

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 8日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591319

研究課題名（和文）

線維芽細胞成長因子23を鍵分子とする代謝性骨疾患の診断・病態解析

研究課題名（英文）

Role of FGF23 in metabolic bone diseases

研究代表者

大菌 恵一（OZONO KEIICHI）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20270770

研究成果の概要（和文）：

ビタミンD欠乏性くる病および低リン血症性くる病間で血清 FGF23 値の差があった。
臍帯血中 FGF23 濃度は成人・妊婦に比し低く、可溶性 Klotho 濃度は高かった。
低リン血症性くる病マウス胎仔の FGF23 値は高く、血清リン値は正常であった。
軟骨細胞では、可溶性 Klotho 添加により、FGF23 シグナルが伝達された。
骨形成不全症の患者では、ビスフォスフォネート投与により FGF23 値が急速に減少した。

研究成果の概要（英文）：

Serum FGF23 levels were lower than 20 pg/ml and higher than 40 pg/ml in 21 patients with vitamin D-deficiency and with hypophosphatemic rickets, respectively.

Umbilical blood FGF23 levels were lower than those in normal adults and pregnant woman. On the other hand, umbilical blood soluble klotho levels were higher than those in normal adults and pregnant woman.

Serum FGF23 levels were high in affected fetus of hyp mice, while serum phosphate levels remained in normal range in affected fetus.

Chondrocyte transduced the signal of FGF23 when FGF23 and soluble klotho were given.

Intravenous administration of bisphosphonate rapidly lowered FGF23 levels in patients with osteogenesis imperfecta.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：リン・カルシウム・FGF23・klotho・骨・成長

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞成長因子23 (fibroblast growth factor 23: FGF23) は、常染色体性優性低リン血症性くる病 (ADHR) の責任分子であり、FGF23 遺伝子変異により不活化の経路である

分子内切断を受けないため、血中 FGF23 値が高値となり、FGF23 の作用が過剰となる。X連鎖性低リン血症性くる病 (XLH)、腫瘍原性骨軟化症 (OOM/TIO) を含む種々の低リン血症性くる病においても、詳細な機序は不明であ

るが FGF23 の産生が過剰となること、病因の主体となる。FGF23 の主たる作用のひとつは、腎近位尿細管におけるナトリウム/リン (Na/P) トランスポーターの機能の抑制効果であり、この結果、尿中リン排泄の増加(リン利尿) が引き起こされ、低リン血症となる。もう一つの作用は、ビタミン D の 1α 位水酸化活性化障害であり、この結果、腸管からのリンの吸収が抑制され、低リン血症となる。さらに最近、FGF23 の産生部位は主として骨細胞であること、IIIc 型 FGF 受容体 1 (FGFR1IIIc) および抗老化因子として発見された Klotho が受容体であることが報告され、リン代謝調節ホルモンとしての重要性が確立された。しかし、血清リン値の恒常性を維持するため、FGF23 分泌がどのようにして調節されているか、また、分泌細胞である骨細胞で発現する PHEX (XLH の原因)、DMP1 (常染色体性劣性低リン血症性くる病=ARHR の原因) との相互作用などは不明である。さらに、Klotho の発現部位(腎遠位尿細管、副甲状腺、脳脈絡叢) と FGF23 作用部位(腎近位尿細管) との違い、可溶性 Klotho (sKlotho) が活性を有するかどうかなど検討すべき点が多く残されている。

本研究者は、早くから FGF23 のリン代謝における重要性に着目し、低リン血症の鑑別診断として、FGF23 の測定は重要であることを共同研究として発表した。例えば、McCune-Albright syndrome (MAS) においても、FGF23 が過剰分泌され、低リン血症性くる病が起りうることを明らかにした。また、低リン血症性くる病においては低リン血症が存在する時には血清 FGF23 値 30 pg/ml 以上が XLH や腫瘍原性骨軟化症等の FGF23 過剰状態を表すことを明らかにした。単独施設としての検討数はさらに増加し、XLH とビタミン D 欠乏性くる病を鑑別するために血清 FGF23 値を測定することは、診断的意義が高いと考えている。また、従来 FGF23 分泌は副甲状腺ホルモン (PTH) に比し、急速に変化しないと考えられ、急速な血清リン値の調節における FGF23 の役割は疑問視されていたが、骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネートの点滴静注に伴い、カルシウム・リン代謝が変化し、血中 FGF23 濃度が急速に低下することを見いだした。さらに、京都大学の鍋島教授との共同研究により、ヒトの血清中の sKlotho の測定に世界に先駆け成功した。sKlotho の機能に関しては、膜結合型のみが機能を有するという意見と sKlotho も膜結合型と同様に FGF23 のシグナルを伝えるという意見があり、その意義は確定していない。血清中の sKlotho の測定は sKlotho の機能を検討する上で重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究において、まず低リン血症性くる病の診断、治療における血清 FGF23 測定の意義を明らかにする。具体的には、ビタミン D 欠乏性くる病との鑑別のためのカットオフポイントを設定する。

低リン血症性くる病患者をビタミン D 投与により治療すると血清 FGF23 値が上昇するが、その値が治療管理の適正さを表わす指標となるかどうか検討する。

血清の sKlotho 値を測定し、代謝性骨疾患における意義を明らかにする。

周産期における sKlotho が FGF23 の動態を明らかにする。

これらの検討により、FGF23/Klotho システムの臨床診断的な価値と治療ターゲットとしての価値が明らかになることが期待される。

3. 研究の方法

本研究は、代謝性骨疾患患者の血清検体を用いた FGF23、sKlotho 値測定を含むが、この点については、倫理委員会の承認を受けている。

(1) カルシウム・リンに異常を来す疾患での FGF23 測定の意義

先行研究により、ビタミン D 欠乏性くる病 6 例、Fanconi 症候群 2 例で FGF23 は低リン血症が存在するにも関わらず低値となることを見いだした。また、低リン血症性くる病では、ビタミン D 治療とともに FGF23 値が上昇することを見いだした。本研究では症例数を増やし、FGF23 と他の指標(血清カルシウム、リン値、PTH 値、25OHD 値など) との相関性を検討する。また、くる病の診断としてカットオフ値の検討を行う。症例の蓄積のため、ビタミン D 欠乏性くる病研究会を組織したので、全国多施設の経験ある小児科医との連携が可能である。副甲状腺機能低下症(偽性を含む)では血清リン値が高値となるが、その際の FGF23 値の検討を行う。低リン血症性の代謝性骨疾患における FGF23 の測定に関しては倫理委員会の承認を受けており、患者およびその親より informed consent を得て測定する。

(2) 血中 sKlotho 濃度の測定とその意義の検討

成人と新生児、臍帯血の sKlotho を測定しその濃度に違いを見いだしている。低リン血症性の代謝性骨疾患における sKlotho の測定に関しては倫理委員会の承認を受けており、患者およびその親より informed consent を得て測定する。特に、FGF23 との相関性を検討し、FGF23 作用との関係を明らかにする。sKlotho の測定キットの開発は某社が行っており、今後の測定に関し、測定キットの有償

提供を受けることができる。正常値の設定に関しては、成人については終了しているが、小児においては設定できていない。成人との差が大きい場合、リン・カルシウム代謝に異常のない小児の血清 sKlotho が必要となるが、新たに倫理委員会に申請して行うこととなる。

(3) sKlotho の FGF23 作用に対する効果の検討

本研究の準備段階として sKlotho を恒常的に発現する CHO 細胞 (CHO-K1) を樹立した。CHO-K1 あるいは親株の CHO 細胞を matrigel とともにヌードマウスに移植し、腫瘍を形成させる。移植後 1 週ごとに 5 週まで採血、採尿を行い、血清 Ca, P, 1,25(OH)₂D, FGF23, sKlotho および尿中 Ca, P, Cr を測定する。既に樹立している FGF23 を恒常的に発現する CHO 細胞 (CHO-F23) 単独移植と sKlotho 同時移植を比較検討し、sKlotho が FGF23 の効果を高めて低リン血症の程度が重篤となるかどうか検討する。このことにより、sKlotho が FGF23 シグナルを増強するかどうか、検討可能となる。軟骨細胞の増殖、分化に対する効果も検討する。

(4) FGF23 分泌調整機序の検討

骨形成不全症 (OI) 児の治療に使用されているパミドロネートは、その骨吸収抑制作用により低カルシウム (Ca) 血症等、Ca・リン代謝に影響を及ぼす。申請者は、パミドロネート静注療法施行中の OI 児において、Ca・リン代謝調節ホルモンおよび FGF23 の変動について検討している。いままで、第 2 治療日より Ca、リンの有意な低下を認め、第 3 治療日より iPTH および 1,25(OH)₂D の有意な上昇を確認している。FGF23 については第 1 治療日の点滴後より有意な低下を認め、3 日間の治療前後での FGF23 値の変化は、 $37.8 \pm 10.5 \rightarrow 17.8 \pm 5.9$ [pg/ml] であった。FGF23 は血清リン値の低下による可能性もあるが、時間経過の検討や重回帰分析の結果から、尿中 NTx 値が FGF23 値と相関し、パミドロネートによる骨吸収抑制効果が骨細胞での FGF23 産生を直接低下させていると考えられた。

4. 研究成果

小児ビタミン D 欠乏症研究会を組織し、全国小児科研修施設 535 カ所に 2003-2007 年の 5 年間での小児ビタミン D 欠乏症の診療の経験の有無をアンケート調査した。48% の施設より回答があり、ビタミン D 欠乏症の経験は、全体の 16% の施設 (86 施設) で、合計 531 例の経験数が報告された。そのうちくる病を呈していたのは 52% であった。また、61% の施設で、ビタミン D 欠乏症の診断のために血清 25 位水酸化ビタミン D の測定を行っていた。さらに詳しい症例の把握のため、2 次調

査を行ったが、回答率は低かった。250HD の血中濃度は、回答のあった全例で 20 ng/ml 以下であった。血清 Ca, P 値が正常例である例もみられた。FGF23 のデータは得られなかったが、21 の自験例ではビタミン D 欠乏例では全例 30 pg/ml 以下で、既報どおりであった。すなわち、21 名のビタミン D 欠乏性くる病の症例と 9 名の低リン血症性くる病の症例で、治療開始時の血清 FGF23 値を比較検討したところ、ビタミン D 欠乏性くる病において 20 pg/ml 以下、低リン血症性くる病において 40 pg/ml 以上と、両者の間に血清 FGF23 値の明瞭な違いが見られた。また、治療後の変化としては、ビタミン D 欠乏性くる病において、アルファカルシドールにより治療した後に FGF23 値は上昇し、低リン血症性くる病においても、リン製剤とアルファカルシドールにより治療後に上昇傾向にあり、低リン血症性くる病において治療後も FGF23 値は正常化しなかった。

臍帯血中の FGF23 濃度は、成人に比し低く、可溶性 Klotho の濃度は高かった。妊婦とその児の臍帯血という直接的に関連のある対象群を設定して FGF23 の測定を行ったところ、FGF23 値は、妊婦は成人と差がなく、それらの値に対し臍帯血では有意に低値であり、また、可溶性 Klotho の濃度は臍帯血では妊婦に比し高いことを確認し論文として発表した。この結果は、胎児の血清リン値が成人に比し高値であることと関連しているものと考えられた。また、胎盤の合胞体栄養膜細胞での Klotho の発現を確認し、このことが臍帯血での可溶性 Klotho の高値の原因ではないかと考えられた。

X 連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) では、FGF23 は高値となるが、胎児あるいは新生児期から高値であるかどうかは知られていない。XLH のモデルである Hyp マウスを用いて、胎仔の FGF23 値を測定したところ、遺伝子異常のある個体で明らかな上昇を認めた。一方、血清リン値は正常に保たれ、胎児期には何らかの代償機能があるものと推察された。

FGF23 のシグナルを Erk のリン酸化、Egr 遺伝子の誘導を指標として検討した結果、可溶性 Klotho が FGF23 のシグナルを伝達するという明確なデータは、細胞移植実験では得られなかった。しかし、軟骨細胞では、膜結合型 alpha-klotho はほとんど発現していないが、可溶性 alpha-klotho (sKL) を添加すると FGF23 は、軟骨細胞においても Erk をリン酸化し、Egr1 の発現を誘導することを見いだし、FGF23 シグナルが伝達されることが明らかになった。さらに、FGF23 シグナルの軟骨分化・成熟過程における役割を検討するために、胎仔中足骨を用いた器官培養系で FGF23/sKL の影響を検討したところ、FGF23 + sKL は濃度依存性に中足骨の長軸方向への

成長を抑制した。また、これらの作用は FGF23 中和抗体により完全に阻害された。組織学的検討から、FGF23+sKL 群の中足骨では、増殖軟骨層が短縮していた。以上から、FGF23 シグナルは sKL の存在下で軟骨の成熟を抑制し、骨成長を抑制する可能性が考えられた。骨形成不全症の患者に対し、ビスフォスフォネートを投与すると FGF23 値が急速に減少するというデータを論文として発表した。

新たな FGF23 関連低リン血症性くる病である脂腺母斑症候群の日本人症例を見いだした。

FGF23 シグナルとリン応答シグナルが FRS2 α 以下の信号伝達が共通していることを見いだし論文として報告した。

マウス長管骨から骨細胞を単離し、ビタミン D 添加や培養液中のリン酸濃度を上昇させる事での FGF23 の発現の変化を検討した。培養液中で、骨細胞は FGF23 産生能力を急速に失うので、評価がやや困難であるが、FGF23 の発現は、ビタミン D 添加により上昇した。

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 16 件)

- 1) Narazaki R, Ihara K, Namba N, Matsuzaki H, Ozono K, Hara T. Linear nevus sebaceous syndrome with hypophosphatemic rickets with elevated FGF-23. *Pediatr Nephrol*. 査読有. 27(5) : 861-863. 2012.
- 2) 大幡泰久, 大藪恵一. 可溶性 α -Klotho 濃度測定の意義. 季刊 腎と骨代謝. 査読無. 25 (1) : 41-46, 2012.
- 3) 大藪恵一. 現代の栄養欠乏としてのビタミン D 欠乏. *Vitamins(Japan)*. 査読有. 86 (1) : 28-31, 2012.
- 4) Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K. Circulating levels of soluble α -Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有. 96(6): E943-E947. 2011.
- 5) Miura K, Umegaki N, Kitaoka T, Kubota T, Namba N, Etani Y, Hirai H, Kogaki S, Nakajima S, Takahashi Y, Tamai K, Katayama I, Ozono K. A Male Patient with Humoral Hypercalcemia of Malignancy (HHM) with Leukocytosis Caused by Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Resulting from Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Clin Pediatr Endocrinol*. 査読有. 20(3): 65-71. 2011.
- 6) Kitaoka T, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Hirai H, Yamamoto T, Ozono K. Decrease in serum FGF23 levels after intravenous infusion of pamidronate in patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab*. 査読有. 29(5):598-605. 2011.
- 7) Otomo T, Yamamoto T, Fujikawa Y, Shimotsuji T, Ozono K. Elevated Bone Turnover in an Infantile Patient with Mucopolysaccharidosis II; No Association with Hyperparathyroidism. *Clin Pediatr Endocrinol*. 査読有. 20(1): 7-12. 2011.
- 8) Otomo T, Higaki K, Nanba E, Ozono K, Sakai N. Lysosomal storage causes cellular dysfunction in mucopolysaccharidosis II skin fibroblasts. *J Biol Chem*. 査読有. 286(40): 35283-35290. 2011.
- 9) 大藪恵一. 主要な生体調節臓器としての骨. *生産と技術*. 査読無. 63(3):77-82. 2011.
- 10) 大藪恵一. 小児とビタミン D. *THE BONE*. 査読無. 25(3): 105-110. 2011.
- 11) 難波範行, 大藪恵一. カルシウム感知受容体における病態. *臨床検査*. 査読無. 55(10) : 973-978. 2011.
- 12) 大藪恵一. 子どもの骨・関節疾患-診断と治療. *総合臨床*. 査読無. 60 (10) : 2151-2152. 2011.
- 13) 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*. 査読有. 47(5):938-947. 2010.
- 14) 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*. 査読有. 111(5):1210-1221. 2010.
- 15) Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab*. 査読有. 27(3):265-271. 2009.
- 16) Miyachi 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*. 査読有. 106(6):1090-1101. 2009.

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 宮川和晃. リン代謝における骨細胞の機能-Hyp マウスを用いた解析-. 第 29 回小児代謝性骨疾患研究会. 2011.12.03. 経団連会館 (東京)
- 2) Ozono K. Recent advances in research and clinical practice for rickets. the Research Center for Rare Disease (Invited lecture) . 2011.11.23. Seoul National University Children's Hospital (Korea)
- 3) Ozono K. management of patients with achondroplasia/hypochondroplasia. Sungkyunkwan University seminar (Invited lecture) . 2011.11.22. Samsung Medical Center (Korea)
- 4) 大藪恵一. 周産期のカルシウムリン代謝. 第 19 回 Bone Research Joint Meeting. 2011.11.08, 大阪大学 (大阪)
- 5) 大藪恵一. 小児科医が知っておくべき骨系統疾患. 第 23 回奈良小児内分泌研究会 (特別講演). 2011.10.27, 奈良県立医科大学 (奈良)
- 6) 大幡泰久. XLH モデル Hyp マウスにおける胎児血中リン値維持機構の存在-FGF23 および胎盤の関与. 第 45 回日本小児内分泌学会学術集会. 2011.10.06. 大宮ソニックシティ (埼玉)
- 7) Miyagawa K. 1,25(OH)2D and PTH Up-regulate Rankl while Down-regulate PheX and Dmpl in Primary Osteocytes Isolated from Mouse Bones. ASBMR 2011 Annual Meeting. 2011.09.19. San Diego Convention Center (USA)
- 8) Koshimizu T. Vinculin-mediated Signaling from Extracellular Matrix Interacts with the Signaling Triggered by Humoral Factors and Regulates Chondrocyte Differentiation in a Sox9-independent Manner. ASBMR 2011 Annual Meeting. 2011.09.16. San Diego Convention Center (USA)
- 9) Ozono K. Osteoporosis and osteopetrosis in the young. IOF Regionals - 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting being held in conjunction with the ANZBMS Annual Scientific Meeting and JSBMR. 2011.09.08, GOLD COAST CONVENTION CENTRE (Australia)
- 10) 大幡泰久. 胎児期特異的ミネラル代謝調節機構における FGF23 の関与-Hyp マウスを用いた解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.07.30. 大阪国際会議場 (大阪)
- 11) 宮川和晃. Hyp マウスの骨においては胎児期より既に Fgf23 及び Dmpl の発現が増加している. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.07.30. 大阪国際会議場 (大阪)
- 12) 三浦弘司. ナトリウム利尿ペプチド受容体 B の機能獲得型変異はヒトおよびマウスにおいて成長促進と低骨密度をもたらす. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011.07.28. 大阪国際会議場 (大阪)
- 13) Miyoshi Y. Serum Triiodothyronine to Thyroxine Ratio in a Child with T3-Predominant Graves Disease. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo. 2011.06.04. Boston Convention & Exhibition Center (USA)
- 14) 大藪恵一. 現代の栄養欠乏としてのビタミン D 欠乏. 日本ビタミン学会第 63 回大会: 2011.06.04, 安田女子大学 (広島)
- 15) Miura K. Three-Generation Dominant Transmission of Tall Stature Due to Gain-of-Function Mutation of the Natriuretic Peptide Receptor B. PAS/ASPR 2011. 2011.05.01. Colorado Convention Center (USA)
- 16) 三浦弘司. ナトリウム利尿ペプチド受容体 B の機能獲得型変異に伴う高身長家系一内分泌学的検討一. 第 84 回日本内分泌学会学術総会. 2011.04.22. 神戸国際会議場 (兵庫)
- 17) Ohata Y. Placenta Expresses Klotho and FGFRL1 in Syncytiotrophoblast and Might Be a Target Organ of FGF23. 32nd annual Meeting ASBMR 2010. 2010.10.14-21. Toronto, Canada
- 18) Miyagawa K. Differential Gene Expression in Osteoblast/Osteocyte Lineage Cells between Hyp Mouse and Wild-type Mouse. 32nd annual Meeting ASBMR 2010. 2010.10.14-21. Toronto, Canada
- 19) Miura K. A Survey on Vitamin D Deficiency in Children in Japan. 32nd annual Meeting ASBMR 2010. 2010.10.14-21. Toronto, Canada
- 20) Ohata Y. Soluble Form of Klotho in Serum Correlates with Serum Levels of Hormones Involved in Phosphate Homeostasis. 8th Joint Meeting of the LWPES / ESPE. 2009.09.09-12. New York, America
- 21) Ohata Y. Serum Levels of Soluble Klotho and FGF23 in Cord Blood. 91th Endo09. 2009.06.10-13. Washington DC, America

[図書] (計 4 件)

- 1) 大藪恵一. 診断と治療社. 小児腎臓病学. 2012. 70-75.
- 2) 大藪恵一. 医学書院. 今日の治療指針私はこう治療している. 2012. 1188.
- 3) 大藪恵一. 医学書院. 今日の小児治療指

- 針 第15版. 2012. 237-238.
- 4) 大菌恵一. 総合医学社. 小児科診療ガイドライン-最新の診療指針- 第2版. 2011. 378-380.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大菌 恵一 (OZONO KEIICHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 20270770

(2) 研究協力者

三浦 弘司 (MIURA KOHJI)
大阪大学・医学部附属病院・その他
研究者番号 : 30625695

藤原 誠 (FUJIWARA MAKOTO)
大阪大学・医学部附属病院・その他
研究者番号 : 50625697