

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08561

研究課題名(和文)慢性腎臓病下での二次性副甲状腺機能亢進の分子背景の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism underlying secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease

研究代表者

片岡 浩介 (Kataoka, Kohsuke)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：20262074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性腎臓病において問題となる二次性副甲状腺機能亢進症SHPTが引き起こされる原因を、転写調節の観点から解き明かすことを目的とした。副甲状腺の発生・機能維持に必須な転写因子Gata3, Gcm2, MafBによりPTH遺伝子エンハンサーを協調的に活性化する再構成実験系を確立していたので、これを利用して、カルシウム感知受容体CaSR、ビタミンD受容体VDRとRXR、あるいはFGFR1とKlothoを共発現させて、それぞれ細胞外カルシウム、ビタミンD、FGF23による生理的な抑制応答を再現した。このときの転写因子群の活性や状態を調べることでSHPTによる破綻の要因を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症SHPTは、QOLを大きく損なう要因のひとつであり、またリン・カルシウム代謝の破綻による血管内石灰化などを引き起こすことで生死に関わる問題を引き起こす。本来の生理的な状況下では、副甲状腺の機能は細胞外カルシウム、ビタミンD、FGF23によって抑制されるが、SHPTにおいては抑制機構が破綻するとされる。しかし、その抑制機構も、破綻の様相もあきらかではない。本研究は、副甲状腺機能と直結する副甲状腺ホルモンPTH遺伝子の発現調節に重要なエンハンサー活性を指標にして、転写調節の観点から生理的抑制機構とその破綻の分子機構の解明にアプローチした。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of secondary hyperparathyroidism (SHPT) associated with chronic kidney disease is not fully understood. We have previously established a reporter assay system to monitor PTH gene enhancer activity by co-expression of parathyroid-enriched transcription factors, Gata3, Gcm2 and MafB into a non-parathyroid cell line. By using this system, we co-expressed receptors for extracellular calcium (CaSR), vitamin D (VDR and RXR) or FGF23 (FGFR1 and Klotho) and recaptured downregulation of PTH expression by these signaling molecules. These physiological responses are known to be compromised under SHPT condition through yet unidentified mechanisms. We therefore explored mechanism of the disability of repression by extracellular calcium, vitamin D and FGF23 through analyzing the synergistic transcriptional activities, post-translational modifications and protein stability of Gata3, Gcm2 and MafB.

研究分野：遺伝子発現調節

キーワード：副甲状腺 転写調節 カルシウム恒常性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症 (secondary hyperparathyroidism: SHPT) は、慢性腎不全に伴って生じ、QOL を大きく損なう要因のひとつである。これはカルシウム・リン代謝異常を伴い、血管内石灰化を引き起こして生命の危険にもつながる問題を生じさせる。本来であれば高カルシウム、高リン状態によって副甲状腺ホルモン PTH の発現や分泌が抑制されるのが生理的な応答であるのだが、SHPT においては抑制が起きない点が異常であり、副甲状腺機能が暴走した状態と捉えることができる。にもかかわらず、副甲状腺における転写調節に関する知見はきわめて乏しく、PTH の発現調節やカルシウム、リン (FGF23 を介する) やビタミン D による発現抑制の仕組みも全く不明である。したがって、これらを明らかにすることが、その破綻の様相を知り、治療につなげる知見を得るための重要な一歩・基盤となることが期待される。

2. 研究の目的

SHPT における副甲状腺の暴走状態を理解するための一歩として、まず副甲状腺の本来の生理的な応答である細胞外カルシウム、FGF23、ビタミン D による機能抑制の分子機構をあきらかにすることを目指した。機能の発揮と抑制に関わる分子群をあきらかにした上で、SHPT における破綻の際に、どのような分子が、どのような異常なふるまいをしているのかを知ることで、SHPT の状態を分子レベルで理解し、治療に結びつくようなポイントを発見することを目的とした。

3. 研究の方法

従前までに、PTH 遺伝子の発現に重要なエンハンサー領域を転写開始点の 5 kb 上流に同定しており、また、そのエンハンサー領域およびプロモーター近位に対して、副甲状腺の発生・分化・機能維持に必須なはたらきをする転写活性化因子である Gata3, Gcm2, MafB が結合して、協調的に転写を活性化することをあきらかにしていた。副甲状腺の研究における大きな障害のひとつは、機能を十分に維持した培養細胞株が利用できない点である。そこで、繊維芽細胞である BHK21 細胞に、この PTH エンハンサー・プロモーターのレポーター・プラスミドと、Gata3, Gcm2, MafB の発現プラスミドを共発現させて、カルシウム、リン (FGF23) あるいはビタミン D による抑制応答を再現する実験系を構築した。その系を利用し、これらの転写因子の発現レベルや転写活性レベルを調べることによって、抑制の分子機構をあきらかにし、さらに破綻のメカニズムを探ることにした。

4. 研究成果

1:細胞外カルシウムによる抑制に関しては、上記の再構築実験系に、さらに G-protein coupled receptor である CaSR (Ca-sensing receptor) を共発現させることによって、細胞外カルシウムによるレポーター活性の抑制を観察できるかどうかを調べた。野生型の CaSR を共発現させると、培地中のカルシウムが低値であっても、その発現量に応じてレポーター活性が抑制された。CaSR は class C の GPCR に属し、活性型状態と不活性型状態の間を揺れ動くとされているので、アゴニストであるカルシウムが低値であっても、発現量が多ければ活性型状態のシグナルを発するためと考えられた。発現量が少ない状況では、細胞外カルシウムに応答したレポーターの抑制が観察された。また、autosomal dominant hypocalcemia の原因となる gain-of function 型の変異 CaSR (A843E) を発現させると、細胞外カルシウム濃度に関係なく、発現量依存的にレポーターを抑制した。一方で、familial hypocalciuric hypercalcemia の原因となる loss-of-function 型の変異 CaSR (L159P) を発現させた場合には、細胞外カルシウム濃度や発現量に関係なく、レポーターの抑制は見られなかった。以上の結果から、CaSR を介して細胞外カルシウムによって PTH 遺伝子の転写抑制をモニターする実験系が期待されたように確立できたと判断した。この実験系は、さまざまなタイプの CaSR の変異体の性状解析に利用可能であることも同時に示した。

以上の結果から、細胞外カルシウムによる PTH 発現抑制の分子機構を解析する上で、gain-of function 型の変異 CaSR (A843E) を発現させることによって、細胞外カルシウムを操作する手間を省略することができる考えた。そこで、CaSR (A843E) を発現させることによる Gata3, Gcm2, MafB の発現レベルを Western blot で調べることにした。MafB および Gata3 はそれぞれに対する抗体を利用可能だが、Gcm2 に関しては、購入したいいくつかの抗体では Gcm2 を検出できなかった。そこで、Gcm2 の N 末端あるいは C 末端にタグを付加した発現プラスミドを作製し、PTH レポーターの活性化や CaSR (A843E) による抑制を検討したところ、N 末端側にタグを付加すると、レポーターの活性化が見られなくなった一方で、C 末端側の 3xHA タグは野生型 Gcm2 と同様にレポ

ーターを活性化し、CaSR (A843E)による抑制も見られた。現在、Gata3, Gcm2-3xHA, MafB の発現レベルの変動などを解析している。

2 : 細胞外リンは、骨において FGF23 の発現・分泌を促し、FGF23 が副甲状腺に発現する受容体 FGFR と共受容体である α Klotho に結合することによって PTH の発現や分泌を抑制することがあきらかにされている。そこで、FGFR のひとつ FGFR1 を α Klotho とともに上記の再構築系に加えて発現させ、FGF23 による抑制が観察されるかどうかを調べた。FGF23 は、組換えタンパク質を培地に添加する方法と、発現プラスミドを共導入することによってシグナル活性化を期待する方法を試みた。また、FGFR1 由来のシグナルをモニターするために、immediate early 遺伝子である *egr1* 遺伝子のプロモーターのレポーターも作製した。

FGFR1 と α Klotho を共発現させた状態で、さらに組換え FGF23 を培地に添加するか、あるいは FGF23 発現プラスミドも共発現させると (すなわち、FGFR1, α Klotho, FGF23 の3者が揃った場合のみ) *egr1* レポーターの活性化が見られた。PTH レポーターに対しても、3者が揃った場合に抑制が観察されたが、いずれか2者のみでも若干の抑制が見られることも分かり、*egr1* の活性化と PTH の抑制には、必要とされる細胞内シグナルの種類あるいは強度に違いがあることが想像された。また、機能亢進型の FGFR1 変異体 (K656E) は *egr1* を活性化できないが、PTH は抑制した。この変異体は、機能亢進型とはいえ複数の下流シグナルのうちの一部のみを活性化する変異体である可能性があり、その違いがレポーターに対する特異性を生み出していることが考えられた。いずれの活性 (*egr1* の活性化および PTH の抑制) も、FGFR1 のキナーゼ活性欠損変異体 (K514A) では見られなかったため、チロシンキナーゼ活性に依存することはあきらかであった。また、FGFR1 と結合できない α Klotho の変異体 (Δ RBA) を発現させた場合には *egr1* の活性化も PTH の抑制も見られず、このことは3者複合体によるシグナルが必要である確証のひとつである。

FGFR1 のチロシンキナーゼ活性の下流では、FRS, Crk, PLC γ , STAT などのシグナル伝達経路が活性化することが知られている。そこで、これらのシグナル伝達能がそれぞれ欠損した変異体を作製し、PTH 抑制に必要なシグナル経路の特定を試みた。すると、FRS, Crk, PLC γ をそれぞれ活性化できない変異体は若干 PTH 抑制活性が弱まった一方で、STAT シグナル欠損の変異体 (Y677F) は PTH 抑制活性が大きく損なわれていた。これらの結果は、PTH の抑制には STAT の活性化が大きく寄与する一方で、それ以外のシグナル経路も関与することを示しており、発現抑制のメカニズムの複雑さを表していると考えられる。

3 : ビタミン D は、その受容体である VDR に結合し、そのヘテロ2量体パートナーである RXR とともに VDRE 配列に結合して転写を活性化あるいは抑制する。PTH 遺伝子上に存在が指摘されていた VDRE は抑制には必要でなかったことから、VDRE を介さない抑制メカニズムが想定され、その解明に取り組んだ。ビタミン D は、VDR と RXR の両者を共発現した場合のみ、濃度依存的に PTH レポーター活性を抑制した。このとき、Gata3 と MafB の発現量が低下することが観察された。Gcm2 の発現量に変化はなかったが、Gcm2 も共存していることが、Gata3 と MafB の発現低下に必要であった。これらのことは、Gata3-MafB-Gcm2 の転写複合体に対して、リガンド (ビタミン D) 結合型の VDR-RXR が作用することによって、例えば複合体を崩壊させることによって分解を促進するなどの機構が考えられる。現在、詳しい分子機構を追及している。

一方で副甲状腺において、all-trans retinoic acid (ATRA) が PTH の mRNA レベルを抑制することが報告されていたので、ビタミン D だけでなく、レチノイン酸がその受容体である RAR とパートナー RXR を介して PTH レポーターを抑制するかどうかを調べたところ、期待通りに抑制が観察された。さらに、RXR ホモ2量体を受容体とするリガンドである 9-cis retinoic acid (9-cis-RA) によっても PTH レポーターは抑制された。さらに、これらのリガンド添加によっても、Gata3 と MafB の発現量低下が観察された。すなわち、VDR-RXR, RAR-RXR, RXR-RXR のいずれのリガンド結合型も PTH を抑制し、そのときに Gata3 と MafB の発現量が低下した。したがって、2量体核内受容体の RXR 側が Gata3-MafB-Gcm2 の転写複合体に作用する可能性が考えられる。その分子機構を詳しく調べる上で、VDR 側ではなく、RXR のさまざまな変異体を利用することが望ましいと判明したことは、今後の研究において重要である。

副甲状腺における転写研究の困難な点のひとつは、ChIP-seq, ATAC-seq などの大規模なゲノムワイドなデータがほとんど利用できないことであった。しかし本研究期間の終了直前の 2024 年 3 月に、ヒト parathyroid adenoma の ATAC-seq および Gcm2 やヒストン修飾の ChIP-seq を行った論文が発表された。当該論文から、われわれが見出した PTH 遠位エンハンサーは PTH 遺伝子の発現制御における最重要なエンハンサーであることや、Gata3, Gcm2, MafB が副甲状腺特異的な転写コアサーキットを形成することなどがあらためて確認された。このような次世代シーケンス関連の大規模データが蓄積していくことと相まって、他の組織と比較して遅れている副甲状腺の転写研究が進展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Yuka, Kataoka Kohsuke	4. 巻 67
2. 論文標題 MafA, NeuroD1, and HNF1 synergistically activate the Slc2a2 (Glut2) gene in -cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 71～82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-20-0339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunekage Yukino, Takeiri Masatoshi, Yoshioka Yuri, Matsumura Shinichi, Kimura Yoshihide, Kataoka Kohsuke	4. 巻 16
2. 論文標題 <i>Nasturtium officinale</i> Extract Suppresses Osteoclastogenesis in RAW 264 Cells by Inhibiting I B-Kinase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X211020643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 會田侑希、片岡浩介
2. 発表標題 臍島 細胞へのリソソームストレスは、TFE3を介してインスリン転写因子MafAの発現を低下させる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井 賢一、松井 貴輝、別所 康全、片岡 浩介
2. 発表標題 GSK3-mediated MafA phosphorylation is indispensable for cell growth
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 會田侑希、片岡浩介
2. 発表標題 過剰なインスリン分泌は転写因子TFE3を活性化して 細胞特異的遺伝子MafAの発現を低下させる
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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