

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591227

研究課題名(和文) リンの感知と骨 腎機能的連関分子基盤の解析

研究課題名(英文) Molecular Mechanism for Phosphate Sensing and Bone-Kidney Functional Interaction

研究代表者

道上 敏美 (Michigami, Toshimi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・環境影響部門・部長

研究者番号：00301804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨から単離した骨芽細胞及び骨細胞を用いて、リン代謝における骨細胞の役割について解析した。Fgf23、Dmp1、Phex、Fam20cの発現はいずれも、骨芽細胞よりも骨細胞において高かった。PHEXを欠失するHypマウスの骨細胞においては、Fgf23に加えて、Dmp1、Fam20c、Pit1の発現が増加していた。活性型ビタミンDは骨芽細胞におけるFgf23発現を強く誘導した。24時間のリン刺激は骨細胞に直接作用し、Dmp1の発現を増加させたが、Fgf23には変化を及ぼさなかったことから、FGF23産生増加には慢性的なリンの負荷が必要であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies suggest the roles of osteocyte in phosphate metabolism, although the underlying mechanisms remain unclear. In the current study, the roles of osteocytes in phosphate metabolism were investigated using the osteoblasts and osteocytes isolated from mouse long bones. The expression of Fgf23, Dmp1, Phex and Fam20c was higher in osteocytes than osteoblasts. In the osteocytes isolated from Phex-deficient Hyp mice, the expressions of Dmp1, Fam20c and Pit1 as well as that of Fgf23 were up-regulated. 24-hour treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D markedly increased the expression of Fgf23. On the other hand, 24-hour treatment with high phosphate did not alter the expression of Fgf23, although it markedly increased the expression of Dmp1. These results suggest that chronic phosphate load is required for the increase of FGF23 production.

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：水、電解質

キーワード：リン代謝 骨細胞 FGF23 DMP1 PHEX ビタミンD

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)は骨で産生されるリン利尿因子であり、リン恒常性維持機構において中心的な役割を担う。一方、慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) においては、比較的早期から血中 FGF23 値の上昇を認める。近年、CKD 患者において血中 FGF23 値の上昇が心血管イベントや死亡のリスクを増加させることを示唆するいくつかの調査結果が報告され、注目されている。従って、FGF23 の産生制御機構を明らかにすることは CKD に伴うミネラル代謝異常 (CKD-MBD) の治療戦略を考える上で有用な情報を提供すると考えられる。しかしながら、生体が体内のリンの過不足を感知する機構や、リンの過剰が FGF23 の産生増加をもたらす分子機序については殆ど明らかになっていない。

また、FGF23 の主たる産生細胞である骨細胞は骨形成を担当する骨芽細胞が最終分化に至り、骨基質に埋め込まれた細胞である。これまでその機能については殆ど解析がなされていなかったが、近年、骨細胞が FGF23 以外にも PHEX や DMP1、FAM20C など複数の遺伝性低リン血症責任分子を発現しており、PHEX、DMP1、FAM20C の機能喪失は FGF23 の産生過剰を介して低リン血症、ビタミン D 活性化障害を引き起こすことが明らかとなった。しかしながら、これらの分子の発現制御機構や相互の機能的連関についても、これまで十分な解析はなされていない。

2. 研究の目的

FGF23 をはじめとするミネラル代謝関連分子群の骨細胞における発現制御機構及び機能的連関を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス長管骨からの初代骨芽細胞・骨細胞の単離

すべての動物実験は大阪府立母子保健総合医療センター研究所の動物実験委員会の承認のもとで行った。

骨細胞を対象とする研究が困難である理由の一つとして、適切なモデル細胞の欠如が挙げられる。そこで、本研究においては、マウス長管骨より単離した初代骨細胞及び骨芽細胞を用いて解析を行った。野生型マウス (C57/BL 6J) の他、*Phex* 遺伝子に欠失を有し、低リン血症及び高 FGF23 血症を呈する *Hyp* マウスを実験に用いた。

雄性 *Hyp* (*Phex*^{Hyp/Y}) あるいは野性型 (WT) 成獣マウスより無菌的に長管骨を摘出、微細化し、collagenase 処理による基質の消化と EGTA 処理による脱灰を反復し、各ステップで遊離する細胞を回収することにより、骨芽細胞及び骨細胞を分化度に応じて段階的に 9 つの Fraction として単離した。単離された細

胞の性状は骨芽細胞、骨細胞マーカー遺伝子の発現により確認した。

(2) 遺伝子発現解析

上記の方法で単離した新鮮な初代骨芽細胞、骨細胞より RNA を抽出し、TaqMan® システムによる real-time PCR を用いて種々のミネラル代謝関連遺伝子や III 型 Na⁺/Pi cotransporter の発現を検討した。また、E18.5 のマウス胎仔の骨より RNA を抽出し、遺伝子発現を検討した。

(3) 骨芽細胞 / 骨細胞の無機リン酸濃度変化及び活性型ビタミン D 刺激に対する応答性の解析

上述の方法で単離した初代骨芽細胞、骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋培養し、1 mM あるいは 10 mM の無機リン酸存在下で 24 時間培養した後に RNA を回収し、種々のミネラル代謝関連遺伝子の発現に対する細胞外無機リン酸濃度変化の影響を検討した。また、活性型ビタミン D [1,25(OH)₂D₃] に対する応答性についても同様にコラーゲンゲル包埋培養により検討した。

4. 研究成果

(1) マウス長管骨からの初代骨芽細胞・骨細胞単離法の確立

上述の方法により骨芽細胞、骨細胞を 9 つの分画として回収し、real-time PCR により骨芽細胞マーカーである *Keratocan* 及び骨細胞マーカーである *Sost* の発現を検討した。その結果、骨芽細胞 / 骨細胞が分化度に応じて段階的に回収されており、Fraction 3-5 は骨芽細胞、Fraction 6-9 は骨細胞の富む細胞集団であることが確認された。

(2) 野生型マウス長管骨から単離した初代骨芽細胞・骨細胞におけるミネラル代謝関連分子群の発現

上述の方法により野生型マウスの長管骨から単離した骨芽細胞、骨細胞の各分画において、遺伝性低リン血症の責任遺伝子である *Fgf23*、*Dmp1*、*Phex*、*Fam20c* や III 型 Na⁺/Pi cotransporter をコードする *Slc20a1* (*Pit1*) 及び *Slc20a2* (*Pit2*) の発現を検討した。*Fgf23*、*Dmp1*、*Phex*、*Fam20c* の発現はいずれも、骨芽細胞よりも骨細胞において高かった。また、III 型 Na⁺/Pi cotransporter については、骨芽細胞 / 骨細胞では *Slc20a1* (*Pit1*) の発現が優位であった。

(3) *Hyp* 骨芽細胞・骨細胞におけるミネラル代謝関連分子の発現変化

Hyp マウス長管骨から単離した細胞においても、*Fgf23*、*Dmp1*、*Fam20c* の発現はいずれも、骨芽細胞よりも骨細胞において高かった。また、*Hyp* 由来の細胞では、野生型マウス由来の細胞と比較して、*Fgf23* のみならず *Dmp1*

及び *Fam20c* の発現が著明に増加しており、骨芽細胞に相当する分画においても高く発現していた。また、*Hyp* 由来の細胞では、*Slc20a1 (Pit1)* の発現も野生型由来の細胞と比較して著明に増加していた。

Hyp 骨芽細胞・骨細胞における *Fgf23*, *Dmp1*, *Fam20c*, *Slc20a1 (Pit1)* の発現増加がいつごろから出現するのかを明らかにする目的で、E18.5 の胎仔の骨におけるこれらの遺伝子の発現を検討した。E18.5 の時点では血清リン値については *Hyp* と野生型との間で差を認めなかったが、*Fgf23*, *Dmp1*, *Fam20c* の発現はすでに *Hyp* で増加していた。一方、*Slc20a1 (Pit1)* の発現は E18.5 の時点では *Hyp* と野生型の間には差を認めなかったことから、出生後に血清リン値の低下に伴って代償的に増加することが推察された。

(4) 骨芽細胞・骨細胞に対する細胞外無機リン酸刺激の直接作用

野生型マウス及び *Hyp* マウス長管骨から上述の方法により単離した初代骨芽細胞、骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋し、1 mM (成人の血清中のリン濃度に近似)、あるいは 10 mM (高濃度) の無機リン酸存在下で 24 時間培養した後に RNA を抽出し、遺伝子発現を検討した。野生型、*Hyp* いずれの骨細胞においても、24 時間の高濃度無機リン酸刺激により *Dmp1* の発現の著明な増加を認め、骨細胞が細胞外無機リン酸濃度変化に応答性を示す事が明らかとなった。一方、*Fgf23* 及び *Fam20c* の発現は野生型、*Hyp* のいずれの骨芽細胞、骨細胞においても、24 時間のリン刺激では変化を示さなかった。このことから、リンの負荷による *Fgf23* の発現増加にはより時間を要することが推察された。野生型骨芽細胞、骨細胞における *Phex* の発現も、24 時間のリン刺激では変化を示さなかった。

マウス骨芽細胞系細胞株として広く使用されている MC3T3-E1 細胞に 10 mM のリン酸を添加したところ、*Dmp1* の発現が強く誘導されたことから、MC3T3-E1 を用いてリン刺激による *Dmp1* の発現制御について解析を進めた。MC3T3-E1 を 1-10 mM の Pi 存在下で 48 時間培養したところ、容量依存的に *Dmp1* の発現が誘導された。10 mM の Pi 刺激は、24 時間後から *Dmp1* の発現を 50 倍以上に強く誘導した。Pi 刺激による *Dmp1* の発現誘導は MEK 阻害剤である U0126 の添加により解除されたことから、MEK/ERK 経路の関与が推察された。さらに、MC3T3-E1 を I 型コラーゲンゲルに包埋し、1-10 mM Pi 存在下で 2 週間培養したところ、10 mM の Pi 存在下では *Dmp1* の上昇に続いて *Fgf23* や *Fam20c* の発現が増加した。*Dmp1* は成熟骨芽細胞及び骨細胞のマーカーであるところから、持続的な細胞外無機リン酸濃度の上昇は骨芽細胞から骨細胞への分化を促進することにより、*Fgf23* の発現増加をもたらすことが示唆される。

(5) 骨芽細胞・骨細胞に対する 1,25(OH)₂D₃ の直接作用

野生型マウス及び *Hyp* マウス長管骨より単離した骨芽細胞、骨細胞を I 型コラーゲンゲルに包埋し、10⁻⁸ M の 1,25(OH)₂D₃ 存在下、非存在下で 24 時間培養し、遺伝子発現を検討した。その結果、1,25(OH)₂D₃ は野生型骨芽細胞における *Fgf23* 発現を増加させたが、*Hyp* 骨芽細胞における *Fgf23* 発現は変化させなかった。野生型骨細胞における *Dmp1* の発現は、1,25(OH)₂D₃ 添加により著明に抑制された。*Vitamin D receptor (Vdr)* の発現については、野生型及び *Hyp* の骨芽細胞で 1,25(OH)₂D₃ 添加により有意に増加したが、骨細胞においては有意な増加を認めなかった。*Hyp* 骨芽細胞において 1,25(OH)₂D₃ 添加により *Fgf23* の発現が変化しなかったこと、*Vdr* の発現増加が野生型と比べて小さかったことから、*Phex* の機能が喪失している *Hyp* 細胞においては野生型と比較して 1,25(OH)₂D₃ に対する応答性が低下していることが推察された。

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 8 件)

Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic *Hyp* mice. *PLoS One*, 9:e93840, 2014. (査読有)

Doi: 10.1371/journal.pone.0093840.

Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of *Hyp* mice. *J Bone Miner Res*, 2014 Jan 28, E-pub. (査読有)

Doi: 10.1002/jbmr.2186.

Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm-dependent manner. *J Biol Chem*, 289:1457-1466, 2014. (査読有)

Doi: 10.1074/jbc.M113.500850.

Michigami T. Extracellular phosphate as a signaling molecule. *Contrib Nephrol*, 180:14-24, 2013. (査読無)

Doi: 10.1159/000346776.

Michigami T. Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 70:4213-4221, 2013. (査読有)

Doi: 10.1007/s00018-013-1346-9.

Matsui I, Hamano T, Mikami S, Inoue K, Shimomura A, Nagasawa Y, Michigami T, Ohnishi T, Fujii N, Nakano C, Kusunoki Y, Kitamura H, Iwatani H, Takabatake Y, Kaimori JY, Matsuba G, Okoshi K, Kimura-Suda H, Tsubakihara Y, Rakugi H, Isaka Y. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304: F751-760, 2013. (査読有)

Doi: 10.1152/ajprenal.00329.2012.

Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T. FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble a-Klotho both *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 288: 2414-2427, 2013. (査読有)

Doi: 10.1074/jbc.M112.410043.

Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, Ozono K, Michigami T. Vinculin functions as a regulator of chondrogenesis. *J Biol Chem*, 287:15760-15775, 2012. (査読有)

Doi: 10.1074/jbc.M111.308072.

[学会発表](計 17 件)

Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Ozono K, Michigami T. Fetal stage-specific mineral metabolism in *Hyp* mice is associated with effects of FGF23 on placenta. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.

Nishino J, Miyagawa K, Kawai M, Yamazaki M, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Signaling of extracellular inorganic phosphate induces the expression of *Dmp1* in osteoblast/osteocytes lineage cells via Na^+/Pi Co-transporter and MEK/ERK pathway. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.

Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. 2013. Sympathetic activation induces skeletal *Fgf23* expression in a circadian rhythm dependent manner. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, 2013.10.4-7.

Yamazaki M, Miyagawa K, Ohata Y, Kawai M, Ozono K, Michigami T. Osteoclastic bone resorption might be involved in the secretion of FGF23 into circulation. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, 2012.10.12-15.

Kawai M, Kinoshita S, Ohata Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ozono K, Michigami T. FGF23 suppresses chondrocyte proliferation and maturation in the presence of soluble a-Klotho both *in vitro* and *in vivo*. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Minneapolis, 2012.10.12-15.

道上敏美: 骨細胞と骨外臓器との関連. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

小林郁江, 今西康雄, 永田友貴, 山形雅代, 蔵城雅文, 石村栄治, 道上敏美: 骨軟化症を合併する抗ミトコンドリア抗体(M2)陽性 Fanconi 症候群の近位尿細管では NaPi-2c と共にメガリンの発現も低下する. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

山崎美和, 宮川和晃, 大幡泰久, 川井正信, 大園恵一, 道上敏美: FGF23の血中分泌過程における破骨細胞性骨吸収の関与の可能性. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

川井正信, 木下さおり, 大幡泰久, 宮川和晃, 山崎美和, 大園恵一, 道上敏美: FGF23は可溶性klotho存在下で軟骨細胞の増殖・成熟を抑制する. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.19-21.

川井正信, 木下さおり, 大幡泰久, 大園恵一, 道上敏美: FGF23は軟骨細胞増殖をリン代謝非依存性に抑制し, X連鎖性低リン性くる病に伴う低身長の一因となりうる. 第46回日本小児内分泌学会学術集会, 大阪, 2012.9.27-29.

Ohata Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Okada T, Kawai M, Ozono K, Michigami T. Analysis of the roles of FGF23 in fetus-specific mineral metabolism using *Hyp* mice. IOF Regionals 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, Gold Coast, 2011.9.4-8.

Miyagawa K, Ozono K, Tachikawa K, Kawai M, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Michigami T. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ and PTH up-regulate *Rankl* while down-regulate *Phex* and *dmp1* in primary osteocytes isolated from mouse bones. 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. San Diego, 2011.9.16-20.

道上敏美. リン代謝調節細胞としての骨細胞の役割. 第29回日本骨代謝学会学術集会. 2011.7.28-30: 大阪.

大幡泰久,三浦弘司,山崎美和,岡田知子,
川井正信,大園恵一,道上敏美.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.2011.7.28-30:
大阪.

宮川和晃,大園恵一,大幡泰久,川井正信,
立川加奈子,高垣裕子,古郷幹彦,道上敏
美. *Hyp*マウスの骨においては胎児期より
既に*Fgf23*及び*Dmp1*の発現が増加している.
第29回日本骨代謝学会学術集会.
2011.7.28-30:大阪.

大幡泰久,宮川和晃,山崎美和,岡田知子,
川井正信,平井治彦,大園恵一,道上敏美.
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.
2011.10.6-8:埼玉.

大幡泰久,道上敏美,大園恵一.胎児特異
的リン代謝:リン経胎盤輸送からみた新知
見.第56回日本未熟児新生児学会学術集
会.2011.11.13-15:東京.

6. 研究組織

(1)研究代表者

道上 敏美 (Michigami Toshimi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
府立母子保健総合医療センター研究所・環
境影響部門・部長

研究者番号:00301804