

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590986

研究課題名(和文) 尿細管における細胞外無機リン酸シグナル応答性分子機構と FGF23 感受性規定因子

研究課題名(英文) Mechanism Underlying the Responsiveness to the Extracellular Phosphate and the Factors which Influence the Sensitivity to FGF23

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 大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・環境影響部門・部長

研究者番号：00301804

研究成果の概要(和文)：リンは生命にとって必須のミネラルであり、生体にはリンの恒常性を維持するための機構が存在する。しかしながら、生体がリンの過不足を感知するしくみは現在のところ不明である。本研究においては、腎臓由来細胞株を用いて細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性を検討し、細胞外リン酸濃度の上昇は Raf/MEK/ERK 経路の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達し、遺伝子発現を変化させること、またこのリン酸応答性に III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の一つである PiT-1 及び FGF 受容体が関与することを明らかにした。細胞外無機リン酸濃度の上昇により惹起されるシグナルはリン酸利尿因子である FGF23 のシグナル伝達と下流のネットワークを共有しており、細胞外無機リン酸濃度の変化が FGF23 感受性に影響を及ぼしうることが示唆された。このことから、慢性腎疾患など血清リン値の異常を伴う病態においては、尿細管の FGF23 応答性が変化している可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Phosphorus is a critical element involved in various biological processes, and organisms possess a system for its homeostasis. However, the mechanism for sensing the excess or shortage of phosphate remains unclear. In this study, we examined the responsiveness of the kidney-derived cell line to extracellular phosphate, and found that increased extracellular phosphate induced the activation of Raf/MEK/ERK pathway leading to altered gene expression. In addition, we revealed that the type III sodium/phosphate co-transporter PiT-1 as well as FGF receptor were involved in the responsiveness of the cells to increased extracellular phosphate. Signaling triggered by an increase in extracellular phosphate shared the same downstream cascade as FGF23 signaling, suggesting that extracellular phosphate itself might influence the sensitivity to FGF23. In conditions with abnormal levels of serum phosphate such as chronic kidney disease, the responsiveness of renal tubules to FGF23 might be altered.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：7205 2

キーワード：無機リン酸、FGF23、Klotho、シグナル伝達、ナトリウム/リン酸共輸送担体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のリン恒常性維持機構においては近位尿細管におけるリン酸の再吸収が重要な役割を果たしており、IIa 型、IIc 型のナトリウム／リン酸 (Na⁺/Pi) 共輸送担体 (NaPi-IIa、NaPi-IIc) がこれを担う。リン酸利尿因子である Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) は近位尿細管における NaPi-IIa、NaPi-IIc の発現を減少させることによりリン酸再吸収を抑制する。また、抗老化因子である *klotho* は FGF23 シグナル伝達における共役因子として機能することも報告され、リン恒常性維持機構に関する理解は急速に進みつつある。しかしながら、リン酸再吸収の場が近位尿細管であるのに対して *klotho* の発現部位は遠位尿細管であることなど、FGF23 の作用機序については依然不明な点が多い。さらに、生体が体内のリンの過不足を感知するシステムや、リンの過剰が FGF23 の産生増加をもたらす機序についても殆どわかっていない。

植物においては、根が土壤中のリンの不足を感知し、根構造を再プログラムすることにより応答性を示す。同様の細胞外リン酸に対する応答性は、哺乳類細胞においても保持されていることが推察される。実際、骨芽細胞では、細胞外無機リン酸の濃度変化がシグナルとして細胞内に伝達され、ERK1/2 経路の活性化を介してオステオポンチン遺伝子の発現を誘導することが報告されている。一方、申請者らは、軟骨細胞株 ATDC5 に DNA マイクロアレイを適用することにより 24 時間以内に細胞外無機リン酸濃度変化に応答性を示す遺伝子群を同定し、このリン酸応答性に III 型 Na⁺/Pi 共輸送担体及び MEK/ERK 経路が関与していることを示唆する結果を得た。これらの知見から筆者らは、リン恒常性維持に関わる他の臓器、すなわち腎臓や腸管、副甲状腺などにおいても、同様の細胞外無機リン酸濃度変化応答性が存在し、細胞外の無機リン酸濃度変化がシグナルとして細胞内に伝達され、細胞の挙動に影響を与える可能性があるのではないかとこの着想に至った。さらに、尿細管においては、細胞外無機リン酸そのものが FGF23 に対する感受性にも影響を及ぼす可能性があるのではないかと考え、この仮説を検証するために、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究においては、細胞外無機リン酸の過不足が尿細管の細胞に及ぼす作用について、そのシグナル伝達機構を含めて詳細に解析し、哺乳類におけるリン酸感知システムの分子機構の解明をめざすとともに、細胞外無機リン酸が腎臓における FGF23 感受性に及ぼす影響について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 の FGF23 応答性

ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 を用い、まず、FGF23 に対する応答性を有するかどうかを検討した。FGF23 のソースとして、FGF23 の機能獲得型変異体 FGF23[R179Q] を恒常的に発現する CHO 細胞を樹立し、その培養上清より FGF23[R179Q] リコンビナント蛋白を調製して実験に用いた。HEK293 細胞親株および HEK293-Klotho 過剰発現株に FGF23[R179Q] を作用させ、FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α) 及び ERK1/2 のリン酸化、標的遺伝子である *Egr-1* の発現を検討した。

(2) HEK293 の細胞外無機リン酸応答性及びナトリウム／リン酸共輸送担体の関与についての検討

HEK293 細胞に種々の濃度の無機リン酸を含む培地にて処理し、Raf/MEK/ERK 経路をはじめとするシグナル伝達に及ぼす影響を Western blot により、遺伝子発現に及ぼす影響を real-time PCR により検討した。種々の濃度の無機リン酸を含む培地は、リン酸を含まない培地にリン酸ナトリウム緩衝液を添加することにより調製し、対照としては硫酸ナトリウムを添加した培地を用いた。さらに、HEK293 の細胞外無機リン酸応答性におけるナトリウム／リン酸共輸送担体の関与について検討するため、ナトリウム／リン酸共輸送担体阻害剤である phosphonoformic acid (PFA) の影響について解析した。また、HEK293 における各種のナトリウム／リン酸共輸送担体の発現量を real-time PCR により評価し、発現の高かったものについては siRNA を用いたノックダウンを試み、細胞外無機リン酸応答性に及ぼす影響を検討した。ナトリウム／リン酸共輸送担体のノックダウンが細胞のリン酸とりこみに及ぼす影響については、RI ラベルした正リン酸の取り込み実験により検討した。

(3) 細胞外無機リン酸により惹起されるシグナルと FGF23 シグナルとの相互作用

上述の検討により HEK293 細胞の細胞外無機リン酸及び FGF23 に対する応答性を確認したのち、両者のシグナルの相互作用の可能性について解析を進めた。

4. 研究成果

(1) HEK293 の FGF23 応答性

HEK293 細胞親株に最終濃度 30-75 pg/ml の FGF23[R179Q] を 30 分間作用させたところ、容量依存的に Raf/MEK/ERK 経路の活性化が誘導された。また、Raf/MEK/ERK 経路の上流に

存在する FRS2 α についてもリン酸化が誘導されることを確認した。また、FGF23 の標的遺伝子として知られている転写因子 *early growth response-1 gene (EGR-1)* の発現が誘導されることを確認した。Real-time PCR により HEK293 親株における Klotho の発現を解析したところ、低レベルながら発現が認められた。また、Klotho 過剰発現株においては、FGF23[R179Q] に対する応答性の増強が認められた。

(2) 細胞外無機リン酸刺激による Raf/MEK/ERK 経路の特異的活性化

HEK293 細胞を種々の濃度の細胞外無機リン酸存在下で 15 分間インキュベートしたところ、c-Raf および ERK1/2 のリン酸化が誘導された。ERK1/2 の上流に存在する MEK に対する阻害剤 PD98059 を同時に添加したところ、細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導される ERK1/2 のリン酸化は解除された。細胞外無機リン酸濃度の上昇は AKT、p38、JNK のリン酸化には影響を及ぼさなかったことから、リン酸刺激は Raf/MEK/ERK 経路を比較的特異的に活性化することが明らかとなった。また、細胞外無機リン酸濃度の上昇は FGF23 シグナルの標的である *EGR-1* の発現を増強させ、この発現増強も PD98059 を同時に添加することにより解除された。

(3) HEK293 の細胞外無機リン酸応答性に対する III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体 PiT-1 の関与

細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導される Raf/MEK/ERK 経路の活性化及び *Egr-1* の発現増強は、ナトリウム/リン酸共輸送担体阻害剤である PFA を添加することにより減弱した。そこで、HEK293 細胞における各種のナトリウム/リン酸共輸送担体の発現量を real-time PCR により評価したところ、III 型輸送担体である PiT-1 の発現が優位であり、IIa 型及び IIc 型の輸送担体の発現は極めて微弱であった。そこで、siRNA を用いて PiT-1 の発現をノックダウンし、細胞外無機リン酸応答性に及ぼす影響を検討した。RI ラベルした正リン酸を用いたリン酸取り込みアッセイにおいては、PiT-1 のノックダウンはリン酸取り込みを有意に減弱させた。細胞外無機リン酸濃度の上昇により誘導される ERK1/2 のリン酸化が PiT-1 をノックダウンすることにより減弱したことから、HEK293 の細胞外無機リン酸応答性に PiT-1 が関与することが示唆された。

(4) FGF23 応答性に対する細胞外無機リン酸シグナルの影響

HEK293 の FGF23 応答性に対する細胞外無機リン酸シグナルの影響について検討するた

め、種々の濃度のリン酸存在下で 50 pg/ml の FGF23[R179Q] を 30 分間作用させ、ERK1/2 のリン酸化を検討した。その結果、リン酸刺激と FGF23 刺激は相加的に ERK1/2 のリン酸化を誘導した。また、ナトリウム/リン酸共輸送担体阻害剤である PFA の存在下では FGF23 刺激による ERK1/2 のリン酸化は著明に減弱し、細胞外無機リン酸で惹起されるシグナルが FGF23 シグナルに影響を及ぼすことが推察された。

(5) 細胞外無機リン酸惹起シグナルと FGF23 シグナルとの収束点

細胞外無機リン酸濃度の上昇及び FGF23 刺激がともに Raf/MEK/ERK 経路の活性化及び *EGR-1* の発現誘導をもたらしたことから、両者のシグナルが下流のネットワークを共有していることが示唆された。そこで、これらのシグナルの収束点を明らかにするため、解析を進めた。細胞外無機リン酸濃度の上昇は、FGF23 と同様に、FRS2 α のリン酸化をもたらしたが、FGF ligand や FGF 受容体、Klotho の発現量には影響を及ぼさなかった。HEK293 細胞には FGF 受容体のうち FGFR1、FGFR2 が発現していたことから、これらに対する siRNA を用いてノックダウンを試みたところ、FGFR1 のノックダウンは HEK293 の細胞外無機リン酸応答性を減弱させた。FGFR2 をノックダウンした場合にも、同様の結果が得られたが、その効果はより小さかった。これらのことから、HEK293 の細胞外無機リン酸応答性に FGFR が関与する可能性が示唆された。そこで、PiT-1 をノックダウンした細胞に FGFR1 を過剰発現し、細胞外無機リン酸刺激で誘導される ERK1/2 のリン酸化に及ぼす影響を検討したところ、PiT-1 ノックダウンによる細胞外無機リン酸応答性の減弱は、FGFR1 の過剰発現により回復した。このことから、FGFR は HEK293 の細胞外無機リン酸応答性に関与し、PiT-1 の下流で働くことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem*, 286:3094-3103, 2011, 査読有
- ② Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T. Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF

- receptors in HEK293 cells. *J Cell Biochem*, 111:1210-1221, 2010, 査読有
- ③ Kimata M, Michigami T, Tachikawa K, Okada T, Koshimizu T, Yamazaki M, Kogo M, Ozono K. Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na⁺/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. *Bone*, 47:938-947, 2010, 査読有
- ④ Nakamura-Utsunomiya A, Okada S, Hara K, Miyagawa S, Takeda K, Fukuhara R, Nakata Y, Hayashidani M, Tachikawa K, Michigami T, Ozono K, Kobayashi M, Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: a report of 6 cases. *Clin Pediatr Endocrinol*, 19:7-13, 2010, 査読有
- ⑤ Matsui Y, Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawabata H, Nishimura G. Czech dysplasia occurring in a Japanese family. *Am J Med Genet A*, 49A: 2285-2289, 2009, 査読有
- ⑥ Miyauchi Y, Sakaguchi N, Okada T, Makishima M, Ozono K, Michigami T. Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function. *J Cell Biochem*, 106:1090-1101, 2009, 査読有
- ⑦ Ohata Y, Yamamoto T, Mori I, Kikuchi T, Michigami T, Imanishi Y, Satomura K, Ida S, Ozono K. Severe arterial hypertension: a possible complication of McCune-Albright syndrome. *Eur J Pediatr*, 168:871-876, 2009, 査読有
- ⑧ Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K. An Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res*, 23:1661-1671, 2008, 査読有
- ⑨ Fukumoto S, Namba N, Ozono K, Yamauchi M, Sugimoto T, Michigami T, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Endo I, Matsumoto T. Causes and differential diagnosis of hypocalcemia—recommendation proposed by expert panel supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. *Endocr J*, 55:784-794, 2008, 査読有
- ⑩ Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Sugimoto T, Yamauchi M, Michigami T, Matsumoto T. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in

hypophosphatemic patients. Proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone*, 42:1235-1239, 2008, 査読有

- ⑪ Suzuki A, Ozono K, Kubota T, Kondou H, Tachikawa K, Michigami T. PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in osteoblastic Saos-2 cells. *J Cell Biochem*, 104:314-317, 2008, 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Ohata Y, Tachikawa K, Kondou H, Michigami T. Signal transduction triggered by extracellular inorganic phosphate involves FGF receptor and influences the FGF23 signaling. 14th International Congress of Endocrinology. 2010年3月29日、京都
- ② Yamazaki M, Okada T, Tachikawa K, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate mediated via sodium-phosphate co-transporters influences FGF23 signaling in renal tubular cells. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008年9月14日、Montreal
- ③ 山崎美和, 岡田知子, 立川加奈子, 大幡泰久, 大菌恵一, 道上敏美. ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 における細胞外無機リン酸シグナル伝達にはⅢ型 Na⁺/Pi 共輸送担体 Pit-1 と FGF receptor substrate 2 α (FRS2 α) が関与する. 第26回日本骨代謝学会学術集会. 2008年10月30日、大阪

6. 研究組織

(1) 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府立母子保健総合医療センター (研究所)・環境影響部門・部長
研究者番号: 00301804

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山崎 美和 (若林美和) (YAMAZAKI MIWA)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪

府立母子保健総合医療センター（研究
所）・環境影響部門・流動研究員
研究者番号：50455549