

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07838

研究課題名(和文) リンの感知における骨細胞の機能と骨成熟の影響

研究課題名(英文) Role of Osteocytes in Phosphate Sensing and Its Relation to Skeletal Maturation

研究代表者

道上 敏美 (Michigami, Toshimi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・骨発育疾患研究部門(旧環境影響部門)  
・部長

研究者番号：00301804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを用いて、成長に伴う骨成熟がリン代謝に及ぼす影響について検討した。成獣マウスの骨には幼若マウスの骨よりもリン酸利尿因子FGF23が多く存在したが、FGF23以外のリン代謝関連分子や骨芽細胞・骨細胞マーカー遺伝子の発現は幼若マウスの細胞の方が高く、低リンくる病マウスの細胞で発現が高い遺伝子群と共通性を認めた。また、幼若マウスの腎臓においてはビタミンD不活性化酵素をコードするCyp24a1の発現が弱く、11c型ナトリウム/リン酸共輸送担体をコードするSlc34a3の発現が高かったことから、FGF23作用が弱いことが示唆され、成長期における体内のリンの蓄積に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長期にはリンの需要が高まり、リンの不足はくる病などの代謝性骨疾患や成長障害をきたすため、小児医療においてリン代謝の理解は重要である。本研究により、成長に伴って骨芽細胞や骨細胞におけるリン代謝や石灰化に関わる分子群の発現やリン酸応答性が変化することが明らかになった。また、低リンくる病の病態形成に骨芽細胞・骨細胞の成熟障害が関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using mouse models, we have investigated the relation between the skeletal maturation and alteration in phosphate metabolism during growth period. The bones of adult mice contained more abundant FGF23 protein than those of young mice. However, the expression of other analyzed molecules related to phosphate metabolism and osteoblastic differentiation was stronger in the osteoblasts and osteocytes derived from young mice than those from adult mice, and they were also up-regulated in the osteoblasts and osteocytes from a mouse model of hypophosphatemic rickets. The renal expression of Cyp24a1 was lower, and that of Slc34a3 was higher, in the younger mice than in the adult mice, which might suggest a weaker action of FGF23 and might contribute to the increase of phosphate in the body during growth period.

研究分野：骨ミネラル代謝学、小児科学

キーワード：リン代謝 骨細胞 骨芽細胞分化 骨成熟

## 1. 研究開始当初の背景

リンは生命の維持に必須のミネラルであり、さまざまな生物学的プロセスに関わる。さらに、脊椎動物においては、リンは骨格の形成や石灰化においても重要な役割を担う。リンの恒常性は腸管からの吸収と腎臓からの排泄により維持されており、その破綻は血清リン値の異常をもたらす。成長期には骨および軟部組織に多量のリンが付加される必要があるため、胎児および小児では血清リン値が成人に比し高く維持されている。

リンは骨格の形成や石灰化に必須であるため、慢性的な低リン血症は小児では成長障害やくる病を、成人では骨軟化症を引き起こす。一方、近年、成人においては、慢性腎臓病などに伴う高リン血症が心血管イベントや死亡のリスクを増加させることが示されている。従って、血清リン値をその年齢における至適範囲に維持することは、生体にとって極めて重要である。

リン恒常性維持機構において中心的な役割を担う fibroblast growth factor 23 (FGF23) は、主として骨細胞から産生される。骨細胞は骨芽細胞が骨基質に埋没して最終分化に至った細胞で、成人の骨においては骨中の全細胞の 90% 以上に相当すると考えられている。FGF23 は、腎近位尿細管の a 型・c 型ナトリウム/リン酸 (Na<sup>+</sup>/Pi) 共輸送担体の発現を低下させることによりリン酸排泄を増加させ、また、ビタミン D の活性化を抑制することにより腸管からのリン吸収を減少させる。興味深いことに、骨芽細胞は骨細胞への分化の過程で、FGF23 に加え、X 連鎖性優性低リン血症性くる病 (XLH) の責任遺伝子である *PHEX*、常染色体劣性低リン血症性くる病 1 型の責任遺伝子である *DMP1*、歯の異常と骨硬化を伴う低リン血症の責任遺伝子である *FAM20C* など、リン代謝関連分子の発現を獲得する。このことは、骨細胞がリン恒常性を維持するための司令塔として働くことを示唆する。*PHEX*、*DMP1*、*FAM20C* の機能喪失変異が FGF23 の過剰産生をもたらすことから、これらは骨局所において FGF23 産生を負に制御していることが推察される。

では、生体はどのようにして体内のリンの過不足を感知し、FGF23 やその他のリン代謝関連分子の産生を制御してリンの恒常性を維持しているのだろうか？ また、成長過程で血清リン値の正常範囲がシフトするのはどのような機序によるのか？ 現在までのところ、これらの疑問点に対する解答は得られていない。単細胞生物である細菌や酵母においては、生育環境中のリンの不足によりリンセンサー (リン感知受容体) を含む Pho/PHO regulon と呼ばれる一群の遺伝子の発現が変化し、環境に適応する。一方、哺乳類のような多細胞生物においては、個々の細胞レベルにおけるリンの過不足のみならず、whole body としてのリンのレベルを感知し、リン代謝関連分子の産生にフィードバックする必要があるが、その分子機構は不明であり、リンセンサーも同定されていない。そもそも、whole body としてのリンの過不足がどの組織で感知されるのかという点についても、見解は一致していない。

## 2. 研究の目的

前述したように、骨芽細胞や骨細胞はリン代謝に関連する分子群を発現しており、リン恒常性維持機構において中心的な役割を担っていると推察される。また、我々はこれまで、骨芽細胞や軟骨細胞など種々の細胞種において、細胞外無機リン酸濃度の変化が FGF 受容体や MEK/ERK 経路を介してシグナルを惹起し、遺伝子発現や細胞の挙動を制御することを報告してきた (Kimata, et al. *Bone* 2010; Yamazaki, et al. *J Cell Biochem* 2010; Nishino, et al. *J Cell Biochem* 2010)。さらに、XLH のモデルである *Hyp* マウスの骨細胞においては FGF 受容体や古典的 FGF リガンドの発現増加を認め (Miyagawa, et al. *PLoS One* 2014)、本疾患の病態の基盤が骨細胞におけるリン感知異常にある可能性がある。これらの成果を踏まえ、我々は whole body としてのリンの過不足が骨細胞や骨芽細胞によって感知され、成長過程においては骨の成熟に伴いリン感知の閾値がシフトするとの仮説を設定したので、本研究においては動物モデルを用いて本仮説を実験的に検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨からの骨芽細胞・骨細胞の単離

全ての動物実験は大阪母子医療センター研究所動物実験委員会の承認のもとで行った (承認番号 BMR-2018-1)。4 週齢の幼若な野生型 (WT) C57BL/6J マウスと 12 週齢の成獣 WT マウス、12 週齢の *Hyp* マウス (C57BL/6J background) を実験に使用した。これらのマウスから採血を行い、血清リン値や intact FGF23 値の測定を行った。FGF23 値の測定には Kainos 社の ELISA キットを使用した。

4 週齢および 12 週齢の WT マウスおよび 12 週齢の *Hyp* マウスの長管骨から、我々が以前報告した方法 (Miyagawa, et al. *PLoS One* 2014) に従って骨芽細胞および骨細胞を単離した。長管骨を無菌的に摘出し、鋏を用いて微細化した後、コラゲナーゼによる骨基質の消化を EGTA による脱灰を反復し、各ステップで遊離する細胞を回収することにより、骨芽細胞および骨細胞を分化度に応じて 9 つの fraction (Fr.) として単離した。使用するコラゲナーゼ溶液および EGTA 溶液の量は、マウスの体重により調節した。骨芽細胞マーカー、骨細胞マーカーの遺伝子発現から、Fr. 3-5 を骨芽細胞に富む細胞集団、Fr. 6-9 を骨細胞に富む細胞集団として以降の実験に用いた。

## (2) 遺伝子発現解析

上記の方法で単離した新鮮な初代骨芽細胞、骨細胞から RNA を抽出し、DNase 処理および cDNA 合成を行ったのち、TaqMan システムにより real-time PCR により、リン代謝や石灰化、骨芽細胞分化に関わる遺伝子群の発現を解析した。一部の遺伝子については、骨髄を除去した脛骨から抽出した RNA を用いて解析した。

また、リン恒常性維持においては FGF23 を介する骨と腎臓との機能的連関(bone-kidney axis)が中心的な役割を担うところから、腎臓における遺伝子発現も解析した。

## (3) 骨中 FGF23 の定量

骨中の FGF23 を測定するため、骨髄を除去した脛骨を凍結破砕し、4M のグアニジン溶液を用いて蛋白質を抽出し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて透析した後に ELISA に供した。測定された FGF23 量は、あらかじめ測定しておいた骨重量にて補正した。脛骨パラフィン切片を用いて、抗 FGF23 抗体による免疫染色も行った。

## (4) 初代骨芽細胞および骨細胞のリン酸応答性

前述の方法で単離した初代骨芽細胞(Fr.3-5)および骨細胞(Fr.6-9)を I 型コラーゲンゲルに包埋培養し、1 mM ないし 10 mM の無機リン酸存在下で 24 時間処理した後に RNA を抽出し、リン酸応答遺伝子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 成長に伴う血清リン値および FGF23 値の変化

4 週齢 WT マウスの血清リン値が 12 週齢 WT マウスの血清リン値に比較して有意に高いことを確認した。血清 intact FGF23 値は、12 週齢 WT マウスの方が 4 週齢 WT マウスよりも有意に高く、12 週齢 *Hyp* マウスの FGF23 値は 12 週齢 WT マウスの約 20 倍であった。

### (2) 4 週齢幼若 WT マウス由来骨芽細胞・骨細胞と 12 週齢成獣 WT マウス由来骨芽細胞・骨細胞における遺伝子発現の比較

骨芽細胞マーカーである *Keratocan* および骨細胞マーカーである *Dmp1* の発現から、いずれのマウスにおいても、Fr.3-5 で骨芽細胞、Fr.6-9 で骨細胞に富む細胞集団が回収されていることが確認された。そこで、リン代謝や骨芽細胞分化に関わる遺伝子群の発現を比較検討したところ、解析した遺伝子のうち、*Fgf23* については 12 週齢マウス由来細胞の方が高く発現していたが、*Keratocan*、*Dmp1*、*Alpl*、*Runx2*、*Fgfr1*、*Slc20a1*、*Slc20a2*、*Ank* については 4 週齢マウス由来細胞の方が高い発現を示した。骨細胞マーカーとして広く用いられている *Dmp1* の発現が 4 週齢マウスの骨芽細胞で 12 週齢マウスの骨細胞より著明に高かったことから、「成長による骨成熟」と「骨芽細胞から骨細胞への分化」が遺伝子発現に及ぼす影響が異なることが推察された。

### (3) 12 週齢 WT マウス由来骨芽細胞・骨細胞と 12 週齢 *Hyp* マウス由来骨芽細胞・骨細胞における遺伝子発現の比較

*Hyp* マウスは *Phex* 遺伝子に大きな欠失を有し、XLH のモデルとして広く使用されている。12 週齢 *Hyp* マウスの長管骨からも骨芽細胞、骨細胞を単離し、遺伝子発現を 12 週齢 WT マウス由来細胞と比較した。興味深いことに、前述の解析で 4 週齢 WT マウス由来細胞で 12 週齢 WT マウス由来細胞よりも発現が高かった *Keratocan*、*Dmp1*、*Alpl*、*Runx2*、*Fgfr1*、*Slc20a1*、*Slc20a2*、*Ank* は *Hyp* マウス由来細胞で WT マウス由来細胞よりも高く発現しており、すなわち、*Hyp* マウス骨由来細胞で高発現していた遺伝子群と 4 週齢幼若 WT マウス骨由来細胞で高発現していた遺伝子群には共通性を認めた。

### (4) 骨中 FGF23 の測定

4 週齢 WT マウス、12 週齢 WT マウスおよび 12 週齢 *Hyp* マウスの脛骨を採取し、骨髄を除去した後、前述のとおり蛋白質を抽出し、ELISA にて intact FGF23 を測定した。値はあらかじめ測定した骨重量にて補正した。血清 FGF 値と同様に、骨中 FGF23 値も 12 週齢 WT マウスの方が 4 週齢 WT マウスよりも高値であった。また、12 週齢 *Hyp* マウスの骨中には 12 週齢 WT マウスの約 30 倍と極めて多量の intact FGF23 が存在していた。抗 FGF23 抗体を用いた免疫染色においても、*Hyp* マウス骨で骨小腔および骨細管に強いシグナルを認めた。一方、脛骨から抽出した RNA を用いた real-time PCR においては、12 週齢 *Hyp* マウスの *Fgf23* mRNA 発現は 12 週齢 WT マウスの 3 倍の増加にとどまった。このことから、*Hyp* マウスにおける FGF23 値の上昇については、蛋白質レベルでの制御が重要であることが推察された。FGF23 の糖鎖修飾に関わる *Galnt3* の発現は、12 週齢 *Hyp* マウス骨から単離された骨芽細胞、骨細胞において 12 週齢 WT マウス由来細胞より高く発現していた。

### (5) 腎臓における遺伝子発現の比較

FGF23 の受容体として働く *Fgfr1*、共役受容体として働く *Klotho* の発現は、4 週齢 WT マウスの腎臓で 12 週齢 WT マウスと比べて高値を示した。12 週齢 *Hyp* マウスにおいては 12 週齢 WT マウスと比較してビタミン D-24 水酸化酵素をコードする *Cyp24a1* の発現増加、a 型および c 型 Na<sup>+</sup>/Pi 共輸送担体をコードする *Slc34a1*、*Slc34a3* の発現抑制を認めた。一方、4 週齢 WT マウスの腎臓では 12 週齢 WT マウスと比較して *Cyp24a1* の発現が抑制されており、一方、*Slc34s3* の発現が増加していた。このことから、4 週齢 WT マウスの腎臓においては、12 週齢 WT マウスに比

べて FGF23 作用が減弱し、体内にリン蓄積に寄与していることが推察された。

(6) 各マウスより単離した初代骨芽細胞および骨細胞のリン酸応答性の比較

前述の方法で 4 週齢 WT マウス、12 週齢 WT マウスおよび 12 週齢 *Hyp* マウスより単離した骨芽細胞 (Fr.3-5)、骨細胞 (Fr.6-9) をそれぞれ I 型コラーゲンゲルに包埋し、1 mM ないし 10 mM のリン酸を含む培地中で 24 時間インキュベートした後に RNA を抽出し、リン酸刺激に対して応答性を示すことが報告されている遺伝子について解析を行った。*Alpl* 発現については、*Hyp* マウス由来骨細胞を除いて、10 mM Pi 刺激により有意な低下を認めた。12W WT 由来骨芽細胞/骨細胞では、他のマウス由来の細胞よりも Pi 刺激による *Alpl* 発現抑制の程度が大きかった。*Ank* 発現は、4 週齢 WT マウス、12 週齢 WT マウス由来細胞では 24 時間の 10 mM リン酸刺激で明確な変化を示さなかったが、12 週齢 *Hyp* マウス由来骨芽細胞および骨細胞においては 10 mM リン酸刺激で有意な上昇を認めた。*Galnt3* については、12 週齢 WT マウス由来細胞において 10 mM リン酸刺激により発現の有意な増加を示し、12 週齢 *Hyp* マウス由来細胞でも増加傾向を示したが、4 週齢 WT マウス由来細胞では明確な変化を示さなかった。*Fgf23* については、いずれの細胞においても、24 時間のリン酸刺激では変化しなかった。

以上の結果から、4 週齢 WT マウス、12 週齢 WT マウスおよび 12 週齢 *Hyp* マウスの骨芽細胞や骨細胞においては、細胞外環境中のリン酸レベルの変化に対して異なる応答性を示すことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamazaki Miwa, Kawai Masanobu, Kinoshita Saori, Tachikawa Kanako, Nakanishi Tatsuro, Ozono Keiichi, Michigami Toshimi	4. 巻 151
2. 論文標題 Clonal osteoblastic cell lines with CRISPR/Cas9-mediated ablation of Pit1 or Pit2 show enhanced mineralization despite reduced osteogenic gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116036 ~ 116036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2021.116036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Masanobu, Kinoshita Saori, Ozono Keiichi, Michigami Toshimi	4. 巻 10
2. 論文標題 Lack of PTEN in osteocytes increases circulating phosphate concentrations by decreasing intact fibroblast growth factor 23 levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78692-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kubota Takuo, Fukumoto Seiji, Cheong Hae II, Michigami Toshimi, Namba Noriyuki, Ito Nobuaki, Tokunaga Shin, Gibbs Yoshimi, Ozono Keiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-term outcomes for Asian patients with X-linked hypophosphataemia: rationale and design of the SUNFLOWER longitudinal, observational cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e036367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjopen-2019-036367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Michigami Toshimi	4. 巻 24
2. 論文標題 Skeletal mineralization: mechanisms and diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 213-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.6065/apem.2019.24.4.213.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Michigami Toshimi, Kawai Masanobu, Yamazaki Miwa, Ozono Keiichi	4. 巻 98
2. 論文標題 Phosphate as a Signaling Molecule and Its Sensing Mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 2317 ~ 2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00022.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michigami Toshimi, Ozono Keiichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of Phosphate in Skeleton	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山崎美和, 川井正信, 大園恵一, 道上敏美.
2. 発表標題 骨芽細胞機能におけるIII型ナトリウム / リン酸共輸送担体の役割
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎美和, 川井正信, 木下さおり, 大園恵一, 道上敏美
2. 発表標題 III型ナトリウム / リン酸共輸送担体は骨石灰化およびピロリン酸・ATP代謝を制御する
3. 学会等名 第22回日本骨粗鬆症学会 / 第37回日本骨代謝学会学術集会合同集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michigami Toshimi
2. 発表標題 Skeletal Mineralization: Mechanisms and Diseases.
3. 学会等名 45th Annual Congress of Korean Society of Pediatric Endocrinology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki Miwa, Kawai Masanobu, Ozono Keiichi, Michigami Toshimi
2. 発表標題 Functional control of osteoblasts by type III sodium/phosphate cotransporters.
3. 学会等名 42nd Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上敏美
2. 発表標題 病態から理解する、くる病と骨軟化症の診断と治療.
3. 学会等名 第29回 臨床内分泌代謝Update (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上敏美
2. 発表標題 リンの恒常性維持とシグナル分子としてのリン
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上敏美
2. 発表標題 骨格の石灰化機構とその破綻による種々の病態
3. 学会等名 第36回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上敏美
2. 発表標題 低リン血症性くる病と骨軟化症 病態から抗FGF23抗体による新規治療までー
3. 学会等名 第28回日本内分泌学会臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山崎 美和  (Yamazaki Miwa)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------