

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790967

研究課題名 (和文) 骨芽細胞における全トランス型レチノイン酸の FGF23 発現・分泌に対する検討

研究課題名 (英文) The effect of all-trans retinoic acid on FGF23 expression/secretion in human osteoblasts

研究代表者

箱田 明子 (HAKODA AKIKO)

東北大学・病院・医員

研究者番号：70509398

研究成果の概要 (和文)：

骨組織において全トランス型レチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid; ATRA) と骨由来ホルモンである FGF23 の連関について未だ報告はない。本研究では ATRA の骨組織における FGF23 発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、ヒト由来骨芽細胞を用いて上清、蛋白、RNA を抽出して ATRA による FGF23 発現分泌変化について調べた。しかしながら用いた細胞の FGF23 発現が低発現であったためにその変化を調べることができなかった。今後 FGF23 が発現している別系統の細胞を用いて同様の実験を行う予定である。

研究成果の概要 (英文)：

It remains unknown effects of all-*trans* retinoic acid (ATRA) on FGF23 expression/secretion in bone tissue. I therefore examined those effects using supernatants, mRNA and protein from human osteoblast culture. However, I couldn't observe the alteration of expression/secretion because FGF23 was not expressed in human osteoblasts we used.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：小児内分泌学

1. 研究開始当初の背景

全トランス型レチノイン酸 (all-*trans* retinoic acid; ATRA) は、生理的な活性化型ビタミン A 誘導体で、核内受容体であるレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor;RAR)

を介して、細胞の増殖や分化、アポトーシスなど様々な作用を発揮する転写調節因子である。急性前骨髄球性白血病細胞に分化誘導能を持つことから、その標準的治療法として使用されている。さらに、新規合成レチノイ

ドの一つである Am80 は、RAR に対する強力なアゴニストとして知られるが、近年、再発時や難治性の急性前骨髄球性白血病の治療に臨床応用されるようになり、劇的な生存率の改善をもたらした (*Leukemia* 2002;16:463-472)。本研究者は、ATRA および Am80 が、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞とヒト皮膚繊維芽細胞の共培養下、濃度依存的に血管新生を促進させ、その機序の一つが血管新生促進因子として知られる血管内皮細胞特異的増殖因子の発現・産生の増加であることを報告した (*Endocrinology* 2007 ; 148 : 1412-1423)。さらに、ATRA および合成 RAR アゴニストである Am580 が血管内皮細胞において PI3 キナーゼ/Akt 経路を介して NO 産生を促進することを解明した (*Circulation* 2005;112:727-736)。このように ATRA を含むレチノイドは、血液疾患のみならず、心血管系障害を含めた様々な疾患に対する治療効果が期待されている。

FGF23 は、251 個のアミノ酸からなる蛋白で、このうち N 端 24 個のアミノ酸はシグナルペプチドで、分泌される全長 FGF23 は 227 個のアミノ酸から構成され、主に骨細胞から産生される (*Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 277:494-498)。リコンビナント FGF23 を用いた検討から、FGF23 は、近位尿細管でのリンの再吸収を担う IIa 型や IIc 型ナトリウム・リン共輸送体の発現を低下させることによりリン利尿を促し (*J Bone Miner Res* 2004;19:429-435)、1,25-水酸化ビタミン D の産生酵素である 25-水酸化ビタミン D-1 $\alpha$ -水酸化酵素発現を低下させるとともに、1,25(OH) $_2$ D を分解する酵素である 25-水酸化ビタミン D-24-水酸化酵素発現を亢進することによって、血中 1, 25(OH) $_2$ D 濃度を低下させ、これらの作用により、低リン血症を惹起する。近年、FGF23 の作用過剰が、様々な病態における低リン血症を引き起こすことが明らかにされた。常染色体優性低リン血症性くる病は、FGF23 のミスセンス変異を認め (*Nat Genet* 2000;26:345-348)、その変異 FGF23 蛋白質は切断耐性を示し生物活性を保持しているためリン利尿が亢進し、低リン血症をきたしているものと考えられている (*Endocrinology* 2002;143:3179-3182)。同様に腫瘍性骨軟化症では、腫瘍が産生する過剰な FGF23 により、腎臓からのリン喪失が引き起こされるものと考えられている (*Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11): 6500-6505)。さらに常染色体優性低リン血症性くる病と類似した症状を呈する X 連鎖性低リン血症性くる病は、PHEX 遺伝子が責任遺伝子として同定されているが (*Nat Genet* 1995 ; 11(2) : 130-136)、その変異が何らかの作用で骨細胞における FGF23 発現上昇をもたらす発症するものと考えられている。常染色体優

性低リン血症性くる病や X連鎖性低リン血症性くる病は、遺伝性の低リン血症性くる病であり、乳幼児期より適切な治療がなされないと成長障害や下肢の変形などくる病をきたし、成人においては骨軟化症をきたす。しかし、根本的治療法はなく、現在標準的に行われている治療は、対症療法としてリンの補充と薬理量の活性型ビタミン D 投与のみである。

これまでに活性型ビタミン D が骨組織において FGF23 の発現や産生を促進することが *in vivo* や *in vitro* の系において報告されてきた (*J Biol Chem* 2005;280: 2543-2549、*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G1036-1042)。一方、活性型ビタミン A 誘導体である ATRA は、血管内皮細胞および線維芽細胞における FGF2 の発現 (*Endocrinology* 2007;148 : 1412-1423)、さらに神経系における FGF8 の発現 (*Neuron* 2003;40:65-79) の調節を行っているなど、FGF ファミリーの制御因子であることが知られているが、FGF23 に関する発現調節作用の報告はない。そこで今回本研究者は、FGF23 の過剰作用により生じる上記疾患に対して FGF23 を制御する因子が新たな治療につながる可能性があると考え、未だ不明である ATRA による FGF23 発現調節を検討することを着想した。

## 2. 研究の目的

骨組織における全トランス型レチノイン酸 (ATRA) と FGF23 の連関について未だ報告はない。そこで、ヒト由来骨芽細胞における、FGF23 の mRNA および蛋白発現、さらに培養上清への FGF23 分泌を解析することにより、骨における ATRA による FGF23 発現・産生への影響を明らかにする。これにより FGF23 により惹起され根本的治療法のない低リン血症性くる病/骨軟化症の新規治療法の開発につなげる。

## 3. 研究の方法

ヒト由来骨芽細胞 (Cambex 社 : Normal Human Osteoblast Cell) とその専用培地 (OGM BulletKit) を用いて ATRA による FGF23 発現・分泌への影響を解明するために、以下のことを行った。

(1)

Control 群と培地に各濃度の ATRA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) および Am80 (1 nM, 10 nM, 100 nM) を添加した群とでヒト由来骨芽細胞を培養後、上清への FGF23 の分泌を ELISA 法で評価する。

方法；ヒト由来骨芽細胞を培養し、50%コンフルエンスで上記の各濃度の ATRA および Am80 を添加した培地に交換し、さらに3日間培養する。培養最終日、各ウェルから上清を採取し、Human FGF-23 (intact) ELISA Kit (PromoCell 社製) を用いて、上清中の FGF23 濃度を測定する。

(2)

Control 群と培地に各濃度の ATRA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) および Am80 (1 nM, 10 nM, 100 nM) を添加した群とでヒト由来骨芽細胞を培養後、蛋白を抽出し、FGF23 抗体を用いた Western blot 法により FGF23 の細胞内蛋白発現を解析する。

方法；ヒト由来骨芽細胞を培養し、50%コンフルエンスで上記の各濃度の ATRA および Am80 を添加した培地に交換し、さらに3日間培養する。約 80%コンフルエンスで、RIPA バッファーにて蛋白を抽出する。SDS-PAGE 法にて蛋白を分離し、蛋白を PVDF メンブレンに転写する。その後 FGF23 抗体 (R&D Systems 社製) を用いて抗体反応を行い、ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, 社製) を用いて発光反応させて X 線フィルムで化学発光を検出し、蛋白発現を解析する。

(3)

Control 群と培地に各濃度の ATRA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) および Am80 (1 nM, 10 nM, 100 nM) を添加した群とでヒト由来骨芽細胞を培養後、RNA を抽出し、定量 PCR を用いて FGF23 mRNA の発現を解析する。

方法；ヒト由来骨芽細胞を培養し、50%コンフルエンスで上記の各濃度の ATRA および Am80 を添加した培地に交換し、さらに3日間培養する。80%コンフルエンスで RNeasy Minikit を用いて RNA を抽出し、RT 反応を行う。得られた cDNA を、FGF23 プライマーを用いて LightCycler technology (Roche Diagnostics 社製) で定量 PCR を行い、FGF23 mRNA の発現を解析する。

#### 4. 研究成果

最初に、ヒト由来骨芽細胞を培養し、50%コンフルエンスになったところで、Control と各濃度の ATRA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) を添加した培地で培地交換を行い、さらに3日間培養した。培養最終日、各ウェルから上清を採取し、Human FGF-23 (intact) ELISA Kit (PromoCell 社製) を用いて、上清中の FGF23 濃度の測定を行ったところ、どの群においても上清中の FGF23 濃度は感度以下であり、ヒト由来骨芽細胞における FGF23 分泌変化を確認することができなかった。

次に、上記と同様に Control 群と各濃度の ATRA を添加した群とでヒト由来骨芽細胞を 72 時間培養後抽出した蛋白を用いて、ヒト FGF23 抗体を用いた Western blot 法により FGF23 の細胞内蛋白発現を解析した。1 回目の実験では、Control 群と 1 nM~100 nM の ATRA 群に対して 1  $\mu$ M の ATRA 群では FGF23 の発現が低下しており、高濃度 ATRA において FGF23 の発現が低下することが示唆されたが、その後同様の実験を繰り返すも再現性は得られなかった。

さらに上記と同様に Control 群と各濃度の ATRA を添加した群とでヒト由来骨芽細胞を 72 時間培養後抽出した RNA を用いて、定量 PCR を行い FGF23 mRNA の発現を解析したが、Control 群を含めたどの細胞群においても FGF23 の発現をみることはできなかった。

今回用いた Cambex 社のヒト由来骨芽細胞 (Normal Human Osteoblast Cell) においてそもそも FGF23 の発現が非常に低発現であったことが示唆され、この細胞が今回の解析に適さない可能性が考えられた。

骨組織における ATRA と FGF23 の連関について未だ報告はなく、ATRA による FGF23 の制御について解明されれば、FGF23 により惹起される疾患の FGF23 を標的とした新たな治療につながることから、今後 FGF23 が発現している骨関連の別の細胞を用いて上記の実験を行いたいと考える。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箱田 明子 (HAKODA AKIKO )

東北大学・病院・医員

研究者番号: 70509398

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: