

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592701

研究課題名(和文)骨・歯科疾患における多臓器連関「FGF23-可溶性型Klothoシステム」の研究

研究課題名(英文)Study of the FGF23-soluble Klotho axis in bone and dental diseases.

研究代表者

吉子 裕二 (YOSHIKO, YUJI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：20263709

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)：私たちは、リン利尿因子FGF23が骨形成を抑制することを見出したが、骨にはFGF23共受容体の膜タンパクKlotho (mKL)が発現していない。一方、私たちは、mKL由来の可溶性Klotho (sKL)がFGF23の作用を補完することを見出した。FGF23は骨に発現するFGFファミリーと一線を画し、活性型ビタミンD3の転写制御を受け、成熟骨芽細胞・骨細胞でのみ一過性のERK1/2のリン酸化を促した。このシグナルは、Phexの発現を抑制し、その基質となるASARMペプチドの蓄積を促した。ASARMペプチドは正常マウスの骨の石灰化を抑制した。以上より、FGF23の骨形成調節機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found that FGF23, a phosphaturic factor, inhibits bone formation even though membrane Klotho (mKL), a coreceptor for FGF23 is not expressed in bone. It is known that mKL is cleaved and circulates as soluble KL (sKL). We confirmed that sKL supports the FGF23 effects on bone. Among FGF family members expressed in bone, FGF23, transcriptionally activated by 1,25(OH)2D3, stimulated transient activation of ERK1/2 only in mature osteoblasts/osteocytes. This signaling downregulated Phex, with the resultant increase in the accumulation of ASARM peptide in bone. Administration of ASARM peptide decreased bone mineralization without affecting osteoblast proliferation and differentiation. These data describe a novel mechanism by which FGF23 regulates bone formation.

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 石灰化 Phex ASARM 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

リン代謝の破綻は歯・骨形成の障害や異所性の石灰化の原因となることから、その調節機構が注目されてきた。とりわけ、2000年の線維芽細胞増殖因子(FGF)23の発見(Nature Genet. 26, 345)は、様々な局面でリン代謝調節の重要性を認識するブレークスルーとなった。慢性腎臓病に伴う骨・リン代謝異常や骨・血管相関(骨量と血管疾患の逆相関)のような病態解明が進展する中、今日では、骨、腎臓、血管は多臓器連関により統制されているのは疑う余地もない。これら病態は骨・歯の石灰化障害を招き、多くの場合FGF23が直接または間接的に関与していると推察される。このように、多臓器連関の側面から見た骨、歯の石灰化機構とその破綻は歯科医学においても十分に配慮すべき問題である。

2. 研究の目的

FFGF23は骨で産生された後、血流を介して腎臓に作用し、低リン血症、引いては骨・歯の石灰化障害をもたらす(Nature, 444, 770, 2006)。これに対し、私たちは、骨(歯)の微小環境においてFGF23が骨芽細胞に直接作用する新しい骨形成調節経路を見出した(J Bone Miner Res, 23, 939, 2008)。しかし、骨微小環境における骨形成の調節は、FGF2をはじめとする古典的経路も存在する。これらのFGFに対し、FGF23が選択的に石灰化を調節する分子基盤を明らかにすることは、FGFファミリーを臨床応用する上で、あるいは骨・腎臓連関とそれに関わる病態を明らかにする上で重要である。私たちは、FGF23の骨形成調節作用に腎臓由来の分泌型(可溶型)Klotho(sKL)の存在が不可欠であることを発見した。そこで、骨・腎臓連関の新しい基軸としてFGF23-sKLが他のFGFファミリーメンバーと一線を画し、どのように骨形成を調節するか、解析することとした。

3. 研究の方法

(1) FGFシグナルの調節系

- 1) FGF依存性のERKシグナルの制御系の作製：ドミナントネガティブRas/Rafを導入した細胞の作製とラット骨芽細胞におけるマイクロアレイ
- 2) マイクロアレイ、qRT-PCRによるラット骨芽細胞を用いたFGF23シグナ

ルの標的分子の探索とFGF2との比較

- 3) マウス骨芽細胞株、ラット骨芽細胞におけるFGF23転写調節：プロモーターアッセイ
- 4) FGF23遺伝子のCpGアイランドのメチル化/脱メチル化応答

(2) FGF23-sKLの標的分子PhexとFGF23の作用

- 1) 可溶化型Phex(sPhex)の組換え体作製
- 2) FGF2とFGF23の比較
- 3) Phex分子の標的分子の探索
- 4) ASARMペプチドの合成
- 5) ASARMペプチドの生物活性
 - (A) 培養モデル
 - (B) マウスモデル

4. 研究成果

- (1) FGF依存性のERKシグナルの多様性：FGF依存性のERKシグナルの活性化は一過性と持続的なパターンがあり、前者はFGF23-sKL、後者はFGF2が該当した。

ERKシグナルはSpryによって負に制御された。

一過性のERKシグナルは、前駆細胞の増殖・分化には影響しないが、骨の石灰化を抑制した。

持続的なERKの活性化は前駆細胞の増殖を促進し、骨芽細胞分化ならびに骨の石灰化を抑制した。

FGF2は前駆細胞で分泌され、骨芽細胞ではほとんど検出されなかった。

持続的なERKの活性化は多数の遺伝子の増減を伴ったが、一過性の活性化は骨芽細胞のみにおいて少数の遺伝子に変動を認めた。

一過性のERK活性化はX連鎖性低リン血症性くる病の原因遺伝子Phexの発現を抑制した

FGFファミリーメンバーの発現において、活性型ビタミンD₃に対する応答が見られたのはFFGF23のみであった。

活性型ビタミンD₃/ビタミンD受容体複合体はFGF23プロモーター領域Vitamin D応答配列に結合し、FGF23の転写活性を促進した。

前駆細胞と骨芽細胞の間でFGF23遺伝子におけるCpGアイランドのメチル化に差は認められなかった。

以上の結果より、FGF23-sKLは以下のような機構を介して骨形成を制御すると推察される。

・FGF23は活性型ビタミンD₃の刺激により、骨芽細胞(骨細胞)において発現する。

・FGF23は、腎臓からのsKLと協働し、骨芽細胞において一過性にERKの活性化

をもたらし、Phex の発現を抑制する。
 ・骨芽細胞においては、活性型ビタミン D₃ は FGF ファミリーメンバーの中で FGF23 の転写を促進し、FGF23 を介して Phex の発現を制御する。

(2) FGF23-sKL/Phex の標的分子 ASARM と石灰化抑制機構

Phex(エンドペプチダーゼ活性を持つ) の基質となる候補分子のうち、

(a) 培養骨芽細胞において直接石灰化を抑制すること、

(b) 同モデルにおいて sPhex の添加によって活性が消失するものを探索した結果、ASARM ペプチドを特定した。

ASARM ペプチドの生物活性

(a) ASARM ペプチドを純度 95% 以上で合成した。

(骨芽細胞モデル、血管平滑筋細胞モデルにおいて、石灰化の抑制作用を確認した。

ASARM ペプチドの活性中心

(a) セリン残基のリン酸化

(b) Phex 切断領域

(c) 鎖長

について特定した。

ASARM ペプチドを認識するポリクローナル抗体を作製した。

免疫染色により、ASARM ペプチドは Klotho 欠損マウスの骨(とりわけ、骨芽細胞、骨細胞と基質の一部) に多く分布した。

以上の結果より、FGF23-sKL/Phex の標的として、

・ASARM ペプチドが有力な候補と推定された。

・ASARM ペプチドはリン酸化によって生物活性を獲得し、その作用は主として骨、骨外組織の基質石灰化を抑制することと推察された。

(3) 正常マウスにおける ASARM ペプチドの効果

ASARM ペプチド(活性型: pASARM、不活性型 ASARM) を浸透圧ポンプを用いて 6 週齢 C57BL/6 マウス() に 2 週間投与した。

体重、血中リン、カルシウム濃度は pASARM、ASARM 投与群間で差はみられなかった。

血中 I 型コラーゲン架橋 N-プロペプチド、骨型アルカリフォスファターゼに群間に差は認められなかった。

骨組織標本

(a) 成長板、軟骨細胞に特筆すべき組織変化は認められなかった。

(b) 骨芽細胞の組織像、骨芽細胞数に特筆すべき差は見られなかった。

(c) 破骨細胞の数は pASARM 投与群で有意な増加を認めた。

μCT による骨形態計測において、群間に以下のような有意差を認めた。

*, P<0.05; **, P<0.01

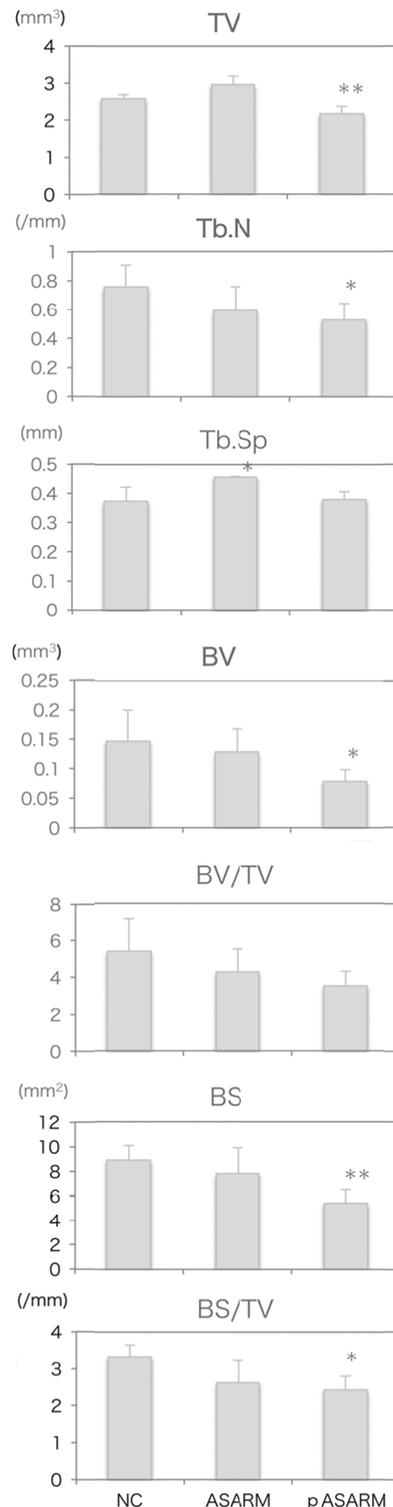
TV, 組織量

Tb.N, 骨梁数

Tb.Sp, 骨梁間の距離

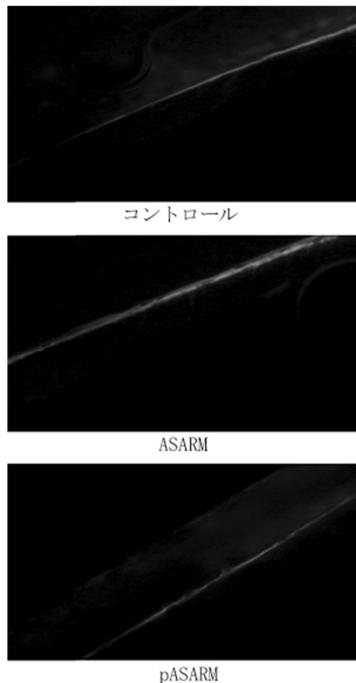
BV, 骨量

BS, 骨表面積



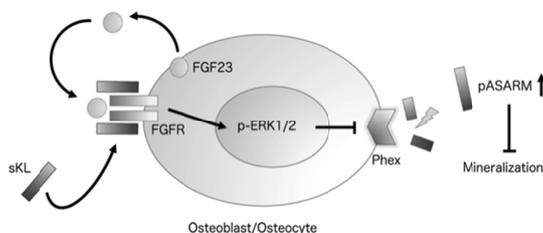
カルセイン標識非脱灰標本
 カルセイン単回標識による石灰化の有無を群間比較したところ、下図のよ

うに pASARM 投与群で石灰化の減少を認めた。



以上の結果より、pASARM は正常マウスにおいて、
 ・血中リン、カルシウム濃度に影響しない。
 ・骨芽細胞の増殖・分化に影響しないが、石灰化の過程を抑制する、
 ・破骨細胞への直接または間接的に影響する可能性がある、と推察された。

これらの結果を総合すると、本件の研究結果として、FGF23-sKL による骨形成は以下の図に示すような調節機構が存在することを支持する。この機構は FGF ファミリーメンバーにおいて FGF23 に特徴的であり、本件により特定した分子は石灰化を標的とした治療、診断のツールとして今後の更なる研究が望まれる。



FGFR, FGF 受容体
 Osteoblast/Osteocyte, 骨芽細胞/骨細胞
 Mineralization, 石灰化

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 4 件)

- (1) Moriwaki Sawako, Suzuki Keiko, Muramatsu Masashi, Nomura Atsushi, Inoue Fuihide, Into Takeshi, Yoshiko Yuji, Niida Shumpei, Delphinidin, one of the major anthocyanidins, prevents bone loss through the inhibition of excessive osteoclastogenesis in osteoporosis model mice, PLoS One, 査読有, 2014, 9, e97177, DOI, 10.1371/journal.pone.0097177.
- (2) 竹井悠一郎, 吉子裕二, 骨・血管相関と microRNA, 臨床化学, 査読無し, 2114, 43, pp106-111.
- (3) Minamizaki Tomoko, Yoshiko Yuji, Yoshioka Hirotaka, Kozai Katsuyuki, Aubin Jane E, Maeda Norihiko, The EP4-ERK-dependent pathway stimulates osteo-adipogenic progenitor proliferation resulting in increased adipogenesis in fetal rat calvaria cell cultures, Prostaglandins Other Lipid Mediat, 査読有, 97, 2012, pp97-102, DOI, 10.1016/j.prostaglandins.2012.01.001.
- (4) Yoshioka Hirotaka, Yoshiko Yuji, Minamizaki Tomoko, Koma Yoshio, Nobukiyo Asako, Sotomoru Yusuke, Maeda Norihiko, Incisor enamel formation is impaired in transgenic rats overexpressing the type III NaPi transporter Slc20a1, Calcified Tissue Int, 査読有, 89, 2011, pp192-202, DOI, 10.1007/s00223-011-9506-0.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Sakurai Kaoru, Minamizaki Tomoko, Fujino Yoko, Takei Yuichiro, Yoshioka Hirotaka, Okada Mitsugu, Kozai Katsuyuki, Yoshiko Yuji, MEPE-ASARM, a substrate of Phex, decreases bone volume independently of serum phosphate levels, The American Society for Bone Mineral Research 2014 Annual Meeting, 12-14 Sep 2014, Houston, USA.
- (2) 櫻井薫, 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 香西克之, 吉子裕二, Phex の基質 MEPE-ASARM は血中リン濃度非依存的に骨量を減少させる, 2014 年 7 月 24~26 日, 大阪
- (3) Takei Yuichiro, Yamaguchi Daisuke, Yoshiko Yuji, A novel therapeutic approach to abdominal aortic aneurysm through the inhibition of osteoclastogenesis, 5th Hiroshima

- Conference on Education and Science in Dentistry, 12-13 Oct 2013, Hiroshima.
- (4) Fujino Yoko, Minamizaki Tomoko, Sakurai Kaoru, Irie Yasumasa, Yoshioka Hirotaka, Takei Yuichiro, Kozai Katsuyuki, Okada Mitsugu, Yoshiko Yuji, Imaging mass spectrometry-based molecular histology of bone shows the implication of MEPE-ASARM for the Klotho-deficient phenotype, 4-7 Oct 2013, Baltimore, USA.
- (5) Minamizaki Tomoko, Konishi Yukiko, Sakurai Kaoru, Yoshioka Hirotaka, Kozai Katsuyuki, Yoshiko Yuji, 28 May-1 Jun 2013, 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe.
- (6) Minamizaki Tomoko, Konishi Yukiko, Yoshioka Hirotaka, Kozai Katsuyuki, Yoshiko Yuji, Transient but not constitutive activation of ERK is necessary for the unique actions of FGF23 in bone, The American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting, 12-15 Oct 2012, Minneapolis, USA.
- (7) Konishi Yukiko, Yoshiko Yuji, Minamizaki Tomoko, Yoshioka Hirotaka, Kozai Katsuyuki, Aubin Jane E, Maeda Norihiko, MEPE-derived phosphorylated ASARM is involved in FGF23/soluble Klotho-dependent hypomineralization, The American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting, 16-19 Sep 2011, San Diego, USA.
- (8) 小西有希子, 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦, MEPE由来リン酸化 ASARM と Phex は FGF23/可溶性 Klotho による石灰化の負の調節系と関連する, 第 29 回日本骨代謝学会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪
- (9) 南崎朋子, 吉子裕二, 小西有希子, 吉岡広陽, 香西克之, 前田憲彦, FGF シグナルによる石灰化調節: FGF23-Phex 経路を中心として, 第 29 回日本骨代謝学会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: リン酸化ペプチド、硬組織および/または異所性石灰化抑制剤, 抗体ならびに硬組織および/または異所性石灰化促進剤

発明者: 吉子裕二, 南崎朋子, 吉岡広陽, 平田伊佐雄, 香西克之, 前田憲彦, 渡邊和晃, 清藤 勉

権利者: 広島大学, (株)ラフィーネインターナショナル, (株)免疫生物研究所

種類: 特許

番号: 特願 2011-150487

出願年月日: 2011 年 7 月 6 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉子 裕二 (YOSHIKO YUJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究
院・教授

研究者番号: 20263709

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

鈴木 敦詞 (ATSUSHI SUZUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号: 90340265

内田 宗志 (UCHIDA SOSHI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60330990