

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09018

研究課題名(和文) 後天性FGF23関連低リン血症性骨軟化症の病因鑑別法の開発

研究課題名(英文) Development of differential diagnostic method for etiology of acquired FGF23 related hypophosphatemic osteomalacia

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：FGF23は骨で産生され腎臓に作用するリン調整ホルモンである。生後にFGF23分泌過剰により低リン血症性骨軟化症をおこす病気ではFGF23産生腫瘍による腫瘍性骨軟化症が最多だが、2-3割で原因腫瘍を確認できない。腫瘍性骨軟化症では骨のFGF23産生は生理的に抑制されているが、遺伝性FGF23関連疾患では抑制されていないため鑑別に利用できる。しかし従来の免疫染色はFGF23の抑制を検出する感度がない。今回、コニカミノルタ社が開発した高感度ナノ免疫染色(PID)を用いて、一般の大腿骨手術時に得られた骨をと比較し腫瘍性骨軟化症手術時の周囲骨でのFGF23の産生抑制を定量的に検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討の結果により、生後にFGF23関連低リン血症性骨軟化症を惹起したと思われる症例において腸骨生検などで骨検体を採取し、高感度ナノ免疫染色(PID)によってFGF23の骨での産生抑制の有無を確認することで、その原因がFGF23産生腫瘍による腫瘍性骨軟化症であるか、それ以外の遺伝性疾患などであるかを明確に鑑別できる技術が完成した。また同時にこれまで悪性腫瘍の発現マーカーなどを定量的に検出し抗癌剤の効果判定などへの応用が期待されていた高感度ナノ免疫染色技術が、今回の検討のようにホルモンの血中濃度が非常に低値である内分泌疾患などでの病因の鑑別などにも用いることができる可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：FGF23 is a phosphaturic hormone derived from osteocytes, which physiologically regulates serum phosphate level. Tumor-induced osteomalacia (TIO) due to FGF23 producing tumor is the most common cause of acquired FGF23-related hypophosphatemic osteomalacia, however, the causative tumor couldn't be recognized among about 20-30% of cases. In TIO patients, FGF23 production in the bone was physiologically suppressed while not suppressed in, such as, inherited FGF23-related hypophosphatemia. However, the conventional immunostaining method could not detect the suppression of FGF23 due to low sensitivity. In this research, PID: nano-immunostaining method with high sensitivity developed by KONICA MINORTA was adopted and the suppression of regional FGF23 in the bone surrounding FGF23 producing tumor in TIO patients was successfully recognized compared to femur bone samples gained during the surgery in the subjects without bone metabolic diseases.

研究分野：内分泌学

キーワード：低リン血症 くる病 骨軟化症 骨粗鬆症 FGF23 病理 免疫染色 ナノ技術

1. 研究開始当初の背景

FGF23 は成熟骨細胞から分泌される生理的な血中リン濃度調節ホルモンである[1]。FGF23 の受容体は Klotho と FGF 受容体との複合体であり、尿管や副甲状腺、脈絡叢、胎盤などにその発現が認められている[2]。近位尿管において FGF23 は、ナトリウム-リン共輸送体の発現を低下させリンの再吸収を抑制する。また FGF23 は近位尿管において 1α 水酸化酵素の発現を抑制する事で、血中 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度を低下させ、腸管からのリン吸収も抑制する[3]。また成熟骨細胞における血中リン濃度に応じて FGF23 の分泌を調整するための血中濃度リン感知機構は完全には解明されていないものの、FGF 受容体はその中心的な役割を担っていることを我々のグループと徳島大学との共同研究で明らかにしている[4]。FGF23 作用が不適切に過剰となると、リンの再吸収抑制および腸管からのリン吸収抑制から低リン血症をきたす。慢性低リン血症により骨の石灰化が障害され、小児ではくる病を、成人では骨軟化症を発症する。FGF23 関連低リン血症と診断され、遺伝性疾患や薬剤性の副作用が除外された場合、腫瘍性骨軟化症が強く疑われる(図1)。腫瘍性骨軟化症(tumor-induced osteomalacia: TIO)は、主に骨や脂肪組織に発生する腫瘍から FGF23 が過剰産生されることによって、低リン血症性骨軟化症をきたす疾患である。正確な頻度は不明であるが、人口 2-10 万人当たり 1 名程度の稀な疾患と考えられている。未診断の例も多く実際にはさらに多くの症例が存在すると考えられる。症状としては偽骨折による骨痛、骨折、筋力低下などがあり、ADL の低下から寝たきりに至ることもある[5]。FGF23 産生腫瘍の完全な切除が根治療法となるため、腫瘍の局在診断が非常に重要となる。しかし腫瘍が数 mm 程度と比較的小さいことも多く、また局在が全身の骨・脂肪組織に分布しうることから腫瘍の局在診断に難渋する症例が多い。また手術で腫瘍が切除しきれない症例、術後に再発する症例がある。腫瘍の局在が同定できない症例や術後に治癒が得られなかった症例では、血清リン濃度を上昇させるために経口リン製剤と活性型ビタミン D 製剤による内科的治療が行われる。しかしその経口リン製剤の効果持続時間は 1-2 時間と短く、また腫瘍における血中リン濃度の感知閾値の下方偏移が病態として予想されており、摂取されたリンの量に応じて FGF23 の分泌が上昇するため、その効果は不十分となる。近年抗 FGF23 モノクローナル抗体である burosumab が TIO 症例の血清リン値を上昇させ、疼痛の軽減や運動機能、骨折治癒の改善をもたらすことが示された[6]。一方で burosumab の長期的な副作用は不明な点もあり、手術療法とその後の予後について直接比較した報告もなく、現時点では腫瘍が同定されさえすれば手術療法が第一選択となる。

一般的に腫瘍の検索を行う際には CT、MRI、FDG-PET/CT などの画像検査が施行される。これらの検査は比較的簡便に施行できるが、腫瘍の存在は確認できるものの、腫瘍が FGF23 を産生しているかどうかについては判定できない。TIO の原因病変である Phosphaturic mesenchymal tumor (PMT) はソマトスタチン受容体を発現していることが多い。これを利用し FGF23 産生腫瘍の機能的局在診断としてソマトスタチン受容体を標的とする画像検査であるソマトスタチン受容体シンチグラフィ(^{111}In -pentreotide: オクトレオスキャン®など)が用いられる。しかしソマトスタチン受容体を発現した腫瘍(甲状腺腫瘍など)や骨折などによる炎症部位において集積を認めるため、FGF23 産生腫瘍特異的な検査ではなく特異度に限界がある。2004 年に我々のグループより、腫瘍からの FGF23 産生を直接確認する手法として、全身静脈 FGF23 サンプリングを報告した[7]。この検査は、大腿静脈から挿入したカテーテルを用いて体幹や四肢の主要静脈から採血を行い、血中 FGF23 濃度が最高値を示す静脈の近傍に腫瘍があると想定するものである。しかしこれらの手法を利用しても原因腫瘍が見つからない TIO 疑い症例が 2-3 割存在し診断法の確立は急務である。正常なリン代謝の恒常性が保たれている場合、なんらかの原因により低リン血症に陥ったとしても負のフィードバック機構により

骨からの FGF23 産生は抑制される。しかし TIO 症例ではこの正常なリン代謝が破綻し、腫瘍が自律的に FGF23 を産生するために慢性低リン血症を発症する。この際、TIO 症例において腫瘍以外の骨組織における成熟骨細胞では FGF23 産生は抑制されている。従って臨床的に TIO と診断されるものの腫瘍が同定できない症例の骨組織で FGF23 産生が抑制されているかを判定することにより、その症例が FGF23 産生腫瘍を本当に有するかどうかを推察することが可能である。しかし従来の免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry: IHC) では比較的発現量が少ない FGF23 の産生抑制を確認し得るほどの感度は得られなかった。また骨組織は他臓器組織と比較し細胞量が少なく、mRNA の発現量解析やウェスタンブロッティングによる蛋白発現量の解析も技術的に困難である。近年 IHC のひとつとして、高輝度蛍光粒子である Phosphor Integrated Dot (PID) nanoparticles を用いた高感度免疫染色法が蛋白質の定量的解析に有用であることが報告されている (図 2) [8]。PID は蛍光色素よりも高い輝度、励起光照射下での高い安定性をもつことから、従来の IHC に比べ標的蛋白の発現を高感度に検出し、さらに粒子数として定量的に評価できる (図 3) [9]。PID を利用した FGF23 高感度免疫染色を行うことで、原因腫瘍の局在が不明である TIO 疑い症例の骨組織における FGF23 産生抑制の有無の評価が可能となり、ひいては原因となっている病態が TIO であるか、遺伝性 FGF23 関連低リン血症などの全身の成熟骨細胞からの FGF23 過剰分泌を惹起するものかの鑑別が可能であると予想される。

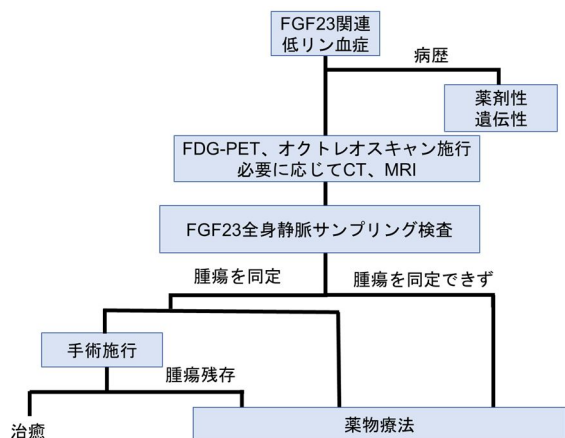


図 1 腫瘍性骨軟化症の検査、治療チャート

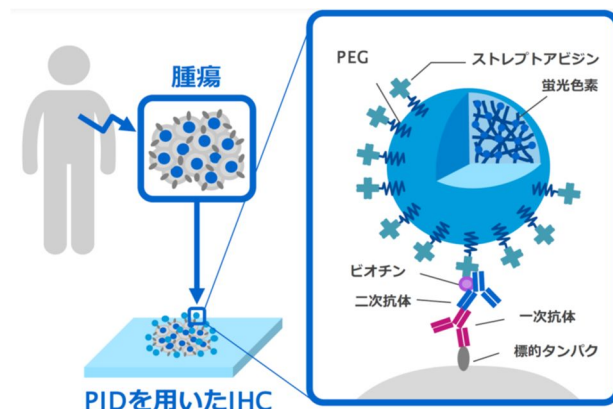


図 2 PID 技術の原理

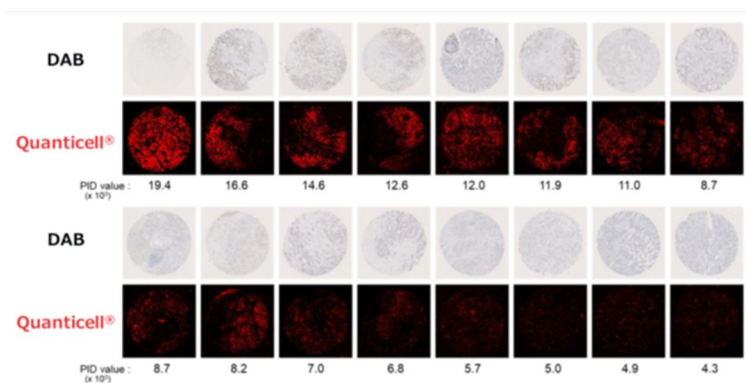


図 3 DAB 染色と PID を用いた染色の比較

2. 研究の目的

局在が同定できなかった TIO 症例に対する病態解明の手段として、骨組織における FGF23 発現抑制の有無を確認するための FGF23 の定量的な発現解析を、蛍光ナノ免疫染色を用いて検討する。特に本研究では、TIO 症例の腫瘍部分以外の骨組織において、骨代謝疾患を有しない患者の骨組織と比較し、FGF23 発現量が抑制されていることを示すまでを目的とした。

3. 研究の方法

当院整形外科で人工関節置換術を施行された腎機能正常症例 (Standard: STD 群)13 例および透析症例(Hemodialysis: HD 群)2 例、骨内腫瘍による TIO で腫瘍摘出術を施行された症例において切除検体に付随して切除された正常骨組織もしくは切除部補強のために採取した腸骨の一部 (TIO-bone 群) 2 例、耳下腺腫瘍による TIO で切除検体に付随して切除された正常耳下腺組織 (Negative control: NC) 1 例を対象とした。STD 群および HD 群では人工関節置換術、TIO 群では腫瘍摘出術により同時に摘出された腫瘍を含まない骨検体ないし非骨検体に対して EDTA 脱灰を行ったのち、4 μm のパラフィン切片を作成し抗 FGF23 抗体にナノ粒子を標識したもので免疫染色を行っている。粒子数の定量は PID 粒子と細胞核表面との距離が最も近い細胞核に PID 粒子を帰属させる帰属法を用いた。

4. 研究成果

病理画像について DAB 染色および PID 染色を図 4 に示す。HD 群では STD 群や TIO-bone 群、NC と比較し非常に多くの PID 粒子を認めている (図 4-B)。解析ソフト

(PidAnalyzer、コニカミノルタ株式会社)を用いて細胞の核を同定し、核から 5.5 μm 以内にある粒子の数を計測した。観察した視野のすべての細胞の平均粒子数をその検体の PID 粒子数とした。STD 群は粒子数の平均値は 1 細胞核あたり 154.6 (標準誤差 53.3)であった。一方で TIO-bone 群は 12.7、12.6、NC は 12.6 と明らかに粒子数の低下を認めた。STD 群、TIO-bone 群および NC での PID 粒子数の比較についてグラフに示す (図 5)。TIO-bone 群では STD 群と比較し、有意に 1 細胞核あたりの PID 粒子数の低下を認め ($p < 0.001$)、NC 群も TIO-bone 群と同程度に低値であった。

以上より本検討において高感度ナノ免疫染色である PID を用いることで、TIO の骨部位での FGF23 の産生抑制が検出できることが確認できた。よって原因腫瘍が明らかでない後天性の FGF23 関連低リン血症性骨軟化症であっても、骨生検を実施することでその病因を明らかとすることができる。また同時にその他の内分泌疾患の病因を確認する目的においても高感度ナノ免疫染色が有用である可能性を示唆することが出来た。

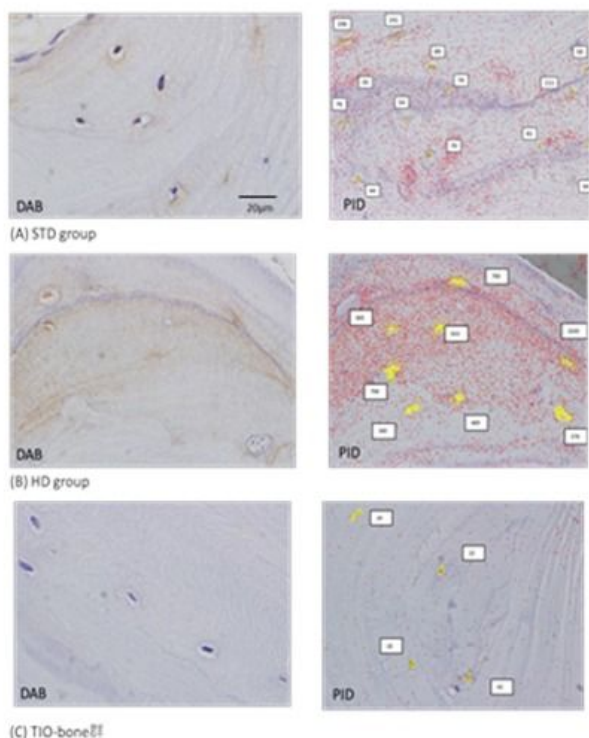


図 4 病理画像

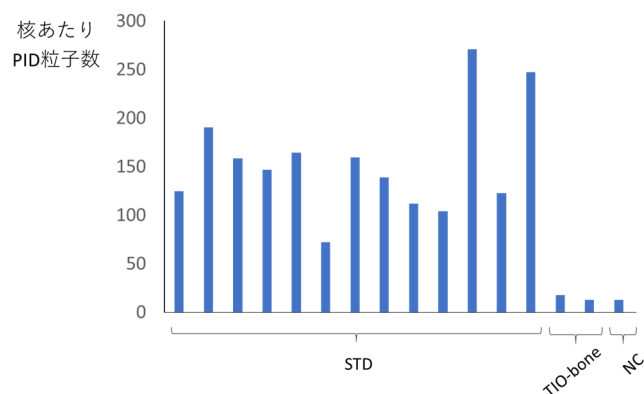


図 5 STD,TIO-bone,NC の PID 粒子数

<引用文献>

- [1] T. Shimada, S. Mizutani, T. Muto, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia, PNAS 98(11) (2001) 6500-6505.
- [2] I. Urakawa, Y. Yamazaki, T. Shimada, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23, Nature 444(7120) (2006) 770-4.
- [3] T. Shimada, H. Hasegawa, Y. Yamazaki, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis, J Bone Miner Res 19(3) (2004) 429-35.
- [4] Y. Takashi, H. Kosako, S. Sawatsubashi, et al. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation, Proc Natl Acad Sci U S A (2019).
- [5] S.M. Jan de Beur. Tumor-induced osteomalacia, JAMA 294(10) (2005) 1260-7.
- [6] Y. Imanishi, N. Ito, Y. Rhee, et al. Interim Analysis of a Phase 2 Open-Label Trial Assessing Burosumab Efficacy and Safety in Patients With Tumor-Induced Osteomalacia, J Bone Miner Res (2020).
- [7] Y. Takeuchi, H. Suzuki, S. Ogura, et al. Venous sampling for fibroblast growth factor-23 confirms preoperative diagnosis of tumor-induced osteomalacia, J Clin Endocrinol Metab 89(8) (2004) 3979-82.
- [8] K. Gonda, M. Watanabe, H. Tada, et al. Quantitative diagnostic imaging of cancer tissues by using phosphor-integrated dots with ultra-high brightness, Sci Rep 7(1) (2017) 7509.
- [9] T. Fujisawa, K. Tsuta, H. Yanagimoto, et al. Quantitative immunohistochemical assay with novel digital immunostaining for comparisons of PD-L1 antibodies, Mol Clin Oncol 10(3) (2019) 391-396.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Minae Koga, Hajime Kato, Yuka Kinoshita, Seiji Fukumoto, Nobuaki Ito
2. 発表標題 Utility of SRS/SRPET and systemic FGF23 venous sampling for tumor localization in 20 consecutive tumor-induced osteomalacia cases
3. 学会等名 Forum on Metabolic Bone Disease
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minae Koga, Hajime Kato, Yuka Kinoshita, Seiji Fukumoto, Nobuaki Ito
2. 発表標題 Utility of SRS/SRPET and systemic FGF23 venous sampling for tumor localization in 20 consecutive tumor-induced osteomalacia cases
3. 学会等名 ASBMR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古家美菜絵、加藤創生、木下祐加、伊東伸朗
2. 発表標題 腫瘍性骨軟化症20症例の局在診断における画像検査および全身静脈FGF23サンプリングの有用性
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東伸朗
2. 発表標題 FGF23関連低リン血症性くる病・骨軟化症
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊東伸朗
2. 発表標題 クリニカルアワー 腫瘍性骨軟化症-基礎と臨床の新知見- 「診断のUpdate」
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古家美菜絵、加藤創生、二谷悦子、小林寛、田中健之、牧瀬尚大、牛久哲男、伊東伸朗
2. 発表標題 蛍光ナノ粒子(PID)染色標本による組織でのFGF23産生定量法の開発
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 古家美菜絵、加藤創生、伊東伸朗
2. 発表標題 Histochemical Quantification of FGF23 Expression in the Bone with Phosphor Integrated Dot Nanoparticles
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古家美菜絵、加藤創生、伊東伸朗
2. 発表標題 蛍光ナノ粒子(PID)染色標本による組織でのFGF23産生定量法の開発
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東伸朗
2. 発表標題 Ectopic ossification in XLH patients and differential diagnosis of acquired FGF23-related hypophosphatemic osteomalacia
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究分担者	小林 寛 (Kobayashi Hiroshi) (20407951)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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
---------	---------