

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791028

研究課題名(和文)新規リン代謝調節因子FGF23/Klothoを指標にした未熟児くる病の解析

研究課題名(英文)Analysis of Rickets in the premature baby using a new biomarker, FGF23 and Klotho

研究代表者

荒堀 仁美(Arahoru, Hitomi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40379186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：早産児・低出生体重児においてみられる未熟児くる病の発症を予測し、その治療効果を確認するためのマーカーとして、血中リンとビタミンD代謝を調節する線維芽細胞増殖因子、FGF23とその制御因子である-Klothoに着目した。可溶性Klotho濃度を測定したところ、臍帯血中では新生児・母体・成人の血液中に比較して有意に高値であること、FGF23が逆に有意に低値であり、これらは臍帯血において負の相関があることが分かった。さらに胎盤では可溶性Klothoが発現していることが免疫染色により明らかとなり、臍帯血中の-Klothoが胎盤由来であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 23, FGF receptor, and Klotho is known to participate in homeostasis of phosphate metabolism. To determine the baseline levels of these molecule and their correlation, we measured the serum levels of soluble Klotho in fetuses and compare them with those in neonates, mothers, and adults. In cord blood, the level of Klotho was markedly higher than levels in other samples, whereas the fetal level of FGF23 was lower than levels in the other subjects. Immunohistochemistry demonstrated that Klotho was predominantly expressed in syncytiotrophoblasts in normal term placenta.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：未熟児くる病 新生児 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

胎児期の骨化の 80%は妊娠末期 3 ヶ月に起こり、そのあいだに必要なカルシウム・リン・ビタミン D の供給はすべて胎盤機能に依存している。胎児の血清リン濃度は母体に比して高値に維持されており、これには能動的なリンの経胎盤輸送が関与していることが示唆されている。

ビタミン D は骨形成を調節する重要なホルモンである。近年このビタミン D 代謝の制御において、リン利尿因子として同定されていた線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor:FGF)23 が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。FGF23 は腎尿細管に作用してリンの再吸収を抑制し、また 1,25(OH)₂D の血中濃度を低下させることによって血清リンの低下を引き起こす。その作用は FGF 受容体 (FGFR) および co-factor として機能する膜 1 回貫通型タンパク質 Klotho との相互作用によっているが、その詳細、とくに申請時期における動態についてはまだほとんど分かっていない。

一方、胎盤に匹敵するミネラルの供給は経口摂取では困難であるため、この時期を経ずして出生した早産児では、カルシウム・リンの絶対的不足が起こり、骨基質および石灰化の減少を伴う未熟児くる病 (あるいは未熟児代謝性骨疾患; metabolic bone disease in premature infant, MBD) を発症するが、この病態を正しく評価し、予防および治療の開始・継続・中止するための明確な指標がない。

2. 研究の目的

本研究では、新生児や早産児の血中 FGF23 の変動を測定することにより、正常新生児における FGF23 の動態と、未熟児くる病における FGF23 の関与を解明することを目的とする。具体的には、正常新生児における FGF23 と Klotho の正常範囲を決定し、骨代謝関連検査項目および母体血測定値と

の相関関係の解析を行うことにより、周産期におけるビタミン D 代謝において FGF23 が果たす役割を明らかにし、とくにこれまでだれも注目することのなかった胎盤機能と FGF23/ Klotho の関わりを解明することで、未熟児くる病の予防と治療法の開発につなげることを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取

大阪大学附属病院倫理委員会で承認を受けた計画書に基づき、同意を得た健常妊娠女性とその児(日齢 4 日目)、分娩時の臍帯血、および健康ボランティアより検体を採取した。

(2) α -Klotho および FGF23 の測定

検体より速やかに分離した血清中の可溶性 α -Klotho および FGF23 を、それぞれ ELISA キット(協和発酵キリン)およびサンドイッチ ELISA 法(カイノス社)によって測定した。また血清カルシウム・リン・PTH・25-OHD・アルブミン・クレアチニンについても測定を行った。

(3) 胎盤での α -Klotho の免疫染色

ヒト胎盤における α -Klotho の発現を確認するため、正常ヒト胎盤(妊娠 38 週)の免疫染色を行った。胎盤組織は 10%ホルマリンで固定したのちパラフィン中に包埋、4 μ m の切片を作製した。抗 α -Klotho 抗体

(sc-22218; Santa Cruz Biotechnology) をもちいて染色を行うとともに、ネガティブコントロールとして Normal goat IgG をもちいて染色を行った。

4. 研究成果

(1) 臍帯血と新生児・母体・成人からの血液における可溶性 α -Klotho 濃度の比較

正常新生児 23 名(在胎 37 - 42 週、うち双胎 2 組含む)とその母親 21 名を対象とし、母体血、新生児の臍帯血、日齢 4 で検査した。また、正常成人 25 名(27 歳 - 48 歳、男性 11 名、女性 14 名)でも検査を行い、比較検討

した。

血清カルシウム・リン・PTH・25-OHD・アルブミン・クレアチニン値は、母体・成人では正常範囲内であった。臍帯血中の血清カルシウムとリン値は有意に高く、PTH 値は低値であった (Table 1.)

Table 1. 各検体における生化学的検査値

| | Cord blood (n = 23) | Mother (n = 21) | Adult (n = 25) |
|------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Calcium (mg/dl) ^a | 10.5 ± 0.43 | 9.44 ± 0.34 ^b | 9.42 ± 0.29 ^b |
| Phosphate (mg/dl) | 4.93 ± 0.65 | 3.66 ± 0.59 ^b | 3.62 ± 0.50 ^b |
| Intact PTH (pg/ml) | 7.11 ± 5.22 | 26.5 ± 12.2 ^{b,f} | 36.4 ± 9.80 ^b |
| 25-OHD (ng/ml) | 8.95 ± 3.47 | 13.3 ± 6.45 ^{d,f} | 15.0 ± 4.43 ^c |
| Albumin (g/dl) | 3.53 ± 0.38 | 3.15 ± 0.42 ^{c,e} | 4.60 ± 0.27 ^b |
| Creatinine (mg/dl) | 0.49 ± 0.09 | 0.48 ± 0.08 ^e | 0.69 ± 0.10 ^b |

Data are expressed as mean ± sd and were compared among the cord blood group, mother group, and adult volunteer group using the ANOVA test.

次に血清の可溶性 α -Klotho 濃度は、臍帯血で $3,243 \pm 1,899$ pg/ml と、新生児(日齢4) 582 ± 90 pg/ml、母 768 ± 261 pg/ml、成人コントロール 684 ± 140 pg/ml に比較して非常に高値 ($P < 0.001$) であった (Fig. 1) 一方、FGF23 は、臍帯血 8.61 ± 6.48 pg/ml、新生児(日齢4) 28.4 ± 20.5 pg/ml、母 26.7 ± 15.1 pg/ml、成人コントロール 34.6 ± 7.69 pg/ml と、臍帯血で有意に低値 ($P < 0.0005$) であった (Fig. 2)

Fig.1 臍帯血・生後4日目の新生児・母体・成人健常者における血清中の可溶性 α -Klotho 濃度の比較

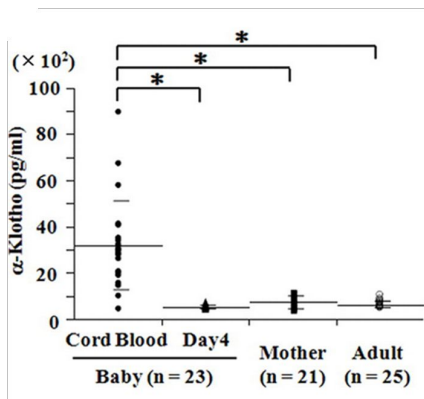
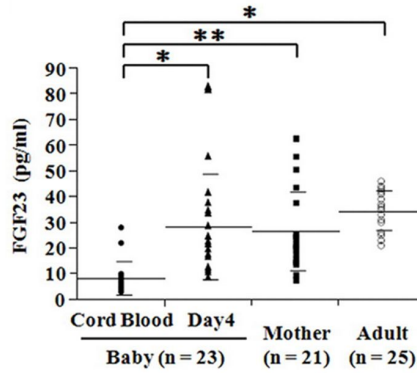
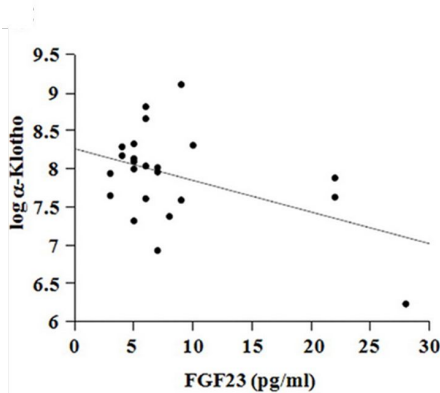


Fig.2 臍帯血・生後4日目の新生児・母体・成人健常者における血清中の FGF23 濃度の比較



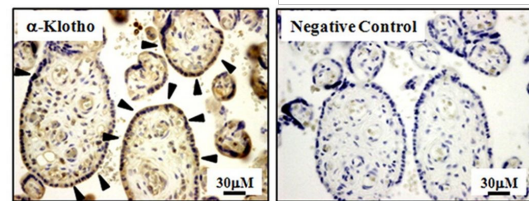
この臍帯血における可溶性 α -Klotho 値と FGF23 値のあいだの相関について解析を行った結果、両者に負の相関があることが分かった ($R^2 = 0.20$, $P < 0.05$; Fig. 3)

Fig.3 臍帯血における α -Klotho と FGF23 濃度の相関関係 (Pearson's correlation test)



正常新生児胎盤における α -Klotho の発現を確認するため免疫組織化学染色を行ったところ、合胞体細胞において α -Klotho が多く発現していることがわかった (Fig. 4)

Fig.4 成期産健常児の胎盤における α -Klotho 抗体をもちいた免疫染色



胎盤の免疫染色の結果から、臍帯血中の可溶性 α -Klotho は、胎盤由来である可能性がある。臍帯血において FGF23 値、Klotho 値が

特徴的な値を示したことは、胎児期に特有のリン恒常性維持機構が存在する可能性を示唆する。一方、未熟児くる病の発症と予防について検討するために、当院での早産児についての可溶性 Klotho 濃度を測定したところ、まだ症例数が少なく予備的データにすぎないものの、健常児に比較して低い値であることが分かった。また FGF23 濃度は逆に高値であり、成人および健常児に見られた可溶性 α -Klotho と FGF23 濃度とのあいだの負の相関が早産児でも確認された。この結果が胎児特異的なミネラル代謝の原因であるのか、それとも結果に過ぎないのかについては、今後さらにサンプル数を増やし明らかにしていく必要がある。また早産児で見られた α -Klotho 濃度の低下について、新生児の体重による影響があるのかを確かめるため、今後正期産・IUGR 児のデータを集めて比較検討したいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood.

*Yasuhisa Ohata, *Hitomi Arahori, Noriyuki Namba, Taichi Kitaoka, Haruhiko Hirai, Kazuko Wada, Masahiro Nakayama, Toshimi Michigami, Akihiro Imura, Yo-ichi Nabeshima, Yuji Yamazaki, and Keiichi Ozono (** these authors equally contributed to this work*)

J Clin Endocrinol Metab 96 (2011): E943-E947. (査読あり)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒堀 仁美 (ARAHORI HITOMI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 40379186