

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592696

研究課題名(和文) 血中カルシウムによる Fgf23 遺伝子発現の調節と Wnt / カテニンシグナルの関係

研究課題名(英文) Serum calcium upregulates Fgf23 expression by Dickopf-1-mediated inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in bone

研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA, Yoshihiro)

武庫川女子大学・健康・スポーツ科学部・博士研究員

研究者番号：70431963

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)：Fgf23は骨細胞から分泌されるリン排泄促進因子である。代表的な遺伝性リン代謝疾患で血清Fgf23濃度が上昇し低リン血症となることから、Fgf23はリン代謝において中心的な役割を果たすと考えられる。しかし、Fgf23発現調節機構は、不明な点が多い。本研究の結果から、血清カルシウムは、分泌型抑制因子Dickopf-1を介して骨組織におけるWnt/beta-cateninシグナルを抑制することにより、Fgf23発現を調節することが明らかとなった。これらの知見は、抗Dickopf-1抗体を用いた新たなリン代謝性疾患の治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Fgf23 is a phosphaturic factor which is secreted from osteocytes in bone. Fgf23 plays a central role for phosphate metabolism as demonstrated by elevated serum levels of Fgf23 in hypophosphatemic diseases. Post-transcriptional modification of Fgf23 is extensively studied, however mechanisms of transcriptional regulation of Fgf23 are not fully understood. In this study, we demonstrated that serum calcium regulates Fgf23 expression by Dickopf-1-mediated inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in bone. This result will provide the possibilities of a new therapy for hypophosphatemic diseases by using anti-Dickopf-1 antibody.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Fgf23 Wnt カルシウム

1. 研究開始当初の背景

Fgf23 は、骨細胞から分泌され、腎臓を標的とするホルモンとして作用する。すなわち、Fgf23 は近位尿管でのリン再吸収を抑制し、血中リン濃度を低下させる。代表的な低リン血症性遺伝性リン代謝疾患における血清 Fgf23 濃度の上昇、Fgf23 遺伝子の活性型変異による低リン血症および同遺伝子の機能欠失型変異による高リン血症の誘発などから、Fgf23 は生体のリン代謝において中心的な役割を持つと考えられる。しかし、Fgf23 遺伝子の転写調節機構に関して不明な点が多い。ビタミン D は、強力な Fgf23 発現誘導因子として知られ、ビタミン D 受容体ノックアウトマウスでは、血清 Fgf23 濃度低下と骨における Fgf23 遺伝子発現低下が認められる。これらの Fgf23 発現の異常は、同ノックアウトマウスに対する高リン食摂取では回復されないが、高カルシウム食摂取により回復されることが報告されている。このことから、血清カルシウムによるビタミン D シグナル経路を介さない Fgf23 遺伝子発現調節機構の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、血清カルシウムによる新たな Fgf23 遺伝子発現調節機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血清カルシウム濃度変化による骨組織での遺伝子発現の変化に関して

4 週齢の C57BL/6 雄マウスにコントロール食および高カルシウム食を摂取させ、1、3、4、および 8 週間後に脛骨を採取し、骨髄を流し出した後、骨組織を粉碎し、RNA を抽出した。これらの RNA を用いて、real-time PCR 法により、種々の遺伝子発現を調べた。

(2) Wnt シグナルの Fgf23 発現に対する作用に関して

内在性に Fgf23 を発現する骨芽細胞株 UMR-106 細胞に Wnt3a タンパク添加や Wnt シグナル修飾因子 (BIO および XAV939、共に Sigma 社) 処理を行い、real-time PCR 法により Fgf23 発現を調べた。

(3) 血清カルシウム濃度上昇による Dickopf-1(Dkk-1)発現に関して

コントロール食および高カルシウム食摂取後 4 週間のマウス脛骨における Dickopf-1 発現を抗 Dkk-1 抗体 (abcam 社, ab109416, 1:1500) を用いた免疫組織化学法により比較した。

(4) 血清カルシウム濃度上昇による血清 Dickopf-1 濃度の変化に関して

コントロール食および高カルシウム食摂取後 4 週間のマウスにおける血清 Dickopf-1 濃度を Quantikine mouse Dkk-1 Elisa

kit (R&D システムズ社) にて測定した。

4. 研究成果

最初に、血清カルシウム濃度変化に伴う脛骨における Fgf23 遺伝子発現の変化を調べた。摂取後 1 週間では、高カルシウム食群とコントロール食群で Fgf23 発現に差は認められなかったが、摂取後 4 週間以降は、コントロール食群と比較して高カルシウム食群では Fgf23 発現が有意に上昇していた (図 1)。またコントロール食群と比較した Fgf23 発現の差は摂取後 8 週間で最も大きく、約 40 倍の発現上昇がみられた。次に、血清カルシウム濃度上昇による Fgf23 発現上昇のメカニズムとして Wnt/ $\beta$ カテニン (Wnt/bcat) シグナルに注目した。高カルシウム摂取後 4 週間のマウス脛骨では、Wnt/bcat シグナルの標的遺伝子である Osteoprotegerin (OPG) や Axin2 発現が減少していた (図 2)。以上の結果から、高カルシウム食摂取マウスでは、Wnt/bcat シグナル活性の減少に伴い Fgf23 発現が上昇することが明らかとなった。

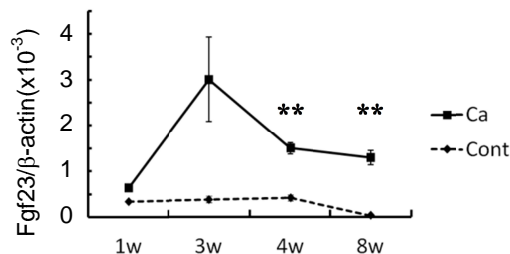


図 1 コントロール食および高カルシウム食摂取マウス脛骨における Fgf23 発現の経時的変化 (Cont: コントロール食, Ca: 高カルシウム食, \*\*P<0.01 by Student's t-test, n=3)

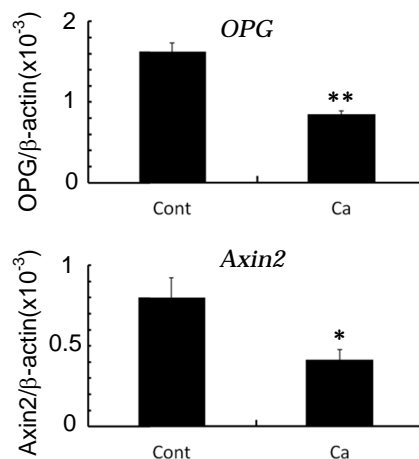


図 2 コントロール食および高カルシウム食摂取マウス脛骨における OPG および Axin2 発現 (\*P<0.05, \*\*P<0.01, n=3)

次に Wnt/bcat シグナルの Fgf23 発現に対する作用を調べるために、UMR-106 細胞を同シグナル伝達を修飾する薬剤で処理し、Fgf23 および OPG 発現を調べた。Wnt3a タン

パクモしくはβカテニンの分解阻害剤 BIO(1μM)添加により Wnt/bcat シグナルを亢進させると、OPG 発現上昇と共に Fgf23 発現は抑制された(図 3A)。逆にβカテニン分解促進剤 XAV939(1μM)による Wnt/bcat シグナル抑制により、Fgf23 発現が上昇した(図 3B)。これらの結果から、Wnt/bcat シグナルは、Fgf23 発現を抑制することが明らかとなった。

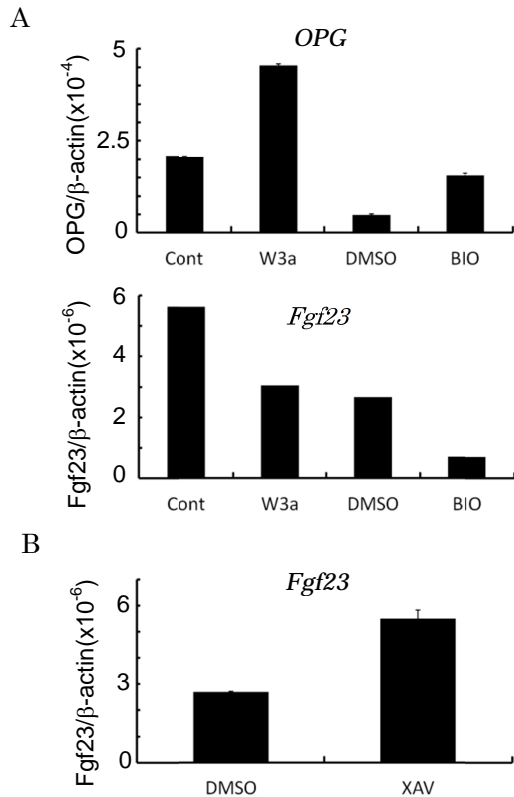


図3 UMR-106細胞におけるWnt/bcatシグナルのFgf23発現に対する作用 (A) Wnt/bcatシグナル亢進によるFgf23発現の変化。(B) Wnt/bcatシグナル阻害によるFgf23発現の変化。Cont: コントロールタンパク質、W3a: Wnt3aタンパク質、XAV: XAV939、DMSO: BIOおよびXAV939に対するコントロール。

さらに血清カルシウム濃度上昇によるWnt/bcatシグナルの抑制機構を明らかにするために、幾つかの同シグナル阻害因子の発現を調べた。その中で、分泌性阻害因子であるDickkopf-1(Dkk-1)発現が、高カルシウム食摂取後8週間の脛骨において上昇することを見出した(図4A)。また、コントロール食および高カルシウム食摂取後4週間のマウス脛骨におけるDkk-1タンパク質の局在を免疫組織化学法により調べた。その結果、コントロール食摂取マウス脛骨では、骨髄細胞と骨芽細胞に強くDkk-1発現が認められたが、Dkk-1陽性の骨細胞はわずかであった(図4B下段矢印)。一方、高カルシウム食摂取マウス脛骨では、骨髄細胞と骨芽細胞に加えて骨細胞でもDkk-1発現が強く認められた(図4B下段矢頭)。以上の結果から、血清カルシウム

の上昇に伴い骨細胞でのDkk-1発現が上昇し、骨組織におけるWnt/bcatシグナルが抑制されることが示唆された。

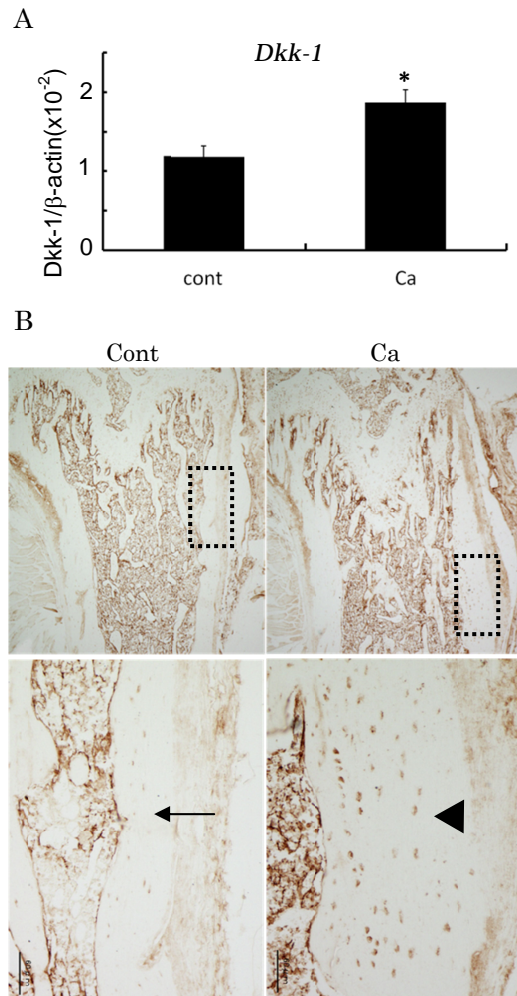


図4 コントロール食および高カルシウム食摂取マウスにおけるDickkopf-1発現。A: 脛骨におけるDkk-1発現の変化。(\* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) B: 脛骨におけるDkk-1タンパク質の免疫組織化学的局在。下段: 上段点線部の拡大像。

最後に、血清カルシウム濃度上昇と血清Dkk-1濃度の関係をELISA法により調べた。高カルシウム食摂取後4週間のマウスでは、血清Dkk-1濃度がコントロールと比較して有意に上昇していた(図5)。

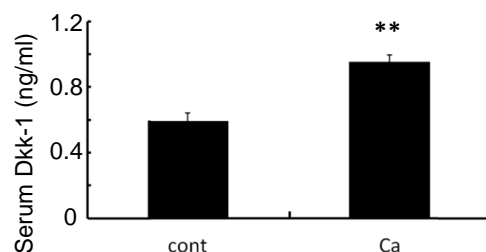


図 5 コントロール食および高カルシウム食摂取マウスにおける血清 Dkk-1 濃度 (\*\*P<0.01、n=3)

結論として、本研究の結果から、血清カルシウムは、Dkk-1 発現誘導を介して Wnt/bcat シグナルを負に制御することにより、Fgf23 遺伝子発現を上昇させることが示唆された。これまでに血清カルシウムと Wnt シグナルおよび Dkk-1 に着目した報告は無く、本研究で得られた知見は、新たな Fgf23 発現調節機構であると考えられる。また、最近ミエローマなどの腫瘍において Dkk-1 発現上昇が報告されており、これらの腫瘍に対する抗 Dkk-1 抗体投与による治療法がマウスで試されている。このことから、本研究の結果は、抗 Dkk-1 抗体を用いた新たなリン代謝疾患治療法開発の可能性を示唆すると考えられる。

#### 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 5 件)

Matsusita Y, Sakamoto K, Tamamura Y, Shibata Y, Minamizato T, Kihara T, Ito M, Katsube K, Hiraoka S, Koseki H, Harada K, Yamaguchi A. Ccn3 protein participates in bone regeneration as an inhibitory factor. J. Biol. Chem. 288(27), 19973-19985, 2013, 査読有り

Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the Mesp2-null mouse: a model of spondylocostal disostosis and spondylothoracic dysostosis. Bone, 53(1), 248-258, 2013, 査読有り

Watanabe T, Tamamura Y, Hoshino A, Makino Y, Kamioka H, Amagasa T, Yamaguchi A, Iimura T. Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. Bone, 51(3), 447-458, 2012, 査読有り

Tamamura Y, Yamaguchi A. Bone and tooth in calcium and phosphate metabolism. Clin. Calcium, 22(1), 11-17, 2012, 査読無し

Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. J. Bone Miner. Metab., 29(6), 662-670, 2011, 査読有り

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA, Yoshihiro)  
武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・博士研究員  
研究者番号：70431963

#### (2) 研究分担者

#### (3) 連携研究者

山口 朗 (YAMAGUCHI, Akira)  
東京医科歯科大学・口腔病理学講座・教授  
研究者番号：00142430

飯村 忠浩 (IIMURA, Tadahiro)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター  
バイオイメージング部門・准教授  
研究者番号：20282775

坂本 啓 (SAKAMOTO, Kei)  
東京医科歯科大学・口腔病理学講座・助教  
研究者番号：00302886