

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462858

研究課題名(和文) 乳癌細胞由来Klotho下流因子による骨・歯の石灰化調節についての研究

研究課題名(英文) The roles of downstream factor(s) of cancer cell-derived Klotho on bone mineralization

研究代表者

南崎 朋子 (MINAMIZAKI, TOMOKO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：30452593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：複数のがん細胞で発現が確認された可溶性型Klotho (sKL) は骨組織由来FGF23と協働し、in vitroにおいて様々な細胞でシグナル伝達を行うが、in vivoでは組織特異性がみられた。これは、FGF23のプロセッシングを担うタンパクの1つがジェノタイプ間で組織特異的に発現変動しているためと考えられた。DNAマイクロアレイで確認されたsKLとFGF23の下流因子Xは、in vitroおよびin vivoにおいて骨基質石灰化を抑制したが、骨芽細胞や破骨細胞の増殖・分化には影響しなかった。Klotho KOマウスでは免疫染色によってXの骨基質、骨芽細胞および骨細胞への強い局在を示した。

研究成果の概要(英文)：Soluble Klotho (sKL) was detected in the several cancer cell lines and stimulated ERK signaling in vitro in the combination with FGF23 which is derived from bone. However, sKL-mediated ERK signaling was tissue-specifically regulated because of the presence of the protease(s) by which FGF23 was processed. Downstream factor of sKL and FGF23, X, was identified by DNA microarray. X inhibited bone matrix mineralization in vivo and in vitro, but did not affect on proliferation and differentiation in both osteoblast and osteoclast cell cultures. X was strongly detected in bone matrix. osteoblasts and osteocytes with immunohistochemistry by anti-X polyclonal antibody.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：Klotho FGF23 骨代謝 リン代謝 骨転移

1. 研究開始当初の背景

癌の骨転移に対する治療薬の現状

骨組織は肺や肝臓とともに癌転移が高頻度におこる臓器として知られている。近年罹患数が増加している乳癌や前立腺癌では、骨への血流量から予測されるよりも高頻度に骨転移が起こり、激しい疼痛、脊髄圧迫や病的骨折などをきたし、患者の QOL は著しく低下する。しかし、骨転移した癌には抗癌剤やホルモン剤（乳癌や前立腺癌の場合）等の薬物療法が効きにくいとされてきた (Anticancer Agents Med Chem, 7, 381-97, 2007)。

ビスホスホネート (BP) 製剤が癌の骨転移に最も使用されているのが現状だが、BP 関連顎骨壊死や長期服用による非外傷性のストレス骨折の問題から、BP 製剤に替わる薬剤の開発が望まれている (Ex. J Am Geriatr Soc, 59, 2350-5, 2011)。今年国内でも製造販売が承認された RANKL に対する抗体モノクローナル抗体もその強力な骨吸収抑制作用が認められているが、同様の問題が発生する可能性が指摘されており、骨リモデリングのバランスを考慮した骨形成（骨石灰化）の側面からのアプローチも期待される (CA Cancer J Clin, 61, 135-6, 2011)。

癌の細胞増殖を抑制する老化関連タンパク

ク Klotho

老化関連タンパク Klotho はその発現が腎臓や副甲状腺等に限局しているが、最近、乳癌や前立腺癌など限られた癌細胞にも発現し、それらの骨転移巣における進展に関与することが明らかになってきた。一方、CD44 の cleavage を介して癌細胞と細胞外マトリックスの接着・離脱を制御している ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 10/17 は、膜 Klotho の細胞外ドメインを切断して Klotho の分泌型 (sKL) を生成する (FEBS Lett, 583, 3221-4, 2009)。

このことから、膜型 Klotho、sKL はいずれも骨転移巣における癌細胞の動態を左右する新しい素因と考えられる。

Klotho は歯・骨組織において FGF23 と協働して石灰化を抑制

本件申請者らは、FGF23 が骨や歯で発現し、腎臓のリン再吸収のみならず骨における石灰化を直接抑制（低石灰化または類骨拡大）することを報告した (Bone, 40, 1565-73, 2007; J Bone Miner Res, 23, 939-48, 2010)。この FGF23 の局所作用には sKL の存在が必須であり、かつ、sKL は膜型 Klotho の分布する腎臓、その他の組織/細胞では FGF23 と協働しないことを発見した (2010 年アメリカ骨代謝学会にて発表、論文投稿中)。すなわち、sKL/FGF23 の発現調節と硬組織（骨や歯）特異的な下流シグナルの解明は、リン代謝と分離された骨、骨芽細胞における石灰化の分子基盤そのものを解明する手がかりと考えてきた。

2. 研究の目的

本件申請者らはこれまで、老化関連タンパク Klotho の分泌型 (soluble KL, sKL) が骨細胞由来線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) 23 と協働して歯や骨形成を直接制御することを発表してきた (Bone, 40, 1565-73, 2007; J Bone Miner Res, 23, 939-48, 2010; J Endocrinol, 206, 279-86, 2010)。最近、Klotho が癌細胞で発現し、自らの増殖を調節することが発表された (Ex. Oncogene, 27, 7094-105, 2008)。これらの癌細胞は骨転移を好発する共通点があり、本件申請者は、骨転移巣において癌細胞と骨細胞が Klotho-FGF23 基軸を形成すると推定した。この基軸の特異的下流因子を明らかにし、Klotho-FGF23 シグナルを調節することで転移巣の拡大を防ぎ、骨質を守るための治療法解明に向けた

基礎研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) sKL/FGF23による骨特異的下流因子を明らかにした

in vitroにおいて、マウスまたはヒトsKL組換えタンパクとヒトFGF23組換えタンパクを種々の細胞(ラットおよびマウス骨芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)、ヒト胎児腎(HEK)細胞等に添加し、シグナル伝達を調べた

同様にin vivoにおいて各種主要臓器でのシグナル伝達を調べた

Klotho KOマウス由来培養骨芽細胞を用いて、sKL添加によって変動する遺伝子をDNAマイクロアレイにて検索した

同定した下流因子Xの免疫染色・質量イメージングにより、局在を明らかにした

(2) がん細胞由来sKLおよびマウスsKL組換えタンパクの性状の差異を明らかにした

両sKL(マウス由来)の性状解析をTOFMSを用いて行う

(3)(1) の下流因子Xの基質石灰化への作用を調べた

ラット胎仔頭頂骨由来培養骨芽(RC)細胞、マウス由来骨髄細胞、破骨細胞株RAW-D細胞にそれぞれ下流因子Xを添加し、MTTおよびマーカー遺伝子発現の確認により、細胞増殖や分化に対する影響を調べた

同様に骨芽細胞培養モデルにおいて基質石灰化への影響を調べた

4. 研究成果

マウスsKLとヒトFGF23はin vitroにおいて、種々の細胞でERKのリン酸化を促進

し、短時間でEgr-1 mRNA 発現レベルを上昇した。一方、正常マウスに活性化型ビタミンDを皮下投与して内因性FGF23の発現を促進した後、マウスsKLを静脈注射し、2時間後に各組織を回収したところ、骨においてのみ、ERKのリン酸化促進およびEgr-1 mRNAレベルの上昇が認められた。これは、ヒトsKLについても、in vitro、in vivoともに同様の結果であった。

ヒトsKLをKlotho KOマウス(6週齢)に浸透圧ポンプを用いて腹腔内投与し、2週間後に各組織を回収したところ、FGF23のプロセッシングを担うプロテアーゼの1つが、ジェノタイプ間で組織特異的に発現変動していた。骨組織と比較して腎臓ではこのプロテアーゼの発現が極めて高くなっており、sKLおよびFGF23のシグナル伝達の組織特異性が見られた原因の1つであると考えられた。

Klotho KOマウス由来骨芽細胞を培養し、DNAアレイによって、sKL添加により変動する遺伝子を検索し、これについてリアルタイムRT-PCRによって発現プロファイルの再現性を確認した。明らかとなった下流因子のうち1つ(X)について、ポリクローナル抗体を用いて骨粗域における局在を免疫染色によって検討したところ、Klotho KOマウスの骨細胞、骨芽細胞および骨基質での強い局在を示した。質量イメージング(MALDI-TOFMS)でも同様の局在を示し、MSMS解析からも、Xであると同定された。

この下流因子Xの合成ペプチドを用いて、RC細胞への影響を検討したところ、骨芽細胞の増殖・分化には影響がみられなかったが、基質石灰化を強く抑制した。一方、RAW-D細胞や骨髄細胞への影響を検討したが、破骨細胞の増殖・分化には影響がみられなかった。

マウス乳がん細胞由来 sKL およびマウス sKL 組換えタンパクには TOFMS 上で判断ができる性状の差異は認められなかった。

乳がん細胞 3 種 (ヒト 2 種、マウス 1 種) および前立腺がん細胞 1 種 (ヒト) はいずれも Klotho を発現しており、FGF23 添加による ERK シグナルの活性化が認められた。

乳がん細胞および前立腺がんの骨転移モデルを作製し、sKL、合成 X ペプチドおよび抗 X ポリクローナル抗体を浸透圧ポンプで導入して骨転移への影響を確認したところ、sKL はいずれのモデルマウスにおいてもがん細胞の増殖を抑制し、X ペプチドは前立腺がんの増殖を抑制した。一方、ポリクローナル抗体についてはいずれのモデルマウスにおいても影響が認められなかった。

以上の結果から、がん細胞由来 sKL の下流因子 X は骨転移の場である骨組織において基質石灰化を抑制することがあきらかとなった。今後、X を標的としたがんの骨転移治療へ応用するため、さらなる研究が必要であると考えられる。また、循環血内の X 濃度の測定ができれば、骨転移の可能性 (危険性) や予後を判断するマーカーとして期待ができる。

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 T., Yoshiko Y. The bioactive acidic serine- and aspartate-rich motif peptide. *Curr Protein Pept Sci*. 査読有 2015;16(3):196-202.
2. Takei Y, Minamizaki T., Yoshiko Y.

Functional diversity of fibroblast growth factors in bone formation. *Int J Endocrinol*. 査読有 2015;2015:729352.

[学会発表] (計 6 件)

1. MEPE-ASARM, a substrate of the neutral endopeptidase PHEX involved in rickets/osteomalacia, acts as an inhibitor of bone formation.: Sakurai K, Minamizaki T., Hayashi I., Yoshioka H., Takei Y., Kozai K., Yoshiko Y.: 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), 24 Oct. 2015.
2. Nano-CT Analysis of Osteocyte Anomalies in Klotho-deficient Mice.: Minamizaki T., Sakurai K., Yoshioka H., Takei Y., Kozai K., Yoshiko Y.: The American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting (Seattle, USA), 10 Oct. 2015.
3. 骨基質タンパク MEPE-由来 ASARM は血中リン濃度非依存的に骨量を減少させる: 櫻井薫, 南崎朋子, 川本真貴子, 藤野陽子, 竹井悠一郎, 吉岡広陽, 岡田貢, 香西克之, 吉子裕二: 日本解剖学会 第 69 回中国・四国支部学術集会 (広島), 2014 年 10 月 26 日 .
4. Klotho 欠損マウス腎臓のイメージング質量分析: 藤野陽子, 南崎朋子, 宮脇聡子, 川上朝子, 宮地孝明, 櫻井薫, 竹井悠一郎, 吉岡広陽, 香西克之, 岡田貢, 吉子裕二: 日本解剖学会 第 69 回中国・四国支部学術集会 (広島), 2014 年 10 月 25 日 .
5. MEPE-ASARM, a substrate of Phex, decreases bone volume independently of serum phosphate levels: Sakurai K., Minamizaki T., Yoshioka H., Takei Y.,

Kozai K., Yoshiko Y.: The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting (Houston, USA), 14 Sep 2014.

6. 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：櫻井 薫, 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 香西克之, 吉子裕二：第 32 回日本骨代謝学会（大阪），2014 年 7 月 26 日。

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

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

(3)連携研究者

二村 学 (FUTAMURA MANABU)
岐阜大学・医学部・准教授
研究者番号：10415515

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：10178212