

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591236

研究課題名(和文)線維芽細胞増殖因子23の脾臓における発現の生物学的意義についての解析

研究課題名(英文)Analysis of the biological role of FGF23-Klotho signal in spleen.

研究代表者

美馬 亨(Mima, Toru)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30373517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでFGF23-Klothoシグナルはカルシウム-リン代謝に関わること以外知られていなかったが、我々はFGF23が免疫調節を行う脾臓でも発現していることを報告してきた。本研究はFGF23-Klothoシグナルの免疫系における役割を明らかにすることを目的に行った。その結果、FGF23は形質細胞様樹状細胞で産生され、KlothoはB細胞に発現していることを明らかにした。さらに、FGF23はKlotho発現B細胞に抗体産生を促進することも明らかにした。以上から、脾臓の形質細胞様樹状細胞はFGF23を介してB細胞の分化を調節していることが示唆され、新たな免疫調節薬のシーズとなると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The FGF23/Klotho signal is known to have an anti-aging effect through its involvement in calcium-phosphorus metabolism. We previously reported that FGF23 was expressed not only in the bone but also in the spleen, and that the regulation of FGF23 production differed between them. In this study, we aimed to clarify the role of the FGF23-Klotho signal to the immune system. We identified that the cells producing FGF23 were plasmacytoid dendritic cells and the cells expressing Klotho were B cells. Moreover, FGF23 stimulated IgG1 expression in Klotho positive B cells but not Bcl-2 and Bcl-XL expressions. These indicated that FGF23-Klotho signal could contribute to the differentiation but not proliferation of B cells in spleen. This suggested that FGF23-Klotho signal in spleen may be new seeds of regulatory drug for immune response.

研究分野：免疫学・腎臓病学

キーワード：FGF23 Klotho B細胞 形質細胞様樹状細胞 免疫抑制 免疫賦活

### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに、FGF23-Klotho シグナルを欠失したマウス、すなわち FGF23 または Klotho ノックアウトマウスでは加齢が進行することから、FGF23-Klotho シグナルは anti-aging の作用を持つと考えられている。さらに、FGF23 もしくは Klotho ノックアウトマウスで脾臓と胸腺が萎縮することも報告されていた。以上から、FGF23-Klotho シグナルが免疫系に生物学的作用を有することが推察される。

(2) これまでのところ、FGF23-Klotho シグナルの生物学的役割については、カルシウム-リン代謝以外には知られていない。ところで、我々は FGF23 の産生調節について解析してきた。その中で、これまで報告のあった骨組織以外に脾臓でも FGF23 が産生されていることを見出した。さらに、骨組織での FGF23 産生は尿毒症マウスでは上昇すること、その上昇は副甲状腺を摘出すると是正されるのに対し、脾臓の FGF23 産生は尿毒症マウスでも上昇せず、副甲状腺を摘出して影響を受けないことを見いだした。以上から、脾臓での FGF23 の産生調節機構は骨組織とは相違し、その生物学的役割も相違すると考えられる。

(3) これまでに、我々は脾臓において FGF23 が産生されることを明らかにしたが、そのリガンドである Klotho の発現については確認できていない。さらに、脾臓で産生される FGF23 の生物学的役割についても明らかではない。

### 2. 研究の目的

(1) 脾臓で Klotho が発現しているか確認すること。

(2) 脾臓で FGF23 を産生もしくは Klotho を発現している細胞を特定すること。

(3) 特定した Klotho 発現細胞を FGF23 で刺激しどのような遺伝子の発現に影響が見られるか解析すること。

(4) 以上のことを明らかにすることにより免疫系(脾臓)における FGF23-Klotho シグナルの生物学的役割を明らかにすることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) マウス脾臓組織から RNA を抽出し、FGF23 もしくは Klotho に特異的な TaqMan プローブで定量的 PCR 法を用いて FGF23 もしくは Klotho の発現を確認する。

(2) マウス脾臓組織に FGF23 もしくは Klotho に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、脾臓における FGF23 の産生もしくは Klotho の発現部位を同定する。

(3) マウス脾臓組織より脾臓細胞を単離し、FGF23 もしくは Klotho に対する抗体と細胞表

面マーカー (T細胞: CD3、B細胞: CD19、樹状細胞: CD11c 等) との二重蛍光染色を行いフローサイトメトリーで解析し、FGF23 産生もしくは Klotho を発現する細胞を特定する。

(4) マウス脾臓組織に蛍光標識した FGF23 もしくは Klotho に対する抗体と上述した細胞表面マーカーとの二重蛍光免疫組織染色を行い FGF23 産生細胞もしくは Klotho 発現細胞を特定する。

(5) Klotho 発現細胞に FGF 受容体 1 (FGFR1) が共発現しているか抗 Klotho 抗体と抗 FGFR1 抗体を用いて確認する。確認した細胞を FGF23 で刺激し、TaqManPCR 法を用いて遺伝子発現誘導がみられた分子を特定する。こうして特定した分子から FGF23 の脾臓における役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 脾臓組織より抽出した RNA を用いて FGF23 もしくは Klotho に特異的なプライマーを用いて TaqManPCR を行ったところ、FGF23 の発現を確認したのみならず、Klotho の発現も確認することができた。次に、脾臓組織を抗 FGF23 抗体もしくは抗 Klotho 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、FGF23 と Klotho の蛋白質レベルの発現を確認した。また、両者の発現は脾臓の辺縁帯に認められた。

(2) Klotho 発現細胞を特定するために抗 Klotho 抗体を PE で蛍光標識し、FITC 標識した CD3、CD19 と CD11c に対する抗体と脾臓細胞を二重蛍光染色した後、フローサイトメトリーで解析した。その結果、CD3 もしくは CD11c 陽性細胞には Klotho の発現を認めなかったが、CD19 陽性細胞に Klotho の発現を認め脾臓では B 細胞にのみ Klotho が発現していることが示唆された。さらに、B 細胞の分化マーカー、CD45R/B220、CD21/CD35、CD1d と CD43 について Klotho 陽性 B 細胞について解析したところ、CD45R/B220+CD21/CD35+CD1d+CD43- の成熟した B 細胞に Klotho の発現を認められた。また、Klotho 陽性 B 細胞には FGFR1 も発現していることを確認し、この B 細胞が FGF23 刺激を受けることが可能であることが示唆された。

(3) FGF23 産生細胞を特定するために、Alexa Flour 647 で標識した抗 FGF23 抗体と FITC 標識した CD3、CD19、CD11c 抗体を用いた二重蛍光免疫組織染色を行った。その結果、CD3 もしくは CD19 陽性細胞には FGF23 の発現を認めなかったが、CD11c 陽性細胞に FGF23 の発現を認め樹状細胞 (DC) が産生していることが示唆された。さらに、CD11b もしくは CD8 陽性細胞には FGF23 の発現を認めなかった。このことから、FGF23 産生細胞は myeloid DC もしくは CD8 DC ではなく plasmacytoid DC であることが明らかとなった。

た。

(4) FGF23 産生細胞と Klotho 陽性細胞の細胞間相互作用の有無について検討するために抗 FGF23 抗体と抗 Klotho 抗体で蛍光二重免疫組織染色を行った。その結果、脾臓の辺縁帯で FGF23 産生細胞と Klotho 陽性細胞が非常に近接して存在し、何等かの細胞間相互作用していることが示唆された。

(5) 次に FGF23 の B 細胞における役割を明らかにするために Klotho と FGFR1 を共に発現していることを確認したマウス B 細胞株である A20 細胞を FGF23 10ng/mL で刺激し、細胞増殖系遺伝子として Bcl-2 と Bcl-XL を、抗体産生遺伝子として IgG の遺伝子発現変化を TaqManPCR で解析した。その結果、Bcl-2 と Bcl-XL の発現については増加は認められなかった。一方、IgG の発現については FGF23 刺激で無刺激に比べ 1.5 倍と有意に増加した。このことから、FGF23 は Klotho-FGFR1 発現 B 細胞に抗体産生を誘導することが示唆された。

(6) 以上から、脾臓の plasmacytoid DC は FGF23 を産生し、産生した FGF23 を用いて Klotho 陽性 B 細胞の抗体産生を促進することにより免疫系を調節していることが想定された。このことは、脾臓における FGF23-Klotho シグナルを賦活化もしくは抑制することにより、免疫賦活化もしくは免疫抑制することが可能であると考えられ、新たな免疫賦活化剤もしくは免疫抑制剤のシーズとなると考えられる。

#### 引用文献

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):45-51.

Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1829-33.

Shimada T1, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, F et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(4):561-8. 5.

Tsujikawa H1, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*. 2003

Dec;17(12):2393-403. Epub 2003 Oct 3.

Saji F, Shiizaki K, Shimada S, Okada T, Kunimoto K, et al. Regulation of fibroblast growth factor 23 production in bone in uremic rats. *Nephron Physiol*. 2009;111(4):59-66.

Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S, Shirai A, Furuya A, et al. Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 19;267(2):597-602.

Monroe JG, Dorshkind K. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Adv Immunol*. 2007;95:1-50.

Amano M, Baumgarth N, Dick MD, Brossay L, Kronenberg M, Herzenberg LA, et al. CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):1710-7.

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 1 件)

名称: 免疫調整剤及びスクリーニング方法  
発明者: 美馬 亨、重松 隆、中島悠里、屋代 充  
権利者: 和歌山県立医科大学、中外製薬株式会社  
種類: 特許  
番号: 特許願 2015-105846  
出願年月日: 平成 27 年 5 月 25 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
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

美馬 亨 (MIMA Toru)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30373517

##### (2) 研究分担者

重松 隆 (SHIGEMATSU Takashi)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30187348

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

中島悠里 (NAKASHIMA Yuri)

屋代 充 (YASHIRO Mitsuru)