

## 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14日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23792105
研究課題名（和文）硬組織におけるPTHの新規作用に着目したミネラル代謝異常に関する基礎的研究
研究課題名（英文）A basic study of de novo function of PTH in mineral metabolism disorders
研究代表者 南崎 朋子 (MINAMIZAKI TOMOKO) 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教 研究者番号：30452593

## 研究成果の概要（和文）：

ラット頭頂骨由来骨芽細胞(in vitro)およびマウス頭蓋骨(ex vivo)を用いて、PTHによる線維芽細胞増殖因子(FGF)23の発現調節について検討したところ、PTHは*Fgf23*のプロモーター活性を促進したが、mRNAおよびタンパクレベルでの変動には有意差が得られなかった。一方、活性型ビタミンD<sub>3</sub>(1,25D)によるFGF23発現誘導下では、PTHは1,25Dによる*Fgf23* mRNAおよびタンパク発現誘導を抑制した。その一因として、PTHによるビタミンD受容体およびIII型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター(Pit1)の発現低下が認められた。また、PTHはPKAシグナルを介してERKの脱リン酸化酵素MKP1のリン酸化を促進し、FGF23のシグナルを減衰させることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

PTH increased the promoter activity of *Fgf23* in rat calvaria-derived osteoblast cell cultures, however, there was no significant change in the levels of *Fgf23* mRNA expression and production. In combination with dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D), on the other hand, PTH decreased 1,25D-induced *Fgf23* mRNA expression and production. One of the reasons for this effect is that the expression of vitamin D receptor and type III sodium-dependent phosphate transporter (Pit1) was suppressed by PTH. Further, PTH promoted MKP1 phosphorylation via PKA pathway, and thereby attenuated the signal FGF23 signaling.

## 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：口腔組織学、骨代謝

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：細胞・組織、骨代謝、リン代謝、PTH、FGF23

## 1. 研究開始当初の背景

現在日本の透析患者数は世界最多の30万人弱、その3分の1は二次性副甲状腺機能亢進症(sHPT)を発症していると推定されるが、長期の内科的治療法では功を奏さず外科的治療(副甲状腺摘出や前腕への一部移植)が行われることも多い。しかし、再発も認められ、あるいは心血管系の病態が進行している場

合外科的治療が行えないケースもあることから、内科的治療によるミネラル代謝異常の治療(硬組織・軟組織とも)の効率性向上に大きな期待がかかっている。

一方、本研究代表者らはこれまで、活性型1,25D、PTHおよびその他の因子(FGF23、老化関連タンパクKlotho等)による骨局所でのミネラル代謝調節において研究を行って

おり、中でも分泌型 Klotho を用いて直接血中リンおよびカルシウム濃度に影響することなく骨の石灰化を調節することに成功するなど、システム的な治療に先駆けた、骨を基軸とするミネラル代謝異常の治療を現実的なものにしつつある点が独創的かつ先進的である。

## 2. 研究の目的

1,25D 製剤以外に PTH 分泌を抑制する候補として、健常人では線維芽細胞増殖因子 23(FGF23)が有力であるが(Ben-Dov IZ et al, J Clin Invest 2007)、慢性腎不全下では FGF23 が高値にもかかわらず PTH 分泌が抑制されない(Canalejo R et al, J Am Soc Nephrol 2010)。興味深いことに本件申請者は同時期、骨組織において高 Pi 状況下で PTH が FGF23 のシグナルを抑制することを明らかにしている(2009 年日本骨代謝学会にて優秀ポスター演題賞受賞、およびアメリカ骨代謝学会発表、現在論文投稿中)。また本件申請者らは FGF23 が主として骨および歯(硬組織)で産生されることを明らかにしている(Yoshiko Y et al, Bone 2008)。すなわち、過剰な PTH 分泌によって、硬組織における FGF23 と PTH のフィードバック機構が破綻していると考えられる。

本研究代表者は、PTH-FGF23 フィードバック機構の正常化を主とする骨からのアプローチが sHPT の新規治療法の開拓につながると想定し、骨における FGF23 のシグナルを抑制する PTH の下流因子を特定し、直接血中カルシウム濃度に影響することなく PTH の分泌を抑制し、骨・関節症状や異所性石灰化を軽減・消失させるという治療の可能性に着目した。

つまり、本研究によって PTH 下流因子を標的とした PTH-FGF23 のフィードバックループの正常化治療が可能となれば、血中カルシウム濃度を上昇する副作用をもたらすことなく、sHPT の内科的治療が行えるという結果が予想された。

## 3. 研究の方法

(1)ラット頭頂骨由来骨芽細胞 (RC 細胞) を用いて、PTH による FGF23 発現およびシグナルへの影響、石灰化への影響を検討した

(1, 25D 誘導下についても同様に行う)。また、頭頂骨 (ex vivo) に PTH および/または 1, 25D を投与し、FGF23 の発現変動を確認した。

具体的な方法は次の通りである。

- ・ ChIP assay
- ・ プロモーターアッセイ
- ・ ALP/von Kossa 染色
- ・ リアルタイム RT-PCR

- ・ ウェスタンブロッティング
- ・ 免疫組織化学

(2) PTH 下流因子 (FGF23 シグナル抑制因子) を限定した。

① PTH の下流因子候補の絞り込み (PKA・PKC リガンド、G タンパク共役型受容体リガンド等)

② FGF23 シグナル抑制の有無の条件下、変動する遺伝子を網羅的に解析

③ ②で2倍以上変動の見られた因子について、RC 細胞で再現性確認

④ PTH による ERK の脱リン酸化を担う MKP1 に着目し、FGF23 シグナルへの影響を確認

(3) PTHR1 発現調節モデルの作成

① 変異 PTHR1 挿入 Tet-On 調節ベクター作成

② HEK293 細胞への感染、力価増幅

③ ラット頭蓋骨由来骨芽 (RC) 細胞またはマウス株細胞 (MC3T3-E1) 等への感染

④ mPTHR1 の発現確認、FGF23 シグナル抑制確認

(4) sHPT モデルラットの作成 (次年度へ継続)  
実験内容: 正常ラットの 5/6 腎切除後、腎および血中マーカー (GFR、Cer、BUN、Cr、Pi、Ca、1, 25D) をモニターしながら sHPT を発症を確認

(5) PTH 下流因子を標的とした FGF23-PTH のフィードバックループ正常化を検討する

1) RC 細胞および PTHR1 発現調節モデルにおける PTH 下流因子を標的とした FGF23 シグナル正常化の検討

① RC 細胞に PTH 投与下あるいは PTHR1 発現調節モデルにおいて、PTH 下流因子を阻害することで FGF23 シグナルが抑制されないことを確認

2) sHPT モデルラットにおける PTH 下流因子を標的とした治療検討

## 4. 研究成果

PTH による FGF23 の発現調節について検討したところ、PTH は FGF23 のプロモーター活性を促進するが、mRNA およびタンパクレベルでの変動には有意差が得られないことが明らかとなった。一方、1, 25D による FGF23 発現誘導下では、プロモーター活性は促進するもののその程度が低下し、1, 25D による FGF23 mRNA およびタンパク発現誘導が抑制されることが明らかとなった。その一因として、PTH によるビタミン D 受容体および III 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター (Pit1) の発現低下が認められた。また、骨芽細胞において PTH による 1, 25D と VDRE の結合能への影響について、ChIP アッセイ等により現在精

査中である。

また、FGF23 は MAPK カスケードの ERK をリン酸化することがわかっているが、PTH は PKA シグナルを介して ERK の脱リン酸化酵素 MKP1 のリン酸化を促進し、FGF23 のシグナルを速やかに減衰させることが明らかとなった。さらに、FGF23 は ERK のネガティブフィードバックである Spouty ファミリーの Spry1,4 の発現を促進することが明らかとなり、これによって FGF23 による ERK シグナルの活性化が一過性であることの裏付けがされた。

一方、sHPT モデルラットの作製はモニタリング期間が長くなることから、途中で断念した。これにより、実験(5)を中止した。

PTH 下流因子候補の絞り込みは現在継続中であるが、一部については RC 細胞で再現性を確認しており、今後これらについて PTHrR 発現調節モデルを用いて、その影響を調査する。

以上より、PTH による FGF23 の発現およびシグナル調節の機序が一部解明された。これを元に、より詳細な下流因子の特定が期待される。

#### 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 2 件)

1. Minamizaki Tomoko, Yoshioka Hirotsuka, Kozai Katsuyuki, Jane E Aubin, 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, p97-102.
2. Yoshioka Hirotsuka, Yoshioka Yuji, Minamizaki Tomoko, Suzuki Sayaka, Koma Yoshiro, Nobukiyo Asako, Sotomaru Yusuke, Suzuki Atsushi, Ito Mitsuyasu, Maeda Norihiko. Incisor enamel formation is impaired in transgenic rats overexpressing the type III NaPi transporter Slc20a1. Calcif Tissue Int. 査読有, 89, 2012, p192-202.

[学会発表] (計 8 件)

1. Minamizaki Tomoko, Konishi Yukiko, Yoshioka Hirotsuka, Kozai Katsuyuki, Yoshioka Yuji. Transient but not Constitutive Activation of ERK Is

Necessary for the Unique Action of FGF23 in Bone. The American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting, 15 Oct 2012, Minneapolis, U. S. A.

2. Yoshioka Hirotsuka, Yoshioka Yuji, Irie Yasumasa, Minamizaki Tomoko, Kato Yukio, Sugiyama Toshihiro, Maeda Norihiko. Phosphate Regulates Fibromodulin Expression Through the ERK Pathway in Ameloblasts. The 41st Annual Meeting of the American Association for Dental Research, 23 Mar 2012, Tampa, U. S. A.
3. 南崎朋子, 吉子裕二, 吉岡広陽, 前田憲彦. 骨の石灰化調節に関わる可溶性型 Klotho-FGF23 基軸. 日本解剖学会第 66 回中国・四国支部学術集会. 2011 年 11 月 13 日, 徳島.
4. Mohri Maya, Yoshioka Yuji, Minamizaki Tomoko, Yoshioka Hirotsuka, Maeda Norihiko. MEPE-associated phosphorylated ASARM is a potential target to facilitate bone mineralization. 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 10 Oct 2011, Hiroshima.
5. 入江泰正, 吉岡広陽, 吉子裕二, 南崎朋子, 加藤幸夫, 前田憲彦. 細胞外リン酸は ERK1/2 のシグナルを介してエナメル芽細胞における Fibromodulin 遺伝子の発現を抑制する. 第 53 回 歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月 1 日, 岐阜.
6. Konishi Yukiko, Minamizaki Tomoko, Yoshioka Yuji, Yoshioka Hirotsuka, Kozai Katsuyuki, Jane E. Aubin, Maeda Norihiko. MEPE-derived phosphorylated ASARM is involved in FGF23/soluble Klotho-dependent hypomineralization. The American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting, 16-17, Sep 2011, San Diego, U. S. A.
7. 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 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28 日, 大阪.
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 回日本骨代謝学会学術集会. 2011 年 7 月 28 日, 大阪.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 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：国立大学法人広島大学，株式会社ラフィーネインターナショナル，株式会社免疫生物研究所

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

2. 名称：石灰化組織における可溶性Klotho、FGF23およびFGFR複合体形成機構を利用した用途

発明者：吉子裕二，南崎朋子，吉岡広陽，前田憲彦，香西克之，渡邊和晃

権利者：国立大学法人広島大学，株式会社ラフィーネインターナショナル

種類：特許

番号：特願2011-123853

出願年月日：2011年6月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南崎 朋子 (MINAMIZAKI TOMOKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
助教

研究者番号：30452593

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

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

吉岡 広陽 (YOSHIOKA HIROTAKA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
助教

研究者番号：50523411

香西 克之 (KOZAI KATSUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授

研究者番号：1017821