

「骨組織Klothoが関与する新たなFGF23分泌調節機構の解明」

【研究概要】

生体のカルシウム、リン代謝の恒常性維持は、腎臓、副甲状腺、骨を中心とする精緻な制御システムによって成り立っている。近年このシステムに関与する新たな因子として発見されたのが線維芽細胞増殖因子23 (FGF23)である。

FGF23は骨細胞により産生されるホルモンで、腎臓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、骨細胞におけるFGF23分泌調節機構の詳細は未だ明らかではない。これまでの検討でリン、PTH、活性型ビタミンDがFGF23分泌を促すことが示されているが、これに加え、骨細胞に発現するFGF受容体もFGF23産生調節に関与していることが相次いで報告されている。しかし、この機構におけるFGF受容体のリガンドは明らかでない。このような状況の中、近年、骨細胞にKlothoが発現していることが明らかとなった。また遺伝子転座によりKlotho発現が顕著に増加した患者において、FGF23が過剰に産生され、低リン血症性くる病をきたしたことが報告された。

以上の知見より、われわれはFGF23がFGF受容体とKlothoの複合体を介し骨細胞に作用し、FGF23分泌を刺激するというpositive feedback仮説を着想するに至った。そこで本プロジェクトでは、骨組織特異的にKlothoを過剰発現するマウスを作製し、FGF23分泌調節におけるKlothoの役割を解明することを目指す。

【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マウスの作製を試みた。本マウスは、ROSA26領域にCAG-loxP-STOP-loxP-Klothoをノックインした遺伝子改変マウスである。本マウスの作製には、研究分担者として参画する大塚正人氏らが作製したTOKMO-3マウスを使用した。TOKMO-3マウスは、ROSA26遺伝子座の第一イントロンに変異loxP, attP配列や変異FRT配列が挿入されたノックインマウスで、目的遺伝子とともにattBや変異FRT配列等が付加されたドナーベクターとPhiC31o mRNA, FLPo mRNAを同時にマウス受精卵に注入することにより、顕微注入法を介して目的遺伝子のノックインマウスを作製することが可能となる。本手法を用いて、計画通りにKlotho-loxPマウスを作製し得た。

さらにこのKlotho-loxPマウスを理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けたCol1a1-Creマウス (B6.FVB-

Tg(Col1a1-cre)1Kryマウス)と交配した(図1)。Col1a1-Creマウス、骨芽細胞および骨細胞特異的にCreを発現することが示されており、骨組織特異的な遺伝子改変を目指す本プロジェクトの目的に合致したマウスである。これらの交配により、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)。現在、このマウスの解析を進めており、FGF23分泌制御におけるKlothoの役割を支持するデータを得ている。

【今後の展望】

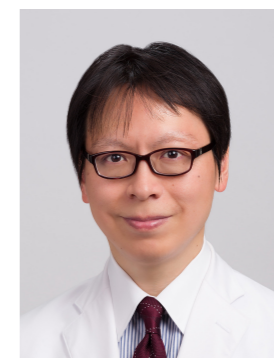
骨組織特異的Klotho過剰発現マウスの作製により、FGF23分泌調節におけるKlothoの役割が解明されることが期待される。またKlotho過剰発現による低リン血症性くる病の疾患モデルとして、治療薬開発の基盤となることも期待される。近年、腎不全患者で著明に上昇するFGF23は多面的な毒性を示す可能性が示されており、この観点からもFGF23分泌制御につながる本研究成果は、臨床的に重要な知見を提供するものである。さらに今後、Klotho-loxPマウスをさまざまな組織特異的Creマウスと交配させることにより、他の臓器におけるKlothoの役割についても検討を進めたいと考えている。



石岡千草
Ishioka Chigusa
腎内分泌代謝内科学
研究技術員



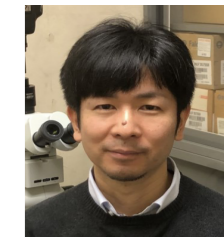
中川洋佑
Nakagawa Yosuke
腎内分泌代謝内科学 助教



プロジェクトリーダー:駒場大峰
Komaba Hirota
医学部医学科腎内分泌代謝内科学 准教授



深川雅史
Fukagawa Masafumi
腎内分泌代謝内科学 教授



大塚正人
Ohtsuka Masato
分子生命科学 教授

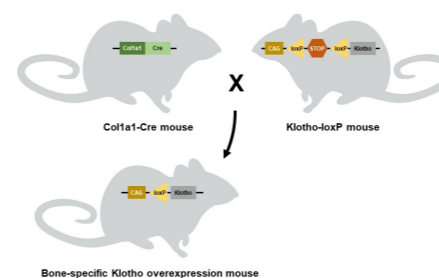


図1. Cre-loxP部位特異的組換え法を用いた骨組織特異的Klotho過剰発現マウスの作製
ROSA26領域にCAG-loxP-STOP-loxP-KlothoをノックインしたKlotho-loxPマウスを作製し、このマウスに骨組織特異的にCreを発現するCol1a1-Creマウスを交配させる。骨組織においてCre-loxP部位特異的組換えによりSTOP配列が切除され、骨組織特異的にKlothoを過剰発現するマウスが誕生する。

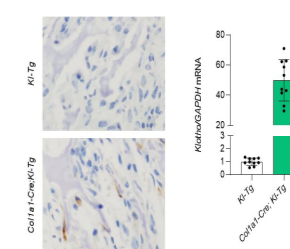


図2. 骨組織におけるKlotho発現
骨組織特異的Klotho過剰発現マウス (Col1a1-Cre;KI-Tg)は対照マウス (KI-Tg)と比較し、骨組織のKlotho発現が著しく亢進していることが確認される。

Selected Papers

- 1.Komaba H, Hamano T, Fujii N, Moriwaki M, Wada A, Masakane I, Nitta K, Fukagawa M. Parathyroidectomy vs cinacalcet among patients undergoing hemodialysis. J Clin Endocrinol Metab 107: 2016-2025, 2022
- 2.Hamano T, Imaizumi T, Hasegawa T, Fujii N, Komaba H, Ando M, Nangaku M, Nitta K, Hirakata H, Isaka Y, Wada T, Maruyama S, Fukagawa M. Biopsy-proven CKD etiology and outcomes: Chronic Kidney Disease Japan Cohort (CKD-JAC) Study. Nephrol Dial Transplant 38: 384-395, 2023
- 3.Komaba H. Renoprotection by GDF15 and Klotho: birds of a feather flock together. Kidney Int 101: 1112-1115, 2022
- 4.Evenepoel P, Jørgensen HS, Komaba H, Mazzaferro S, Vervloet M, Cavalier E, Fukagawa M. Lower bone turnover and skeletal PTH responsiveness in Japanese compared to European patients on hemodialysis. J Clin Endocrinol Metab 107: e4350-e4359, 2022
- 5.Kubota M, Hamasaki Y, Hashimoto J, Aoki Y, Kawamura T, Saito A, Yuasa R, Muramatsu M, Komaba H, Toyoda M, Fukagawa M, Shishido S, Sakai K. Fibroblast growth factor 23-Klotho and mineral metabolism in the first year after pediatric kidney transplantation: A single-center prospective study. Pediatr Transplant 27: e14440, 2023
- 6.Nakagawa Y, Komaba H, Wada T, Takahashi H, Takahashi Y, Hyodo T, Hida M, Suga T, Kakuta T, Fukagawa M. Serum sclerostin levels and mortality in hemodialysis patients: An 8-year prospective study. Am J Nephrol 53: 767-774, 2023
- 7.Ohashi Y, Toyoda M, Saito N, Koizumi M, Kanai G, Komaba H, Kimura M, Wada T, Takahashi H, Takahashi Y, Ishida N, Kakuta T, Fukagawa M, Ichida K. Evaluation of ABCG2-mediated extra-renal urate excretion in hemodialysis patients. Sci Rep 13: 93, 2023
- 8.Komaba H. Roles of PTH and FGF23 in kidney failure: a focus on nonclassical effects. Clin Exp Nephrol. 27: 395-401, 2023