

論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍状石灰沈着症発症における線維芽細胞増殖因子 23 の役割

指導教員 五十嵐 隆教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

新谷かおり

近年、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone ; PTH) とは独立して血清リン濃度を調節する液性因子として、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor ; FGF) 23 が同定された。FGF23 は、近位尿細管でのリン再吸収を担う NaPi2a、 NaPi2c の発現を低下させることで尿中リン排泄を促進する。また FGF23 は、腎で 1,25(OH)₂D 産生酵素である 25-水酸化ビタミン D-1 α 水酸化酵素の発現を抑制するとともに、1,25(OH)₂D を不活性物質に代謝する 25-水酸化ビタミン D-24 水酸化酵素の発現を亢進させる。こうした機序によって FGF23 は、血清リン濃度を低下させる作用を持つ。

FGF23 は、251 個のアミノ酸からなるポリペプチドである。N 端側の 24 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが離脱した後、アミノ酸 227 個からなる分子量約 32 kD の全長 FGF23 が分泌される。一部の全長 FGF23 タンパクは、プロテアーゼによってアルギニン 179 とセリン 180 の間でプロセッシングを受け、N 端フラグメント FGF23 と C 端フラグメント FGF23 に分かれる。全長 FGF23 のみが低リン血症を惹起する活性を有しており、N

端、C 端フラグメントはともに活性がない。

近年、いくつかの低リン血症性疾患が過剰な FGF23 活性により惹起されることが明らかにされた。すなわち、*FGF23* は常染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia ; ADHR) の病因遺伝子として同定された。

一方 X 染色体優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia ; XLH) の原因遺伝子として *PHEX* (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) 遺伝子が同定されている。詳細なメカニズムは明らかになっていないが、XLH の患者血中で FGF23 の上昇が認められている。

また腫瘍性くる病・骨軟化症 (tumor-induced rickets/osteomalacia ; TIO) は、主に中胚葉系良性腫瘍に随伴してみられる低リン血症性くる病・骨軟化症である。FGF23 は、この TIO の惹起因子としても同定された。腫瘍組織における FGF23 の過剰産生が低リン血症を惹起すると考えられている。

TC は、異所性石灰化を特徴とする疾患である。本研究では家族性高リン血症性 TC について検討した。家族性高リン血症性 TC は小児期に発症し、皮下を主とする異所性石灰化とリン再吸収亢進による高リン血症を特徴とする常染色体性劣性の遺伝性疾患である。

ADHR、XLH、TIO では、近位尿細管でのリン再吸収率の低下と血清 1,25(OH)₂D 濃度の相対的な低下が認められる。一方 TC では、リン再吸収率の上昇と血清 1,25(OH)₂D 濃度の相対的な上昇が認められる。従って本症は、ADHR、XLH、TIO とは鏡面像的な疾患であるといえる。

低リン血症性疾患の発症における FGF23 の関与は既に確立されている。一方 FGF23 と高リン血症性疾患との関連には不明な点が多い。そこで高リン血症を伴う TC の発症における FGF23 の関与を明らかにすることを目的とした。

TC の 1 家系と XLH 患者 16 名を対象とした。臨床的に XLH と診断された患者 16 名に

においても、TC 患者と同様に血清 FGF23 濃度を測定した。

FGF23 値の測定法としては、enzyme-linked immunosorbent(ELISA)法による全長アッセイと C 端アッセイとがある。全長アッセイは、プロセッシング部位の N 端側と C 端側に対する 2 種類のモノクローナル抗体を用いて全長 FGF23 のみを測定する。一方 C 端アッセイは、C 端側に対する 2 種類のポリクローナル抗体を用いて、全長 FGF23 と C 端フラグメントの両者を測定する。

症例は 28 歳のアラビア人男性で、両親はいとこ婚である。小児期より、白色分泌物を伴う皮下腫瘍を左肩甲骨周囲と左股関節周囲に自覚していた。家系図から、本疾患が常染色体劣性遺伝様式をとることが推察された。血清リン濃度は 5~10 mg/dl (基準値 : 2.5~4.5), リン再吸収率 (tubular reabsorption of phosphate; TRP) は 96~100% (80~95) と高値であった。また血清 1,25(OH)₂D 濃度も 59~89 pg/ml (15~55) と高値であった。

XLH 患者では、全長アッセイの FGF23 濃度と C 端アッセイでの FGF23 濃度に有意の正相関関係が認められた。一方本症例の血清 FGF23 は、全長アッセイと C 端アッセイで以下のような乖離を示した。すなわち全長アッセイでは FGF23 濃度は正常低値であった。これに対し、C 端アッセイでは著明な高値であった。これらの結果より、本患者血中には全長 FGF23 が少量しか存在していないこと、その一方で、プロセスされた C 端フラグメントが蓄積していることが示唆された。

この全長アッセイと C 端アッセイとの FGF23 値の乖離の原因を明らかにするため、本症例の *FGF23* 遺伝子を解析した。コドン 129 においてセリンがフェニルアラニンに変換されるミスセンス変異が同定された。本症例はこの変異のホモ接合体であった。

次に S129F 変異が FGF23 タンパクに及ぼす影響を明らかにするために、in vitro で S129F 変異型 FGF23 を発現させて、培養液と細胞融解液をウエスタンブロット法で分析した。野生型 FGF23 を発現させ、培養液を抗 N 端抗体と抗 C 端抗体を用いてウエスタンブロットすると、全長 FGF23 とプロセスされたフラグメントの両者が観察された。一方

S129F 変異型では、培養液中に全長 FGF23 と N 端フラグメントはほとんど検出できず、C 端フラグメントのみ認められた。従って、S129F ミスセンス変異によって全長 FGF23 タンパクのプロセッシングが亢進したと考えられた。さらにコドン 129 のセリンの重要性を調べるため、他のいくつかの変異型 FGF23 を作成した。S129A 変異型の培養液では、野生型に比べて全長 FGF23 もプロセスされたフラグメントも減少していた。一方、S129T 変異型、S129W 変異型の培養液では S129F 変異型と同様に全長 FGF23 と N 端フラグメントの消失が認められた。また培養液中の全長 FGF23 タンパク濃度を測定すると、これらの変異 FGF23 では明らかな低値が認められた。従って、これらの変異型 FGF23 では、全長 FGF23 タンパクの分泌が低下していることが示された。さらに細胞融解液をウエスタンブロットで解析すると、野生型においても変異型 FGF23 タンパクを合成する細胞と同様に、30 kD あたりにバンドが検出された。全長 FGF23 タンパクよりもやや分子量が小さいこれらのタンパクの本態は明確にはわかっていないが、未成熟な FGF23 タンパクである可能性がある。つまりこれらの結果はコドン 129 におけるセリンが、全長 FGF23 タンパクの成熟と分泌に欠くことのできないものであることを示していると考えられる。

近年、FGF23 の生理作用を検討するため、FGF23 ノックアウトマウスが作成された。この TC と FGF23 ノックアウトマウスの病態の類似性は、TC が FGF23 作用不全による疾患であることを示唆している。

また、これまでの研究で以下の知見により、*FGF23* 遺伝子発現は血中リン濃度などにより厳密に調節されているものと考えられている。第 1 に、*FGF23* ノックアウトマウスのヘテロ接合体は、野生型と同様の表現型、血清リン値、FGF23 値を示す。第 2 に TIO の責任腫瘍を除去した直後には、腫瘍摘出前は高値であった FGF23 値が検出感度以下の低値になる。このことは慢性の低リン血症下では、正常組織における FGF23 産生が抑制されていることを示している。第 3 に FGF23 濃度は、げっ歯類においては高リン食を与えると上昇する。またヒトにおいても、慢性腎不全やリン負荷が血清 FGF23 値を上昇させることがわか

っている。したがってこの症例で C 端アッセイでの FGF23 濃度が上昇していたのは、高リン血症、あるいは高リン血症に伴う他の代謝変化に対する代償的な FGF23 産生の亢進によるものであると考えられる。FGF23 遺伝子の S129F ミスセンス変異によって全長 FGF23 タンパクのプロセッシングの亢進がおこり、活性を有する全長 FGF23 タンパクが減少することによって高リン血症が惹起され、代償性変化をもたらすと推測される。

また、本研究では細胞融解液のウエスタンブロットでは、25~30kDa の大きさのタンパクが検出された。このタンパクの本態は明確にはわからないが、全長 FGF23 よりもやや分子量が小さいことから、糖化が不十分である FGF23 タンパクを表している可能性がある。このタンパクは細胞融解液中において野生型と変異型 FGF23 の両方で検出された。一方細胞融解液中では野生型においても、変異型 FGF23 と同様に、糖化が完成していると考えられる 32kDa の全長 FGF23 を示すバンドは認められなかった。したがって糖化が完了した FGF23 は細胞内に蓄えられず、迅速に細胞外に分泌されていると考えられる。

これらの結果から、FGF23 ノックアウトマウスの場合と同様に FGF23 は生理的なリンと 1,25(OH)₂D の調節因子であることを最後に言う。