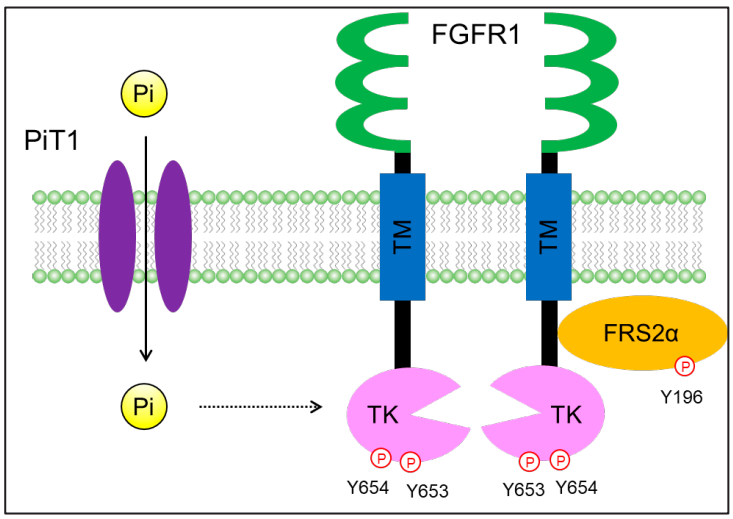
183　ファーストメッセンジャーとしてのリンの作用機序	髙士　祐一

【目的】骨は内分泌臓器としてホルモンを介し、全身性の代謝を制御することが明らかになりつつある。骨より産生・分泌されるホルモンである線維芽細胞増殖因子 23（fibroblast growth factor 23：FGF23）は、腎臓近位尿細管で作用し、血中リン濃度を低下させる。一方、FGF23 の産生・分泌を担う骨が、いかに血中リン濃度の変動を感知し、どのように血中 FGF23 濃度を調節しているのかは未解明である。報告者はこれまでの研究の中で、リンがファーストメッセンジャーとして作用し、骨においては FGF 受容体 1（FGF receptor 1：FGFR1）がリン感知分子として機能していることを見出した。しかし、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機構を介して受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 を活性化するのかは不明である。さらに、骨における FGF23 産生・分泌以外のリンによる生物作用にも FGFR1 が関与しているのかも明らかではない。そこで本研究では、リンによる FGFR1 活性化の分子基盤を解明すること、および骨以外の臓器を含めたリン感知分子としての FGFR1 の機能と臨床的意義について明らかにすることを目的とした。

【方法】FGFR1 と相互作用を示す蛋白として、Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体（PiT1、PiT2）に着目した。阻害剤や siRNA を用いた実験により、リン感知における PiT1 および PiT2 の関与について検討した。また、骨以外の臓器を含めた FGFR1 の機能と臨床的意義を明らかにするために、野生型マウスに FGFR 阻害剤の投与を行い、高リン食負荷に対する血中副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）濃度の変化を評価した。さらに、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを長期飼育して、骨の FGFR1 の生存率への影響を検討した。

【結果】Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体の阻害剤である phosphonoformic acid（PFA）により、骨芽細胞様細胞株である UMR106 において、リン負荷に対する extracellular signal-regulated kinase（ERK）のリン酸化、およびリン応答遺伝子である *Galnt3* 発現の亢進が抑制された。Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体には PiT1 と PiT2 の 2 種類があるが、siRNA を用いた実験から、リン感知には PiT2 ではなく PiT1 が関与していることを明らかとした。また、野生型マウスに高リン食を摂取させると、血中 FGF23 濃度の上昇とともに血中 PTH 濃度の上昇が認められた。ここで、FGFR 阻害剤である NVP-BGJ398 を投与すると、高リン食負荷による血中 PTH 濃度の上昇が抑制された。すなわち、副甲状腺におけるリン感知にも FGFR1 が関与していることが示唆された。骨特異的 FGFR1 欠失マウスの長期飼育では、成長に伴う体重増加は 22 週齢までは骨特異的 FGFR1 欠失マウスとコントロールマウスとの間で有意差を認めなかったが、23 週齢以降骨特異的 FGFR1 欠失マウスで有意な体重減少が認められた。カプランマイヤー法により生存率を評価したところ、骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して有意に短命であることが明らかとなった。

ファーストメッセンジャーとしてのリンとリン感知機構



183. ファーストメッセンジャーとしてのリンの作用機序

髙士　祐一

*福岡大学 筑紫病院 内分泌・糖尿病内科

Key words：リン，FGF2，FGFR1，PiT1，PTH

緒　言

骨は生体の支持、内臓の保護、造血といった機能を有することに加え、近年内分泌臓器として機能していることが明らかとなりつつある。骨が内分泌臓器であることが判明する契機となったのは、骨が産生するホルモンである線維芽細胞増殖因子 23（fibroblast growth factor 23：FGF23）の同定である。FGF23 は生体のリン代謝に中心的な役割を果たすホルモンであり、腎臓近位尿細管において作用し、血中リン濃度を低下させる［1］。生体のカルシウム代謝に中心的な役割を果たす副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）の産生・分泌は、副甲状腺のカルシウム感知受容体を介して調節されている。一方、FGF23 の産生・分泌を担う骨が、いかに血中リン濃度の変動を完治し、どのように血中 FGF23 濃度を調節しているのかは未解明である。また血中リン濃度の上昇は、骨における FGF23 の産生を促進するだけでなく、PTH の産生促進や軟骨細胞のアポトーシスの誘導などを惹起するファーストメッセンジャーとして機能することが明らかになっている。さらに、慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）患者に認められる慢性高リン血症は、血管平滑筋を骨芽細胞様細胞に変化させ、血管石灰化を惹起する原因と考えられている［1］。しかし、ファーストメッセンジャーとしてのリンが、どのような分子を介し、生物作用を発揮しているのかについては明らかとなっていない。

報告者はこれらの課題を解決すべく、まず *in vivo*、*in vitro* 双方の系で、リン負荷に対する FGF23 産生調節に、*O* 型糖鎖修飾酵素である *Galnt3* 遺伝子産物が重要な役割を果たしていることを突き止めた。さらに骨芽細胞様細胞株 UMR106 において、*Galnt3* がリン応答遺伝子であることを見出し、*Galnt3* 遺伝子を指標として細胞レベルでのリン応答を評価する系を新規に構築した。本細胞を用いたトランスクリプトーム解析から、細胞のリン応答における extracellular signal-regulated kinase（ERK）のリン酸化、および *Galnt3* 遺伝子の誘導に必須の転写因子 early growth response（EGR1）、Ets variant 5（ETV5）の関与を明らかとした。さらに、リン酸化蛋白のプロテオーム解析から ERK の上流分子として FGF 受容体 1 （FGF receptor：FGFR1）を同定するに至った［2］。これまでの成績により、FGFR1 が骨におけるリン感知分子として機能しているとの着想に至った［3～5］。そこで、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを作製して解析を行った。その結果、FGFR1 が骨においてリン感知分子として機能していることを *in vivo* においても明らかにすることができた（論文投稿中）。しかし、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機序を介して受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 を活性化するのかは不明である。さらに、骨における FGF23 産生促進以外のリンによる生物作用にも FGFR1 が関与しているのかについても明らかではない。そこで本研究では、リンによる FGFR1 活性化の分子基盤を解明すること、および骨以外の臓器を含めたリン感知分子としての FGFR1 の機能と臨床的意義について明らかにすることを目的とした。

本研究の結果、FGFR1 のさらなる上流の制御分子として、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体である PiT1 の関与を明らかとした。すなわち、細胞外リンは PiT1 を介して細胞内に取り込まれ、細胞内からリガンド非依存的に FGFR1 をリン酸化している可能性が示唆された。また、骨以外にも副甲状腺におけるリン感知に FGFR1 が関与していることを示した。骨特異的 FGFR1 欠失マウスを長期飼育すると、本マウスはコントロールマウスに比して有意に短命であることが明らかとなった。したがって、リン感知分子としての FGFR1 による血中リン濃度調節、高リン血症発症の防御機構は、生存率の上昇に寄与することが明らかとなった。以上、本稿ではこれらの成績について報告する。

*現在の所属：福岡大学 医学部 内分泌・糖尿病内科学

方　法

1. 細胞培養

ラット骨芽細胞様細胞株である UMR106 は ATCC より購入した。培養液は DMEM（Wako）を使用した。10%FBS（Mediatech）を添加し、抗生剤として penicillin-streptomycin-amphotericin B（Wako）を使用した。37℃の 5%CO_2 インキュベーターで培養した。細胞へのリン負荷は、Na_2HPO_4（Wako）と NaH_2PO_4（Wako）を混合し、pH 7.4、0.1 M に調製したリン酸バッファーを用いて行った。Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体の阻害剤として、phophonoformic acid（PFA）（Sigma-Aldrich）を 1 mM で使用した。

2. マウスを用いた実験

マウスを用いた実験に際しては、徳島大学および福岡大学動物実験委員会の承認を得て施行した。ICR マウスは Japan SLC より購入した。4 週齢の雄マウスに、リン含有量 1.2%の高リン食（11101203、Research Diets）あるいは 0.6%のコントロール食（16012703、Research Diets）を 2 週間摂取させた。各食餌のカルシウム含有量は 0.5%で、その他の栄養素も各食餌間で差はない。FGFR 阻害剤である NVP-BGJ398 Selleckchem）は PEG300/D5W（2：1、vol/vol）に溶解し、15 mg/kg で 2 週間 1 日 1 回経口投与した。骨特異的 FGFR1 欠失マウスは、floxed *Fgfr1* マウス（ヘルシンキ大学 Juha Partanen 先生より供与）と *Ocn-Cre* マウス（Jackson Laboratory）の交配により作製した。血清 PTH 濃度は、mouse PTH 1-84 ELISA Kit（immutopics）を用いて測定した。

3. RNA 解析

UMR106 細胞からの RNA の抽出には、NucleoSpin RNA（Machrey-Nagel）を使用した。抽出した RNA を PrimeScript RT Master Mix（Takara）を用いて逆転写した。逆転写後の cDNA に対して、FastStart Essential DNA Green Master（Roche）を用いた SYBR 法により、LightCycler 96 System（Roche）で real-time PCR を施行した。

4. siRNA

ラット *Slc20a1* および *Slc20a2* siRNA の設計は Bioneer に発注した。siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX Reagent（invitrogen）を用いて行った。

5. ウエスタンブロッティング

UMR106 の細胞抽出液の作製は、Complete Mini Protease Inhibitor Mixture（Roche）と PhosSTOP（Roche）を加えた RIPA バッファー（50 mM Hepes、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.5% Na-deoxycholate、0.1% SDS、1 mM EDTA）を用いて行った。10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS/PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体反応は、抗 phospho-ERK1/2 抗体（Thr202／Tyr204）（1：1666、Cell Signaling Technology）、抗 ERK1/2 抗体（1：4000、Cell Signaling Technology）、抗 phospho-FRS2α（Tyr196）抗体（1：2000、Cell Signaling Technology）、抗α-Tubulin 抗体（1：4000、Sigma-Aldrich）を使用した。ケミルミネッセンスによる検出では、Clarity Western ECL Substrate（Bio-Rad）を用い、ChemiDoc Touch（Bio-Rad）で撮影を行った。

6. 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（2D-DIGE）

UMR106 の細胞抽出液を作製後、PhosphoProtein Purification Kit（Qiagen）、2-D Clean Up Kit（GE Healthcare）を用いてリン酸化蛋白の精製を行った。精製したリン酸化蛋白を Cy2、Cy3、Cy5 で蛍光標識した（CyDye DIGE Fluors、GE Healthcare）。Ettan IPGphor Ⅱ system（24 cm、pH 4～7）を用いて一次元展開を行った後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元 SDS/PAGE を行った。Cy2、Cy3、Cy5 それぞれの蛍光シグナルを Typhoon 9400 scanner（GE Healthcare）を用いて検出した。

結　果

1. 細胞外リンはⅢ型ナトリウム-リン共輸送体である PiT1 を介して細胞内へ取り込まれリガンド非依存性に FGFR1 をリン酸化する

ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機序を介して FGFR1 をリン酸化するのかを

解明するため、我々は FGFR1 のさらに上流の制御分子としてⅢ型ナトリウム-リン共輸送体に着目した。Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体は広く様々な組織において発現しており、従来からリン感知への関与が議論されてきたが、FGFR1 のリン酸化との関係性は不明である。そこで、Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体の阻害剤である phophonoformic acid（PFA）を用いた実験を行った。UMR106 細胞において、PFA はリン応答性の *Galnt3* 発現亢進を抑制した（図 1a）。また PFA により、リンによる ERK、および FGFR substrate 2α（FRS2α）(Tyr196）のリン酸化の誘導が消失した（図 1b)。また、Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体には *Slc20a1* のコードする PiT1 と *Slc20a2* のコードする PiT2 とが存在する。そこで、どちらのサブタイプがリン感知に関与しているのかを検討するために、siRNA を用いて *Slc20a1* および *Slc20a2* をノックダウンし、リン応答遺伝子である *Galnt3* 発現への影響について評価した。結果、si*Slc20a1* によりリン応答性の *Galnt3* 発現亢進が抑制されたことから、リン感知には PiT2 ではなく PiT1 が関与していることが明らかとなった（図 1c)。したがって、細胞外リンによる FGFR1 のリン酸化には、Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体である PiT1 を介した細胞内へのリンの取り込み必須であり、細胞内に取り込まれたリンがリガンド非依存性に FGFR1 をリン酸化する可能性が示唆された。また、UMR106 細胞において細胞外リン濃度の上昇は、FGFR1 を含めていくつかの蛋白のリン酸化を惹起することを我々は報告している［2]。これらの蛋白のリン酸化にⅢ型ナトリウムーリン共輸送体が関与しているのかを検討するために、PFA を用いたプロテオーム解析を行った。通常の 1 mM の細胞外リン濃度で培養した UMR106 細胞から作製した細胞抽出液に加えて、5 mM の細胞外リン濃度でリン負荷を行ったもの、5 mM のリン負荷とともに PFA で処理したものを用意し、これらの細胞抽出液を用いて 2D-DIGE を行った。細胞外リン濃度の上昇によりいくつかの蛋白のリン酸化が惹起されているが、PFA によりこれらのリン酸化が消失していることが示された（図 1d)。本成績も、Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体がリン感知に関与していることを支持するものであった。

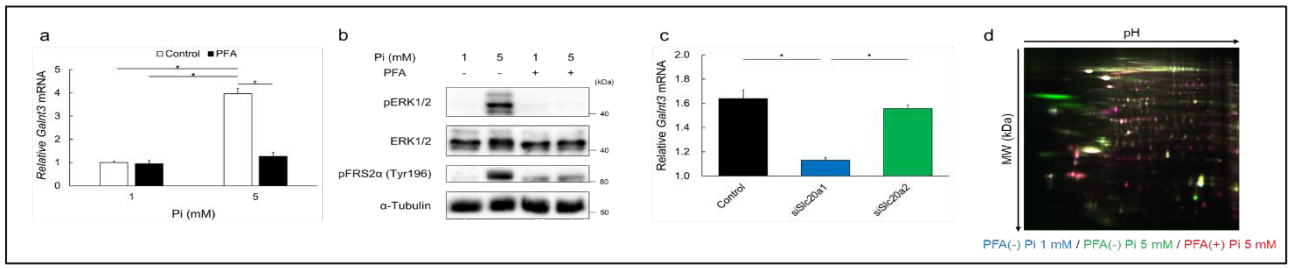


図 1. Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体 （PiT1）とリン感知

a） Ⅲ型ナトリウム-リン共輸送体の阻害剤である PFA を用いた real-time PCR による細胞外リン濃度の上昇に対する *Galnt3* mRNA 発現の評価。

b） PFA を用いたウエスタンブロッティングによる細胞外リン濃度の上昇に対する ERK および FRS2α のリン酸化の評価。

c） siRNA により *Slc20a1* および *Slc20a2* をノックダウンした際の real-time PCR による細胞外リン濃度上昇時の *Galnt3* mRNA 発現変化の比較。

d） 高リン負荷および PFA 処理を行った UMR106 細胞抽出液を用いたリン酸化蛋白の 2D-DIGE。

データは平均±標準誤差で示し、Tukey 検定による統計処理を行った（*P<0.05 を有意差ありとした）(a、c)。

2. リン感知分子としての FGFR1 は高リン食負荷による副甲状腺における PTH の産生・分泌促進にも関与する

PTH は生体のカルシウム代謝に中心的な役割を果たすホルモンであるが、FGF23 同様に尿中リン排泄を促進する作用を有する。実際に、野生型マウスに高リン食を 2 週間摂取させると、血中 FGF23 濃度の上昇に加えて血中 PTH 濃度の上昇が認められた。高リン食およびコントロール食に含有されるカルシウムは同量であることから、高リン食負荷に対して PTH の産生・分泌が促進されたものと考えられた。そこで野生型マウスを用いて、2 週間高リン食を負荷す

るとともに、連日 FGFR 阻害剤である NVP-BGJ398 の経口投与を行い、血中 PTH 濃度を評価した。NVP-BGJ398 の投与により、高リン食負荷に対する血中 PTH 濃度の上昇が抑制される結果となった。したがって、高リン食負荷に対する副甲状腺における PTH の産生・分泌促進にも、リン感知分子として FGFR1 が関与していることが考えられた。

3. 骨のリン感知分子としての FGFR1 は高リン血症発症防御を介して生存率を向上させる

FGF23 欠失マウスや Klotho マウスは高リン血症を呈し、老化が促進、短命であることが知られている。そこで、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを作製し長期飼育することで、リン感知分子としての FGFR1 の生存率への影響を検討した。骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して、血中 FGF23 濃度が低値であり、その結果血中リン濃度が高値であった。成長に伴う体重増加は、22 週齢までは骨特異的 FGFR1 欠失マウスとコントロールマウスとの間で有意差を認めなかったが、23 週齢以降骨特異的 FGFR1 欠失マウスにおいて有意な体重減少が認められた（図 2a）。カプランマイヤー法を用いて生存率を評価したところ、骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して有意に短命であることが明らかとなった （図 2b）。したがって、骨の FGFR1 による血中リン濃度調節、高リン血症発症の防御機構は、生存率の上昇に寄与することが示された。

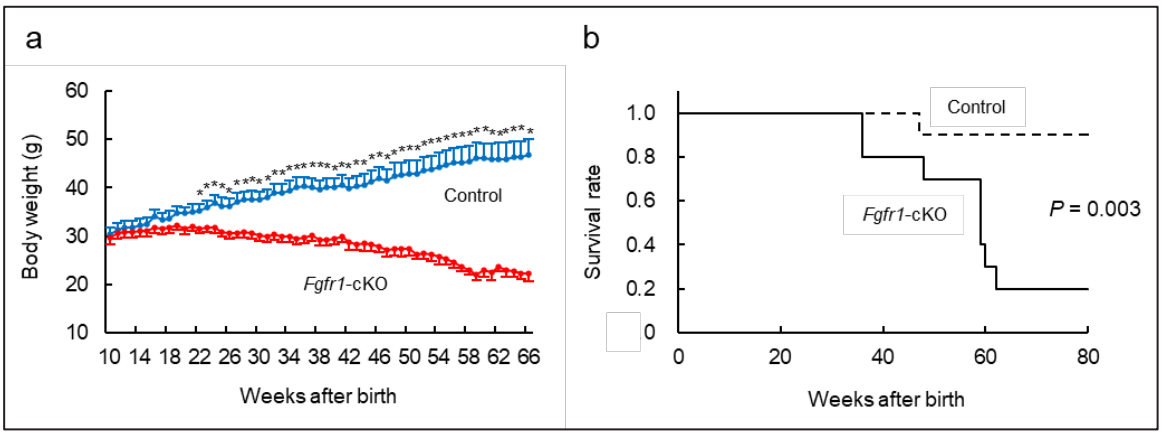


図 2. 骨の FGFR1 による生存率の向上

a) 10 週齢以降の骨特異的 FGFR1 欠失マウス（*Fgfr1*-cKO）の体重変化。データは平均±標準誤差で示した。Student の *t* 検定による統計処理を行い、**P* <0.05 を有意差ありとした。

b) カプランマイヤー法による骨特異的 FGFR1 欠失マウス（*Fgfr1*-cKO）の生存率。データは平均±標準誤差で示した。log rank 検定による統計処理を行った。

考　察

本研究により、骨において細胞外リンは PiT1 を介して細胞内に取り込まれ、細胞内から FGFR1 をリガンド非依存的にリン酸化する可能性が示唆された。また、骨以外にも副甲状腺におけるリンのファーストメッセンジャーとしての生物作用に FGFR1 が関与していることを明らかとした。さらに、骨の FGFR1 は血中リン濃度の恒常性を維持するための FGF23 産生調節に関与するだけに留まらず、生存率の向上に寄与することを示した。

しかし、PiT1 を介して細胞内に取り込まれたリンが、どのような機序を介して細胞内からリガンド非依存的に FGFR1 をリン酸化するのかは不明である。また、本機構が骨以外の臓器を含めたファーストメッセンジャーとしてのリンの生物作用に共通するものなのかの検討も必要である。今後これら未解明の課題を克服し、本研究が生体のリン感知機構を標的とした新規創薬研究に発展することが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所分子内分泌学研究分野の沢津橋俊先生、松本俊夫先生、福本誠二先生、同細胞情報学分野の小迫英尊先生、同糖尿病臨床・研究開発センターの松久宗英先生、徳島大学医歯薬学研究部血液・内分泌代謝内科学分野の遠藤逸朗先生、安倍正博先生である。

文　献

1) Takashi Y, Fukumoto S. FGF23 beyond phosphotropic hormone. Trends Endocrinol Metab. 2018 Nov 29(11): 755-767. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30217676 DOI: 10.1007/s00774-019-01066-0

2) Takashi Y, Kosako H, Sawatsubashi S, Kinoshita Y, Ito N, Tsoumpra KM, Nangaku M, Abe M, Matsuhisa M, Kato S, Matsumoto T, Fukumoto S. Activation of unliganded FGF receptor by extracellular phosphate potentiates proteolytic protection of FGF23 by its O-glycosylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan 116(23): 11418-11427. Epub 2019 May 16. PMID: 31097591 DOI: 10.1073/pnas.1815166116

3) Fukumoto S, Takashi Y, Tsoumpra MK, Sawatsubashi S, Matsumoto T. How do we sense phosphate to regulate serum phosphate level? J Bone Miner Metab. 2020 Jan 38(1):1-6. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31797064 DOI: 10.1007/s00774-019-01066-0

4) Takashi Y, Fukumoto S. Phosphate-sensing and regulatory mechanism of FGF23 production. J Endocrinol Invest. 2020 Jul 43(7): 877-883. Epub 2020 Mar 7. PMID: 32140858 DOI: 10.1007/s40618-020-01205-9

5) Takashi Y, Fukumoto S. Fibroblast growth factor receptor as a potential candidate for phosphate sensing. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2020 Jul 29(4): 446-452. Epub 2020 May 20. PMID: 32427693 DOI: 10.1097/MNH.0000000000000618