

論文の内容の要旨

論文題目 繊維芽細胞増殖因子 FGF23 の生理作用と受容体に関する研究

氏名 浦川 到

生体においてリンは全ての組織、細胞に不可欠の構成要素であり、生理機構で非常に重要な役割を果たしている元素の一つである。生体内に保持されるリンの量は摂食による小腸からの吸収と腎臓での尿中への排泄によって調節されており、血中のリン濃度はほぼ一定になるような恒常性が存在している。一方、何らかの理由でリン代謝機構に破綻が生じ、血中のリン濃度を一定に保てなくなる病態が存在する。低リン血症性くる病・骨軟化症は、腎臓でのリンの再吸収の低下と血中の活性化ビタミン D である 1,25-dihydroxy vitamin D(1,25(OH)₂D)の上昇不全により、小児ではくる病、成人では骨軟化症の症状を示す疾患である。先天性の疾患としては、伴性優性低リン血症性くる病・骨軟化症(X-linked hypophosphatemic rickets / osteomalacia : XLH)、常染色体性優性低リン血症性くる病・骨軟化症(Autosomal dominant hypophosphatemic rickets / osteomalacia : ADHR)などが知られており、後天性の疾患としては、腫瘍性くる病・骨軟化症(Tumor induced rickets / osteomalacia : TIO)が知られている。

繊維芽細胞増殖因子(FGF)23はこれらの疾患の原因分子として同定されたアミノ酸251個より構成されるポリペプチドであり、N末端部分に24アミノ酸からなるシグナル配列を有する分泌タンパク質である。FGF23の生理活性は、腎臓での尿中リン再吸収抑制による血清リン低下作用と、1,25(OH)₂D活性化酵素CYP27b1の発現抑制および不活性化酵素CYP24の発現亢進による1,25(OH)₂Dの低下が報告されているが、低リン血症性くる病におけるFGF23の作用機序を解明することは、これらの疾患の治療に役立つと考えられる。そこで、筆者らは低リン血症性くる病・骨

軟化症における FGF23 作用の解析と、病態惹起機構の解明、さらには FGF23 受容体機構の解明を目的として本研究を行なった。

まずは、FGF23 が生後から高値である状態が生体にどのような影響を与えるのかについて評価を行なう為、FGF23 のトランスジェニックマウスを作製し、表現型の解析を行なった。その結果、FGF23 トランスジェニックマウスは成長障害、生殖異常、リンパ球産生異常、血中リン低下、血中 1,25(OH)₂D、骨形態異常、など様々な表現型を示し、低リン血症性くる病様の症状と類似する結果となった。これらのことから、持続的な FGF23 の高値がくる病様の表現型を引き起こすことが示された。

表1 FGF23トランスジェニックマウスの血清および尿中パラメータ

	non-transgenic	transgenic
Serum phosphate (mg/dL)	7.49 +/- 0.26	3.41 +/- 0.45**
Serum calcium (mg/dL)	8.34 +/- 0.10	7.88 +/- 0.10**
Serum 1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	100.9 +/- 0.5	29.2 +/- 0.1**
Serum PTH (pg/dL)	11.9 +/- 1.6	3.0 +/- 1.5*
FEPI (%)	18.9 +/- 1.9	38.6 +/- 7.6*

次に、常染色体性優性低リン血症性くる病・骨軟化症 (ADHR) における FGF23 の変異が病態の惹起にどのように関連するのかについて解析を行なった。ADHR 患者の FGF23 は、176 番目のアルギニン残基がグルタミン残基、もしくは 179 番目のアルギニン残基がグルタミン残基又はトリプトファン残基へのミスセンス変異が明らかになっている。これらの変異が確認される領域のアミノ酸配列は、RXXR という furin 様プロテアーゼの認識配列と一致する。野生型の FGF23 を CHO 細胞で産生させると、全長の FGF23 分子の培養上清中への分泌と共に、この領域で切断された部分断片が確認された。一方、R176Q、R179Q、および R179W 変異の入った FGF23 を CHO 細胞で発現させたところ、全長 FGF23 の産生が増加し、部分断片の産生が抑制された。また、FGF23 の部分断片を正常マウスに投与しても血清リンの低下作用および血清 1,25(OH)₂D の低下作用は確認されなかった。これらのことから、ADHR で確認される FGF23 の変異は FGF23 の細胞内プロテアーゼに対する切断耐性をもたらし、このことによる全長 FGF23 の産生の安定化が病態の惹起に繋がっていることが示唆された。

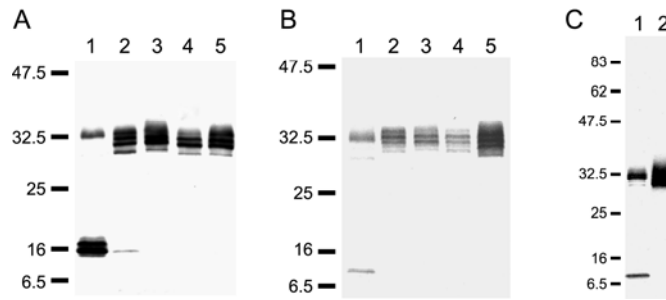


図1 変異 FGF23 タンパク質のウェスタンブロッティングによる解析

(A, B) 各種変異 FGF23 を一過性に発現させた Peak rapid 細胞の培養上清を用いてウェスタンブロッティングを行なった。野生型 FGF23 (レーン 1)、FGF23(R176Q) (レーン 2)、FGF23(R179Q) (レーン 3)、FGF23(R179W) (レーン 4)、FGF23(R176Q, R179Q) (レーン 5)。(A) 抗 FGF23 (P148) 抗体、(B) 抗 His タグ抗体。(C) 野生型 FGF23 および変異 FGF23(R176Q, R179Q) を安定的に発現する CHO 細胞の培養上清を用いたウェスタンブロッティング。用いた抗体は抗 His タグ抗体。

FGF23 は骨から分泌され、血中を循環し、腎臓に作用するという内分泌様の性質を示す分子であり腎臓には FGF23 に対する受容体が存在すると考えられた。そこで筆者らは、FGF23 特異的受容体機構を解明する目的で、腎臓での FGF23 応答遺伝子の探索を cDNA アレイを用いて行った。FGF23 投与 1 時間後のマウスの腎臓の解析から、初期応答遺伝子である Egr-1 遺伝子の発現上昇が認められた。Egr-1 遺伝子は MAP Kinase の活性化に伴ない発現上昇することが報告されていたことから、FGF23 投与 10 分後のマウス腎臓での MAP Kinase である ERK1/2 のリン酸化を確認したところ、FGF23 投与によって ERK1/2 のリン酸化亢進が認められた。そこで、この Egr-1 遺伝子発現上昇を指標に FGF23 応答臓器を検索したところ、腎臓の他に副甲状腺と下垂体が FGF23 応答臓器として見出された。これらのことから、FGF23 特異的受容体機構は、腎臓、副甲状腺、および下垂体、に存在することが予想された。

FGF23 特異的な受容体機構が腎臓に存在すると考えられたことから、マウス腎臓のホモジネートより FGF23 に結合する分子の探索を行なった。FGF23 結合ビーズとマウス腎臓ホモジネートを混合し、FGF23 に結合する分子を探索した結果、約 130kDa の分子が FGF23 結合ビーズに特異的に結合することが認められた。この結合分子を TOF-Mass にて解析したところ、この FGF23 結合分子は Klotho であることが明らかとなった。

Klotho は分子量約 130kDa の 1 型膜タンパク質であり、細胞外に 2 つの β グリコシダーゼ様ドメインとそれに続く膜貫通ドメイン、および 11 アミノ酸からなる非常に短い細胞内ドメインから構成される。Klotho 遺伝子は腎臓で強く発現が認められ、副甲状腺、下垂体、脳脈絡叢なども発現臓器として報告されており FGF23 応答臓器とよく重なる。外来遺伝子挿入により Klotho 遺伝子の発現に障害を受けているマウスでは、短命、成長障害、生殖機能障害、リンパ系組織萎縮、異所性石灰化、高リン血症、高カルシウム血症、高 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ などの表現型を示すが、これらの表現型は FGF23 欠損マウスと酷似している。この Klotho 発現低下マウスの血中の FGF23 濃度を測定したところ、このマウスの FGF23 濃度は正常マウスの約 2000 倍以上に上昇していた。Klotho 発現

低下マウスの FGF23 の異常高値にもかかわらず、このマウスの表現型は FGF23 欠損マウスと非常に良く似ていること、また Klotho 発現低下マウスに FGF23 組換え体を投与しても血清リンの低下や 1,25(OH)₂D の低下は確認されないことから、Klotho 発現低下マウスでは FGF23 作用が破綻していることが考えられた。このことを細胞レベルで証明する為に、FGF23 に応答しない腎臓由来培養細胞 (HEK293 細胞) に Klotho を発現させたところ、FGF23 を投与した腎臓と同様に、FGF23 刺激によって ERK1/2 のリン酸化亢進と Egr-1 遺伝子発現上昇が確認された。これらのことから、Klotho 分子は FGF23 の作用に必須の因子であると考えられた。

Klotho 分子は細胞膜貫通領域を有する膜タンパク質であるが、細胞内領域は非常に短く、この部位のみでは細胞内へのシグナル伝達を行なうことは困難と予想された。このことから FGF23 のシグナル伝達には Klotho 以外の別の分子が介在している可能性が考えられた。そこで、FGF 受容体を発現していない細胞に各種 FGF 受容体と Klotho を共発現させたところ、FGFR1c 受容体と Klotho を共発現させたとき、顕著な FGF23 応答性が認められた。また、実際に FGF23 刺激をした Klotho 発現細胞の FGFR1c のリン酸化を調べた結果、FGF23 刺激によって FGFR1c のリン酸化亢進が認められた。FGFR1c と Klotho の結合を調べたところ、FGFR1c と Klotho の結合が認められ、さらに FGF23 と FGFR1c および Klotho はヘパリン存在下において複合体を形成することが確認された。以上のことから、Klotho と FGFR1c 複合体が FGF23 受容体として機能しており、Klotho の臓器特異性が FGF23 作用の臓器特異性を決定していることが示唆された。

以上の様に、本研究により FGF23 が低リン血症性くる病の病態惹起と深く関連することが明らかとなった。また、Klotho が既知の FGF 受容体と結合することによってリガンド特異性が転換するという特徴的な受容体機構が発見された。今後、FGF23-Klotho 作用の更なる理解の進展により、FGF23 作用を制御する物質の創薬研究が進み、リン代謝・ビタミン D 代謝の調節による疾患治療応用への展開が期待される。

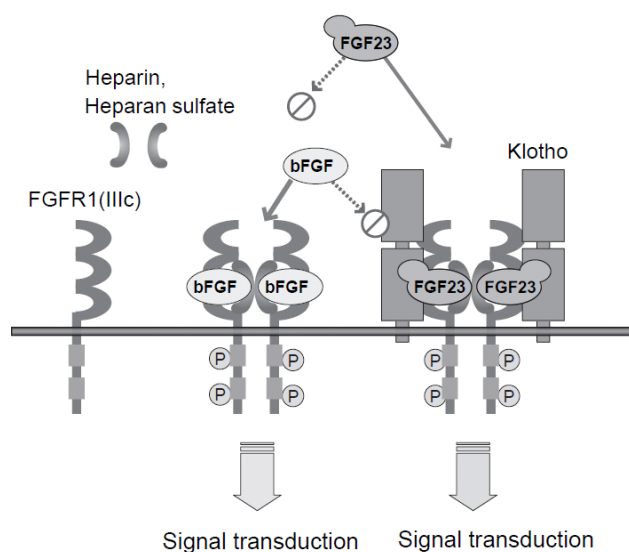


図2 FGF23 特異的受容体のモデル図