

## 論文の内容の要旨

論文題目 線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor: FGF)23 の産生、  
及び血中濃度調節機構に関する研究

指導教員 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学(内分泌病態学)専攻

氏名 伊東 伸朗

### [背景]

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF)23 は、FGF ファミリーの一員として同定された蛋白である。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)の原因遺伝子として同定され、腫瘍性くる病/骨軟化症 (tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO)における低リン血症惹起液性因子であることも報告された。FGF23 は腎近位尿細管における 2a、2c 型ナトリウム-リン共輸送体の発現抑制と 25-水酸化ビタミン D-1 $\alpha$ -水酸化酵素発現を低下させることにより、血中リン濃度を低下させる。一部の FGF23 蛋白は不活性なフラグメントに切断される。また FGF23 ノックアウトマウスが著明な高リン血症を起こすことや、正常健常人において高リン負荷や低リン食で、FGF23 血中濃度がそれぞれ上昇、低下することから、FGF23 は血中リン濃度の生理的調節因子と考えられる。この FGF23 の測定系には、活性を持つ全長 FGF23 のみを測定する全長 FGF23 測定キットと、全長 FGF23 と共にプロセッシングを受けた活性をもたないC端フラグメントも測り込むと考えられるC端 FGF23測定キットが利用可能である。

### ー リン代謝異常と FGF23 ー

ADHR や TIO に加え、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)や常染色体劣性低リン血症性くる病/骨軟化症

(autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ARHR)などの疾患も過剰な FGF23 活性により惹起されることが報告された。逆に、尿細管でのリン再吸収亢進による高リン血症と、高 1,25 (OH)<sub>2</sub>D 血症、異所性石灰化を特徴とし、ADHR や ARHR、XLH と鏡像をなす疾患として、家族性腫瘍状石灰沈着症 (familial tumoral calcinosis: FTC)が知られている。FTC の原因遺伝子としては *FGF23* 遺伝子と、蛋白のムチン型 O 型糖鎖付加を媒介する酵素である UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase3 (ppGaNTase-T3)をコードする *UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase3 (GALNT3)*遺伝子が報告されている。

#### － FGF23 の産生調節 －

FGF23 の血中濃度調節機構に関しては、前述の正常健常人における高リン負荷、低リン食の報告がある。これに加え慢性腎不全などの慢性高リン血症状態でも、FGF23 が上昇すると報告されている。さらに動物モデルにおいても、経口リン負荷や、1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 負荷により FGF23 が上昇することが知られている。また FGF23 のリンの変動に対する反応時間に関しては、数日単位であることが報告されている。一方 *In vitro* では、リンや 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の刺激により、マウス *FGF23* のプロモーター活性が上昇するという報告が散見される。

#### [目的]

しかし、各種リン代謝異常症患者の血中 FGF23 濃度測定の意義や測定法の相違、*GALNT3* 遺伝子変異による FTC の発症における FGF23 の関与、更には血中 FGF23 の濃度調節、産生調節機序は明らかでない。そこで下記の点を明らかにするために以下の検討を行った。

1. 低リン血症性疾患 (XLH、TIO)、および高リン血症性疾患 (FTC (*FGF23*、*GALNT3* 遺伝子変異))患者における FGF23 濃度測定の意義、測定法の相違を明らかにする。
2. *GALNT3* 遺伝子変異による FTC 発症機序を明らかにする。
3. 血中 FGF23 濃度がリンにより直接制御されているかどうかを、*in vivo* および *in vitro* で検討する。

#### [方法]

ヒトでの検討は、東京大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得て行った。

#### － XLH、TIO、FTC 患者の血中 FGF23 濃度 －

全長及び C 端 FGF23 測定キットを用いて、TIO 患者 13 名と XLH 患者 29 名、及び 3 名の既に *FGF23*、*GALNT3* 遺伝子変異が判明している FTC 患者の血清 FGF23 を測定した。

－ HOS TE-85 細胞における *GALNT3* 遺伝子 siRNA の FGF23 切断に対する影響 －

ヒト骨芽細胞様細胞HOS TE-85に、*GALNT3*遺伝子に対するsiRNAとFGF23発現ベクターをトランスフェクトした。細胞内のppGaNase-T3の発現と、培養上清中の全長FGF23と FGF23 C端フラグメントをウェスタンブロッティングで確認するとともに、培養上清中の FGF23を2種類のキットで測定した。

－ 急激な高リン、低リン負荷による血中 FGF23 濃度の変化 －

健常成人男性4名にリン負荷としてリン酸二カリウム液の持続静注 (10mEq/hour)を4時間施行した。同様に4名が150gの炭水化物を経口摂取し、それぞれ0~6時間の血清リン、FGF23を前値と1時間ごとに全長 FGF23 測定キットで測定した。

－ 培養上清中のリン濃度調節による HOS TE-85 細胞内のシグナル伝達の変化 －

HOS-TE85で、培養上清中のリン濃度を0、1、5 mMに変化させ、0、30、60分後の細胞融解液におけるERK (Extracellular signal-regulated protein kinase)1/2、p-ERK (phosphor-ERK)1/2の発現の比率をウェスタンブロッティングにより確認した。

－ *FGF23* 遺伝子プロモーター領域の解析 －

各種の長さのヒト *FGF23* 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに導入した。これらのプロモーターベクターを HOS-TE85 にトランスフェクトし、プロモーター活性を検討した。またプロモーターベクターをトランスフェクトした4時間後に、メディアウム中のリン濃度を1、5、10 mMに変更してプロモーター活性を比較した。

[結果]

－ 各種疾患における FGF23 濃度 －

XLH患者の血清 FGF23 値は全長 FGF23 測定キットでは29例中24例 (82.8%)、C端 FGF23 測定キットでは29例中13例 (44.8%)が基準値上限以上であった。

TIO患者の血清 FGF23 濃度は、全長 FGF23 アッセイでは全例が、C端 FGF23 測定キットでは13例中10例 (76.9%)が基準値上限以上であった。*FGF23* 遺伝子変異による FTC患者では、全長 FGF23 の値は11.0 pg/ml と基準値内低値であったのに対し、C端 FGF23 の値は2948 RU/ml と異常高値であった。また *GALNT3* 遺伝子変異による FTC患者2例でも、全長 FGF23 の値は12.1、7.0 pg/ml と基準値内低値、または低値であったのに対して、C端 FGF23 の値は4700、1478 RU/ml と異常高値であった。

－ FTC の発症機序 －

*GALNT3* 遺伝子に対する siRNA により ppGaNase-T3 の発現は抑制された。ppGaNase-T3

の抑制により全長 FGF23 が減少したのに対して、C 端フラグメントは増加 (124.3 %)した。また培養上清中の FGF23 濃度でも、全長アッセイでは 60.9 %に減少していたにもかかわらず、C 端アッセイでは有意な変化を認めなかった。

#### － FGF23 産生調節 －

リン酸二カリウム液静注負荷により、血清リンは 3 時間目で前値の 186 %まで有意に上昇した。炭水化物経口摂取負荷では、血清リンは 2 時間目で前値の 81 %と有意な低下を認めた。しかしいずれの実験においても、血中 FGF23 の有意な変動は認められなかった。

HOS-TE85 の培養上清中のリン濃度を 5 mM に上昇させた場合、細胞内の ERK のリン酸化の亢進が認められた。

コントロールと比較し、*FGF23* のプロモーターベクターは何れも有意な活性の上昇を示した。また 1826 bp にてコントロールの 9.1 倍と最も高い活性を示した。培養上清中のリン濃度を 1、5、10 mM に変更しても、*FGF23* 遺伝子プロモーター活性の有意な変化は認められなかった。

#### [考察]

XLH 患者と TIO 患者の血中 FGF23 の測定により、全長アッセイの方が、XLH、TIO の診断に感度が高いことが示唆された。

*FGF23*、*GALNT3* 遺伝子変異による FTC 患者血清では、いずれも全長 FGF23 測定キットでの測定値が低値を示し、C 端 FGF23 測定キットでの測定値が著明に増加していた。このことから、全長アッセイと C 端アッセイによる FGF23 測定値は、疾患によっては乖離し、これらの測定法の意義は異なることが示された。またこれらの患者血中では、全長 FGF23 は存在したとしてもごくわずかであるのに対し、C 端フラグメントは著明に増加していることが考えられる。このことは、これらの疾患では FGF23 蛋白のプロセッシングの亢進から全長 FGF23 が低下し、全長 FGF23 作用不全による高リン血症、もしくは高 1,25 (OH)<sub>2</sub>D 血症などにより FGF23 の産生が促進されるためであると想定される。これらの結果から、*FGF23* 遺伝子や *GALNT3* 遺伝子変異による FTC の診断には、全長、C 端 FGF23 測定キットの併用が有用と考えられた。

更に *in vitro* の実験で、FGF23 蛋白への O 型糖鎖付加には、FGF23 を切断酵素による切断から保護する作用があることが示唆された。

急激な高リン、低リン負荷による実験の結果から、血清リン濃度の急激な変動に対して、血清 FGF23 は 6 時間までの範囲では変化を示さないことが示された。

ヒト *FGF23* 遺伝子のプロモーターの検討では、血清中のリン濃度の変化は、HOS-TE85 によって感知されるものの、FGF23 の産生を直接には変化させない可能性が示された。ただし、株化された細胞で FGF23 を充分発現する細胞が存在しないこと、生体のリン感知機構が不明であることもあり、本検討ではリンの FGF23 産生における作用を解明することは

できなかった。

#### [結語]

今回の検討により、血中 FGF23 の測定はリン代謝異常症の病態の把握に有用であること、XLH と TIO においては、全長 FGF23 測定キットの方が C 端 FGF23 測定キットより、診断感度が優れていることが示された。また 2 種類の FGF23 測定法の臨床的意義は異なり、FTC では、両測定キットの併用が診断に有用であることが判明した。さらに *FGF23* 及び *GALNT3* 遺伝子変異による FTC の病因が、FGF23 蛋白のプロセッシングの亢進にあることが明らかとなり、*GALNT3* 遺伝子変異が、おそらく O 型糖鎖付加の障害を介して、FGF23 蛋白の易切断性を惹起していることも確認できた。

一方 FGF23 濃度や産生調節については、急激な血中リン濃度の変化は、6 時間以内には血中の FGF23 濃度を変化させないことが明らかとなった。また *in vitro* の実験系では、細胞外リン濃度の上昇により細胞内情報伝達系に変化は認められたが、*FGF23* 遺伝子のプロモーター活性は変化しなかった。

今後は、FGF23 が関与する低リン、高リン血症性疾患の治療法の開発のためにも、FGF23 産生調節機構の更なる解明が必要と考えられる。