

令和元年6月26日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09652

研究課題名(和文)腎障害時における骨由来新規腎リン利尿因子であるFGF23代謝調節機構の研究

研究課題名(英文) Study on the FGF23 metabolic regulation mechanism derived bone as a novel phosphaturic factor in renal insufficient status.

研究代表者

重松 隆 (Shigematsu, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30187348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回、In vitroで骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞を分離してFGF23産生能を検討した。分化石灰化能を有する骨芽細胞系Cell LineのMC3T3-E1細胞を、アスコルビン酸刺激とリン負荷にて骨細胞まで分化石灰化させた。成熟骨芽細胞と初期骨細胞が特にFGF23産生能力が高いことが判明した。しかも、FGF23産生促進はリン負荷よりも活性型ビタミンD化合物が産生促進作用が強かった。その他、脾臓構成細胞のうちPlasmatoïd樹状細胞や、異所性石灰化した血管でもFGF23産生能を部分的にも有することを観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGF23は腎機能障害者においては、生命予後と密接に関係することが明らかとなりつつある。またFGF23受容体となるKlotho蛋白をコードするKlotho遺伝子は長寿遺伝子すなわち抗老化作用を有することが明らかとなった。本研究成果は、この老化の本質的なメカニズムの一端を明らかにするものであり、今後の抗老化作用を有する創薬にもつながる成果である。さらには心血管病の進展や免疫系への作用など広い分野の研究領域を啓く可能性が

研究成果の概要(英文)：We estimated the FGF23 production in vitro among isolated osteoblasts, osteocytes and osteoclast in bone constitution cells without osteocyte harvest. The osteoblastic Cell Line MC3T3-E1 cells have ability to be calcified spontaneously. We changed these cells into osteocytes by ascorbic acid and phosphate overload in vitro. We estimate the FGF23 mRNA expression at each stage from osteoblast to osteocyte. The both of matured osteoblast and immature osteocyte had the most effective production ability. We discovered that the most powerful stimulator on FGF23 is active vitamin D and analogues (vitamin D receptor activator), but not phosphate loading. In addition, we were able to observe the even plasmatoïd dendritic cell in spleen and calcified vessel as an ectopic calcification have also FGF23 production ability. These phenomena might explain the effect of FGF23 on cardiovascular events and immune system. This area is needed further investigation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：FGF23 骨細胞 骨芽細胞 ビタミンD リン

1 . 研究開始当初の背景

腎機能障害に由来する二次性副甲状腺機能亢進症は、PTH 高値を示し腎臓のリン利尿過剰による更なる腎機能低下と線維性骨炎を来す。骨由来の FGF23 は腎臓で抗加齢遺伝子蛋白の Klotho 複合体を受容体としリン利尿亢進とビタミン D 活性化抑制作用を示す。このように腎臓と骨は腎-骨連関軸として関連が深い。しかし腎機能障害並びに腎機能廃絶に伴う腎-骨連関軸の鍵となる FGF23 動的平衡についてはほとんど知られておらず、軸のミッシングリンクとなっている状況であった。

2 . 研究の目的

本研究では、腎機能障害の進展に伴う骨・ミネラル代謝異常のうち、腎-骨連関軸のミッシングリンクとなっている腎臓を中心としたリンと FGF23 の代謝調節機構を中心に、骨組織における FGF23 産生調節メカニズムと腎機能障害の及ぼす効果の検討を行う。

3 . 研究の方法

骨細胞様細胞培養法を用いて、腎障害に大きく変動するリン・Ca・ビタミン D などの Ca 調節ホルモン・各種尿毒素の FGF23 の産生分泌に及ぼす作用を検討する。その上で、同実験系を用いて FGF23 の産生分泌調節の分子機構を検討した。

骨細胞様細胞培養法: 石灰化能を有する骨芽細胞(Osteoblast)Cell Line の MC3T3-E1 細胞を、50 μ g/ml のアスコルビン酸と 5mM β -glycerophosphate を 24 時間添加し強制的に分化誘導させ 14 日間長期培養を行い、骨細胞マーカーの Sclerostin 遺伝子 SOX-1 高発現 Cells を骨細胞群とした。得られた骨細胞様細胞培養にて無 37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 下で 48 時間培養し、培地中の C-端と intact-FGF23(カイノス社製 ELISA キット)で測定する。抽出した RNA を Realtime PCR 法を用いて FGF23 発現を確認した。

リン負荷: 腎機能低下に伴い蓄積上昇するリンに焦点をあて、リン調節ホルモンである FGF23 産生分泌に対する効果の検討を行う。in vitro にて得られた骨細胞様細胞にてリン(0.8mM, 2.0mM, 3.8mM)を培地中に添加し、培地中の C-端 FGF23 と intact-FGF23 濃度並びに FGF23 遺伝子発現の変化を測定する。(Control+初代骨細胞培養系 1 種 + 骨細胞様細胞培養群 1 種) \times リン 3 濃度の計 9 群で比較検討を行った。

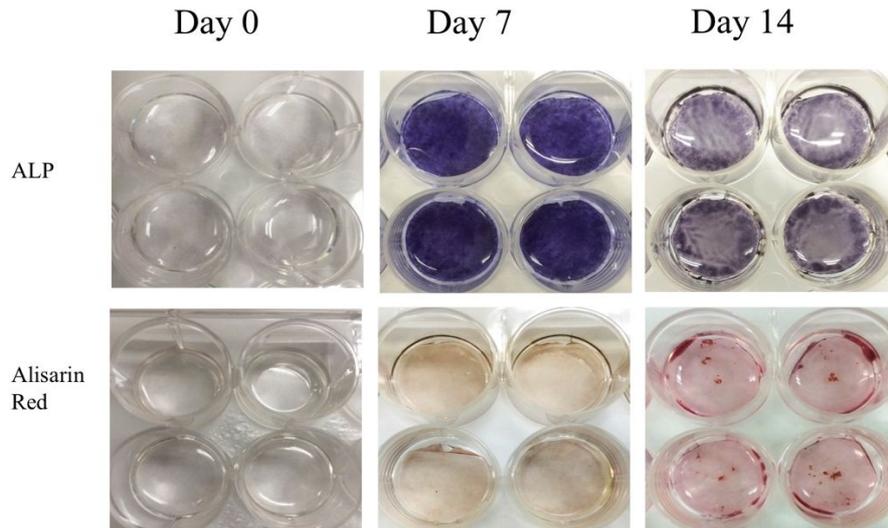
活性型ビタミン D: 腎機能低下に伴い低下する活性型ビタミン D に焦点をあて、FGF23 産生分泌に対する効果の検討を行った。in vitro にて骨細胞様細胞にて、Ca²⁺(1.25mM, 2.5mM, 4.0mM)と活性型ビタミン D 活性型ビタミン D (Calcitriol 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M) を培地中に添加を添加し、培地中 C-端と intact-FGF23 濃度並びに FGF23 遺伝子発現の変化を測定する細胞様細胞培養群 2 種 \times (Control+Ca₃ 濃度 + Calcitriol 3 濃度) の計 14 群で比較検討を行った。さらにビタミン D 受容体アクチベーター (VDRA): 二次性副甲状腺機能亢進症を有する慢性腎不全症例の治療に用いられている各種 VDRA を、ビタミン D 受容体 (VDR) の親和性に応じて濃度調整を行い、Control, alfacalcidol, Maxacalcitol, Falecalcitriol, Paricalcitol, Eldecalcitol の各群を骨細胞様細胞に添加し、培地中 C-端と intact-FGF23 濃度並びに FGF23 遺伝子発現の変化を測定し比較検討した。

ビタミン D 受容体 (VDR): これらの作用がビタミン D 受容体 (VDR) を介したものであるかどうかを確かめるために、培養骨細胞様細胞にて、VDR の knock down を行い FGF23 減弱を確認した。具体的には VDR knockdown sequence は pcDNA3.1 vector (Invitrogen)を用いた。pcDNA3.1 を培養 MC3T3-E1 細胞に入れる群と入れない群を作成し比較検討した。これらの細胞を 1 \times 10⁻⁸M Calcitriol で刺激し、FGF23 と VDR の mRNA を FGF23 と VDR (Mm00437297) プライマーを用い

て qPCR で検討した。

4. 研究成果

今回、In vitroで骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞を分離してFGF23産生能を検討した。分化石灰化能を有する骨芽細胞系Cell LineのMC3T3-E1細胞を、アスコルビン酸刺激とリン負荷にて骨細胞まで分化石灰化させた【図1】。



このうち、成熟骨芽細胞と初期骨細胞が特にFGF23産生能力が高いことが判明した。しかも、FGF23産生促進はリン負荷よりも活性型ビタミンD化合物が産生促進作用が強かった。さらにはビタミンDのうち、生体内の活性型ビタミンD (Calcitriol) のみでなく、現在臨床上で用いられている活性型ビタミンDアナログ (ビタミンD受容体刺激薬: VDRA) にParicalcitol, Maxacalcitol, farecalcitol, eldecalcitolにおいても観察され、さらには活性型ビタミンDの前駆体である25(OH)D3でも観察された。これらのFGF23の産生刺激能力は、各化合物のビタミンD受容体への親和性と関連性が認められた。このことから活性型ビタミンDならびにアナログでは、FGF23産生亢進は受容体を介するGenomic Actionであることが判明した。

その他、脾臓構成細胞のうちPlasmatoid樹状細胞や、異所性石灰化した血管でもFGF23産生能を部分的にも有することを観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- (1) Ishida K, Ashizawa N, Matsumoto K, Kobashi S, Kurita N, Shigematsu T, Iwanaga T. Novel bisphosphonate compound FYB-931 preferentially inhibits aortic calcification in vitamin D3-treated rats. J Bone Miner Metab. 2019 Feb 2. doi: 10.1007/s00774-019-00987-0. [Epub ahead of print]
- (2) Tetsuo Shoji, MD; Masaaki Inaba, MD; Masafumi Fukagawa, MD; Ryoichi Ando, MD; Masanori Emoto, MD; Hisako Fujii, DMS; Akira Fujimori, MD; Mitsuru Fukui, PhD; Hiroki Hase, MD; Tetsuya Hashimoto, MD; Hideki Hirakata, MD; Hirokazu Honda, MD; Tatsuo Hosoya, MD; Yuji Ikari, MD; Daijo Inaguma, MD; Toru Inoue, MD; Yoshitaka Isaka, MD; Kunitoshi Iseki, MD; Eiji Ishimura, MD; Noritomo Itami, MD; Chiharu Ito, MD; Toshitaka Kakuta, MD; Toru Kawai, MD; Hideki Kawanishi, MD; Shuzo

Kobayashi, MD; Junko Kumagai, MD; Kiyoshi Maekawa, MD; Ikuto Masakane, MD; Jun Minakuchi, MD; Koji Mitsuiki, MD; Takashi Mizuguchi, MD; Satoshi Morimoto, MD; Toyoaki Murohara, MD; Tatsuya Nakatani, MD; Shigeo Negi, MD; Shinichi Nishi, MD; Mitsushige Nishikawa, MD; Tetsuya Ogawa, MD; Kazumichi Ohta, MD; Takayasu Ohtake, MD; Mikio Okamura, MD; Senji Okuno, MD; Takashi Shigematsu, MD; Toshitsugu Sugimoto, MD; Masashi Suzuki, MD; Hideki Tahara, MD; Yoshiaki Takemoto, MD; Kenji Tanaka, MD; Yoshihiro Tominaga, MD; Yoshiharu Tsubakihara, MD; Yoshihiro Tsujimoto, MD; Kazuhiko Tsuruya, MD; Shinichiro Ueda, MD; Yuzo Watanabe, MD; Kunihiro Yamagata, MD; Tomoyuki Yamakawa, MD; Shozo Yano, MD; Keitaro Yokoyama, MD; Noriaki Yorioka, MD; Minoru Yoshiyama, MD; Yoshiki Nishizawa, MD.

Effect of Oral Alfacalcidol on Clinical Outcomes in Patients Without Secondary Hyperparathyroidism Receiving Maintenance Hemodialysis : The J-DAVID Randomized Clinical Trial. JAMA 320(22):2325-2334, 2018

- (3) Takashi Shigematsu, Masafumi Fukagawa, Keitaro Yokoyama, Takashi Akiba, Akifumi Fujii, Motoi Odani, Tadao Akizawa
Effects of the intravenous calcimimetic etelcalcetide on bone turnover and serum fibroblast growth factor 23: post-hoc analysis of an open-label study.
Clinical Therapeutics 2018 Dec;40(12):2099-2111. doi: 10.1016/j.clinthera.2018.10.016
- (4) Masaki Ohya,* Mitsuru Yashiro, Tomohiro Sonou, Kouji Okuda, Toru Mima, Yoshinori Tone, Shigeo Negi, Yasushi Saika, Takashi Shigematsu : Intravenous maxacalcitol therapy correlates with serum fibroblast growth factor 23 levels in hemodialysis patients independent of serum phosphate or calcium levels
Contrib Nephrol. 2018;196:44-51. doi: 10.1159/000485696. Epub 2018 Jul 24
- (5) Yuko Iwashita, Masaki Ohya (Corresponding Author), Mitsuru Yashiro, Tomohiro Sonou, Kazuki Kawakami, Yuri Nakashima, Takuro Yano, Yu Iwashita, Toru Mima, Shigeo Negi, Kaoru Kubo, Koichi Tomoda, Toshitaka Odamaki, Takashi Shigematsu
Dietary changes involving Bifidobacterium longum and other nutrients delays CKD progression.
Am J Nephrol. 2018;47:325-332. doi: 10.1159/000488947.
- (6) Mitsuru Yashiro, Masaki Ohya, Toru Mima, Yumi Ueda, Yuri Nakashima, Kazuki Kawakami, Yohei Ishizawa, Shuto Yamamoto, Sou Kobayashi, Takuro Yano, Yusuke Tanaka, Kouji Okuda, Tomohiro Sonou, Tomohiro Shoshihara, Yuko Iwashita, Yu Iwashita, Kouichi Tatsuta, Ryo Matoba, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu FGF23 modulates the effects of erythropoietin on gene expression in renal epithelial cells.
Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis. 2018 ; 11 : 125-136
DOI <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S158422>
- (7) Takashi Shigematsu, Masafumi Fukagawa, Keitaro Yokoyama, Takashi Akiba, Akifumi Fujii, Motoi Odani, Tadao Akizawa, ONO-5163 Study Group : Long-term effects of etelcalcetide as intravenous calcimimetic therapy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism.
Clin Exp Nephrol. 22(2):426-436, 2018 doi: 10.1007/s10157-017-1442-5.

- (8) Yokoyama K, Fukagawa M, Shigematsu T, Akiba T, Fujii A, Odani M, Akizawa T.
A 12-week dose-escalating study of etelcalcetide (ONO-5163/AMG 416), a novel intravenous calcimimetic, for secondary hyperparathyroidism in Japanese hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 88(2):68-78, 2017 doi: 10.5414/CN108974.
- (9) Obi Y, Hamano T, Wada A, Tsubakihara Y3; Committee of Renal Data Registry of the Japanese Society for Dialysis Therapy. Nakai S, Hanafusa N, Masakane I, Itami N, Yamagata K, Shinoda T, Kazama JJ, Watanabe Y, Shigematsu T, Marubayashi S, Morita O, Kimata N, Wakai K, Ogata S, Iseki K, Yamamoto K, Shintani A. : Vitamin D Receptor Activator Use and Cause-specific Death among dialysis Patients: a Nationwide Cohort Study using Coarsened Exact Matching.
Sci Rep. 2017 Jan 31;7:41170. doi: 10.1038/srep41170.
- (10) Tomohiro Sonou, Masaki Ohya, Mitsuru Yashiro, Tomohiro Syoshihara, Asuka Masumoto, Yuri Nakashima, Teppei Ito, Toru Mima, Shigeo Negi, Hiromi Kimura-Suda, Takashi Shigematsu
Magnesium Prevents Phosphate-induced Vascular Calcification via TRPM7 and Pit-1 using Aortic Tissue Culture. *Hypertens Res.* 2017 Jun;40(6):562-567.
- (11) Yuri Nakashima, Toru Mima, Mitsuru Yashiro, Tomohiro Sonou, Masaki Ohya, Asuka Masumoto, Shintaro Yamanaka, Daisuke Koreeda, Koichi Tatsuta, Yoshiyuki Hanba, Mari Moribata, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu : Expression and localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 and Klotho in the spleen: Its physiological and functional implications.
Growth Factors. 2016 Dec;34(5-6):196-202.

〔学会発表〕(計7件)

- (1) Toru Mima, Yuri Nakashima, Masaki Ohya, Mitsuru Yashiro, Kazuki Kawakami, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu : FGF23-Klotho axis involving B cell immune response and possibly causing for ESRD patients as immunocompromised hosts.
ISN Frontiers Meetings 2018. 2018.2.22-25, Tokyo, Japan.
- (2) Masaki Ohya, Kazuki Kawakami, Tomohiro Sonou, Mitsuru Yashiro, Toru Mima, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu.: 1,25-Dihydroxyvitamin D Stimulation Increases FGF23 Expression in Calcified Vessels Under High Phosphate Condition.
ASN Kidney Week 2018. 2018.10.23-28, San Diego ,USA
- (3) Masaki Ohya, Tomohiro Sonou, Takashi Shigematsu, Kouji Okuda, Yuko Iwashita, Mitsuru Yashiro, Tomohiro Shoshihara, Kazunori Kawakami, Yuri Nakashima, Toru Mima, Shigeo Negi : Magnesium prevents phosphate-induced vascular medial calcification (VC) via TRPM7 and Pit-1 in an aortic tissue culture ex-vivo model.
ISN Frontiers Meetings 2018. 2018.2.22-25, Tokyo, Japan.
- (4) Mitsuru Yashiro, Toru Mima, Masaki Ohya, Yuri Nakashima, Shigeo Negi, Takashi Shigematsu : Crosstalk between FGF23 and erythropoietin signaling in renal tubule epithelial cells. ISN Frontiers Meetings 2018. 2018.2.22-25, Tokyo, Japan.
- (5) 大矢昌樹・河上和紀・重松隆：ワークショップ「FGF23 とビタミン D～石灰化血管におけるビタミン D 刺激による FGF23 産生～」第 63 回日本透析医学会学術集会・総会 2018.6.29-

7.1 神戸

- (6) 美馬亨・中島悠里・大矢昌樹・重松隆：ワークショップ 透析患者で高値を示す FGF23 の免疫系の関与 第 6 1 回日本透析医学会学術集会 2016.6.9-12 大阪
- (7) 大矢昌樹・増本明日香・奥田浩二・重松隆：シンポジウム 血管石灰化とリン吸着剤 第 6 1 回日本透析医学会学術集会 2016.6.9-12 大阪

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 美馬亨・中島悠里・大矢昌樹・重松隆：CKD-MBD 発症に重要な FGF23-Klotho シグナルの免疫系に果たす役割 .最新透析医療 先端技術との融合,新田孝作監修,峰島三千男,土谷健編,医薬ジャーナル社,大阪：555-560,2016
- (2) 大矢昌樹・屋代充・重松隆：VDRA と FGF23 産生制御 .最新透析医療 先端技術との融合,新田孝作監修,峰島三千男・土谷健編,医薬ジャーナル社,大阪：702-704,2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

公立大学法人和歌山県立医科大学腎臓内科講座として業績を公開中
<https://www.wakayama-med.ac.jp/kenkyu-sankangaku/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

大矢昌樹：

Ohya Masaki：

所属研究機関名：公立大学法人和歌山県立医科大学

部局名：腎臓内科学講座

職名：医学部講師

研究者番号 (8 桁): 90550301

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。