

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17079

研究課題名(和文) FGF23シグナル破綻における骨・血管のカルシウムパラドックス

研究課題名(英文) The paradox of calcium in bone and blood vessel induced by FGF23 signaling disruption

研究代表者

長谷川 智香 (Hasegawa, Tomoka)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50739349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身性のカルシウム・リン調節因子であるFGF23/klothoシグナルの破綻により誘導される骨基質石灰化異常のメカニズムを明らかにする目的で、FGF23遺伝子欠損マウスの長管骨を組織学的に解析した。その結果、FGF23遺伝子欠損マウスでは、高リン・高カルシウム結晶を呈するにも関わらず、骨基質の低石灰化が生じており、これらは骨芽細胞における局所リン代謝調節因子の発現変化と石灰化球形成の抑制を生じるとともに、骨細胞におけるDMP1をはじめとしたSIBLING Family蛋白発現上昇による骨細胞の機能異常に起因する可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、FGF23/klothoシグナル破綻によって誘導される骨基質石灰化異常の病理機序解明の一助を担うものである。骨基質石灰化は、全身性および局所性のカルシウム・リン代謝調節因子によって制御されており、複雑な機序で進行する。本研究成果は、全身性のリン調節因子であるFGF23/klothoシグナルの局所作用の可能性を示唆するものであり、基質石灰化制御機構の解明という基礎医学の発展のみならず、慢性腎臓病に伴う骨基質石灰化異常の病態解明や新規治療法の開発にも繋がる臨床研究の基盤として重要な学術的・社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined femora in FGF23 deficient mice to clarify the mechanism of bone mineralization induced by disrupted FGF23/klotho signaling.

FGF23 deficient mice revealed a broad non-mineralized bone matrix despite highly-elevated serum concentration of Ca/Pi. Many matrix vesicles were localized in osteoid underneath ALP/ENPP1-positive osteoblasts, while few mineralized nodules were formed in FGF23 deficient osteoid. Furthermore, osteocytes in FGF23 deficient mice expressed abundant SIBLING family proteins such as DMP-1 and osteopontin compared with control mice. It seems likely that the disrupted FGF23/klotho signaling may induce the disfunction of osteoblasts and osteocytes and the abnormal mineralization in bone.

研究分野：組織学

キーワード：骨基質石灰化 FGF23/klotho 骨芽細胞 骨細胞

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

1. 研究開始当初の背景

FGF23/klotho シグナルは、腎臓の近位尿細管において血中リン濃度調節に作用する全身性のリン調節因子である。一方、骨組織では、骨基質の主体を為すリン酸カルシウム結晶を形成するためにリン酸イオンとカルシウムイオンの局所的な濃度調節が必要である。そのため、骨芽細胞・骨細胞に存在するピロリン酸合成酵素 (ENPP1) や組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNALP) によるリン酸イオン生成と、NaPi co-transporter III (Pit 1) などの膜輸送体によるリン酸イオンの移動が生じていると考えられている。加えて、Dentin matrix protein (DMP)-1 や osteopontin などの SIBLING family 蛋白は、血中リン・カルシウム濃度非依存的に局所的な基質石灰化の調節に関与することが報告されている。これらのことから、骨基質石灰化は、全身性ならびに局所性のリン濃度調節機構を主体に、複雑なメカニズムで調節を受けていることがわかる。

これまでの先行研究において、FGF23/klotho シグナルの破綻により高リン血症を呈する *klotho* 遺伝子変異 (*kl/kl*) マウスの骨組織では、広範囲に亘って未石灰化骨基質が局在する一方、血管石灰化および血管骨化が誘導されることを明らかにしてきた。さらに、個体発生・成長時に骨芽細胞系細胞に *klotho* や *Fgfr1c* 遺伝子が発現していることが見出され、このことは、1) FGF23 が腎臓を介さずに局所的なリン代謝調節やオートクライン・パラクライン作用を行う可能性、2) *Fgf23* 遺伝子欠損 (*Fgf23*^{-/-}) マウスにおける骨基質石灰化異常は、*klotho* 欠損状態 (*kl/kl* マウスや *klotho*^{-/-} マウス) と相違がある可能性を示唆している。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、1) FGF23 が腎臓を介さずに局所的なリン代謝調節やオートクライン・パラクライン作用を行う可能性、2) *Fgf23*^{-/-} マウスにおける骨基質石灰化異常と、*kl/kl* マウスや *klotho*^{-/-} マウスの骨基質石灰化異常に相違がある可能性、すなわち、基質石灰化における FGF23 や *klotho* の独自作用が存在する可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

生後7週齢 *Fgf23*^{-/-} マウスの大腿骨・脛骨を用い、FGF23 が欠損した場合における骨基質石灰化異常の微細構造解析、および、骨芽細胞・骨細胞に存在する $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{PO}_4^{3-}$ の膜輸送体や酵素群、SIBLING Family 蛋白・遺伝子の局在・発現解析を行った。骨基質石灰化異常については、透過型電子顕微鏡を用いた石灰化結晶の微細構造解析を行うとともに、基質石灰化の開始点となる基質小胞・石灰化球形成の微細構造解析を行った。また、骨芽細胞、前骨芽細胞、骨細胞における TNALP, ENPP1 などの $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{PO}_4^{3-}$ 産生・輸送に関わる各種の酵素・膜輸送体、および、DMP-1 や osteopontin など SIBLING family の局在を免疫組織化学にて、遺伝子発現を real timePCR にて解析した。

4. 研究成果

生後7週齢 *Fgf23*^{-/-} マウスでは、control マウスと比較して、血中リン・カルシウム濃度高値を呈するにも関わらず、大腿骨・脛骨は広範囲に亘って低石灰化を示していた。未石灰化骨基質の表面に存在する骨芽細胞は、TNALP 陽性反応の低下と ENPP1 強陽性反応を呈したことから、石灰化抑制因子であるピロリン酸の局所的濃度が上昇していると推測された。また、このような骨芽細胞とその直下の類骨層を透過型電子顕微鏡観察したところ、多数の基質小胞が認められたにも関わらず、石灰化球はほとんど認められず、石灰化結晶ならびに石灰化球の成長が抑制されている可能性が強く示唆された。一方、未石灰化骨基質に埋め込まれた骨細胞の中には、SIBLING family 蛋白である DMP-1 や osteopontin を強発現しているにも関わらず、石灰化沈着を生じているものが存在した。さらに、*Fgf23*^{-/-} マウスの大腿骨では、*Dmp-1*, *Osteopontin*, *Mepe* 遺伝子の発現が上昇する一方、SIBLING ファミリー蛋白を基質として用いる *Phex* 遺伝子の発現上昇も認められたことから、骨細胞による石灰化抑制が解除され、骨細胞自身やその周囲に石灰化沈着が誘導された可能性が推測された。以上より、FGF23 欠損状態では、骨芽細胞・骨細胞の機能異常が生じ、骨芽細胞による骨基質石灰化が抑制される一方、骨細胞への過剰な石灰化沈着が誘導される骨基質石灰化異常が生じる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Hasegawa T., Yamamoto T., Hongo H., Qiu Z., Abe M., Kanesaki T., Tanaka K., Endo T., Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Three-dimensional ultrastructure of osteocytes assessed by focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM). *Histochem Cell Biol.* 149(4):423-432, 2018. DOI: 10.1007/s00418-018-1645-1. (査読有)
2. 長谷川智香, 宮本幸奈, 邱 紫璇, 阿部未来, 本郷裕美, 網塚憲生: FGF23/klotho シグナルによる基質石灰化制御機構の解明. *日本骨粗鬆症学会雑誌* 4(3):134-136, 2018. (査読無)
3. Sakurai A., Hasegawa T., Kudo A., Shen Z., Nagai T., Abe M., Yoshida T., Hongo H., Yamamoto T., Yamamoto T., Oda K., Freitas de PHL., Li M., Sano H., Amizuka N.: Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse metaphyseal trabecular and cortical bone. *Biomed Res.* 38(4):257-267, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2220/biomedres.38.257> (査

読有)

4. Hikone K., Hasegawa T., Tsuchiya E., Hongo H., Sasaki M., Yamamoto T., Kudo A., Oda K., Haraguchi M., Freitas PHL., Li M., Iida J., Amizuka N.: Histochemical examination on periodontal tissues of *Klotho*-deficient mice fed with phosphate insufficient diet. *J Histochem Cytochem.* 65(4): 207-221, 2017. DOI: 10.1369/0022155416689670(査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Hasegawa T., Miyamoto Y., Qiu Z., et al.: Abnormal mineralization in bone and aorta induced by the disrupted signaling of FGF23/*klotho*. International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, 2019.
2. Hasegawa T., Miyamoto Y., Hongo H., et al.: Paradoxical mineralization in bone and aorta induced by defective FGF23/*klotho* signaling - Histological examination on *kl/kl* and *klotho*^{-/-} mice - . The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2018.
3. 長谷川智香, 邱 紫璇, 山本知真也, 他: *Fgf23* 遺伝子欠損マウスの骨基質石灰化異常における SIBLING family の関与. 第 38 回日本骨形態計測学会, 2018 年
4. 長谷川智香, 宮本幸奈, 本郷裕美, 他: FGF23/*klotho* シグナルによる基質石灰化制御機構. 第 60 回歯科基礎医学学会, 2018 年
5. 長谷川智香, 邱 紫璇, 山本知真也, 他: *Fgf23* 遺伝子欠損マウスの骨基質石灰化異常における SIBLING family の局所作用. 第 36 回日本骨代謝学会学術集会, 2018 年
6. 長谷川智香, 宮本幸奈, 邱 紫璇, 他: 骨基質石灰化における FGF23/*klotho* と SIBLING family の連関 - *Fgf23* 遺伝子欠損マウスを用いた組織化学・微細構造解析 - . 第 20 回日本骨粗鬆症学会, 2018 年
7. 長谷川智香, 本郷裕美, 網塚憲生: 骨基質石灰化における局所リン酸供与と FGF23/*klotho* シグナル. 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 2017 年
8. 長谷川智香, 網塚憲生: *klotho*/FGF23 破綻による骨組織石灰化異常は低リン食給餌により回復する. 第 37 回日本骨形態計測学会, 2017 年
9. 長谷川智香, 山本知真也, 網塚憲生: *kl/kl* マウスにおける基質小胞性石灰化の抑制メカニズムについて. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017 年
10. Hasegawa T., Hikone K., Hongo H., et al.: Histochemical examination on calcification in bone and arteries in *kl/kl* mice and *klotho*^{-/-} mice fed with phosphate-insufficient diet. The Joint Annual Scientific Meetings of the Endocrine Society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, 2016.
11. 長谷川智香, 本郷裕美, 山本知真也, 坪井香奈子, 網塚憲生: 低リン食給餌が *kl/kl* マウスおよび *klotho*^{-/-} マウスの骨・血管石灰化に及ぼす組織学的影響. 第 34 回日本骨代謝学会学術大会, 2016 年

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。