

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390236

研究課題名（和文）FGF23/Klotho/リンセンサーを介したリン代謝ホルモンの同定と機能解明

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of regulatory factors for fibroblast growth factor 23/klotho/inorganic sensor system

研究代表者

宮本 賢一 (MIYAMOTO KENICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：70174208

研究成果の概要（和文）：本研究では、NaPi-IIa (Npt2a)/NaPi-IIc (Npt2c) のD-KOダブルノックアウトマウスを作製して、本マウスのリン代謝異常を解明した。DKOマウスは、著しいリン再吸収能の低下による低リン血症、高カルシウム尿症およびクル病を呈した。この表現型は、高カルシウム尿を伴う低リン血性クル病（HHRH）に類似していた。また、DKOマウスを用いて、腸管および腎臓において DNAアレーを行いリン制御因子として機能している新しい細胞膜蛋白の同定を行なった。CLCA6は、DKOマウスの腎臓で高発現しており、リントランスポーター（PiT2）を制御している重要な因子であることが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated inorganic phosphate (Pi) metabolism in the type IIa and type IIc sodium-dependent Pi cotransporter gene knockout mice (Npt2a^{-/-}Npt2c^{-/-} DKO mice). To clarify the relative importance of Npt2a and Npt2c, we studied DKO mice. These mice exhibited severe hypophosphatemia, hypercalciuria, and rickets. This phenotype is similar to that seen in hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria (HHRH) which is characterized by hypophosphate, short stature, rickets, and/or osteomalacia, with secondary absorptive hypercalciuria. Studies of the DKO animals showed that the expansion of the late hypertrophic zone in the bone, which is a characteristic feature of rickets, might be secondary to the impaired apoptosis of these cells. In the analysis of DNA microarray in the kidney of DKO mice, we identified the clone encode calcium activated chloride channel 6 (CLCA6) and analyzed its function in *Xenopus* oocytes and renal epithelial cells. The present study indicates that CLCA6 modulates the activity of type III renal sodium-dependent Pi cotransporter PiT2 in DKO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：リン、腎臓、トランスポーター、副甲状腺ホルモン、骨、低リン血症、クル病

1. 研究開始当初の背景

リンは生体において必須の因子であるが、その代謝系に関しては、不明な点が多い。これまでリン代謝調節は、副甲状腺ホルモン (PTH)、ビタミンD、カルシトニンなどの古典的な骨代謝を中心としたカルシウム調節ホルモンの付随的な作用として行われると考えられていた。しかしながら、最近、fibroblast growth factor 23 (FGF23) が新しいリン利尿因子として登場し、その共受容体 klotho と結合することで、骨と腎臓を結ぶ新しいリン代謝系が明らかにされた。腎臓はリン再吸収を担う、生体リン代謝の中心臓器である。近位尿細管には、Type IIa ナトリウム依存性リン輸送体 (NaPi-IIa) が発現しておりリン代謝制御の司令塔として機能している。我々は、新しい分子として脳室、消化管、骨および腎近位尿細管においてリン調節系を担うリンセンサー蛋白 (Growth-related Na/Pi cotransporter, NaPi-IIc) を同定し、その下流の存在する新規リン代謝ホルモンの生理作用について検討を推進してきた。しかしながら、NaPi-IIc がどのような分子と相互作用して、リンセンサーとしての機能を発揮しているかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究期間にリン代謝調節機構の中核をなすリンセンサーによるリン感受機構の全貌を解明すること、さらにリンセンサーからのシグナルを伝える新規リン代謝ホルモン群の機能を明らかにすることで、新しいリン代謝系を司るネットワーク分子によるシグナル伝達系の解明を目指す。とくに、NaPi-IIa (Npt2a)/NaPi-IIc (Npt2c) のD-KOダブルノックアウトマウスを作製して、本マウスのリン代謝異常を解明する。また、DKOマウスを用

いて、腸管および腎臓において DNAアレーを行いリン制御因子として機能している新しい細胞膜蛋白の同定を行なう。また、副甲状腺ホルモンPTHや FGF23/klothoによるリン制御機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

<動物>

常法に従い Npt2a KO、Npt2c KO、Npt2a/Npt2c DKO を作製した。動物実験は徳島大学動物実験委員会の許可の下、徳島大学動物実験指針に従って行った。

<Npt2a/Npt2c DKO 腎臓における DNA マイクロアレイ解析>

12 ヶ月齢の雄の WT および Npt2a/Npt2c DKO から摘出した腎臓組織重量に約 10 倍量の ISOGEN (WAKO) を加え、精製した。得られた total RNA をもとに DNA マイクロアレイ (Affimetrix 社) 解析を行った (徳島大学先端医療研究資源・技術支援センターへ委託)。遺伝子解析、細胞培養、生化学的解析方法は、過去の報告に従った。

4. 研究成果

Npt2a/Npt2c DKO における表現型および腎臓 mRNA 発現量の網羅的解析

Npt2a および Npt2c ノックアウトマウス (Npt2a KO、Npt2c KO)、さらに両遺伝子を欠損させたダブルノックアウトマウス (Npt2a/Npt2c DKO) を作製し、その表現型を詳しく解析した。Npt2a KO は、著しいリン再吸収能の低下による低リン血症、高カルシウム尿症および高ビタミン D 血症を呈した。一方、Npt2c KO は、血中カルシウムおよびビタミン D 濃度が上昇し、尿中カルシウム排泄は増加するが、血中リン濃度および尿中リン排泄は正常である。Npt2a と Npt2c を欠損した Npt2a/Npt2c DKO では、生体リ

ン濃度を維持することができないと当初予想した。しかし、Npt2a/Npt2c DKO の解析では、ナトリウム依存性リン輸送活性は完全に消失することなく、50%程度維持されていることが明らかとなった。このことから、Npt2a や Npt2c とは別のナトリウム依存性リン輸送システムが存在する可能性が示唆された。

我々の予想に反して Npt2a/Npt2c DKO 腎臓における mRNA 発現パターンは WT と比して変動が少なかった。また、データには載せていないが、免疫系の遺伝子群の変動が見られた。低下した遺伝子としては、Slc34a1 (Npt2a)、Slc34a3 (Npt2c)、Cyp24a1 (cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide, 1, 24 位水酸化酵素)、Aqp4 (aquaporin 4)、Slc7a12 である。発現が上昇した遺伝子としては、mCLCA6 と腸型 ALP (Alpi : alkaline phosphatase, intestinal) が挙げられる。中でも mCLCA6 遺伝子発現は、WT と比して 3.8 倍上昇した。

mCLCA6 は、CLCA ファミリーに属し、カルシウム依存性クロライド輸送を活性化する機能を持つ。CLCA ファミリーは多くの種に保存されているが、それにもかかわらず、ミネラル輸送において果たす役割の詳細は未だ明らかにされていない。本研究により、この蛋白質は細胞膜部分で切断を受けて、液性因子として機能している可能性が示唆された。また、通常腎臓に発現している mCLCA1/2 ではなく、DKO マウス腎臓では mCLCA6 の発現が上昇していた。これらのことから、mCLCA6 がリン輸送を活性化する因子として機能する可能性を見出した。本蛋白質はリン代謝に関与する組織で特異的に機能している証拠が得られた。CLCA6 は、腸管に発現しておりリン負荷により、その蛋白質量が増大した。一方、腎近位尿細管の

CLCA6 は、細胞内に局在しており、切断後、細胞外にも分泌される。Xenopus oocytes における NaPi-IIa および PiT2 と CLCA6 の共発現では、NaPi-IIa に対しては機能抑制、一方、PiT2 に対しては機能亢進を引き起こした。また、W-KO マウスの腎臓では CLCA6 の機能が残存するリン輸送能亢進に寄与している可能性が示された。このように、腸管上皮細胞および腎近位尿細管細胞において CLCA6 はリン代謝制御に関与する分子と考えられた。以上より、NaPi-IIa/NaPi-IIc 遺伝子欠損したマウスにおけるリン代謝異常を是正する因子として CLCA6 の重要性が示唆された。本分子は、腸管上皮細胞に発現しており、何らかの刺激で分泌され、一部、血中を介して腎臓に作用する可能性も考えられる。今後、腎臓と腸管を結ぶ因子として CLCA6 の役割を明らかにする必要がある。

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 18 件)

(1) Miyamoto KI, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. Sodium-dependent phosphate cotransporters: Lessons from gene knockout and mutation studies.

J Pharm Sci. 2011 May 12. doi: 10.1002/jps.22614. 査読有.

(2) Liu Z, Segawa H, Aydin C, Reyes M, Erben RG, Weinstein LS, Chen M, Marshansky V, Fröhlich LF, Bastepe M. Transgenic overexpression of the extra-large Gs α variant XL α s enhances Gs α -mediated responses in the mouse renal proximal tubule in vivo. Endocrinology. 2011 Apr;152(4):1222-33. 査読有.

(3) Fukagawa M, Komaba H, Miyamoto K. Source matters: from phosphorus load to bioavailability. Clin J Am Soc Nephrol. 2011 Feb;6(2):239-40. 査読有.

(4) Kaneko I, Segawa H, Furutani J, Kuwahara S, Aranami F, Hanabusa E, Tominaga R, Giral H, Caldas Y, Levi M, Kato S, _

Miyamoto K. Hypophosphatemia in vitamin D receptor null mice: effect of rescue diet on the developmental changes in renal Na⁺-dependent phosphate cotransporters. *Pflugers Arch.* 2011 Jan;461(1):77-90. 査読有.

(5) Nagai S, Okazaki M, Segawa H, Bergwitz C, Dean T, Potts JT Jr, Mahon MJ, Gardella TJ, Jüppner H. Acute down-regulation of sodium-dependent phosphate transporter NPT2a involves predominantly the cAMP/PKA pathway as revealed by signaling-selective parathyroid hormone analogs. *J Biol Chem.* 2011 Jan 14;286(2):1618-26. 査読有.

(6) Ito M, Sakurai A, Hayashi K, Ohi A, Kangawa N, Nishiyama T, Sugino S, Uehata Y, Kamahara A, Sakata M, Tatsumi S, Kuwahata M, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto KI. An apical expression signal of the renal type IIc Na⁺-dependent phosphate cotransporter in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul;299(1):F243-54. 2010. 査読有.

(7) Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K, Kaneko I, Tominaga R, Hanabusa E, Aranami F, Furutani J, Kuwahara S, Tatsumi S, Matsumoto M, Ito M, Miyamoto KI. Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jun;298(6):F1341-50. 2010. 査読有.

(8) Aranami F, Segawa H, Furutani J, Kuwahara S, Tominaga R, Hanabusa E, Tatsumi S, Kido S, Ito M, Miyamoto KI. Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium. *J Med Invest.* Feb;57(1-2):95-108. 2010. 査読有.

(9) Masuda M, Yamamoto H, Kozai M, Tanaka S, Ishiguro M, Takei Y, Nakahashi O, Ikeda S, Uebanso T, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto KI, Takeda E. Regulation of renal sodium-dependent phosphate co-transporter genes (Npt2a and Npt2c) by all-trans-retinoic acid and its receptors. *Biochem J.* 429(3)583-92. 2010. 査読有.

(10) Matsumoto N, Hemmi A, Yamato H, Ohnishi R, Segawa H, Ohno S, Miyamoto K. Immunohistochemical analyses of parathyroid hormone-dependent downregulation of renal type II Na-Pi

cotransporters by cryobiopsy. *J Med Invest.* 57(1-2)138-45. 2010. 査読有.

(11) Ishiguro M, Yamamoto H, Masuda M, Kozai M, Takei Y, Tanaka S, Sato T, Segawa H, Taketani Y, Arai H, Miyamoto K, Takeda E. Thyroid hormones regulate phosphate homeostasis through transcriptional control of the renal type IIA sodium-dependent phosphate co-transporter (Npt2a) gene. *Biochem J.* 427(1) 161-9. 2010. 査読有.

(12) Kusano K, Saito H, Segawa H, Fukushima N, Miyamoto K. Mutant FGF23 Prevents the Progression Chronic Kidney Disease but Aggravates Renal Osteodystrophy in Uremic Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 99-105. 2009. 査読有

(13) Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol Renal Physiol.* Sep;297(3),F671-8, 2009. 査読有.

(14) Breusegem SY, Takahashi H, Giral-Arnal H, Wang X, Jiang T, Verlander JW, Wilson P, Miyazaki-Anzai S, Sutherland E, Caldas Y, Blaine JT, Segawa H, Miyamoto K, Barry NP, Levi M. Differential regulation of the renal sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa, NaPi-IIc, and PiT-2 in dietary potassium deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol.* Aug;297(2), F350-61, 2009. 査読有.

(15) Segawa H, Aranami H, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone.* Vol. 45, S2-S7. 2009. 査読有.

(16) Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami H, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Nephrol.* Jan 20(1). 104-113. 2009. 査読有.

(17) Kuwahata M, Kuramoto Y, Sawai Y, Amano S, Tomoe Y, Segawa H, Tatsumi S, Ito M, Kobayashi Y, Kido Y, Oka T, Miyamoto K. Polypyrimidine tract-binding protein is involved in regulation of albumin synthesis in response to food intake. *J*

Nutr Sci Vitaminol. 54(2), 142-7. 2008. 査読有.

(18) Kusano K, Segawa H, Ohnishi R, Fukushima N, Miyamoto K (2008) Role of low protein and low phosphorus diet in the progression of chronic kidney disease in uremic rats. J Nutr Sci Vitaminol. 54, 237-243. 2008. 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

(1) Tatsumi S, Yamaguchi S, Kamatani T, Shiozaki Y, Nomura K, Saito Y, Kido S, Segawa H, Miyamoto K. Phosphate Homeostasis in Osteocyte-Ablated Mice. The American Society of Nephrology. Colorado Convention Center, Denver, CO, USA. 11/18. 2010.

(2) Segawa H, Maeda A, Thomas J, Gardella, Miyamoto K, Harald J. PTH-Dependent Regulation of Npt2a and Npt2c Expression Appears To Involve Predominantly cAMP/PKA-Dependent Mechanisms. The American Society of Nephrology. Colorado Convention Center, Denver, CO, USA. 11/18. 2010.

(3) Segawa H, Sawai Y, Tominaga R, Hanabusa E, Kuwahara S, Aranami F, Furutani J, Kaneko I, Kuroiwa Y, Kisuhara H, Sugiyama Y, Miyamoto K. Inorganic Phosphate Homeostasis in the Type 1 Na/Pi-transporter (NPT1) Null Mice. The American Society of Nephrology. San Diego Convention Center. San Diego, CA, USA. 10/30. 2009.

(4) Kaneko I, Segawa H, Hanabusa E, Miyamoto K. Deficiency of Vitamin D Receptor Prevents the Development of Renal Pi Reabsorption. The American Society of Nephrology. San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA. 10/30. 2009.

(5) Nishiyama T, Ito M, Ohi A, Sugino S, Kaneko I, Sakata M, Kamahara A, Kido S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. klotho Modulates the Activity of Type 1 Na⁺-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-1lc) in Renal Epithelial Cells. The American Society of Nephrology. San Diego Convention Center. San Diego, CA, USA. 10/30. 2009.

(6) Hanabusa E, Ueda O, Segawa H, Kaneko I, Kuwahara S, Tatsumi S, Ohtomo S, Horiba N, Tachibe T, Wada N, Kawase Y, Jishage

K, Fukushima N, Miyamoto K, Characterization of Phosphate Metabolism in the NaPi-11b Hetero Knockout Mice.

The American Society of Nephrology San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA. 10/30. 2009.

(7) Segawa H, Tomoe Y, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Kuwahara S, Ito M, Miyamoto K. The Synergistic Role of Npt2a and Npt2c in Inorganic Phosphate Metabolism of Mice. The American Society for Bone and Mineral Research. alais des congres de Montreal Montreal, Quebec, Canada. 9/12-16. 2008.

(8) Miyamoto K, Klotho, Minerals, and Aging. The American Society of Nephrology. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 11/4-9. 2008.

(9) Ito M, Sakurai A, Ohi A, Hayashi K, Nishiyama T, Kangawa N, Sugino S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K.

Mutation of Type IIc Na⁺-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-IIc) and Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria (HHRH) The American Society of Nephrology. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 11/7. 2008.

(10) Tatsumi S, Fukushima Y, Shimamura S, Ito M, Segawa H, Miyamoto K. 1.25 (OH) 2 Vitamin D3 Modulates The Expression of the Human Type IIc Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-IIc) Gene in Renal Osteoblast Cells. The American Society of Nephrology. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia Pennsylvania, USA. 11/7. 2008.

(11) Tomoe Y, Segawa H, Kaneko I, Furutani J, Aranami F, Kuwahara S, Tominaga R, Hanabusa E, Ito M, Miyamoto K. Effect of Fibroblast Growth Factor (FGF)23 on Npt2a, Npt2c Double-Knockout (WKO) Mice. The American Society of Nephrology. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 11/7. 2008.

[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：
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

宮本 賢一 (MIYAMOTO KENICHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
・教授
研究者番号：70174208

(2) 研究分担者

瀬川 博子 (SEGAWA HIROKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
・講師
研究者番号：70325257

辰巳 佐和子 (TATSUMI SAWAKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
・助教
研究者番号：80420545

(3) 連携研究者

()

研究者番号：