

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16161

研究課題名(和文)カルシウム・リン代謝異常症における異所性石灰化の分子機序の検討

研究課題名(英文) Pathogenesis of ectopic calcification in disorders of calcium and phosphate metabolism.

研究代表者

木下 祐加 (Kinoshita, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00746729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：後天性のfibroblast growth factor 23 (FGF23)関連低リン血症性疾患である腫瘍性骨軟化症(TIO)を対象とし、骨以外の間葉系腫瘍からFGF23が産生される機序を検討した。耳下腺に発生したFGF23産生腫瘍を用いてRNAシーケンズを行い、腫瘍におけるKlothoの発現上昇を確認した。また腫瘍組織において、Klotho/FGFR1c下流のシグナルであるMAPK経路の活性化を確認した。TIOの原因腫瘍において、分泌されたFGF23が腫瘍のKlotho/FGFR1cに作用しFGF23産生を促進するというポジティブ・フィードバック機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、TIOの原因腫瘍に発現するKlothoがFGF23産生調節に関与している可能性が示された。近年Klothoが骨細胞や骨芽細胞に発現することが報告されていることから、TIOの原因腫瘍におけるKlotho発現は、間葉系細胞の骨芽細胞分化、すなわち腫瘍内における異所性石灰化を反映している可能性がある。したがって、TIOにおけるKlotho発現調節機構を更に検討することで、TIO以外の疾患における異所性石灰化の機序の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the mechanism of how mesenchymal tumors in tumor-induced osteomalacia produce fibroblast growth factor 23 (FGF23), which is one of the hormones usually secreted from the bone. We have performed RNA-sequencing analysis using an FGF23-producing tumor in the parotid gland and found the elevated expression of Klotho in the tumor. Additionally, we have seen the activation of MAPK signaling pathway in the tumor. Therefore, we assume that FGF23 secreted from tumors may activate the receptor complex of Klotho/FGFR1c and facilitate further the production of FGF23 in tumors by a positive feedback mechanism.

研究分野：骨ミネラル代謝異常症

キーワード：腫瘍性骨軟化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生体において、石灰化は生理的に骨や歯に限定して見られる現象であり、その過程はホルモンや局所因子により厳密に制御されている。一方、骨や歯以外の軟部組織にカルシウム塩の沈着が見られる現象を、異所性石灰化と呼ぶ。典型的な異所性石灰化は血管壁、心臓弁、腎臓などに見られるが、一部の疾患において皮下、筋肉、大脳基底核、靭帯などに著明な石灰化を生じることが報告されている。副甲状腺ホルモン (PTH) や線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) は骨ミネラル代謝調節における主要なホルモンであるが、これらのホルモン異常による疾患において、しばしば異所性石灰化の合併が報告されている。

FGF23 は生理的には骨細胞や骨芽細胞で産生され、腎臓への作用により、リンとビタミン D 代謝を調節するホルモンである。FGF23 の作用過剰は、各種の低リン血症性くる病および骨軟化症を惹起する (図 1、表 1)。先天性の FGF23 関連低リン血症性疾患の代表例として、*phosphate-regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)* 変異による X 染色体優性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets, XLHR: OMIM No. 307800)、*FGF23* 変異による常染色体優性低リン血症性くる病 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets, ADHR: OMIM No. 193100) が知られている。また、後天性に血中 FGF23 の上昇を伴う低リン血症を来す疾患として、腫瘍性骨軟化症 (tumor-induced osteomalacia: TIO) (Shimada *et al.* Endocrinology 2002) や、含糖酸化鉄およびポリマルトース鉄の静注による薬剤性低リン血症性骨軟化症が報告されている (Shimizu *et al.* Bone 2009)。TIO の原因腫瘍の多くは、病理組織学的には phosphaturic mesenchymal tumor, mixed connective tissue variant (PMTMCT) と呼ばれる間葉系腫瘍である。TIO において骨以外の間葉系組織から異所性に FGF23 が産生される機序は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、Ca・リン代謝異常症における異所性石灰化の機序を明らかにすることを目的としている。後天性の FGF23 関連低リン血症性疾患である TIO を対象とし、間葉系腫瘍から FGF23 が産生される機序の背景に腫瘍組織内の異所性石灰化が関与しているという仮説をたて、腫瘍組織を用いて以下の検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) 耳下腺腫瘍による TIO の一症例を対象として、耳下腺に発生した FGF23 産生腫瘍と正常耳下腺の組織を用いて、RNA シークエンスを施行した。
- (2) 外科手術が施行された TIO 患者の腫瘍組織を用いて、各種免疫染色を施行した。
- (3) 腫瘍内に発現増加を認めた遺伝子の DNA メチル化解析や、腫瘍に高発現するタンパクの血中濃度の測定を行った。
- (4) 腫瘍内において活性化が予測されるシグナル伝達経路について免疫染色を行った。

4. 研究成果

耳下腺に発症した FGF23 産生腫瘍と正常耳下腺の組織を用いて、RNA シークエンスを施行した。その結果、腫瘍組織において骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞に発現する遺伝子群の発現上昇を認めた。腫瘍性骨軟化症の腫瘍組織では、骨組織に類似した環境が形成されている可能性が示された。

次に、耳下腺腫瘍において発現上昇を認めた遺伝子のひとつであり一回膜貫通型蛋白である

Klothoに着目して検討をすすめた。外科手術を施行されたT10患者の腫瘍組織の免疫染色を施行し、13例中9例の腫瘍においてKlotho陽性細胞を認めた(表1)。KlothoはFGF受容体1c(FGFR1c)と複合体を形成し、FGF23の受容体となることが報告されている。また、骨細胞におけるFGFRシグナルがFGF23産生調節に関与することも報告されている。これらのことから、腫瘍から分泌されたFGF23が腫瘍内に発現するKlothoとFGFR1cの複合体に作用し、ERKの活性化を介してFGF23産生をさらに促進するというポジティブフィードバック機構が存在する可能性を考えた(図1)。実際、腫瘍組織の免疫染色では13例中11例にERKのリン酸化を認めた(表1)。

Klothoは腎臓、胎盤、小腸などに限定して発現することが知られ、この組織特異性にKlotho遺伝子のDNAメチル化が関与している可能性が報告されている。T10の原因腫瘍におけるKlotho発現機序を明らかにするために、腫瘍DNAを用いてKlotho遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化解析を行った。その結果、Klotho遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化の程度と、RT-PCRや免疫染色で確認される腫瘍内Klotho発現量に関連を認めなかった。したがって、T10の原因腫瘍におけるKlothoの発現はDNAメチル化以外の機構によって調節されていると考えた。また、血中FGF23濃度と血中Klotho濃度に有意な相関を認めないことから、遊離型Klothoではなく膜型KlothoがT10の原因腫瘍からのFGF23産生に関与していると考えた。近年、Klothoが骨細胞や骨芽細胞に発現することが報告されており、腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍におけるKlotho発現は、間葉系細胞の骨芽細胞分化、すなわち腫瘍内における異所性石灰化を反映していると考えた。

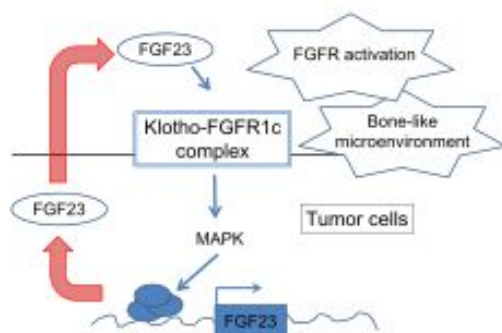
表1 Klothoとp-ERKの免疫染色(文献1より引用)

Summary of immunohistochemical and RT-PCR analyses of tumors.

Case	Klotho		p-Erk
	IHC	RT-PCR	IHC
1	+	+	+
2	+	N.E.	+
3	+	+	+
4	+	N.E.	+
5	+	+	+
6	-	N.E.	+
7	+	N.E.	+
8	-	N.E.	+
9	+	N.E.	+
10	+	N.E.	N.E.
11	-	-	N.E.
12	-	N.E.	+
13	+	N.E.	+

IHC, Immunohistochemistry; +, positive; -, negative; N.E., not examined.

図1 T10の原因腫瘍におけるFGF23産生のポジティブ・フィードバック機構
(文献1より引用)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Kinoshita Y, Takashi Y, Ito N, Ikegawa S, Mano H, Ushiku T, Fukayama M, Nangaku M, Fukumoto S. Ectopic expression of Klotho in fibroblast growth factor23 (FGF23)-producing tumors that cause tumor-induced rickets/osteomalacia (TIO). Bone Rep. 2018 Dec 31;10:100192. doi:10.1016/j.bonr.2018.100192. eCollection 査読有

(2) Kinoshita Y, Fukumoto S. X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment. Endocr Rev. 2018 Jun 1;39(3):274-291.doi:10.1210/er.2017-00220. Review. PubMed PMID: 29381780. 査読有

(3) Kobayashi H, Ito N, Akiyama T, Okuma T, Kinoshita Y, Ikegami M, Shinoda Y, Fukumoto S, Tanaka S, Kawano H. Prevalence and clinical outcomes of hip fractures and subchondral insufficiency fractures of the femoral head in patients with tumour-induced osteomalacia. Int Orthop. 2017 Dec;41(12):2597-2603.doi:10.1007/s00264-017-3610-3. Epub 2017 Aug 23. PubMed PMID: 28836028. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

(1) 木下祐加、よくわかる骨粗鬆症治療薬の使い方、第19回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会、2018年9月8日、中野セントラルパーク(中野区)

(2) 木下祐加、The activation of FGF receptor signaling is involved in the pathogenesis of FGF23-producing tumors、The 15th Bone Biology Forum、2018年8月18日、クロスウェーブ幕張(千葉市)

(3) 木下祐加、FGF23関連低リン血症の病態、第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年7月28日、長崎ブリックホール(長崎市)

(4) 木下祐加、成人期の FGF23 関連低リン血症性疾患の診断と治療 FGF23 関連低リン血症の病態、第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年7月27日、長崎ブリックホール(長崎市)

(5) 木下祐加、高士祐一、伊東伸朗、池川志郎、牛久哲男、福本誠二、腫瘍性骨軟化症の原因腫瘍における異所性 Klotho (KL) 発現、第91回日本内分泌学会学術総会、2018年4月28日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎市)

(6) 木下祐加、Ectopic expression of Klotho in the causative tumors of tumor-induced osteomalacia(TIO)、第35回日本骨代謝学会学術集会、2017年7月27日、ホテル日航福岡(福岡市)

(7) 木下祐加、伊東伸朗、槇田紀子、南学正臣、福本誠二、ビタミンD依存症2型の治療に伴う骨代謝の変化、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(京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://square.umin.ac.jp/endo403/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 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。