

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19529

研究課題名(和文) 生体におけるリン感知機構の解明

研究課題名(英文) Exploration for the phosphate sensing mechanism of the body

研究代表者

伊東 伸朗 (Nobuaki, Ito)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10731862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、血中のリン濃度調節因子として腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍から FGF23 というホルモンを同定し、またそのホルモンの受容体として尿細管で FGFR1/Klotho 受容体複合体を同定した。本研究では FGF23 産生腫瘍を用いてリン感知受容体を同定することを目的とし、まずは FGF23 の高感度ナノ免疫染色法を開発し、FGF23 産生腫瘍における FGF23 産生細胞を組織学的に一細胞レベルで選別することを可能とした。今後は本法を用いて FGF23 産生細胞からリン感知受容体を同定したい。

研究成果の概要(英文)：To date, FGF23 was identified as the phosphate regulating humoral factor from the neoplasm causing tumor induced osteomalacia (TIO) by our study group. Then, FGFR1/Klotho complex was identified as the receptor complex for FGF23. In the current study, we are aiming to identify the phosphate sensing receptor also from the FGF23 producing tumor causing TIO. First, a nano imaging immunohistochemical technique for FGF23 was developed to detect very tiny amount of FGF23 because the expression level of FGF23 protein in a cell is fundamentally very low. This technique enables us to discriminate the FGF23 producing cells from the other type of cells in the same tumor. Hereafter, we will try to identify the phosphate sensing receptor through this technique.

研究分野：内分泌内科学

キーワード：低リン血症 FGF23 Klotho くる病 骨軟化症 腫瘍随伴症候群 免疫染色 ナノ技術

1. 研究開始当初の背景

(1)、我々はこれまでに血中リン濃度調節因子として腫瘍性骨軟化症 (Tumor-induced osteomalacia: TIO) の原因腫瘍から FGF23 を同定した。その後世界に先駆けて FGF23 のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを作成し、尿細管での FGF23 の生理的作用 (ビタミン D 代謝酵素とナトリウム-リン共輸送体の発現調節) を解明した。その後、FGF23 の受容体が、一般的な FGF 受容体と Klotho 蛋白の複合体で形成されることを報告し、以降の hormonal FGF 研究の端緒となった。また我々の研究室で開発した血清 FGF23 測定 ELISA の普及により、種々の先天性/後天性リン代謝疾患の鑑別診断が可能となった。また血中 FGF23 は透析患者の予後予測因子になるという報告もなされている。その他に我々は FGF23 遺伝子変異による血中 FGF23 濃度の著明な低下は、異所性石灰化を主な徴候とする腫瘍状石灰沈着症を惹起することを報告した。以上より、内因性の FGF23 産生、分泌調節機構を解明し、その結果を創薬に反映させることが急務であると考え、その FGF23 調整機構の出発点と想定される血清リン濃度感知受容体 (inorganic Phosphate Sensing Receptor: PiSR) が未だ明らかにされていない。

(2)、一方、活性型 FGF23 濃度の不適切な増加による先天性低リン血症性くる病・骨軟化症の原因遺伝子としては、これまでに *FGF23* に加え *phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)*、*dentin matrix protein 1 (DMP1)*、*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1)*、*family with sequence similarity 20, member C (FAM20c)* が同定されている。PHEX、DMP1、ENPP1 の詳細な機能は依然解明されていないものの、PiSR ~ 活性型 FGF23 蛋白濃度調節までの一連の経路の中で、重要な役割を果たすものと予想される。一方で、FAM20C は全長 FGF23 の furin などによる切断点近傍をリン酸化することで、全長 FGF23 の GalNAc-T3 による O 型糖鎖付加修飾を阻害する。従って、PHEX、DMP1、ENPP1 などの蛋白を介した未知の血清リン濃度感知機構が、血清リン濃度に応じたシグナルを送り、GalNAc-T3 と FAM20C による全長 FGF23 蛋白の O 型糖鎖付加を調節して、活性を持つ全長 FGF23 蛋白の分泌量を変化させているものと予測する。

(3)、当大学病院において責任腫瘍を切除した TIO 症例の中で、残存腫瘍があった症例において、一旦 FGF23 濃度が低下したものの、術後数時間で FGF23 濃度の再上昇と低リン血症の再発が認められた。また一般的に TIO 患者では、無機リンや活性型ビタミン D を投与し

ても、FGF23 血中濃度が上昇して低リン血症が持続するため内科的治療に抵抗性である。これらのことは TIO 惹起腫瘍では腫瘍量が FGF23 産生量を規定しているのではなく、腫瘍の PiSR の感知域値が低下していることを示唆している。よって TIO 惹起腫瘍は PiSR を発現していると確信した。

2. 研究の目的

(1)、TIO を惹起する FGF23 産生腫瘍は PiSR を発現していると予想され、また FGF23 産生量も通常の骨と比較し豊富である。よって本検討では FGF23 産生腫瘍を用いて、ディープエンサーを利用した mRNA Seq や Exome Seq を利用して、FGF23 の産生調節に関連すると予想されるタンパクを検出し、最終的に PiSR を同定することを目的とした。

(2)、FGF23 は骨組織中の成熟骨細胞で産生されていると考えられているが、元来発現する絶対量が少なく従来の免疫染色では発現の確認も困難であることがあった。更には FGF23 産生腫瘍の構成細胞の中でも FGF23 を産生する細胞とその他の種類の細胞が混在することが示唆されていた。そこで本検討では FGF23 産生腫瘍を用いて FGF23 の高感度ナノ免疫染色を開発し、FGF23 産生腫瘍や正常骨組織において FGF23 産生細胞の特徴や、FGF23 産生量と相関する事象を明らかとすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1)、TIO 患者さんの手術時に得られた FGF23 産生腫瘍を用いて Exome Seq を施行し、全エクソン領域において変異や欠失、挿入などを確認する。また同腫瘍において同様に次世代シーケンサーを用いた手法によって染色体転座の有無を確認する。体細胞変異や体細胞における染色体転座が確認された場合には、FGF23 産生腫瘍の病因となっている可能性を検討するため、末梢血採血により得られた白血球細胞に同様に変異や転座がないかを確認する。上記によって FGF23 産生腫瘍発生に関与すると疑われる遺伝子変異や染色体転座が確認された場合には、培養細胞や実験動物を利用して同異常がもたらす表現型を確認する。

(2)、(1)と同様に TIO 患者さんの手術時に得られた FGF23 産生腫瘍から抽出した mRNA の相対量を、同時に手術中に採取された周囲の周囲に付着している正常組織から抽出した mRNA の相対量と次世代シーケンサーを利用した mRNA Seq をもちいて比較する。本手法により FGF23 産生腫瘍に多く、もしくは特異的に発現している mRNA を同定することで、FGF23 の産生調節に関与している分子、特に血清リン濃度感知受容体 (PiSR) の候補となる分子を探索する。上記によって FGF23 の産生調節に関与すると考えられる分子や PiSR

の候補分子を確認した場合には、培養細胞や実験動物を利用して同分子の過剰発現や発現減少がもたらす表現型を確認する。

(3)、T10 患者さんの手術時に得られた FGF23 産生腫瘍を陽性コントロール、腫瘍に付着している正常組織を陰性コントロールとして FGF23 に対する高感度ナノ免疫染色法を作成する。作成された高感度ナノ免疫染色法を用いて、通常の大腿骨頸部骨折を起こした患者さんにおける大腿骨頭置換術時に得られた骨組織を利用して、健常人の骨細胞における FGF23 産生を検出できるように FGF23-高感度ナノ免疫染色法のプロトコルを調整する。上記プロトコルが作成されたうえで、正常骨組織における FGF23 産生細胞の分布（皮質骨と海綿骨の比較など）や FGF23 産生細胞の特徴を検討する。また後天性に発症した FGF23 相対的高値を示す慢性低リン血症により T10 が疑われる患者さんのなかで、一部腫瘍の局在が従来のサンプリングやシンチグラムなどの検査で検出できない症例がある。これらの症例の T10 であるか、遺伝性もしくはその他の FGF23 関連低リン血症性骨軟化症の鑑別に対して骨組織での本 FGF23-高感度ナノ免疫染色法の施行が有用であるかを検討する。

4. 研究成果

(1)、FGF23 産生腫瘍切除術に至った 4 例の腫瘍性骨軟化症において全エクソンシーケンシング解析、および染色体転座解析を施行した。しかしながら、4 例の腫瘍において体細胞変異や転座を確認することは出来なかった。おそらくこれらの 4 例では遺伝子の non-coding region に腫瘍化を惹起する変異が存在するものと考えられる。今後は全ゲノムシーケンシングがより簡便化、汎用化され、その解析手法がより成熟した時点で改めて FGF23 産生腫瘍の病因となる体細胞異常を全ゲノムシーケンシングにより解析したい。

(2)、FGF23 産生腫瘍切除術に至った 4 例の腫瘍性骨軟化症において腫瘍切除時に周囲に付着していた正常組織を対象として mRNA Seq を施行した。FGF23 産生腫瘍が耳下腺に存在した症例では mRNA の抽出に問題がなかったものの、他の骨腫瘍による FGF23 産生腫瘍においては mRNA の抽出が困難であり、検体不十分にて mRNA Seq が施行できなかった。骨腫瘍が原因である腫瘍性骨軟化症では正常骨と同様に硬組織である骨組織の中に FGF23 産生細胞が存在するために、通常 mRNA 抽出方法では骨組織に覆われている細胞を抽出することが出来ないと考えられる。また骨組織を mRNA 抽出前に破壊する方法も試行したが、mRNA にダメージが生じてしまうためかやはり mRNA Seq のために必要な量の mRNA を抽出することは困難であった。耳下腺腫瘍による腫瘍性骨軟化症症例においての mRNA Seq

の結果（1-18 位）を以下の表 1 に示す。

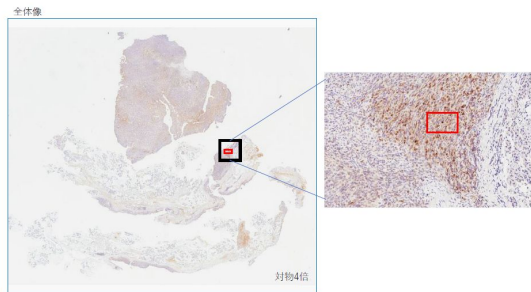
順位	遺伝子 ID	変化率(倍)
1	DMP1	2345
2	FGF1	2107
3	FREM2	1463
4	COMP	1352
5	FGF23	1288
6	MEPE	1271
7	SOST	1248
8	SFRP4	1185
9	ARHGAP36	1136
10	ECEL1	1066
11	RAMP1	921
12	KL	911
13	LRRTM3	885
14	SPP1	852
15	IGSF1	775
16	NCAM1	690
17	ACP5	684
18	PHEX	657

(表 1: FGF23 産生腫瘍における mRNA-Seq の結果 (正常周囲組織を対照))

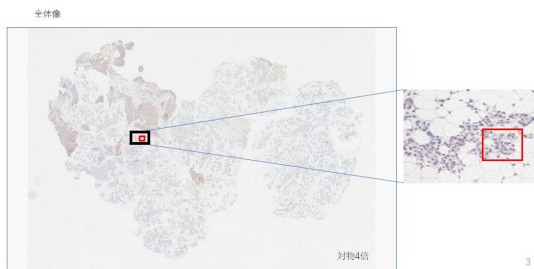
まず FGF23 産生腫瘍であることから FGF23 (順位 5) の高発現を認めた。これにより解析対象となっている腫瘍が間違いなく FGF23 産生腫瘍であることを確認できる。次に既に FGF23 の産生調節に関連があることが示唆されているタンパクである DMP1 (順位 1) と PHEX (順位 18) の発現が確認できた。DMP1 の機能喪失型変異は常染色体劣性低リン血症性くる病 (autosomal recessive hypophosphatemic rickets: ARHR) を惹起し、PHEX の機能喪失型変異は X 染色体優性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets: XLHR) を惹起する。ともに FGF23 の血中濃度が相対的高値となり低リン血症性くる病を先天性に惹起する疾患であり、血清リン濃度の閾値異常がそれを調整する DMP1 や PHEX の異常から惹起されるものと予想される。生理的に FGF23 細胞はこれらのリン濃度感知 ~ 調節に関わるタンパクを兼ね備えていると考えられるため、これらのタンパクの発現順位が高いことは予想にそぐわなかった。また MEPE (順位 6)、SOST (順位 7) と生理的に骨細胞が発現するタンパクの高発現を認めた。MEPE は DMP1 も含まれる骨や歯牙の細胞外石灰化部位に含まれる 5 つの基質タンパク (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein: SIBLING proteins) の一つでありある程度成熟した骨細胞が発現している。SOST は Sclerostin (Scl) をコードする遺伝子であり、Scl は FGF23 と同様に最終段階まで成熟した骨細胞が発現するパラクライン因子である。骨細胞で産生された Scl は骨芽細胞に作用して骨形成を阻害するため、SOST の機能喪失型変異では骨量の著明な増加をきたす硬化性骨症を惹起する。MEPE や SOST の変異による FGF23 産生への影響は

明らかではなく、これらの遺伝子の FGF23 産生腫瘍における高発現は、FGF23 産生腫瘍中の FGF23 産生細胞が FGF23 産生に特化した PHEX や DMP1 の発現を併せ持つ細胞というだけでなく、生理的な FGF23 産生細胞である骨細胞と非常に近似した細胞であることの傍証となる。KL (順位 12) は Klotho をコードする遺伝子であり、生理的には FGF23 の受容体を構成する受容体複合体の一部として尿管細管や副甲状腺などに存在する。FGF23 産生腫瘍での Klotho 発現の意義は非常に興味深く、今後他の T10 患者での FGF23 産生腫瘍の mRNA Seq 解析を行っていく際にも注目すべき分子の一つであると考えられる。その他に本検討での mRNA Seq で高発現を認めた分子の中にリン感知受容体に相当すると考えられる分子が含まれている可能性がある。今後も T10 手術症例における FGF23 産生腫瘍での mRNA Seq 解析を継続し、複数の症例で同様に高発現を認める分子を選別していき、リン感知受容体を含む、生理的リン感知機構に関連した分子の同定を進めたい。

(3)、FGF23 産生腫瘍を陽性コントロール、手術時に周囲に付着した正常組織を陰性コントロールとして、FGF23 タンパクに対する好感受度ナノ免疫染色 (phosphate-integrated dot staining:PID) のプロトコル開発を行った。耳下腺腫瘍による T10 症例での FGF23 産生腫瘍組織、周囲正常組織でまずは PID のプロトコルを作成した (図 1、2)。



(図 1. FGF23 産生腫瘍 (耳下腺腫瘍) で通常の FGF23 免疫染色と FGF23-PID プロトコル作成に使用した陽性コントロール部位)



(図 2. FGF23 産生腫瘍周囲 (正常耳下腺) で通常の FGF23 免疫染色と FGF23-PID プロトコル作成に使用した陰性コントロール部位)

下の図 3、4 に示すように、作成した FGF23-PID プロトコルにより定量性をもって FGF23 の免疫染色を行えることが確認できた。

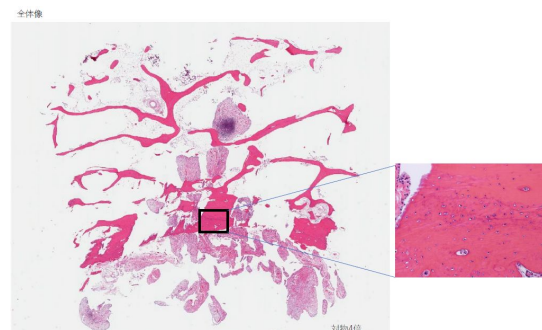
	DAB染色	PID染色 (1次抗体50倍希釈)
細胞あたり粒子数	-	102.2
明視野画像		
PIDとの重ね合わせ (解析画像) 赤点はPID粒子		

(図 3. FGF23 産生腫瘍 (耳下腺腫瘍) における PID による FGF23 免疫染色)

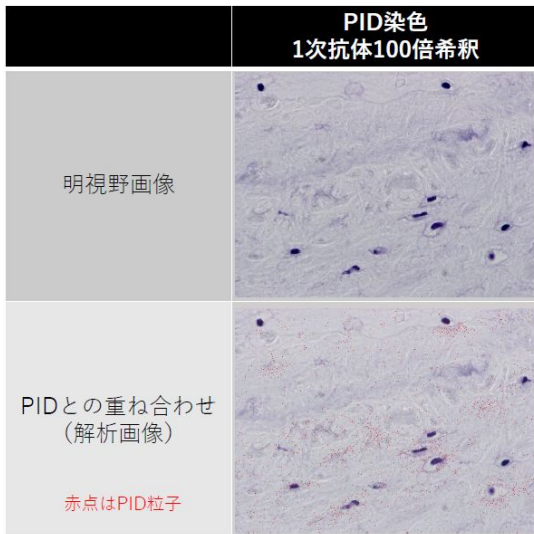
	PID染色 1次抗体100倍希釈
細胞あたり粒子数	5.8
明視野画像	
PIDとの重ね合わせ (解析画像) 赤点はPID粒子	

(図 4. FGF23 産生腫瘍周囲 (正常耳下腺) における PID による FGF23 免疫染色)

更には FGF23 発現量が少なく通常の免疫染色では染色自体が困難であった大腿骨頭置換術の際に採取された正常骨においても PID-FGF23 により FGF23 産生が確認され (図 5、6) PID による免疫染色が非常に高感受度であることが証明された。



(図 5. 正常骨 (大腿骨) における PID による FGF23 免疫染色を施行した箇所全体像)



(図6. 正常骨(大腿骨)におけるPIDによるFGF23免疫染色)

以上より FGF23-PID による FGF23 の高感度ナノ免疫染色が正常骨細胞や T10 を惹起する FGF23 産生腫瘍においてその FGF23 の産生量を高感度かつ定量的に検出できることが証明された。今後は本法を用いて、基礎研究としては FGF23 を産生する正常骨細胞や T10 を惹起する FGF23 産生腫瘍を本 FGF23-PID と microlaser dissection などの手法を併用して 1 細胞レベルで解析し、FGF23 産生調節に関わるタンパクやシグナルを検討したい。臨床研究としては T10 が疑われるものの従来のサンプリングやシンチグラムの検査で原因腫瘍が認められない症例において、倫理申請の上で腸骨生検を行い、通常骨での FGF23 産生が増加しているかもしくは抑制されているかを確認することで実際の診断が T10 かその他の遺伝性晩発性の FGF23 関連低リン血症性骨軟化症、もしくはその他の原因による FGF23 関連低リン血症を鑑別することに有効であるか確認をするための検討を行いたい。

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4件)

Takashi Y, Kinoshita Y, Ito N, Taguchi M, Takahashi M, Egami N, Tajima S, Nangaku M, Fukumoto S. Tumor-induced Osteomalacia Caused by a Parotid Tumor. Intern Med. 2017;56:535-539. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7565.

Kobayashi H, Akiyama T, Okuma T, Shinoda Y, Oka H, Ito N, Fukumoto S, Tanaka S, Kawano H. Three-dimensional fluoroscopic navigation-assisted surgery for tumors in patients with tumor-induced osteomalacia in the bones. Comput Assist Surg (Abingdon). 2017;12:1-14. doi: 10.1080/24699322.2017.1282044

Takashi Y, Kinoshita Y, Hori M, Ito N, Taguchi M, Fukumoto S. Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy. Endocr Res. 2017;42:132-137. doi: 10.1080/07435800.2016.1242604

Tajima S, Takashi Y, Ito N, Fukumoto S, Fukuyama M. ERG and FLI1 are useful immunohistochemical markers in phosphaturic mesenchymal tumors. Med Mol Morphol. 2016;49:203-209. DOI:10.1007/s00795-015-0115-2

〔学会発表〕(計3件)

伊東伸朗、木下祐加、荒井誠、高士祐一、三谷康二、高橋美和子、桂正樹、榎田紀子、南学正臣、「腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍同定におけるオクトレオチド受容体シンチグラムと全身静脈 FGF23 サンプリングの有用性の検討」、第90回日本内分泌学会学術総会、2017年4月22日、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都府京都市)

高士祐一、木下祐加、伊東伸朗、Maria K. Tsoumpra、沢津橋俊、松本俊夫、福本誠二「FGF23 活性調節を担う GALNT3 遺伝子の転写因子」、第90回日本内分泌学会学術総会、2017年4月22日、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都府京都市)

高士祐一、木下祐加、伊東伸朗、松本俊夫、福本誠二、「FGF23 の活性調節機構の検討」、第34回日本骨代謝学会学術総会、2016年7月21日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科
内分泌・骨ミネラル代謝研究グループ
<https://square.umin.ac.jp/endo403/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 伸朗 (ITO, Nobuaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10731862

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福本 誠二 (Fukumoto, Seiji)

徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・
特任教授