

「腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常の病態解明」

【研究概要】

腎臓は副甲状腺、骨とともに、生体のミネラルバランスの維持に重要な役割を担っている。このため、腎臓病患者では骨・ミネラル代謝異常が出現し、骨病変のみならず、血管石灰化を介して生命予後に深刻な影響を及ぼす。このような病態において重要な役割を担っているのがFGF23-Klotho系である。

FGF23は骨細胞により産生されるホルモンで、腎尿細管を主な標的臓器とし、尿中へのリン排泄および活性型ビタミンD産生を抑制する。FGF23がその生理作用を発揮するためには、標的細胞にFGF受容体とともに膜蛋白Klothoが共受容体として必要となる。FGF23は副甲状腺にも作用し、副甲状腺ホルモン(PTH)の産生を抑制するが、腎不全患者では異常高値を示すFGF23によってもPTH分泌は抑制されない。われわれは腎不全患者ではFGF受容体とともにKlothoの発現が低下していることを発見し、これによるFGF23抵抗性のため、異常高値を示すFGF23によってもPTH分泌が抑制されないという病態をこれまで明らかとしてきた。

しかしながら、FGF23-Klotho系の詳細は未だ完全には解明されていない。骨細胞におけるFGF23産生に関して、近年、骨細胞にも僅かに発現するKlothoが関与している可能性が示されているが、未だ確定的ではない。また、FGF23は近位尿細管を主たる標的臓器とし、尿中へのリン排泄および活性型ビタミンD産生を抑制するが、近位尿細管よりも遠位尿細管の方がKlothoは強く発現しており、近位尿細管のKlothoがFGF23作用にどのように関与しているかは明らかではない。

そこで本プロジェクトでは、骨組織、あるいは近位尿細管に特異的にKlothoを過剰発現するマウスを作製し、FGF23-Klotho系の解明を目指す。さらに腎臓病患者を対象とするコホート研究のデータを用いて、腎臓病におけるFGF23-Klotho系の役割の解明を目指す。

【研究成果】

骨組織特異的Klotho過剰発現マウスを、Cre-loxP部位特異的組換え法を用いて作製するため、われわれはまずKlotho-loxPマウス (ROSA26領域にCAG-loxP-STOP-loxP-Klothoがノックインされたマウス) を作製した。このKlotho-loxPマウスをCol1a1-Creマウス (B6.FVB-Tg(Col1a1-cre)1Kryマウス) と交配し、骨組織特異的Klotho過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg) を得ることに成功した。本マウスは対照マウス (KI-Tg) と比較し、骨組織のKlotho発現が著しく亢進していることをRT-PCT, 免疫染色, Western Blotにより確認した (図2)。

さらにこのマウスを解析したところ、FGF23産生が著明に亢進していることを見出した。また、著明な全身の骨石灰化障害を呈し、生後間もなく死亡することが明らかとなった。KI-Tgマウスより骨芽細胞を単離・培養し、この細胞を分化成熟させると、FGF23発現が著しく上昇し、培養液中のFGF23濃度も上昇することを見出した。阻害薬を用いた検討により、Klotho過剰発現によるFGF23の発現亢進は、FGFR依存的なMAPK経路の活性化によって媒介されることが確認された。またFGF23投与により、Egr-1発現が亢進することを確認した。以上の結果より、膜型KlothoはFGF23-Klotho-FGFRシグナル複合体を介した正のフィードバックループを形成することにより、骨細胞におけるFGF23産生を刺激するものと考えられた。

次いで、Klotho-loxPマウスをSlc34a1-Creマウス (Slc34a1tm1(EGFP/cre/ERT2)Bhum) と交配させ、近位尿細管特異的Klotho過剰発現マウスを作製した。生化学データの解析では、リン・ビタミンD代謝に大きな変化は認められなかったが、FGF23の有意な抑制を認めた。近位尿細管でのKlotho過剰発現により、FGF23に対する感受性が亢進していることが示唆される結果であった。

さらに現在、血液透析患者を対象とするコホート研究の保存血清を用いて、近年、FGF23産生に関与することが示されたグリセロール3-リン酸 (G-3-P) との関連性を検討している。血清G-3-P値の上昇は血清リン値の上昇と強く関連しており、さらにこの関連性とは独立して血清FGF23値の上昇と関連していることが明らかとなった。透析患者においてG-3-Pがリン上昇に伴って上昇し、FGF23産生の調節に関与する可能性が示唆された。

【今後の展望】

骨組織特異的Klotho過剰発現マウス、近位尿細管特異的Klotho過剰発現マウスを用いた検討により、FGF23-Klotho系の詳細が解明されることが期待される。また、Klotho過剰発現による低リン血症性くる病の疾患モデルとして、治療薬開発の基盤となることも期待される。近年、腎不全患者で著明に上昇するFGF23は多面的な毒性を示す可能性が示されており、この観点からもFGF23分泌制御につながる本研究成果は、臨床的に重要な知見を提供するものである。さらに今後、Klotho-loxPマウスをさまざまな組織特異的Creマウスと交配させることにより、他の臓器におけるKlothoの役割に関しても検討を進めたい。

肝臓・腎臓病学研究部門

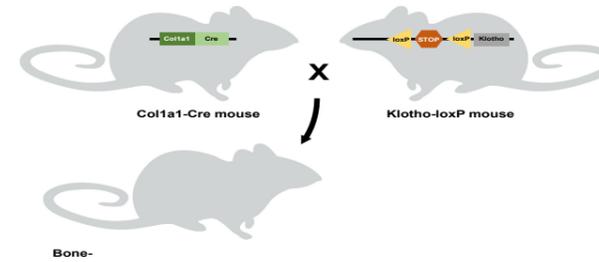


図1. Cre-loxP部位特異的組換え法を用いた骨組織特異的Klotho過剰発現マウスの作製
ROSA26領域にCAG-loxP-STOP-loxP-KlothoをノックインしたKlotho-loxPマウスを作製し、このマウスに骨組織特異的にCreを発現するCol1a1-Creマウスを交配させる。骨組織においてCre-loxP部位特異的組換えによりSTOP配列が切除され、骨組織特異的にKlothoを過剰発現するマウスが誕生する。

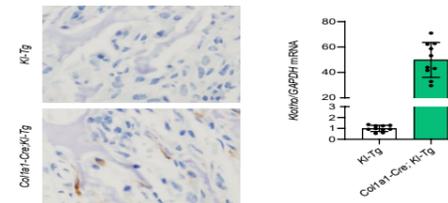
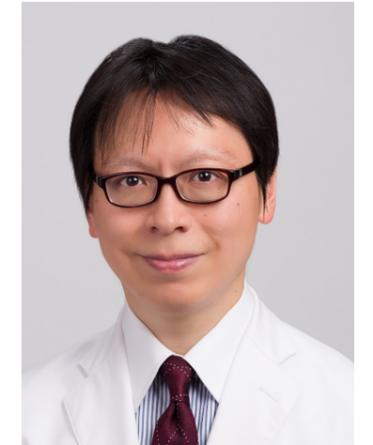
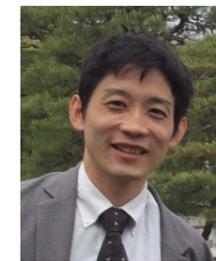


図2. 骨組織におけるKlotho発現
骨組織特異的Klotho過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg) は対照マウス (KI-Tg) と比較し、骨組織のKlotho発現が著しく亢進していることが確認される。



プロジェクトリーダー: 駒場大峰
Komaba Hirotaka

医学部医学科内科学系 腎内分泌代謝内科学 領域主任教授
腎・血液透析センター センター長



中川 洋佑
Nakagawa Yosuke
腎内分泌代謝内科学 講師



大塚 正人
Ohtsuka Masato
分子生命科学 教授



深川 雅史
Fukagawa Masafumi
腎内分泌代謝内科学 客員教授



石岡 千草
Ishioka Chigusa
腎内分泌代謝内科学 研究技術員

Selected Papers,

1. Komaba H. Roles of PTH and FGF23 in kidney failure: a focus on nonclassical effects. Clin Exp Nephrol 27: 395-401, 2023
2. Hasegawa T, Imaizumi T, Hamano T, Murotani K, Fujii N, Komaba H, Ando M, Maruyama S, Nangaku M, Nitta K, Hirakata H, Isaka Y, Wada T, Fukagawa M. Association between serum iron markers, iron supplementation, and cardiovascular morbidity in pre-dialysis chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant 38: 2713-2722, 2023
3. Komaba H, Zhao J, Karaboyas A, Yamamoto S, Dasgupta I, Hassan M, Zuo L, Christensson A, Combe C, Robinson BM, Fukagawa M. Active Vitamin D Use and Fractures in Hemodialysis Patients: Results from the International DOPPS. J Bone Miner Res 38: 1577-1585, 2023
4. Nakashima A, Miyawaki Y, Komaba H, Kurita N, Onishi Y, Yokoo T, Fukagawa M. Proton pump inhibitors and hyporesponsiveness to erythropoiesis stimulating agents in hemodialysis patients: results from the Japan Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. Am J Nephrol 55: 165-174, 2024
5. Nakagawa Y, Komaba H. Standardization of PTH measurement by LC-MS/MS: a promising solution for interassay variability. Kidney Int 105: 244-247, 2024
6. Soeda K, Komaba H, Nakagawa Y, Kawabata C, Wada T, Takahashi H, Takahashi Y, Hyodo T, Hida M, Suga T, Kakuta T, Fukagawa M. Association of serum sodium levels with fractures and mortality in patients undergoing maintenance hemodialysis. J Nephrol, in press