

骨細胞と腎臓を結ぶナトリウム依存性リン輸送調節系の解明 —骨細胞におけるリン処理機序—

宮本 賢一, 辰巳 佐和子

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

概要 現在、慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)では非常に早期から腎機能の低下に関連して骨細胞の代謝が変化すると認識されている。例えば骨細胞から分泌されるFibroblast growth factor 23 (FGF23)はリン利尿因子であり、CKDのステージ2 (60-89 mL/min/1.73 m²)より上昇することから、CKDの早期マーカーとして注目されている。これらの知見から、血中リン濃度の恒常性を維持するために腎臓と骨細胞の間で臓器相関があると考えられているが、未だ不明な点が多い。本研究はリン代謝における骨細胞の役割を明らかにするため、任意の時期に骨細胞を死滅させることが可能であるDMP1-hHB-EGF Tgマウスを利用してそのリン代謝動態の解析を行った。

本マウスに対してジフテリア毒素 (Diphtheria toxin: DT)を投与すると、48時間以内に骨細胞の死滅が起こり、骨細胞死滅の割合はDT投与量に依存して増加していた。DT投与後9日目の骨細胞死滅マウスにおいて血中リン、カルシウムなどの電解質に変動は見られなかった。しかしながら、尿中リン排泄は著しく増加していた。骨細胞の死滅によりリン利尿促進因子である血清 FGF23 は著しく減少しており腎臓における FGF23/Klotho シグナルの減弱が推察される。

一方で尿中リン排泄は亢進しており、腎臓における NaPi-IIa 発現は著しく低下していた。そこで、リン利尿因子である副甲状腺ホルモン (PTH)を測定したが変動は見られなかったことより、FGF23/Klotho および PTH 経路とは異なる、リン代謝調節経路の存在を提示した。

また、骨細胞死滅マウスは体内リン保持機構の破綻が認められた。さらに、食餌性リン応答に骨細胞が関与するか否かを検討した。野生型マウスにおいては高リン負荷に対し、尿中リン排泄の顕著な亢進がみられ血中リン濃度は正常値に維持された。しかしながら、骨細胞死滅マウスにおいては野生型マウスにみられた尿中リン排泄の著しい増加がみられず、血中リン濃度の上昇が起きていた。よって、骨細胞は食餌性リン負荷に応答し腎臓へリン排泄を促すシグナルを送る可能性が示唆された。

以上のことから、骨細胞は食餌性リン応答に必須の細胞であり、体内リン保持機構に重要な役割を担うことが明らかとなった。本研究は、骨細胞と腎臓リン代謝をつなぐ新たなナトリウム依存性リン輸送調節システムの存在を提示するものである。

1. 目的

無機リン酸イオン(以下リン)は、骨吸収と骨形成、腎臓などが様々な調節因子に応答し、厳密な制御が行われている。腎近位尿細管におけるナトリウム依存性リン再吸収機構(NaPi)は、血中リン濃度を調節する中核である。加齢や腎臓病などで腎機能低下が生じると、リン代謝異常が惹起され骨疾患、心臓病、腎不全や寿命短縮などを引

き起こす為、NaPi の破綻は生体に重大な問題となる。とくに血中リン濃度上昇による恒常性の破綻は、慢性腎臓病患者の生命予後を悪化させることが知られている。我々は、腎臓における NaPi-IIa/NaPi-IIc ナトリウム依存性リントランスporterが、リン代謝の中核として機能していることを明らかにした¹⁻⁹。一方、その調節因子として骨細胞が分泌する fibroblast growth factor 23 (FGF23) /Klotho システム

が同定され、慢性腎臓病発症に重要である事が明らかにされた^{7,10,11}。しかしながら、どのような因子が FGF23 の誘導や Klotho の制御に関与するか明らかにされていない。申請者グループの Tatsumi らは、任意の時期に誘導的に骨細胞を破壊できるマウスを樹立した。さらに最近の我々の解析結果から、主要なリンホルモンが骨細胞より産生される可能性を示唆した¹²。つまり骨細胞はリン恒常性維持において、FGF23/klotho 系とはことなる経路に関与する可能性が示唆された。

本研究では、骨細胞から分泌される因子を同定する為に、骨細胞死滅マウスを作製して、リン調節系の異常が存在するか否かを検討し、新しいリン調節因子の存在を提示する。さらに、腎臓ナトリウム依存性リン輸送の制御機序および骨細胞のリンセンシング機序について検討を加える。

2. 研究方法

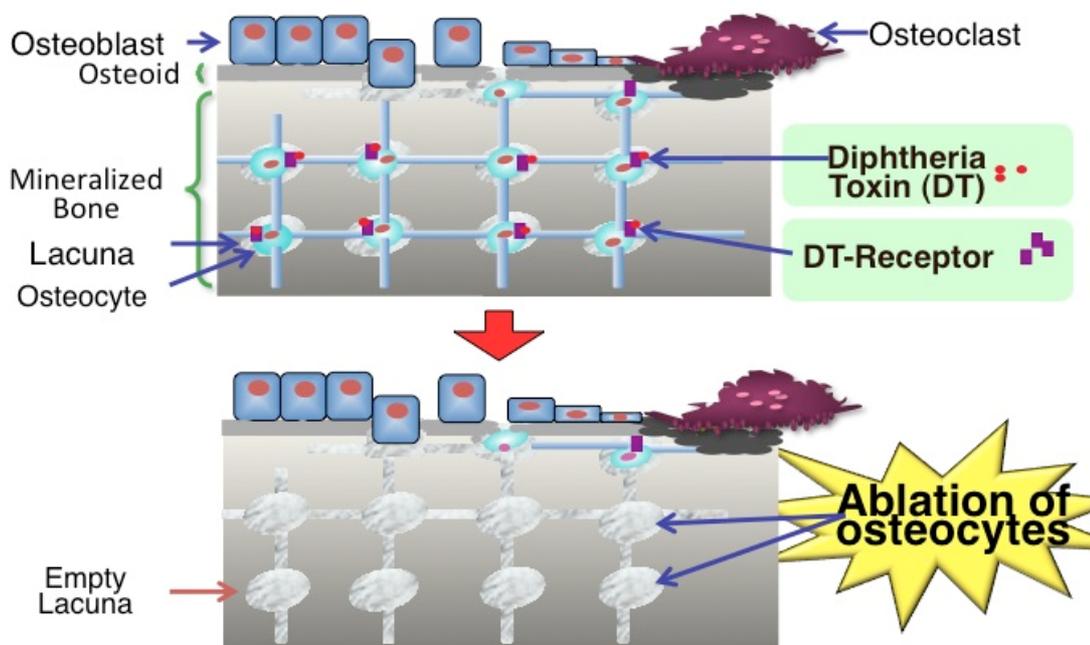
任意の時期に誘導的に作製できる、骨細胞のないマウス¹²を用いて、リン代謝異常が存在するか否かを検討した。骨細胞死滅マウスにおける尿細管リン輸送調節および FGF23、klotho 発現を確認した。

2. 1 骨細胞死滅マウスの作製

8~12 週齢の pDR9.6 Tg マウス(Tg)¹²(Figure 1 参照)、および野生型マウス(WT)にジフテリア毒素(DT)を 1 回投与した(25-50 µg/kg 体重)。室温 23°C の恒温の飼育室で、暗明サイクル(8:00~20:00)のもと実験動物用固形飼料(Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)と滅菌水の自由摂取により飼育した。24 時間尿の解析を行なうため、必要な時には代謝ケージを使用した。また、ジフテリア毒素投与後 9 日目に解剖しサンプルを回収した。なお、動物実験には学内の徳島大学動物実験委員会が設定する徳島大学動物実験管理規則に従った。

2. 2 骨細胞死滅マウスに血液、尿サンプルの解析

各マウスより得た血漿および尿を以下の各種キットを用いて測定した。無機リン濃度:p-メチルアミノフェノール還元法を用いたホスファ C テスト Kit(Wako, Osaka, Japan)、カルシウム濃度:メチルキシレノールブルー発色法を用いたカルシウム E テスト Kit(Wako)、クレアチニン濃度:酵素法を用いた L タイプワコー CRE・M(Wako)、総胆汁酸:総胆汁酸テストワコー(Wako)、BUN:尿素窒素 B-テストワコー(Wako)、グルコース:グルコース C II テストワコー(Wako)、FGF23:FGF-23 ELIZA Kit(KAINO, INC.,



Tatsumi S, Ikeda K et al. *Cell Metabolism* 5, p464-75, 2007

Figure 1. Osteocyte ablation by TRECK (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout) system

Tokyo, Japan)、PTH: Mouse PTH 1-84 ELIZA Kit (Immutopics, California, USA)、1,25(OH)2D3:1,25(OH)2Vitamin D3 ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany)。血中 pH、K⁺、Na⁺、iCa²⁺は血液ガス分析装置ラピッドラボ 248/348 (SIMENSE Japan Tokyo, Japan)を用いて測定した。

2.3 カルシウム・リン出納

24 時間蓄糞により採取した糞を PYREX ビーカーに入れて重量を測定し、電気炉にて灰化を行った。灰化後の糞を定法にしたがい塩酸で溶解しリン及びカルシウム濃度測定を行い血中濃度、摂食量とともにカルシウムおよびリン出納を検討した。

2.4 腎臓及び小腸上皮細胞刷子縁膜の分離

腎臓及び小腸上部・下部の刷子縁膜画分 (Brush border membrane vesicle:BBMV)の調整は Ca 沈降法を用いて行った。BBMV の蛋白濃度は BCA Protein Assay Kit (Thermo)を用いて測定した。

2.5 骨細胞死滅マウスにおけるリン負荷実験

Tg および WT に DT (15, 50 µg/kg 体重)を投与し骨細胞を死滅させたマウス、正常の骨細胞をもつ WT を作製する。DT 投与後 5 日から通常食 (Pi:0.6 %, Ca:0.6%)より高リン食 (Pi:1.2%, Ca:0.6 %)へ変更する。

2.6 統計処理

統計学的解析は Student's test で行った。平均値 ± SEM で表示した。p < 0.05(*)または p < 0.01(**)を有意差ありとした。

3. 研究結果

3.1 骨細胞死滅マウスの作製

すでに、共同研究者である辰巳らにより、任意の時期に骨細胞を特異的に死滅させることの出来るマウスが開発されている (TREC:Toxin Receptor-mediated Cell Knockout) (Figure 1)。本マウスを用いて、リン代謝変動を検討できるように、ジフテリア毒素量を決定した。Tg マウスに 15-50 µg/kg body weight のジフテリア毒素 (DT)を投与した。

3.2 血液および尿生化学解析

Tg マウスに 50 µg/kg body weight のジフテリア毒素 (DT)を投与した。定期的に、代謝ケージを使い糞、尿を回収した。毒素投与後 7 もしくは 9 日目に解剖した。血清カルシウム、リン、尿素窒素濃度、グルコース濃度の値は野生型 (WT)と比べ変化が認められなかった。さらに、血液中のナトリウム、カリウム、カルシウム、pH にも差は認められなかった。一方尿中生化学データについては、クレアチニン補正した尿中カルシウム、ナトリウム、カリウム排泄に有意差は見られなかった。しかし、クレアチニン補正した尿中リン排泄は Tg マウスにおいておよそ 3.1 倍の増加を示した。

3.3 リン代謝調節因子の変動

骨細胞死滅マウスでは尿中リン排泄の亢進より、リン代謝調節因子の検討を行った。骨細胞を減少させたマウスにおいて、血清 FGF-23 は著しく減少した。

一方、血漿副甲状腺ホルモン (PTH)濃度は正常マウスと比較して変化がなかった (Figure 2)。

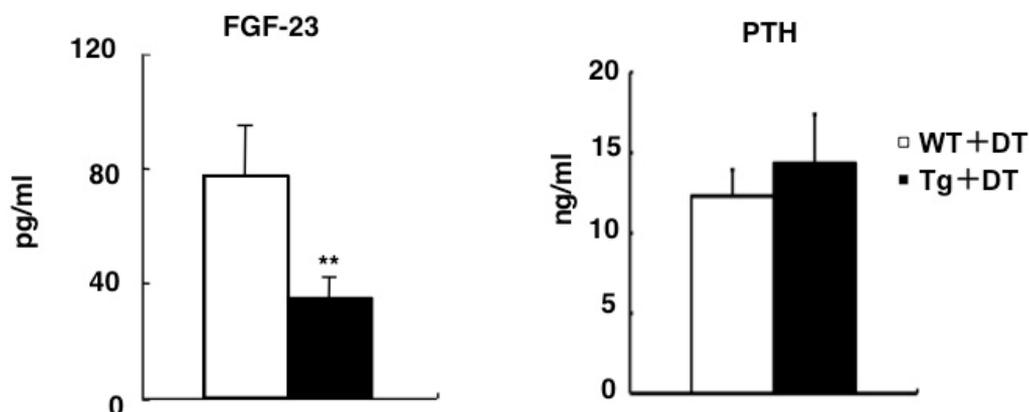


Figure 2. Plasma PTH and FGF23 levels in osteocyte-ablated mice. Ten-week old male wild-type (WT) and transgenic (Tg) mice were injected i.p. with 50 µg/kg body weight DT in 0.9% NaCl at 20 days. The bar graphs are presented as arithmetic means ± SEM (n=5 each group). **p<0.01

3. 4 骨細胞死滅マウスにおける高リン負荷応答

骨細胞を 70%以上死滅させることができる量の DT (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{B.W}$) 投与を WT、Tg マウスに施した。DT 投与後 5 日目の血漿リン濃度、尿中リン排泄を基準とした。高リン水による高リン負荷を施した DT 投与後 9 日目の血漿リン、尿中リン排泄を基準値と比較した結果、血漿リン濃度は各群に有意差は見られなかった (Figure 3)。一方、尿中リン排泄は WT+DT マウスにおいて高リン負荷により尿中リン

排泄の著しい増加が見られ、正常なリン応答を示した。しかしながら、Tg マウスはリン負荷量の違いによる有意な差は示さなかった。

次に、骨細胞死滅の割合を減少させ食餌による高リン負荷を行ったところ、WT+DT 群では著しい尿中リン排泄が認められた。一方 Tg+DT 群では尿中リン排泄の亢進が抑制され、血中リン濃度の上昇が認められた (Figure 4)。

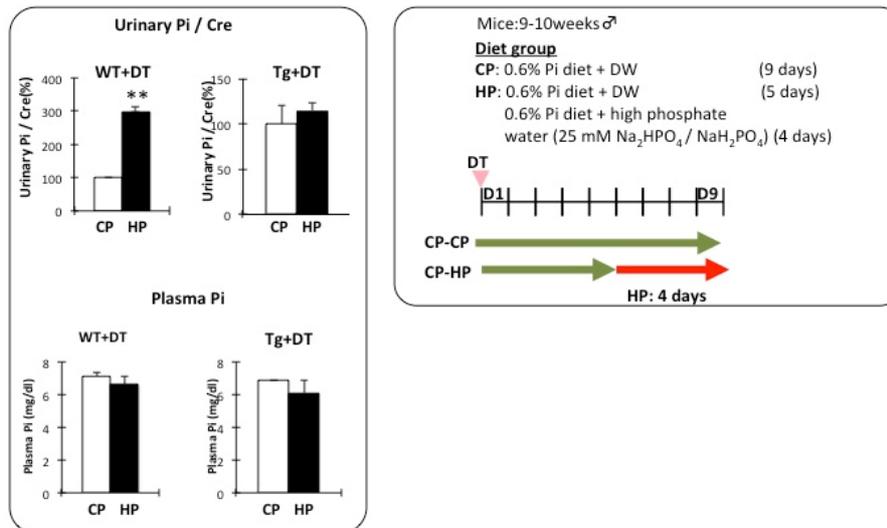


Figure 3. Effect of high Pi loading on urinary Pi and plasma Pi in osteocyte-ablated mice

Ten-week old male transgenic (Tg) mice were injected i.p. with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight DT in 0.9% NaCl at 9 days. The bar graphs are presented as arithmetic means \pm SEM ($n=5$ each group). ** $p<0.01$

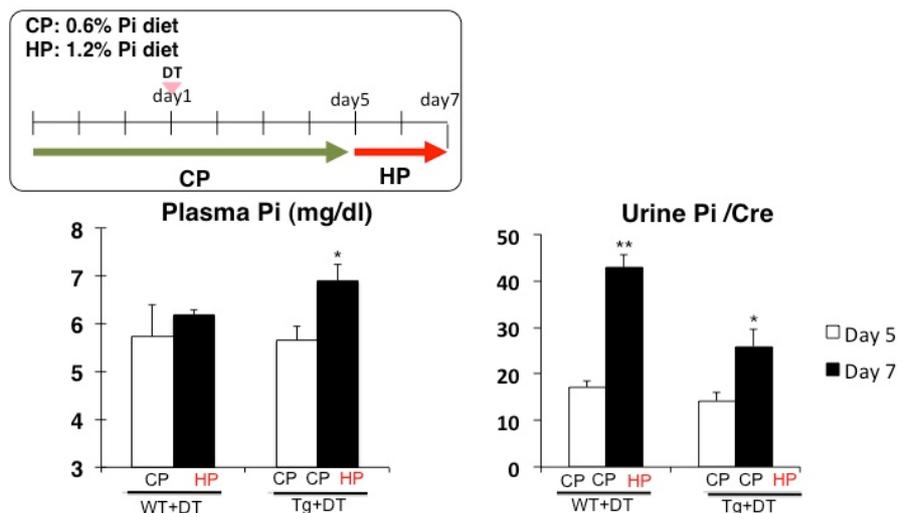


Figure 4. Effect of high phosphate loading on plasma Pi concentration and urinary phosphate excretion in osteocyte-ablated mice.

Ten-week old male transgenic (Tg) mice were injected i.p. with 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight DT in 0.9% NaCl at 9 days.

The bar graphs are presented as arithmetic means \pm SEM ($n=5$ each group). * $p<0.05$, ** $p<0.01$

4. 考 察

骨細胞ではリン調節因子である FGF23、DMP1、MEPE、PHEX が発現している。この中で、FGF23 は高リン状態や活性型ビタミン D によって分泌が亢進され、腎臓において Klotho と FGF receptor 1c (FGFR1c) からなる複合体に結合し、NaPi-IIa および NaPi-IIc の膜局在量を負に調節することで腎臓でのリン再吸収を抑制し、尿中へのリン排泄量を増加させる。この FGF23/Klotho シグナルは同時に、24(OH)ase の遺伝子発現を上昇させ、1,25(OH)₂D の産生を抑制することから腸管におけるリン吸収を低下させる。従って FGF23 は高リン状態を是正する因子と予想された^{4, 6}。しかしながら骨細胞死滅マウスでは、血中 FGF23 濃度の減少を示すが血漿リン濃度に有意な変化は見られなかった¹²。実際、今回再検討を行なっても同様の結果であった。そこから、我々は DT 投与による骨細胞特異的な死滅の誘導により、FGF23 以外のリン排泄因子により尿中リン排泄量の増加が起こると予測した。実際に骨細胞の死滅に伴い、FGF23 の血中濃度は有意に減少していたが (Figure 2)、DT 投与後の骨細胞死滅マウスにおいて血漿リン濃度に変動は見られなかった。一方で、尿中リン排泄量の著しい増加が認められた。さらに PTH 濃度に変動は認められなかった (Figure 2)。よって本マウスにおける異常な尿中リン排泄の亢進は FGF23 や PTH など既存の因子だけでは説明がつかない。骨細胞が腎臓に対して何らかのシグナル伝達を介し、リンを生体内に留める役割を担っていることを提示した。また、新規性のリン利尿促進因子の関与も示唆された。

次に、骨細胞死滅マウスにおいては異常なリン排泄促進が生じることから、本マウスはリン負荷に対する応答性に異常があるのではないかという仮説を立てた。一般的に野生型マウスに高リン負荷を施した際、尿中リン排泄の増加が生じ、血中リン濃度の恒常性は維持される。今回の実験においても野生型マウス通常食群と比較して同マウス高リン食群における尿中リン排泄は有意に増加していた。対照的に骨細胞死滅マウスにおいては、高リン負荷による更なる尿中リン排泄促進の抑制が見られた。以上から骨細胞数の減少は高リン負荷時において、腎臓でのリン排泄に対する応答性の低下に関与すると考えられた (Figure 3, 4)。さらに骨細胞が食餌性リン負荷を感知する細胞である可能性が示唆された。

腎臓でのリン排泄促進を示す例として、詳細なメカニズムは不明であるが、ラットへのニコチンアミド投与が古くから知られている^{13, 14}。最近我々は、ニコチンアミド代謝酵素 Nampt の活性化により NaPi-IIa 発現抑制を介して腎臓リン排泄亢進が生じることを見いだした¹⁵。骨細胞死滅マウスにおけるリン喪失へのニコチンアミド代謝の亢進の関与について調べるため、ニコチンアミド代謝酵素である Nampt の発現量を検討した結果、腎臓における Nampt は有意に増加した (Data not shown)。骨細胞死滅マウスにおける、NaPi-IIa 発現低下に、ニコチンアミド/Nampt 経路の活性化も要因の一つと考えられる。

加齢やリン過剰摂取によりリン利尿が増大すると腎臓に対する負荷が増大し腎機能が低下し慢性腎臓病を進展する¹⁶。本マウスでは尿中リン排泄が著しく亢進しているため、尿細管への高リン負荷状態が持続し腎機能が低下していると考えた。そこで、腎臓の線維化を調べた結果、骨細胞死滅マウスの腎臓で線維化が見られた (Data not shown)。骨細胞の減少は腎老化に関与する可能性が考えられた。

本研究から骨細胞は腎臓とリン代謝において臓器相関があり、リン負荷を感知する細胞である可能性が考えられた。また骨細胞の役割は、体内にリンを適切に保持する役割があると示唆された。

5. 今後の課題

骨細胞は老化や寝たきりなどによりアポトーシスが促進され、減少することが知られている¹⁷。骨細胞の減少に伴い CKD の早期マーカーである FGF23 は減少する。CKD 患者に対する多数の疫学調査により、CKD 患者は高齢者に多いことが分かっている^{18, 19}。老化に伴うネフロン数の減少、骨細胞数の減少により腎機能の低下が起こると考えられる。加えて現代のリン過剰傾向にある食生活から、CKD 患者は今後増え続けることから、今回我々が提示した新しいリン調節因子の同定と、骨細胞のリン感知機構を解明することで、CKD 患者の高リン血症、心血管疾患予防の分子基盤につながるため、研究を継続させたいと考える。

6. 文 献

1. Taketani Y, Segawa H, Chikamori M, Morita K, Tanaka

- K, Kido S, Yamamoto H, Iemori Y, Tatsumi S, Tsugawa N, Okano T, Kobayashi T, Miyamoto K, Takeda E: Regulation of type II renal Na⁺-dependent inorganic phosphate transporters by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Identification of a vitamin D-responsive element in the human NAPI-3 gene. *J Biol Chem* 273: 14575-14581, 1998.
2. Tatsumi S, Miyamoto K, Kouda T, Motonaga K, Katai K, Ohkido I, Morita K, Segawa H, Tani Y, Yamamoto H, Taketani Y, Takeda E: Identification of three isoforms for the Na⁺-dependent phosphate cotransporter (NaPi-2) in rat kidney. *J Biol Chem* 273: 28568-28575, 1998.
 3. Kido S, Miyamoto K, Mizobuchi H, Taketani Y, Ohkido I, Ogawa N, Kaneko Y, Harashima S, Takeda E: Identification of regulatory sequences and binding proteins in the type II sodium/phosphate cotransporter NPT2 gene responsive to dietary phosphate. *J Biol Chem* 274: 28256-28263, 1999.
 4. Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J Biol Chem* 278: 2206-2211, 2003.
 5. Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K: Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* 277: 19665-19672, 2002.
 6. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N: Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J Biol Chem* 280: 2543-2549, 2005.
 7. Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F, Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K: Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol* 20: 104-113, 2009.
 8. Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H: Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci* 100: 3719-3730, 2011 Review.
 9. Segawa H, Aranami F, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K: The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone* 45 Suppl 1: S2-7, 2009 Review.
 10. Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto K: Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in *kltho* mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F769-779, 2007.
 11. Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, Kuwahata M, Segawa H: New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter. *Am J Nephrol* 27: 503-515, 2007.
 12. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K: Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 5: 464-475, 2007.
 13. Kempson SA, Turner ST, Yusufi AN, Dousa TP: Actions of NAD⁺ on renal brush border transport of phosphate in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 249: F948-955, 1985.
 14. Katai K, Tanaka H, Tatsumi S, Fukunaga Y, Genjida K, Morita K, Kuboyama N, Suzuki T, Akiba T, Miyamoto K, Takeda E: Nicotinamide inhibits sodium-dependent phosphate cotransport activity in rat small intestine. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1195-1201, 1999.
 15. Nomura K, Tatsumi S, Miyagawa A, Shiozaki Y, Sasaki S, Kaneko I, Ito M, Kido S, Segawa H, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K, Miyamoto K: Hepatectomy-related hypophosphatemia: a novel phosphaturic factor in the liver-kidney axis. *J Am Soc Nephrol* 25: 761-772, 2014.
 16. Razaque MS: Phosphate toxicity: new insights into an old problem. *Clin Sci (Lond)* 120: 91-97, 2011.
 17. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM: Age and

- distance from the surface but not menopause reduce osteocyte density in human cancellous bone. *Bone* 31: 313-318, 2002.
18. Raymond NT, Zehnder D, Smith SC, Stinson JA, Lehnert H, Higgins RM: Elevated relative mortality risk with mild-to-moderate chronic kidney disease decreases with age. *Nephrol Dial Transplant* 22: 3214-3220, 2007.
19. Imai E, Horio M, Watanabe T, Iseki K, Yamagata K, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Moriyama T, Ando Y, Fujimoto S, Konta T, Yokoyama H, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Prevalence of chronic kidney disease in the Japanese general population. *Clin Exp Nephrol* 13: 621-630, 2009.

Sodium-Dependent Phosphate Transport System in the Kidney-Bone Axis — Phosphate Handling of Osteocytes —

Ken-ichi Miyamoto, Sawako Tatsumi

Molecular Nutrition, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

Summary

Recent studies have shown that alterations in osteocytes metabolism occur in very early stages of chronic renal disease (CKD) and likely mediate altered bone and mineral metabolism in patients with even very mild degree of renal dysfunction. The fibroblast growth factor 23 (FGF23) and dentin matrix protein 1 (DMP1) genetic mutations cause phosphorous (Pi) metabolic disorders. FGF23 and DMP1 are made primarily in osteocytes. These are suggesting that the osteocyte plays the total systemic Pi regulation. In a previous study, we have established a transgenic mouse model, based on the diphtheria toxin (DT) receptor-mediated cell knockout (TRECK) system, in which inducible and specific ablation of osteocytes is achieved in vivo (Tatsumi S *et al.* Cell Metab 2007). Within 48 hours of DT administration, more than 70% the osteocytes were killed. “Osteocyte-ablated” mice exhibited excessive bone resorption, impaired mineralization and adipose tissue proliferation in marrow space, all of which are hallmarks of the ageing skeleton. To analysis the role of osteocyte in Pi homeostasis, we investigated renal Pi handling in the osteocyte-ablate mice. Plasma Pi and calcium concentration were not changed in the ablated mice. Plasma FGF23 levels were significantly decreased and plasma PTH levels were not changed in the ablated mice. Urinary Pi excretion was markedly increased and renal sodium dependent Pi cotransporter NaPi-IIa protein levels were significantly decreased in the ablated mice. Thus, the osteocyte-ablated mice show increased renal Pi excretion. In addition, dietary Pi manipulation was not affected Pi excretion in the osteocyte-ablated mice. We concluded that FGF23 and PTH independent system is involved in Pi homeostasis in the osteocyte-ablated mice.