hasegawa T., Oda K., Freitas PHL., Hoshi K., Li M., Ozawa H.: Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci*. 4:2085-2100, 2012. doi:10.2741/526 ( 査読有 )

[学会発表] (計 33 件)

1. 本郷裕美、佐々木宗輝、齋藤雅美、虎谷彌、宇田川信之、網塚憲生: 骨細胞性骨溶解における微細構造学的・組織化学的解析. 第 16 回日本骨粗鬆症学会 2014

- 年 10 月 23-25 日 Osteoporosis Jpn. 22(suppl 1): 230, 2014. 京王プラザホテル (東京都・新宿区)
2. 彦根久美子、長谷川智香、佐々木宗輝、本郷裕美、土屋恵李佳、虎谷彌、織田公光、飯田順一郎、網塚憲生: klotho-/-マウスおよび kl/kl マウスの下顎臼歯部歯周組織における組織化学的解析. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 25-27 日 プログラム・抄録集:131, 2014. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
  3. 網塚憲生、本郷裕美、坪井香奈子、山本知真也、長谷川智香: 骨細胞・骨細管系における形態学的アプローチ. カレントコンセプト 5-1 骨代謝制御における骨細胞の役割 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24-26 日 プログラム・抄録集:163, 2014. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
  4. Amizuka N., Tsuboi K., Hasegawa T., Yamamoto T., Yokoyama A., Shindo M., Kitagawa Y.: Histopathological Examination on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ). The 9th Scientific Meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 2014.7.4-5, AAO 2014 Program & Abstracts:37, 2014. 札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)
  5. Amizuka N., Sasaki M., Kobayashi Y., Hongo H., Yamamoto T., Hasegawa T., Yurimoto H.: Localization of 15N-minodronate by Isotope Microscopy and Histochemical Assessment for the Biological Effects of Minodronate to Bone Cells in Mice. SISS-16, 2014.6.19-20 Program & Abstracts :64-65, 2014. 北海道大学創成科学研究棟(北海道・札幌市)
  6. 彦根久美子、山本知真也、織田公光、工藤明、飯田順一郎、網塚憲生: Klotho 遺伝子欠損マウスの下顎臼歯部歯槽骨における組織化学的解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27-29 日 プログラム・抄録集:112, 2014. 自治医科大学キャンパス(栃木県・下野市)
  7. 長谷川智香、山田珠希、佐々木宗輝、網塚憲生: Klotho 遺伝子変異マウスで生じた血管骨化における組織学的検索. 第 15 回日本骨粗鬆症学会 骨ドック・健診分科会 2013 年 10 月 11-13 日 Osteoporosis Jpn. 21(suppl 1): 266, 2013. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
  8. 網塚憲生、宮本幸奈、本郷裕美、佐々木宗輝、長谷川智香: オーバービュー: 骨の司令塔 - 骨細胞 -. サテライトシンポ

ジウム 12-1 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 55(suppl):102, 2013. 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

9. Hasegawa T., Ohkido I., Syoji S., Yamada T., Oda K., Yokoyama K., Amizuka N.: Disrupted signaling of FGF23/klotho induces not only vascular calcification but also vascular ossification. ANZBMS 23rd annual scientific meeting, 2013.9.8-11. 2013. (オーストラリア・メルボルン)
10. 網塚憲生、佐々木宗輝、長谷川智香、本郷裕美、田幡千尋、山田珠希、山本恒之: klotho 欠損マウスにおける骨・血管石灰化のカルシウムパラドックス. 硬組織シンポジウム「硬組織研究への顕微鏡科学の応用とその新展開」日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会 2012 年 5 月 14-16 日 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会発表抄録集 47(1):59, 2012. つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

[図書](計 3 件)

1. 網塚憲生: 口腔組織発生学 第 2 版 (脇田 稔、前田健康、中村浩彰、網塚憲生 編) 医歯薬出版株式会社 東京 総ページ数 369, 2015.
2. 網塚憲生、長谷川智香: 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会・編集 羊土社 東京 総ページ数 327, 2015.
3. 網塚憲生: 口腔科学「骨の解剖生理」(監修:戸塚靖則、高戸 毅) 朝倉書院 東京 総ページ数 1072, 2014.

[その他]

ホームページ等

[http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai\\_d/index.html](http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 3 0 2 4 2 4 3 1