

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17301

研究課題名（和文）ファーストメッセンジャーとしてのリンとその感知機構の解明

研究課題名（英文）Phosphate as a first messenger and its sensing mechanisms

研究代表者

高士 祐一（Takashi, Yuichi）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：50803524

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）：本研究では、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機構を介して、報告者が骨におけるリン感知分子として同定した線維芽細胞増殖因子受容体1(fibroblast growth factor receptor 1: FGFR1)をリン酸化し、生物作用を発揮するのかを解明することを目的とした。結果、リンによるFGFR1のリン酸化に、PiT1を介した細胞内へのリンの取り込みが必須であることを明らかとした。さらに、FGFR1によるリン感知は、生命の維持に必須の機構であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファーストメッセンジャーとしてのリンの作用機構を明らかにしようとする本研究は、世界的にも非常にユニークで類のないものである。本邦に1,330万人もの罹患患者がいるとされるCKD患者において慢性の高リン血症により惹起される血管石灰化は、罹患患者の死因に直結しているものと考えられる。本研究により、リンの作用機構が明らかとなれば、CKD患者の二次性副甲状腺機能亢進症や血管石灰化に対する新たな治療戦略の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Fibroblast growth factor (FGF) 23 produced by the bone is the principal hormone to regulate serum phosphate level. The bone has some phosphate-sensing mechanism to regulate the production of FGF23. Previously, we showed that extracellular phosphate induces the phosphorylation of FGF receptor 1 (FGFR1) and FGFR1 signaling regulates the production of FGF23. In this study, we have indicated that phosphate phosphorylates FGFR1 via a phosphate-transporter: PiT1. In addition, a significance of FGFR1 in normal life span has been revealed.

研究分野：骨・ミネラル代謝

キーワード：リン 慢性腎臓病 線維芽細胞増殖因子23

1. 研究開始当初の背景

骨は生体の支持、内臓の保護、造血といった機能を有することに加え、近年内分泌臓器として機能していることが明らかとなってきた。骨が内分泌臓器であることが判明する契機となったのは、骨が分泌するホルモンである線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor:FGF)23の同定である。申請者が所属していた研究グループは、低リン血症性疾患の惹起液性因子としてFGF23を同定した(Shimada T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001)。さらに、FGF23が生理的な血中リン濃度の制御因子であることを明らかとしてきた(Shimada T et al. *J Clin Invest*, 2004)。また、FGF受容体(FGF receptor: FGFR)1cがKlothoと複合体を形成することでFGF23の受容体として機能することを発見するなど(Urakawa I et al. *Nature*,2006)、リン代謝研究において世界をリードしてきた。生体のカルシウム代謝に中心的な役割を果たす副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)分泌は、副甲状腺のカルシウム感知受容体を介して調節されている。一方、FGF23の分泌を担う骨が、いかに血中リン濃度の変動を感知し、どのように血中FGF23濃度を調節しているのかは未解明である。また血中リン濃度の上昇は、骨におけるFGF23の分泌を促進するだけでなく、PTHの分泌促進(Silver J et al. *Kidney Int*, 2009)や軟骨細胞のアポトーシスの誘導(Zhong M et al. *Calcif Tissue Int*, 2011)などを惹起するファーストメッセンジャーとして機能することが明らかになってきている。さらに、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)患者に認められる慢性高リン血症は、血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に変化させ、血管石灰化を惹起する原因と考えられている(Guacgekku CM et al. *J Am Soc Nephrol*, 2003)。しかし、ファーストメッセンジャーとしてのリンが、どのような分子を介し、生物作用を発揮しているのかについては明らかにされていない。未知の生体のリン感知機構の解明を目指す本研究成果は、カルシウム感知受容体の同定がPTH分泌抑制を惹起する新規薬剤の開発に結び付いたように、リン感知機構を標的とした新規創薬につながるものと期待される。

2. 研究の目的

報告者はこれまでの研究の中で、リンに対するFGF23産生調節に、O型糖鎖修飾酵素である*Galnt3*遺伝子産物が重要な役割を担っていることを突き止めた。骨芽細胞系細胞株UMR106において、*Galnt3*がリン応答遺伝子であることを見出し、*Galnt3*遺伝子を指標として細胞レベルでのリン応答を評価する系を新規に構築した。本細胞を用いたトランスクリプトーム解析から、細胞のリン応答におけるextracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化、および*Galnt3*遺伝子の誘導に必須の転写因子early growth response (EGR1)、Ets variant 5 (ETV5)の関与を明らかとした。さらに、リン酸化蛋白のプロテオーム解析からERKの上流分子としてFGFR1を同定するに至った(Takashi Y et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019)。これまでの成果により、FGFR1が骨のリン感知受容体として機能しているとの着想に至った。しかし、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとしてどのような機構を介して受容体型チロシンキナーゼであるFGFR1を活性化するのは不明である。さらに、骨におけるFGF23産生促進以外のリンによる生物作用にもFGFR1が関与しているのかについても明らかではない。そこで本研究では、リンによるFGFR1活性化の分子基盤を明らかとし、世界に先駆けて生体のリン感知機構の全容解明を目指した。加えて、リン感知受容体としてのFGFR1の機能と臨床的意義について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

ラット骨芽細胞様細胞株であるUMR106を用いた。培養液はDMEMを使用した。10% FBSを添加し、抗生物質としてpenicillin-streptomycin-amphotericin Bを使用した。37℃の5%CO₂インキュベーターで培養した。細胞へのリン負荷は、Na₂HPO₄とNaH₂PO₄を混合し、pH 7.4、0.1 Mに調整したリン酸バッファーを用いて行った。Na型ナトリウム-リン共輸送体の阻害剤として、phosphonoformic acid (PFA) (Sigma-Aldrich)を1 mMで使用した。

マウスを用いた実験

マウスを用いた実験に際しては、福岡大学動物実験委員会の承認を得て施行した。骨特異的FGFR1欠失マウスは、floxed *Fgfr1*マウス(ヘルシンキ大学Juha Partanen先生より供与)と*Ocn-Cre*マウス(Jackson Laboratory)の交配により作製した。

RNA解析

UMR106細胞からのRNAの抽出には、NucleoSpin RNA (Machrey-Nagel)を使用した。抽出したRNAをPrimeScript RT Master Mix (Takara)を用いて逆転写した。逆転写後のcDNAに対して、FastStart Essential DNA Green Master (Roche)を用いたSYBR法により、LightCycler 96 System (Roche)でreal-time PCRを施行した。

siRNA

ラット *Slc20a1* および *Slc20a2* siRNA の設計は Bioneer に発注した。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX Reagent (invitrogen) を用いて行った。

ウエスタンブロッティング

UMR106 の細胞抽出液の作成は、Complete Mini Protease Inhibitor Mixture (Roche) と PhosSTOP (Roche) を加えた RIPA バッファー (50 mM Hepes、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.5% Na-deoxycholate、0.1% SDS、1 mM EDTA) を用いて行った。10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS/PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写した。ケミルミネッセンスによる検出では、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用い、ChemiDoc Touch (Bio-Rad) で撮影を行った。

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE)

UMR106 の細胞抽出液を作成後、PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen)、2-D Clean Up Kit (GE Healthcare) を用いてリン酸化蛋白の精製を行った。精製したリン酸化蛋白を Cy2、Cy3、Cy5 で蛍光標識した (CyDye DIGE Fluors、GE Healthcare)。Ettan IPGphor system (24 cm、pH 4-7) を用いて一次元展開を行った後、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元 SDS/PAGE を行った。Cy2、Cy3、Cy5 それぞれの蛍光シグナルを Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) を用いて検出した。

4. 研究成果

細胞外リンは Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体である PiT1 を介して細胞内へ取り込まれリガンド非依存性に FGFR1 をリン酸化する

ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機序を介して FGFR1 をリン酸化するのかを解明するため、我々は FGFR1 のさらに上流の制御分子として Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体に着目した。Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体は広く様々な組織において発現しており、従来からリン感知への関与が議論されてきたが、FGFR1 のリン酸化との関係性は不明であった。そこで、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体の阻害剤である PFA を用いた実験を行った。UMR106 細胞において、PFA はリン応答性の *Galnt3* 発現亢進を抑制した [図 1A]。また PFA により、リンによる ERK、および FGFR substrate 2 α (FRS2 α) のリン酸化の誘導が消失した [図 1B]。また、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体には *Slc20a1* のコードする PiT1 と *Slc20a2* のコードする PiT2 とが存在する。そこで、どちらのサブタイプがリン感知に関与しているのかを検討するために、siRNA を用いて *Slc20a1* および *Slc20a2* をノックダウンし、リン応答遺伝子である *Galnt3* 発現への影響について評価した。結果、si*Slc20a1* によりリン応答性の *Galnt3* 発現亢進が抑制されたことから、リン感知には PiT2 ではなく PiT1 が関与していることが明らかとなった [図 1C]。したがって、細胞外リンによる FGFR1 のリン酸化には、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体である PiT1 を介した細胞内へのリンの取り込み必須であり、細胞内に取り込まれたリンがリガンド非依存性に FGFR1 をリン酸化する可能性が示唆された。また、UMR106 細胞において細胞外リン濃度の上昇は、FGFR1 を含めていくつかの蛋白のリン酸化を惹起することを我々は報告している。これらの蛋白のリン酸化に Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体が関与しているのかを検討するために、PFA を用いたプロテオーム解析を行った。通常の 1 mM の細胞外リン濃度で培養した UMR106

細胞から作成した細胞抽出液に加えて、5 mM の細胞外リン濃度でリン負荷を行ったもの、5 mM のリン負荷とともに PFA で処理したものを用意し、2D-DIGE を行った。細胞外リン濃度の上昇によりいくつかの蛋白のリン酸化が惹起されているが、PFA によりこれらのリン酸化が消失していることが示された [図 1D]。本成績は、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体がリン感知に関与していることを支持するものであった。

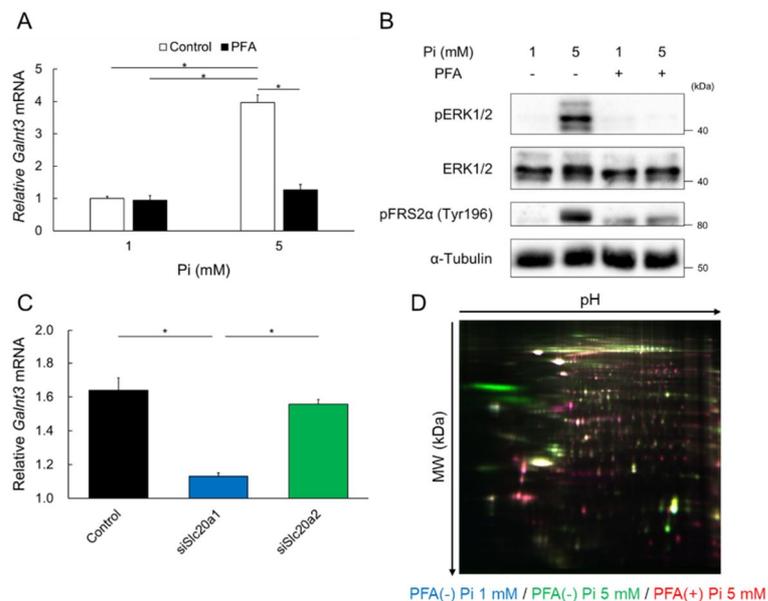


図1. Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体(PiT1)とリン感知

骨の FGFR1 によるリン感知は生命の維持に必須の機構である

FGF23 欠失マウスや Klotho マウスは高リン血症を呈し、老化が促進、短命であることが知られている。そこで、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを作成し、本マウスを長期飼育することで、リン感知分子としての FGFR1 の生存率への影響を検討した。骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して、血中 FGF23 濃度が低値であり、その結果血中リン濃度が高値であった。成長に伴う体重増加は、22 週齢までは骨特異的 FGFR1 欠失マウスとコントロールマウスとの間で有意差を認めなかったが、23 週齢以降骨特異的 FGFR1 欠失マウスにおいて有意な体重減少が認められた[図 2A]。 Kaplan-Meier 法を用いて生存率を評価したところ、骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して有意に短命であることが明らかとなった[図 2B]。したがって、骨の FGFR1 によるリン感知は、血中リン濃度を調節し高リン血症の発症を防ぐだけでなく、生命の維持に必須の機構であると考えられた。

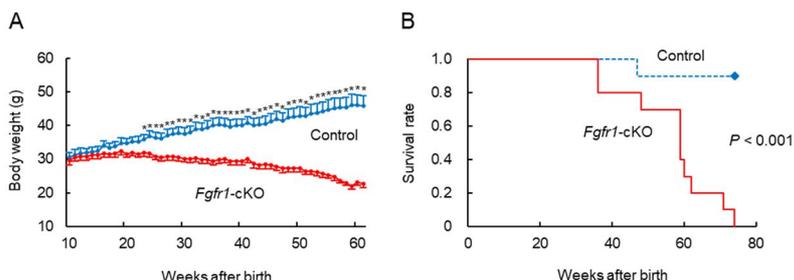


図2. 骨特異的FGFR1欠失マウスの体重推移と生存率

GFP 付加 FGFR1 安定発現 UMR106 細胞の作出

前述の PiT1 を介して細胞内に取り込まれたリンが、どのような機序を介して、細胞内からリガンド非依存的に FGFR1 をリン酸化するのかをさらに解明することを目指した。UMR106 細胞を用いて細胞外リン濃度を上昇させた時に、FGFR1 に対する結合が変化する蛋白の中から、候補分子の同定を試みることにした。ここで、FGFR1 に対する特異的な抗体が世界的に見ても存在しないことが問題となった。そこで、標識として GFP を付加した FGFR1 を用いて代替する計画を立てた。まず、FGFR1 の C 末端に GFP を付加した FGFR1 の発現ベクターを作製した。本ベクターをリポフェクタミン法により UMR106 細胞に過剰発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。結果、GFP の蛍光は確認できたものの、FGFR1 の本来の局在である細胞膜上ではなく、細胞質中にドット状に観察された。過剰発現の系では、GFP 付加 FGFR1 蛋白の小胞体ないしゴルジ体から細胞膜への移送に問題が生じているものと考えられた。そこで、GFP 付加 FGFR1 を細胞膜に発現させるために、安定発現細胞株を得ることとした。合計 6 クローン樹立し、うち 2 クローンにおいて、GFP の蛍光が細胞膜上に観察された[図 3A]。さらに、GFP 蛋白の発現をウエスタンブロッティングにより確認した[図 3B]。本細胞の細胞外リン濃度を 1 mM から 5 mM まで上昇させたところ、リン応答性の ERK のリン酸化が認められた[図 3C]。今回作出した GFP 付加 FGFR1 安定発現 UMR106 細胞が、PiT1 を介したリンの細胞内への取り込みと FGFR1 のリン酸化を媒介する未知の因子を同定するためのツールとなることが期待される。

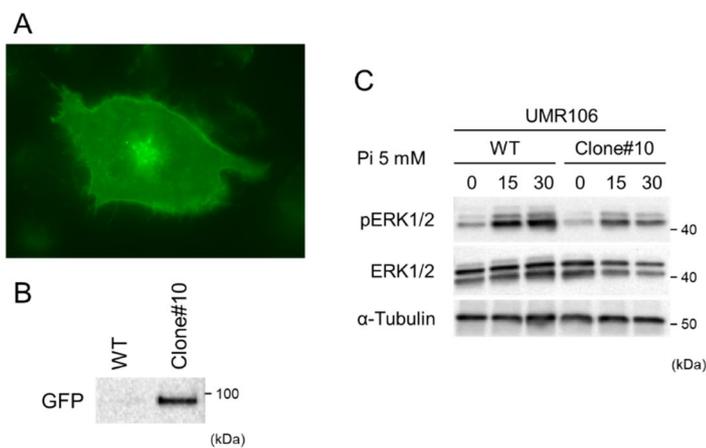


図3. GFP付加FGFR1安定発現UMR106細胞

<参考文献>

Skeletal FGFR1 signaling is necessary for regulation of serum phosphate level by FGF23 and normal life span. Takashi Y, Sawatsubashi S, Endo I, Ohnishi Y, Abe M, Matsuhisa M, Kawanami D, Matsumoto T, Fukumoto S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;27:101107.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takashi Yuichi, Sawatsubashi Shun, Endo Itsuro, Ohnishi Yukiyo, Abe Masahiro, Matsuhisa Munehide, Kawanami Daiji, Matsumoto Toshio, Fukumoto Seiji	4. 巻 27
2. 論文標題 Skeletal FGFR1 signaling is necessary for regulation of serum phosphate level by FGF23 and normal life span	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101107 ~ 101107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101107	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 Takashi Yuichi, Kawanami Daiji, Fukumoto Seiji	4. 巻 19
2. 論文標題 FGF23 and Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Osteoporosis Reports	6. 最初と最後の頁 669 ~ 675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11914-021-00709-4	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 Takashi Yuichi, Kawanami Daiji	4. 巻 23
2. 論文標題 The Role of Bone-Derived Hormones in Glucose Metabolism, Diabetic Kidney Disease, and Cardiovascular Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2376 ~ 2376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042376	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 FGF23によるリン代謝調節と肥満
3. 学会等名 第28回西日本肥満研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 骨リンセンサー分子FGFR1による高リン血症発症防御は生存率を向上させる
3. 学会等名 第71回日本体質医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 骨のFGFR1によるリン濃度感知、高リン血症発症防御は生存率を向上させる
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 リン代謝調節と糖尿病性腎臓病
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 老いなき世界を目指した食事療法
3. 学会等名 第4回日本抗加齢学会九州地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 FGF23とリン代謝
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

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 骨によるリン感知機構
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

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 骨特異的FGFR1欠失マウスを用いた リン感知分子としてのFGFR1の解析
3. 学会等名 第20回日本内分泌学会四国支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 リンと生活習慣病
3. 学会等名 第18回日本機能性食品医用学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高土祐一
2. 発表標題 FGF23によるリン代謝調節とくる病・骨軟化症～新規治療薬クリスピータへの期待～
3. 学会等名 第20回日本内分泌学会四国支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高土祐一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科 血中リン濃度の感知機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学講座 https://www.med.fukuoka-u.ac.jp/interna5/index.html</p>
--

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

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