

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20790601

研究課題名（和文）

破骨細胞阻害因子ノックアウトマウスのリン調節の解明

研究課題名（英文）

the phosphorous regulatory mechanism of OPG knockout mouse

研究代表者

大城戸 一郎 (OHKIDO ICHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40372966

研究成果の概要（和文）：

生体内のリン代謝調節は、腎臓からの排泄・腸管からの吸収・骨との交換・細胞膜における輸送のバランスにより行われているが、血中リン濃度を規定している主たる因子は腎臓からのリン排泄で、ほとんど近位尿細管の管腔側の NaPi IIa による再吸収によって決まっている。近年 FGF-23 と破骨細胞分化阻害因子（OCIF：Osteoclast inhibitory factor / OPG：Osteoprotegerin）が慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症の病態形成に重要な役割を演じていることが想定されている。しかしながら、FGF-23 や OPG が PTH あるいは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 調節系と如何なるネットワークを形成しているかは不明な点が多い。そこで我々は慢性腎不全モデルマウスにおける OPG、FGF-23、klotho などの分子学的役割を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：

The phosphorus metabolic regulation is performed by the excretion from kidney, the absorption from intestinal tract, the exchange with bones, a balance of the transportation in the cell membrane. The main factor prescribing blood phosphorus concentrations is fixed by reabsorption by NaPi IIa of the lumen side of most proximal tubules by the phosphorus excretion from kidney. It is assumed that FGF-23 and OCIF : Osteoclast inhibitory factor / OPG : Osteoprotegerin) play the role that is important to clinical condition formation of the secondary hyperparathyroidism in the chronic renal failure. However, there are many any questions whether FGF-23 and OPG form PTH or $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ adjustment system and what kind of network. Therefore we determine molecular roles such as OPG in the chronic renal failure model mouse, FGF-23, klotho.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：Osteoprotegerin、FGF-23

1. 研究開始当初の背景

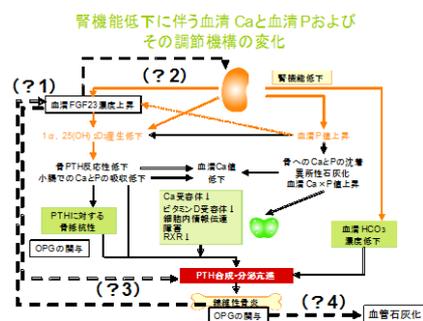
生体内のリン代謝調節は、腎臓からの排泄・腸管からの吸収・骨との交換・細胞膜における輸送のバランスにより行われているが、血中リン濃度を規定している主たる因子は腎臓からのリン排泄で、吸収されたリンの90%が糸球体から濾過され、その80~90%が尿細管で再吸収され尿中へ排泄される。ほとんど近位尿細管の管腔側のNa-Pi cotransporter type IIa(NaPi IIa)による再吸収によって決まっている。このため、腎機能が正常であれば高リン血症はほとんど生じない。しかし、腎機能が低下するとリンが蓄積し、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 活性化障害が生じる。このことが、低Ca血症を介して間接的にあるいは直接的に副甲状腺ホルモン（以下PTH）の合成分泌を刺激する。これが、二次性副甲状腺機能亢進症の病態形成の仮説であった。しかし、近年 fibroblast growth factor 23(FGF-23)と高い破骨細胞分化阻因子(OCIF: Osteoclast inhibitory factor / OPG: Osteoprotegerin)が二次性副甲状腺機能亢進症の病態形成に重要な役割を演じていることが想定されている。FGF-23は常染色体優性遺伝性低リン血症性くる病(ADHR)の家系の検討から低リン血症の原因因子として同定されたリン利尿ホルモンである。実際にfull-lengthのFGF-23をマウスに静注すると、8時間以内に血清リン濃度は20~25%低下し、腎ではNaPi IIaタンパクの減少が認められることが明らかになっている。一方、OPGは尿毒症病態における骨の抵抗性に関与していると考えられている。保存期腎不全患者の血中OPG濃度は、腎機能に反比例して上昇し、透析患者ではin vitroで十分に破骨細胞形成抑制効果を示す濃度に達していると報告され、腎不全患者の血中で増加しているOPGがPTHによる破骨細胞性骨吸収促進作用を抑制するならば骨芽細胞機能は正常でも破骨細胞にPTH作用に対する抵抗性が存在する可能性がある。さらにFGF-23とOPGが腎不全患者の骨病変に関与するだけでなく、血管石灰化などの生命予後に深く関わる病態とも関連することが明らかになってきている。また、近年ではFGF-23の産生部位は骨細胞であること推測されているが、そのことが事実であれば、OPGが骨代謝を介してFGF-23の合成分泌に影響を与えている可能性がある。

しかしながら、FGF-23やOPGがPTHあるいは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 調節系と如何なるネットワークを形成しているかは不明な点が多い。これは、これらの液性因子が血清CaあるいはPの影響を受けるために、液性因子相互の関連を評価することが困難であるた

めであろう。そこで我々はOPG KO miceあるいは初代ヒト副甲状腺培養細胞を用いて二次性副甲状腺機能亢進症あるいは血管石灰化病態下での、新しい液性因子の挙動を明らかにする。

2. 研究の目的

二次性副甲状腺機能亢進症の病態については以前から研究されてきており、近年ではOPGやFGF-23をはじめとした液性因子の関与が示唆されてきている。申請者はOPGとFGF-23との関連性について初めて証明し、本研究ではさらに副甲状腺細胞に対するOPGやFGF-23の作用を検討することにより、二次性副甲状腺機能亢進症の病態形成の機序を一層明確にすることができる。そこでその調整系を明らかにする。



3. 研究の方法

OPGノックアウトマウスを用いて経口リン負荷に対するFGF-23、PTHの調節系についてELISA法を用いて血中濃度や臓器での反応を検討する。また、腎不全モデルやklothoマウスを用いて同様にFGF-23、PTH、klothoの調節系について検討する。

4. 研究成果

OPGノックアウトマウスでは、経口リン負荷に対するFGF-23の反応性が低下しており、OPGがFGF-23の調節になんらかの役割を果たしていることが示唆された。

そこでさらに我々は慢性腎不全モデルマウスにおけるOPG、FGF-23、klothoなどの分子学的役割を明らかにするため、さらに以下の研究を進めた。慢性腎不全状態を尿管結紮マウスを作製することで、異常にFGF23が高い状態を作製し、経口リン負荷に対するFGF-23の反応性が低下している状態での、血中のFGF-23や、Klotho、OPGの挙動を観察した。その際、calcitriol, Maxacalcitol, Paricalcitolを投与し、それらが腎機能に及ぼす影響を観察した。これにより、正常に比較してFGF23の反応性が低下している状況下

での、ビタミンDの生理学的挙動を明らかにした。その結果、尿管結紮モデルでは、腎不全状態の病理学的検討では個体間に差が生じ均一な腎不全状態を得られることが困難であった。腎臓における type1 collagen の蛋白発現量についても、尿管結紮モデルでは有意に上昇しているもののその個体間での差は顕著であった。

そのため、アデニン投与による腎不全モデルマウスを作製しさらに検討を進めた。アデニン投与マウスは、腎不全状態を比較的均一に引き起こし、また、病理学的にも個体間のばらつきは少なかった。尿管結紮モデル、及びアデニン投与モデルの腎不全モデルマウス何れにおいてもビタミンD投与下において腎間質の線維化を抑制することが認められた。特に paricalcitol では、腎臓の線維化を抑制することが明らかとなった。

一方、klotho ノックアウトマウスにおいて経口リン負荷での FGF-23 の発現を検討した。FGF-23 は klotho ノックアウトマウスにおいて著名な増加を認め、低リン食にて軽度増加傾向を示した。また、正リン食においてリン吸着薬である塩酸セベラマーを投与することで FGF-23 の発現量が低下傾向を示した。また、塩酸セベラマー投与により大動脈の石灰化が減少した。リン吸着薬である塩酸セベラマーは FGF23 を減少することで大動脈石灰化を抑制する可能性が示唆された。



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 10 件)

1) Yokoyama K, Tanno Y, Ohkido I, Hosoya T. Guidelines and medication compliance. *Kidney Int.* (査読有り) 2012; 81(6): 595.

2) Yokote S, Yokoo T, Matsumoto K, Ohkido I, Utsunomiya Y, Kawamura T, et al. Metanephros transplantation inhibits the progression of vascular calcification in rats with adenine-induced renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* (査読有り) 2012; 120(1): e32-40.

3) Yoshida H, Yokoyama K, Yaginuma T, Ohkido I, Yamamoto H, Utsunomiya Y, et al. Difference in coronary artery intima

and media calcification in autopsied patients with chronic kidney disease. *Clin Nephrol.* (査読有り) 2011; 75(1): 1-7.

4) Yokoyama K, Urashima M, Ohkido I, Kono T, Yoshida T, Muramatsu M, Niu T, Hosoya T. L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C is a novel candidate gene associated with secondary hyperparathyroidism: an application of haplotype-based analysis for multiple linked single nucleotide polymorphisms. *Nephron Clin Pract.* (査読有り) 2010; 115(4): c237-43.

5) Ohkido I, Yokoyama K, Kagami S, Hosoya T. The hypothesis that bone turnover influences FGF23 secretion. *Kidney Int.* (査読有り) 2010 Apr; 77(8): 743;

6) Ohkido I, Yokoyama K, Imura A, Utsunomiya Y, Hosoya T. Persistent alpha-Klotho (a-Kl) expression in the parathyroid glands of patients with secondary hyperparathyroidism. Nabeshima Y. *Nephrol Dial Transplant.* (査読有り) 2010 Mar; 25(3): 1007-8

7) Yokoyama K, Urashima M, Ohkido I, Kono T, Yoshida T, Muramatsu M, et al. L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C is a novel candidate gene associated with secondary hyperparathyroidism: an application of haplotype-based analysis for multiple linked single nucleotide polymorphisms. *Nephron Clin Pract.* (査読有り) 2010; 115(4): c237-43.

8) 大城戸一郎, 横山啓太郎. 注目の新薬 シナカルセト塩酸塩 (レグパラ®). 診断と治療 (査読有り) 2010; 98(4): 685-8.

9) Yokoyama K, Matsuba D, Adachi-Akahane S, Takeyama H, Tabei I, Suzuki A, Shibasaki T, Iida R, Ohkido I, Hosoya T, Suda N. Dihydropyridine- and voltage-sensitive Ca²⁺ entry in human parathyroid cells. *Exp Physiol.* (査読有り) 2009 Jul; 94(7): 847-55.

10) 大城戸一郎. 【リンコントロール 基礎と実践】 リン調節臓器 腎とリン代謝. 腎と骨代謝. (査読無し) 2009; 22(4): 275-80.

〔学会発表〕（計5件）

1) Ohkido I, Yokoyama K, Hasegawa T, Hosoya T. Sevelamer hydrochloride inhibits aortic calcification regardless of serum phosphorus concentrations. American Society of Nephrology 44th Annual Renal Week Meeting. 2011年11月9日 Philadelphia.

2) 大城戸一郎, 横山啓太郎. シンポジウム. 血中Klotho蛋白の臨床的意義と今後の展望. 第56回日本透析医学会学術集会・総会. 2011年6月7日、横浜

3) 大城戸一郎, 横山啓太郎, 浦江 淳, 丸山之雄, 関野 宏, 細谷龍男. シナカルセト塩酸塩による骨回転是正はFGF23動態へ影響を与える. 第55回日本透析医学会学術集会・総会. 2010年6月3日. 神戸.

4) 大城戸一郎, 横山啓太郎, 鍋島陽一, 伊村明浩, 各務志野, 山本裕康、ほか. 二次性副甲状腺機能亢進症患者における副甲状腺細胞でのalpha-KI発現の検討. 第52回日本腎臓学会学術総会. 2009年6月4日. 横浜.

5) Ohkido I, Yokoyama K, Nabeshima YI, Imura H, Kagami S, et al. Alpha-KI expressions remained in the parathyroid glands of patients with secondary hyperparathyroidism. American Society of Nephrology 41th Annual Renal Week Meeting. 2008年11月7日、San diego.

〔図書〕（計3件）

1) 大城戸一郎. 急性腎不全、慢性腎不全. 豊島聡編集. 疾病と病態生理. 東京：南江堂 2012:119-27.

2) 大城戸一郎. PDとCKD-MBD. 細谷龍男監修. 腹膜透析療法マニュアル. 東京：東京医学社. 2011: 164-73.

3) 大城戸一郎. 尿細管障害. 市田公美, 細山田真編集. 薬学生のための新臨床医学. 東京：廣川書店, 2009: 579-80.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大城戸 一郎 (OHKIDO ICHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：40372966

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし