

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790847

研究課題名(和文) FGF23による筋・骨格系障害の分子機序解明

研究課題名(英文) Muscle atrophy in patients with CKD results from FGF23/klotho-mediated suppression of Insulin/IGF-1 signaling

研究代表者

木戸 慎介(KIDO, Shinsuke)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30437652

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)：慢性腎臓病(CKD)患者に併存する筋・骨格系の異常(ロコモティブ症候群)は患者の日常生活動作(ADL)を制限するのみならず、その悪化は寝たきりや痴呆の原因にもなりうる極めて重篤な問題であるが、その病態の詳細については未だ不明な点が多い。申請者はAGEsがFGF23の共受容体Klothoの分子内切断を促進することにより生じたsKlothoがFGF23と協調して骨格筋におけるIGF/IRS経路を抑制し、これが当該患者における筋萎縮の原因である可能性を突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Muscle atrophy is a significant consequence of CKD that increases a patient's risk of mortality and decrease their QOL. In these patients, the circulation levels of FGF23 are significantly increased, but the relationship between FGF23 and muscle atrophy are not clear. In this study, we attempted to identify the causative factors responsible for the shedding of Klotho, and whether both FGF23 and Klotho induced muscle atrophy. As a results, we found that AGEs, an accumulated in patients with CKD, increases shedding of Klotho in kidney cells. Moreover, we demonstrated that both FGF23 and sKlotho inhibited differentiation of cultured skeletal muscle cells through down-regulation of insulin/IGF-1 signaling. These observations suggested a divergent role of FGF23 and sKlotho in the regulation of skeletal muscle differentiation and thereby muscle atrophy under the pathological conditioned in CKD patients.

研究分野：骨・ミネラル代謝

キーワード：慢性腎臓病 筋萎縮 ロコモティブ症候群 栄養 食事療法 臨床栄養 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病等の生活習慣病が増加しその合併症である慢性腎臓病 (CKD)から透析導入に移行する患者数が増加傾向にある。CKD患者では CKD-MBD と称される、骨・ミネラル代謝障害が生じ患者の生命予後をも左右する。また当該患者においてはしばしば臀部・大腿部等に筋萎縮を認める。こうした筋・骨格系障害 (ロコモティブ症候群) は患者の日常生活動作 (ADL) に多大な影響を与えるにも関わらず、他の合併症に比べてもその対策は軽視されがちである。また筋骨格系の障害は運動機能の低下及び転倒・骨折リスクを増大させることで病臥の長期化並びにさらなる筋・骨格系の萎縮 (廃用性萎縮) など負の連鎖に陥る恐れが高いことから、本症の病態解明とその予防・治療法の確立は喫緊の課題である。繊維芽細胞増殖因子 FGF23 はリン利尿因子として同定された新規液性因子である。FGF23 の病態への関与として、CKD 患者では腎機能の低下に先行して血中 FGF23 値が上昇し、時に異常高値を呈すること、血中 FGF23 値は CKD 患者の生命予後に関連することなどが報告されている。他方、FGF23 の異常高値を呈する腫瘍性骨軟化症 (TIO) では低リン血症とともに筋肉痛や筋力低下などの筋症状を呈する。これらの成績は CKD あるいはそれに併存する筋骨格系障害の発症及び進展と FGF23 の関連を示唆するが、FGF23 がリン代謝障害に加えてこれら筋・骨格系障害の惹起因子であるか否かについては全くもって不明である。

また慢性腎臓病患者では多くの症例において骨病変を認める。申請者はこれまで生理的な骨形成促進機序の解析を通じて、力学的負荷等の骨形成促進刺激は骨芽細胞系における Wnt 経路の活性化を促すこと (Kido S et al. PloS One 5(9):2010, Kido S et al. Bone 2009)、また逆にステロイド投与あるいは長期臥床等の骨形成低下性病態では同経路の

活性抑制が見られることを明らかにしてきた (Kuriwaka-Kido R, et al. Endocrinology 2013, Matsumoto T, et al. Endocr J 2011)。加えて申請者は糖尿病性骨症の発症機序として、本症患者で蓄積が見られる終末糖化産物 (AGEs) が骨芽細胞系での Wnt 経路の下方制御を介して骨芽細胞分化を抑制することを見いだしている。FGF23 は主に骨で産生される。その産生機序は未だ不明な点が多いが、骨での FGF23 発現は骨代謝回転に依存する可能性が示されており、申請者も骨芽細胞での解析より、FGF23 発現は Wnt 経路により負の制御を受けており、AGEs 刺激は FGF23 発現を強く誘導することを明らかにしている。FGF23 は転写制御に加えて分子内切断による活性制御を受けており、GalNAc-T3 は当該切断部位付近の糖鎖修飾を介して FGF23 の活性制御に関わる重要な分子である。申請者は低リン血症・骨軟化症を呈するイタイイタイ病患者の病態解析から、本症患者では FGF23 値が亢進していることを明らかにしている (Aranami F et al. J Med Invest, 2010)。また発症機序としてカドミウム (Cd) は AhR 依存的に GalNAc-T3 の転写促進を介して FGF23 産生を亢進させることを明らかにした (Kido S et al. Toxicological Sciences, 2014)。AhR はダイオキシン等の化学物質に加えてインドール誘導体により活性化されることから、慢性腎臓病患者体内で蓄積が見られるインドキシル硫酸 (IS) 等の尿毒素が当該経路を活性化する可能性が予測される。事実、インドール誘導体の幾つかは GalNAc-T3 遺伝子の発現を誘導する事を確認している。従って慢性腎臓病患者では、これら複数の経路を介して FGF23 の発現並びに産生が亢進している可能性が示唆される。以上、これまでミネラル代謝 (リン・カルシウム) 制御に関わると考えられていた FGF23 が CKD 患者の骨において誘導され、これが血流を介して全身に運

ばれ、合併症としてのロコモティブ症候群の発症並びに進展に関わる可能性が予測される。

2. 研究の目的

本研究計画では当該仮説を分子レベルで詳細に解析することを目的として、(1)尿毒症物質 (AGEs)による骨での Wnt 経路の下方制御を介した FGF23 遺伝子転写誘導機序の解析、(2)尿毒症物質 (IS)による GalNAc-T3の誘導を介した FGF23 活性制御機序(分子内切断)の検討、及び(3)FGF23が筋・骨格系に及ぼす影響(筋萎縮並びに骨不全)の分子機序の解析、の3段階に分けて検討を試みる。

3. 研究の方法

1)CKDにおける骨での FGF23 遺伝子転写誘導機序の解析

培養骨芽細胞を用いた予備解析から、CKD-MBDの骨形成低下性病態では主に Wnt 経路の下方制御に伴う FGF23 の転写亢進が予測される。この仮説を検証すべく、腎不全 (Adenine 投与)モデル動物を作成し、骨での FGF23 発現並びに Wnt 経路の発現解析を試みる。また尿毒症物質が FGF23 産生を惹起するか否かについて、特に AhR を介した GalNAc-T3 の発現調節への関与を中心に解析を進める。

2) FGF23 が骨格筋萎縮に及ぼす影響の解析

上記モデル動物において骨格筋萎縮の有無を組織学的に解析するとともに、IRS-1 経路への関与を中心にその詳細を解析する。

3) FGF23 が骨格系に及ぼす影響の解析

先行研究により FGF23 が骨芽細胞自身に悪影響(骨芽細胞分化・機能の抑制)を及ぼす事が知られているが、Wnt 経路の関与や FGF23 下流標的的存在等、未だ不明な点が多く残されている。筋萎縮との相互関連も含めて上記モデル動物を用いた解析を試みる。

4. 研究成果

1) CKD における骨での FGF23 遺伝子転写誘導機序の解析

CKD 患者では血清リン (P)や副甲状腺ホルモン (PTH)に先行して血清 FGF23 値が上昇することが数多くの観察研究から明らかとなっているが、その詳細な分子機序は不明である。一方、糖尿病はCKDの主要なリスクであると同時に早期より骨病変を多く認める。申請者はこの糖尿病性骨症の惹起因子として終末糖化産物 (AGEs)が骨芽細胞系の分化・機能維持の鍵シグナルである Canonical Wnt 経路の下方制御を介して骨芽細胞の分化と機能を抑制することを見いだしている。糖尿病合併症を含む CKD 患者における骨・ミネラル代謝障害 (CKD-MBD)ではしばしば骨形成の低下がみられること、骨での FGF23 遺伝子発現は骨代謝回転に応じて変動することなどから、FGF23 が Wnt 経路の下流標的である可能性が示唆される。そこで本研究では糖尿病あるいはCKD患者体内で蓄積が認められる AGEs が Wnt 経路を介して FGF23 の発現に何らかの影響を及ぼすのではないかとこの仮説を立て、その検証を試みた。その結果、AGEs は培養骨芽細胞において Ubiquitin E3-ligase である β -TrCP1 mRNA を誘導するとともに、Wnt 経路の鍵因子である β -Catenin のユビキチン化分解を促進することを見いだした。また骨芽細胞系での FGF23 mRNA の発現は活性ビタミン D 刺激により誘導されることが知られているが、同作用は AGEs との同時添加により強く促進された。また Wnt 経路阻害薬を有する薬剤は AGEs と同じく同細胞系での FGF23 mRNA 発現を強く促進したが、逆に Wnt 経路活性化薬は活性型ビタミン D による作用をほぼ完全に阻害した。以上、AGEs は Wnt 経路の下方制御を介して骨芽細胞分化を抑制するが、同時に FGF23 遺伝子の発現を増強することが明らかになった。本成績は糖

尿病腎症を含むCKD患者におけるFGF23の産生亢進を説明する新たな機序であるとともに、糖尿病に併存するCKDにおいてFGF23の作用標的臓器である腎-骨連関がその発症並びに進展に深く関わる可能性を示唆するものである。

また申請者はこれまでに、イタイイタイ病の原因物質であるカドミウム (Cd)が芳香族炭化水素受容体 (AhR)依存的にFGF23の翻訳後修飾に関わるGalNAc-T3 FGF23はProteaseによる分子内切断を介してその生理活性を失うが、GalNAc-T3はその切断部位付近への糖鎖修飾を加えることで活性を維持する機能を有する)を誘導し、FGF23の安定化を促すこと、これがCd暴露時にみられるリン代謝障害の原因の一つであることを明らかにしている (Kido S et al. Toxicological Sciences, 2014)。そこで当該研究計画では、CKD患者におけるFGF23産生亢進におけるGalNAc-T3の関与について検討した。また今回、GalNAc-T3の惹起因子として尿毒症物質であるインドキシル硫酸 (IS)に着目した。ISはCKD患者体内で蓄積し、CKD患者に見られる諸症状の発症に関わるとされる、いわゆる尿毒症物質であると理解されている。まず培養骨芽細胞にISを添加したところ、GalNAc-T3 mRNAの誘導並びにFGF23たんぱくの産生増加を認めたが、FGF23 mRNAは不変であった。またIS添加によるGalNAc-T3 mRNAの誘導についても骨細胞で認められる事をマウス頭蓋骨より単離した初代培養骨細胞を用いた系並びにIS投与後の骨組織における免疫組織染色により確認している。またAdenine投与における腎障害モデルマウスにおいては血中FGF23値の高値を認めたが、これは経口尿毒症吸着活性炭薬(クレメジン)の併用により低下することも確認している。次にISにおけるGalNAc-T3 mRNA誘導機について検討を加えるため、ヒトGalNAc-T3遺伝子の転写調節領域(プロモーター領域)を用いた

解析を試みた。その結果、ISは当該遺伝子転写活性を用量依存性に誘導すること、またその作用は当該領域内に存在するAhR応答配列(XRE)依存であることを新たに見いだした。以上の成績は、尿毒症物質の一つであるISがGalNAc-T3の誘導を介してFGF23の安定化を促す事を示すものであり、CKD患者におけるFGF23異常高値の機序の一端を分子レベルで説明しうるものである。

2) FGF23が骨格筋萎縮に及ぼす影響の解析

CKD患者に併存する筋・骨格系障害(ロコモティブ症候群)は患者の日常生活動作(ADL)を制限するのみならず、その悪化は寝たきりや痴呆の原因ともなりうる極めて重篤な問題であるが、その病態の詳細については未だ不明な点が多い。Insulin-receptor substrate (IRS)-1は骨格筋においてIGF-IやInsulin刺激を媒介することで細胞常食に深く関与している。IRS-1はインスリン受容体(IR)あるいはIGF-I受容体(IGFR)の有するチロシナーゼ活性によりリン酸化を受ける最も代表的な基質であり、骨格筋におけるIGF-I/IRS-1シグナルの減弱は骨格筋萎縮を引き起こすことが知られている(Nikawa K et al. FASEB J, 18(3):522-4, 2004)。一方、CKD患者では血清FGF23濃度の異常高値を呈すが、この作用発現にはその特異的受容体FGFRに加えて共役因子としてKlothoの存在を必要とする。寿命制御因子として同定されたKlothoはIRS-1シグナルの抑制を介して寿命を制御することが明らかにされている。またKlothoはその変異により寿命の短縮並びに多臓器に渡る種々の病態を呈することから、生活習慣病への関与が指摘されている。さらに膜たんぱくであるKlothoは細胞外領域で分子内切断を受け、その断片が血中に放出されることが知られている(Chen CD et al. PNAS, 104(50):19796-801, 2007)。これらのことから、FGF23/KlothoがCKD患者や透析導入患者

でみられる骨格筋萎縮に關与している可能性が示唆される。そこで本研究では FGF23/Klotho が有する新たな生理機能として骨格筋での IRS-1 シグナルに及ぼす FGF23 の作用を調べるとともに、Klotho の分子内切断の惹起因子として AGEs の關与について検証した。その結果、申請者は培養腎臓細胞において膜状に発現する Klotho が AGEs の添加により切断されること、及びその切断は TACE 依存的であることを新たに見いだした。また培養骨格筋細胞において FGF23 は単独では IRS-1 活性に何ら影響を与えないものの、前述の AGEs 処理にて生じた sKlotho を含む培養液を添加することにより、IRS-1 活性化は強く抑制された。また FGF23 及び sKlotho は培養骨格筋細胞において筋萎縮関連遺伝子 Atrogin-1 の発現を促進した。さらに、申請者は糖尿病や CKD モデル動物の骨格筋においても Atrogin-1 の発現が増加している事を見いだしている。以上の成績から、糖尿病あるいは CKD モデル動物にみられる骨格筋萎縮の少なくとも一部に FGF23/Klotho が關与している可能性が示唆された。

3) FGF23 が骨格系に及ぼす影響の解析

CKD 患者ではミネラル代謝障害に加えて、異所性石灰化や腎生骨異常栄養症などの骨代謝障害が少なからず認められ、これらは患者の ADL を制限する要因でもある。また本病態は CKD に見られる合併症の中でも比較的早期から認められるが、その詳細な分子病態は未だ完全に理解されていない。申請者は FGF23 が産生細胞である骨・骨細胞自身に autocrine/paracrine 的に作用することでその分化と機能を抑制する点 (Wang H et al. J Bone Miner Res, 23(6):939-48, 2008) に着目し、FGF23 が骨に及ぼす影響について検討を加えた。はじめに、IS を連日投与した野生型マウスの骨における各種遺伝子発現を解析したところ、IS 投与群では Wnt inhibitor の一種である Dkk-1 の発現低下を認めた。前

述の如く、Wnt 経路は骨・骨芽細胞系の分化並びにその機能維持に必須のシグナル経路である。そこでこの IS による Dkk-1 の誘導が FGF23 依存的であるかについて培養骨芽細胞を用いた検討を加えた。培養骨芽細胞に IS あるいは比較対象として rhFGF23 組換え体を加えたところ、いずれの細胞においても Dkk-1 mRNA の発現増加を認めたが、IS による同作用は FGF 受容体 (FGFR) の選択的阻害剤の同時添加により強く阻害された。以上の成績は IS による Dkk-1 の誘導は FGF23 依存的であることを強く示唆するものである。

以上、本研究計画では CKD 患者における FGF23 産生亢進機序の解析と、CKD 患者の多くにみられる筋・骨格系障害の発症及びその進展における FGF23 の關与について、検討を試みた。FGF23 は CKD 患者にみられるミネラル代謝障害のみならず、筋・骨格系障害の発症にも関わることから、今後 FGF23 あるいはその産生亢進に関わる各種シグナル経路を分子標的とした新たな治療法の確立が期待される。

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 9 件)

Kido S, Fujihara M et al. Molecular mechanisms of cadmium-induced FGF23 upregulation in osteoblast-like cells. Toxicological Sciences, 査読有り、139(2): 301-16, 2014

doi: 10.1093/toxsci/kfu043.

Nomura K, Tatsumi S et al. Hepatectomy-related hypophosphatemia: A novel phosphaturic factor in the liver-kidney axis. J Am Soc Nephrol, 査読有り、25(4): 761-71, 2014

doi: 10.1681/ASN.2013060569.

Nakamura S, Miki H et al. Activating transcription factor 4, an ER stress mediator, is required for, but excessive ER stress suppresses osteoblastogenesis by bortezomib. Int J Hematol, 査読有り、98(1): 66-73, 2013

doi: 10.1007/s12185-013-1367-z.

Kido S, Kaneko I et al. Vitamin D and type II sodium-dependent phosphate cotransporters. Contrib Nephrol, 査読有り、180: 86-97, 2013

doi: 10.1159/000346786.

Kuriwaka-Kido R, Kido S et al. Parathyroid hormone(1-34) counteracts the suppression of interleukin-11 expression by glucocorticoid in murine osteoblasts: a possible mechanism for stimulating osteoblast differentiation against glucocorticoid excess. *Endocrinology*, 査読有り、154(3): 1156-67, 2013

doi: 10.1210/en.2013-1915.

Kuwahara S, Aranami F et al. Identification and functional analysis of splice variant of mouse sodium-dependent phosphate transporter Npt2c. *J Med Invest*, 59(1-2): 116-26, 2012

Haito-Sugino S, Ito M et al. Processing and stability of type II sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *Am J Physiol Cell Physiol*, 査読有り、302(9): C1316-30, 2012

doi: 10.1152/ajpcell.00314.2011.

Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R et al. Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J*, 査読有り、59(2): 91-101, 2012

木戸慎介、藤原真理奈他、カドミウム暴露によるリン代謝異常～FGF23産生亢進機序の検討～、日本衛生学雑誌、査読有り、67(4): 464-71, 2012

〔学会発表〕(計 12 件)

上西梢、東千尋他、高血圧に併存する骨代謝障害の病態解析-脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットを用いて-、第18回日本病態栄養学会年次学術集会、京都国際会議場(京都府、京都市)、2015年1月

木戸慎介、瀬川博子他、FGF23を介した腎臓-骨のリン恒常性維持機構に対するカドミウムの攪乱作用-第41回日本毒学会学術集会(招待講演)、神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市)、2014年7月

上西梢、海野悠他、高血圧に併存する生活習慣病の発症・進展に関わる分子病態の解明、第68回日本栄養・食糧学会大会、札幌市教育文化会館(北海道、札幌市)、2014年5月

上西梢、竹森久美子他、胎児期の低栄養暴露による生活習慣病の増悪化とその予防-脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットを用いて-、第17回日本病態栄養学会年次学術集会、京都国際会議場(京都府、京都市)、2014年1月

木戸慎介、越智美佐子他、慢性腎臓病に併存する骨ミネラル代謝障害(CKD-MBD)の発症並びに進展におけるFGF23の関与、第67回日本栄養・食糧学会大会、名古屋大学(愛知県、名古屋市)、2013年5月

木戸慎介、越智美佐子他、慢性腎臓病におけるFGF23産生亢進の分子機能解析、第16

回日本病態栄養学会年次学術集会、京都国際会議場(京都府、京都市)、2013年1月

Kido S, Fujihara M et al. Molecular mechanism of cadmium-dependent fibroblast growth factor 23 secretion in bone. American Society of Nephrology for Kidney Week, San Diego Convention Center(San Diego, U.S.), Oct.30, 2012

木戸慎介、藤原麻里奈他、慢性腎臓病患者におけるFGF23産生亢進の分子機能解析、第66回日本栄養・食糧学会大会、東北大学(宮城県、仙台市)、2012年8月

木戸慎介、藤原真理奈他、カドミウム汚染によるリン代謝異常・骨軟化症発症機序の検討、第30回日本骨代謝学会、新宿京王プラザホテル(東京都、新宿区)、2012年7月

Kido S, Hashimoto Y et al. Muscle atrophy in patients with CKD results from FGF23/Klotho-mediated suppression of Insulin/IGF-I signaling. XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease. Hilton Hotel(Honolulu, Hawaii, U.S.), Jun.26, 2012

藤原真理奈、木戸慎介他、カドミウム汚染によるリン代謝異常：骨軟化症発症機序の検討、第15回日本病態栄養学会年次学術集会、京都国際会議場(京都府、京都市)、2012年1月

木戸慎介、橋本由衣他、糖尿病に併存する腎障害・骨障害の発症並びに進展におけるFGF23の関与、第15回日本病態栄養学会年次学術集会、京都国際会議場(京都府、京都市)、2012年1月

〔図書〕(計 5 件)

宮本賢一、新井英一他、ミネラル摂取と老化制御-リン研究の最前線-(分担執筆：第2編リンと栄養、第6章：リン添加物)、p.69-87、建帛社、2014年5月

大西律子、木戸慎介他、慢性腎臓病におけるリン管理、リン添加物の話題、臨床栄養、124(3): 317-324、2014年

木戸慎介、カドミウムや鉄などの重金属と骨代謝、臨床栄養、23(9): 59-66、2013年

木戸慎介、野村憲吾他、リン添加物に関する情報と栄養指導、臨床栄養、22(10): 127-135、2012年

木戸慎介、桑原頌治他、FGF23の作用と作用機序、腎と骨代謝、25(1): 25-31、2012年

〔その他〕

ホームページ等

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/04syokuhin/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木戸 慎介 (KIDO, Shinsuke)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30437652