

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790832

研究課題名（和文） 心腎連関におけるNotchシグナル及びFGF23の役割の解明

研究課題名（英文） The role of Notch signals and FGF23 in cardio-renal interaction.

研究代表者

中原 健裕（NAKAHARA TAKEHIRO）

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：00599540

研究成果の概要（和文）：我々は心腎連関における線維芽細胞増殖因子23（FGF23）の役割を解明するため、種々の基礎的検討、臨床的検討を行った。その結果、FGF23がオステオプロテジェリンを誘導し、結果として血管の石灰化を抑制することを示した。以上の結果から、慢性腎臓病の比較的早期から上昇するFGF23は血管に対して保護的に作用している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In order to evaluate the effect of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) in cardio-renal interaction, we examined several basic analysis. As a result we identified that FGF23 induced Osteoprotegerin (OPG), decoy of RANKL. OPG prevent RANK-RANKL interaction and protect vascular calcification. In conclusion, FGF23, increased from early stage of CKD, may protect vascular calcification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

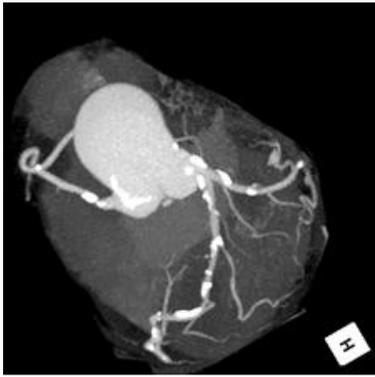
キーワード：循環器・腎臓病、FGF23、血管石灰化

1. 研究開始当初の背景

蛋白尿やアルブミン尿を呈する患者では、CVD（Cardio Vasulcular Disease：心血管病）の発症頻度が高い。2002年米国腎臓病基金からガイドラインが発表され、CKD（chronic kidney disease：慢性腎臓病）が、CVDの危険因子であることが改めて大きくクローズアップされ、cardio-renal association（心腎連関）が広く認識されるに至った。その後、本邦の報告も含め世界で情報の蓄積がなされ、いまやCKDは糖尿病と同等もしくはそれ以上の冠危険因子とみなされる情勢にある。本邦におけるCKDの頻度は10.4%とされ、CKDの危険因子の研究が進められている。しかし、その心腎連関の機序に関しては、多くが未解決の課題として残されている。

CKD患者、特に透析患者では、血中FGF23濃度が非常に高値であることが知られている。FGF23は、常染色体優性低リン血症性くる病や腫瘍性骨軟化症の原因遺伝子として同定されたリン調節ホルモンである（文献2、3）。主な生理的産生部位は骨細胞と考えられており、産生されたFGF23は、腎近位尿細管でNAT2a/2c遺伝子の発現を低下させてリン利尿をもたらし、また1 α 水酸化酵素活性を低下させて1 \cdot 、25(OH)2VitD3産生を抑制し、結果的に腸管からのリン吸収を抑制することにより血液中リン濃度を低下させることが明らかにされている。しかし、腎臓以外の臓器における、FGF23の役割はまだ不明である。

図1 冠動脈石灰化



血清 Ca、P、副甲状腺ホルモン (PTH) 値は FGF23 の産生を促進するため、FGF23 と CVD の相関はこれらの因子を介して

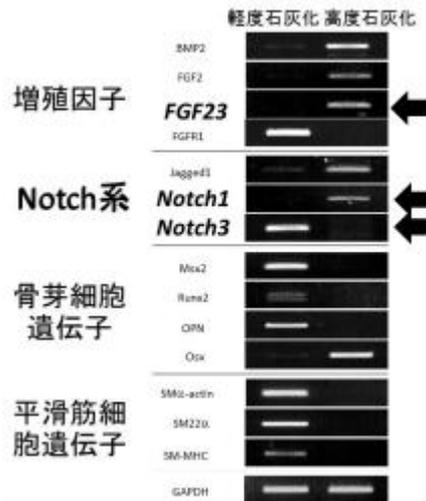
いる可能性は否定できない。しかし、ArMORR 研究のサブ解析では、透析導入後 1 年間に死亡した 200 人と血清 Ca、P、PTH に有意差がない生存している 200 人との比較したところ、FGF23 濃度が、血清 Ca、P、PTH とは独立して、死亡率増加と相関する因子であることが示された。透析患者は腎臓が機能していないので、これまでに解明されている FGF23 の腎臓における作用では説明がつかず、FGF23 の腎臓以外の臓器における機序が、これら CKD 患者の心血管イベント、ひいては死亡率増加の原因として存在するとの仮説を立てた。

申請者ら循環器内科医が日常診療の検査、特に心臓 CT で検出する血管石灰化は、糖尿病患者や腎不全患者で顕著であり、心血管イベントの強力な予測因子である (図 1)。10 年ほど前まで血管石灰化は、受動的なものであり加齢に伴って起こると考えられてきたが、胎生期の骨形成や骨吸収に通じる特徴を有しており、骨形成・骨吸収にかかわる遺伝子群が関与する能動的なものであることが明らかになってきた。申請者らはその中の転写因子の一つである Runx2 の誘導に FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) が重要な役割を担っていることを報告した。

また申請者らのグループは、血管石灰化における細胞内シグナルとして Notch シグナルが重要であることを明らかにした。Notch シグナルとはヒトから線虫にいたるまで進化的に保存された機構であり、局所的な細胞間相互作用を通して細胞の運命 (分化) を決定するために機能する。遺伝子改変動物の解析から心臓・血管の発生にも必須のシグナルであることが明らかになっている。申請者らは、動脈硬化病変において Notch の発現が上昇し、Notch シグナルが血管の石灰化に重要な役割を担っていることを明らかにした。血管石灰化には、骨の石灰化に重要な役割を担っている因子: Msx2・HERP などの遺伝子発現が血管内で誘導され、血管石灰化に結び付くと考えられている。

これらの結果を元にして、まず申請者らは、血管において、FGF23 が発現しているか否かを、剖検標本を用いて検討したところ、大動

脈の高度石灰化病変において FGF23 の発現上昇を認めた (図 2)。次に血管平滑筋細胞を用いて、FGF23 の発現を検討した。血管平滑筋



細胞において、

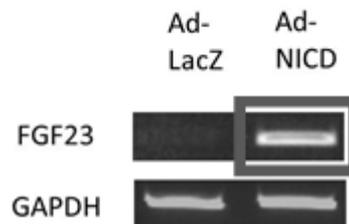
図2 石灰化病変における遺伝子発現 (剖検例)

Notch シグナルを過剰発現させる (アデノウイルスを用いて、Notch の核内移行シグナルである NICD: Notch Intra Cellular Domain を過剰発現させた) と FGF23 の発現が上昇することを見出した (図 3)。

これまで、FGF23 は骨細胞で産生されることが知られているが、申請者らは FGF23 が血管平滑筋細胞でも発現しており、その発現には Notch シグナルが関与している可能性を見出した。腎不全患者においては、FGF23 発現が上昇している患者が多く、これまで血管石灰化にかかわるとされている既知の因子 (P や Ca 濃度など) とは独立して心血管イベントに結び付くことが示唆される。

そこで、申請者らは FGF23 が心血管系の細胞 (血管平滑筋細胞・心筋細胞) に直接的な影響を及ぼし、これらの結果が CVD を引き起こしているという仮説を立てた。本研究では FGF23 を CKD と CVD を結ぶ重要なホルモンと考え、心腎連関における FGF23 の役割を検討した。

図3 Notch は FGF23 を誘導。



3. 研究の方法

心腎連関における Notch シグナル及び FGF23 の役割に関して、次の 4 項目を解析することとした。

1) CKD 患者における FGF23 の発現部位を明らかにする。

2) Notch シグナルによる FGF23 発現の調節機序を解明する。

3) 動物モデルを用い、Notch シグナルや FGF23 が血管病変や心筋病変の発症・進展に関与するかを明らかにする。

4) 心血管イベントハイリスク患者における FGF23 の血液中濃度と心臓 CT によって得られる石灰化スコアとの関連性を明らかにする。

4. 研究成果

まず、CKD 患者における FGF23 の発現部位を検討した。剖検によって得られたヒト大動脈を用いて、局所における FGF23 の発現を検討した。血管石灰化部位に FGF23 の発現を認め、血管石灰化に FGF23 が関与している可能性が示唆された。

次に Notch シグナルによる FGF23 発現調節機序を検討した。活性型 Notch (NICD) アデノウイルスを Human Aortic Smooth Muscle Cell (HASMC) に導入し、FGF23 の発現量を ELISA 法、real-time PCR 法で検討した。しかし血管平滑筋細胞における FGF23 の発現量が当初の予想より下回ったことが判明した。発現した蛋白濃度を測定したところ 10pg/ml 前後であり、生理的発現量 (基準値 10 ~ 50pg/ml、透析患者では 1000 ~ 10000pg/ml 以上となることもある) に比して、変化が乏しく、Notch による FGF23 の誘導は、生体内ではあまり影響を及ぼさないことが予想された。

そこで、計画を変更し、FGF23 の血管における役割の検討をした。

まず、FGF23 が血管平滑筋に作用しうるかを検討した。FGF23 の受容体として知られている、FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 及び Klotho の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて、確認したところ、いずれの遺伝子も HASMC において発現しており、特に FGFR1 の発現が豊富であることが明らかになった。

また、Western blot 法にて FGF23 が血管平滑筋に対して直接作用するかを検討した。FGF family で誘導される ERK リン酸化、ついで Egr-1 の誘導を確認した。よって FGF23 が血管平滑筋細胞に直接作用している可能性が示唆された。

次に FGF23 が石灰化に影響を及ぼすかを検討した。アデノウイルスベクターを用いて、血管平滑筋に FGF23 を導入したところ、石灰化の指標である BMP2, ALP 遺伝子が、LacZ コントロールと比較して有意に低下していることを real time PCR 法にて認めた。また、

ALP assay を用いて、FGF23 による ALP の発現量を検討したところ、FGF23 導入群で有意に ALP 発現量が低下していた。また、BCIP/NBT を用いて ALP 染色を行ったところ、FGF23 導入群で有意に ALP 発現の低下を認め、かつ石灰化が誘導される beta glycerophosphate の刺激下でも ALP 発現の低下を認めた。さらに石灰化マーカー遺伝子である Msx2, Runx2 遺伝子が、LacZ コントロールと比較して有意に低下していることを real time PCR 法にて認めた。よって FGF23 は血管石灰化に抑制的に働いているものと考えられた。

血管石灰化抑制の原因として、FGF23 が血管平滑筋細胞の分化を誘導することで、「脱分化し、石灰化誘導」というプロセスを抑制する可能性を考えた。分化誘導マーカーである SM α -アクチン、SM22 α 、SM-MHC の遺伝子発現を real-time PCR 法で確認したところ、FGF23 によるこれらの遺伝子の誘導は明らかではなかった。

他の機序として、FGF23 が血管平滑筋細胞の増殖能・遊走能を高め、血管平滑筋の石灰化を抑制する可能性を考えた。しかし migration assay を用いて検討したが、FGF23 による血管平滑筋細胞の増殖能・遊走能への影響は明らかではなかった。

FGF23 が血管平滑筋の石灰化に対して抑制的に作用する機序として、血管石灰化抑制因子の産生を誘導している可能性を考えた。血管石灰化抑制因子として我々が注目した因子は、オステオプロテジェリン (OPG : Osteoprotegerin) である。OPG は破骨細胞の分化を抑制する因子として発見された。OPG は RANK のデコイとして作用し、石灰化促進に働く RANK-RANKL 結合を阻害することにより、破骨細胞の分化を抑制する。その後血管平滑筋細胞・血管内皮細胞においても OPG の発現が確認された。OPG ノックアウトマウスでは血管の石灰化が抑制されることから、OPG は血管石灰化に対して抑制的に作用しているものと考えられている。

FGF23 が導入された血管平滑筋において、OPG の mRNA 発現を検討したところ、その発現が有意に上昇していることが確認できた。また上清中の OPG 濃度を ELISA 法にて確認したところ FGF23 を導入した場合、LacZ コントロールと比較して約 2 倍の蛋白発現量増加を認めた。

FGF23 が直接的に OPG 誘導をしているかを検討したところ、OPG プロモーター上に Egr-1 結合部位を 2 か所、Sp-1 結合部位を 10 か所認めた。FGF23 による Sp-1 の誘導を Western blot 法にて確認したところ、先に述べた Egr-1 と同様に FGF23 による Sp-1 蛋白の誘導を認めた。このことから FGF23 が OPG を誘導し、RANK-RANKL 結合を阻害し、血管石灰化カスケードを抑制することで、最終的に血管石

灰化を抑制する可能性が示唆された (図 4)。生体内で、FGF23 による OPG の発現が起りうるかを検討するため、群馬大学医学部附属病院の外来患者を対象として、血中の FGF23 濃度と OPG 濃度の相関を検討したところ、有意な相関を認めた (図 5)。この結果は、われわれの仮説に矛盾しない結果と考えられた。

もっとも、FGF23 が直接 OPG プロモーターに働きかけているかは確認するなど、さらなる検討を要するが、FGF23 が血管石灰化に対して抑制的に作用することが強く示唆されたと考えられる。

図 4 FGF23 による血管石灰化抑制シエマ (仮説)

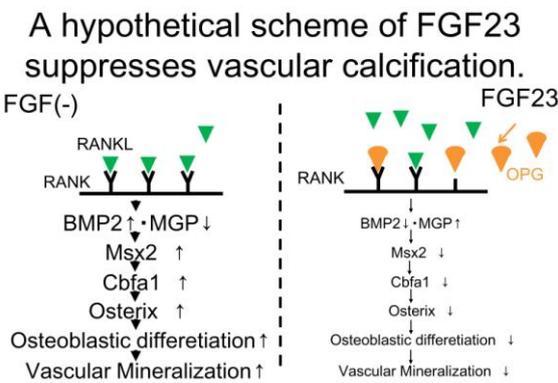


図 5 血清中 FGF23 濃度と OPG 濃度は相関する。

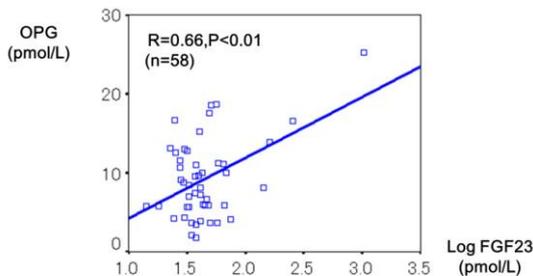
5. 主な発表論文等

(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 4 件)

- ① Nakahara T, Takahashi-Tateno R, Hasegawa A, Kimura T, Tsushima Y,

Serum FGF23 level was correlated with serum OPG level.



Murakami M, Kurabayashi M. Doppler echocardiography may provide a potentially life-saving screening of anomalous origin of coronary artery in

young athletes. *Int J Cardiol.* 2012 Apr 5;156(1):104-5. 査読有

- ② Nakahara T, Niwamae N, Kurosawa K, Kurabayashi M. Cardiac computed tomography can diagnose the tricuspid valve pouch. *Int J Cardiol.* 2012 Jun 14;157(3):e50-1. 査読有
- ③ Takahara T, Jinzaki M, Fukuda N, Takahashi Y, Ishihara T, Takada A, Suzuki K, Manita M, Imanari T, Kanesawa N, Kuribayashi S, Kurabayashi M. Estimation of the left ventricular diastolic function with cardiac MDCT: correlation of the slope of the time-enhancement-curve with the mitral annulus diastolic velocity. *Eur J Radiol.* 2012 Feb;81(2):234-8 査読有
- ④ Nohara R, Daida H, Hata M, Kaku K, Kawamori R, Kishimoto J, Kurabayashi M 他、Nakahara T, (110 名中 68 番目) Justification for Atherosclerosis Regression Treatment (JART) Investigators. Effect of intensive lipid-lowering therapy with rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in Japanese patients: Justification for Atherosclerosis Regression Treatment (JART) study. *Circ J.* 2012;76(1):221-9. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Takehiro Nakahara. Fibroblast growth factor 23 inhibits osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells: A protective role against vascular calcification? Annual Meeting of ATVB Early Career Networking Reception 2012 (*Invite presentation*) USA, 2012
- ② Nakahara T, Kawai-Kowase K, Matsui H, Iso T, Utsugi T, Tomono S, Arai M, Kurabayashi M. Fibroblast Growth Factor 23 Inhibits Osteogenic Differentiation Of Vascular Smooth Muscle Cells: A Protective Role Against Vascular Calcification? Annual Meeting of American Heart Association Scientific Sessions 2012, USA, 2012
- ③ Takehiro Nakahara, Keiko Kawai-Kowase, Hiroki Matsui, Tatsuya Iso, Toshihiro Utsugi, Shoichi Tomono, Akira Ogawa,

Kanesawa Norio, Masashi Arai, Masahiko Kurabayashi Fibroblast growth factor 23 inhibits osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells: A protective role against vascular calcification.
日本循環器学会第77回学術集会
2012.3.15~3.17 横浜

④ Takehiro Nakahara, Masahiro Jinzaki, Nogiku Niwamae, Ryoutarou Seki, Norimichi Koitabashi, Tadasi Nakajima, Tasuya Iso, Yuuichirou Saito, Yoshiaki Kaneko, Masashi Arai, Yoshito Tsushima, Sachio Kuribayashi, Masahiko Kurabayashi
“Replacement injection” methods may enable better visualization in the right heart.
Annual Meeting of ASCI Asian Society of Cardiovascular Imaging 2012,
(*Best young investigator award session*), Thailand, 2012

⑤ Takehiro Nakahara, Nogiku Niwamae, Tadashi Nakajima, Tatsuya Iso, Yuuichirou Saito, Yoshiaki Kaneko, Masashi Arai, Yoshihito Tsushima, Keigo Endo, Masahiko Kurabayashi
“Replacement injection” methods may enable better visualization in the right heart.
Annual Meeting of SCCT Society of Cardiovascular Computed tomography
(*Young Investigator Award session*), USA, 2011

⑥ Takehiro Nakahara, Masahiro Jinzaki, Nobuaki Fukuda, Yasuyuki Takahashi, Toshihiro Ishihara, Atsuko Takada, Kenichi Suzuki, Mamoru Manita, Tetsuro Imanari, Norio Kanesawa, Sachio Kuribayashi, Masahiko Kurabayashi
Can Cardiac CT evaluate Left Ventricular Diastolic Function? Correlation of the Slope of the Time-Enhancement-Curve with the Mitral Annulus Diastolic Velocity.
Annual Meeting of ASCI Asian Society of Cardiovascular Imaging 2011,
(*Best young investigator award session*), Hong-Kong, 2011

⑦ Takehiro Nakahara, Nogiku Niwamae, Norimichi Koidatabashi, Ryoutarou Seki, Tadashi Nakajima, Tatsuya Iso, Yuuichirou Saito, Yoshiaki Kaneko, Masashi Arai, Yoshihito Tsushima, Masahiko Kurabayashi
“Replacement injection” methods may enable better visualization in the right heart.”
日本循環器学会第76回学術集会
2012.3.16~3.18 福岡

⑧ Takehiro Nakahara, Masahiro Jinzaki, Nobuaki Fukuda, Yasuyuki Takahashi, Toshihiro Ishihara, Atsuko Takada, Kenichi Suzuki, Mamoru Manita, Tetsuro Imanari,

Norio Kanesawa, Sachio Kuribayashi, Masahiko Kurabayashi
Can Cardiac CT evaluate Left Ventricular Diastolic Function? Correlation of the Slope of the Time-Enhancement-Curve with the Mitral Annulus Diastolic Velocity.
日本循環器学会第76回学術集会
2012.3.16~3.18 福岡

⑨ 中原健裕、外山卓二、関亮太郎、小板橋紀通、庭前野菊、中島忠、斉藤勇一郎、金古善明、新井昌史、対馬義人、倉林正彦
Dual Energyを用いた心筋perfusionの可能性について—心筋SPECTとの比較—
第51回日本核医学会学術総会
2011.10.27~29 筑波

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 健裕 (NAKAHARA TAKEHIRO)
群馬大学・医学部・医員
研究者番号：00599540

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし