

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 浦川 到

生体必須元素であるリンは、摂食による小腸からの吸収と腎臓での排泄・再吸収によって保持量が調節されている。血中リン濃度の低下は、くる病や骨軟化症の原因となるが、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 251 アミノ酸の分泌タンパク質である。本論文は、FGF23 による病態惹起機構と受容体分子の解明を目的とした研究の成果をまとめたもので、5章から成っている。

第1章では、生体におけるリンの役割と調節、低リン血症性疾患、FGF23 の研究開始時までの知見をまとめ、研究の目的と意義を述べている。FGF23 の作用は、腎臓における尿中リン再吸収抑制と活性化ビタミンD量低下が知られていた。

第2章では、生後から FGF23 が高値だと生体にどう影響するか評価するため、ヒト FGF23 高発現トランスジェニックマウスを作製し表現型を解析した。このマウスは、成長障害、生殖異常、リンパ球産生異常、血中リン低下、活性化ビタミンD量低下、骨形態異常など、低リン血症性くる病類似の表現型を示し、FGF23 高値が病態の原因になることが示された。

第3章では、常染色体性優性低リン血症性くる病(ADHR)にみられる変異型 FGF23 と病態の関連性を解析した。ADHR 患者の FGF23 には、R176Q, R179Q, R179W などのミスセンス変異がある。この領域は、furin 様プロテアーゼの認識配列 RXXR と一致することから、FGF23 の切断耐性化と病態の関係を予想した。CHO 細胞で野生型 FGF23 を産生させると、全長タンパク質と上記領域で切断を受けた部分断片が培養上清に検出された。一方、変異型 FGF23 では、全長の産生量が増加し、部分断片の産生は抑制された。部分断片を正常マウスに投与しても、全長が起す血清リン濃度の低下は認められなかったことから、変異 FGF23 はプロテアーゼに対して安定化し病態を惹起していることが示唆された。

第4章では、FGF23 の受容体機構を解析した。FGF23 は、骨から分泌され、血中を循環し、腎臓に作用することから、腎臓に FGF23 の特異的受容体が存在するはずである。FGF23 投与 1 時間後に腎臓で発現上昇する遺伝子を cDNA アレイにより調べたところ、MAP kinase 活性化に応答する Egr-1 遺伝子が捕まえられた。マウス腎臓の MAP kinase ERK1/2 のリン酸化は、FGF23 投与 10 分後に確認された。Egr-1 遺伝子発現上昇を指標に FGF23 応答臓器を探索すると、腎臓の他に副甲状腺と下垂体が見出され、これらに FGF23 受容体が存在することが分かった。

FGF23 固定化ビーズに結合する分子を、マウス腎臓ホモジネートから探索し、分子量約 130K の 1 型膜タンパク質 Klotho を同定した。Klotho 遺伝子発現臓器は、腎臓、甲状腺、下垂体、脳脈絡叢で、FGF23 応答臓器と一致する。Klotho 遺伝子障害マウスは、成長障害、生殖障害、リンパ組織萎縮、異所性石灰化、高リン血症、高カルシウム血症、高活性化ビ

タミンD量など、FGF23 欠損マウス酷似の表現型を示す。血中 FGF23 濃度は正常マウスの 2000 倍以上に上昇しており、FGF23 を投与しても血清リン濃度などの応答は認められなかった。FGF23 の異常高値にもかかわらず、それに応答しないことから、Klotho は FGF23 の受容に必須である。元来 FGF23 に応答しない腎臓由来培養細胞(HEK293)に Klotho を発現させると、FGF23 投与で ERK1/2 のリン酸化亢進と Egr-1 遺伝子発現上昇が認められるようになった。

Klotho は、2 つの β グリコシダーゼ様配列をもつ細胞外ドメインと膜貫通ドメイン及び 11 アミノ酸の細胞内ドメインから成る。この構造から、細胞内に FGF23 のシグナルを伝達するには別の分子の介在が予想された。各種 FGF 受容体と Klotho を共発現させると、FGFR1c が顕著な FGF23 応答性を示し、実際に FGF23 による FGFR1c のリン酸化亢進が認められた。更に、FGFR1c と Klotho が結合すること、この複合体と FGF23 が、ヘパリン存在下において 3 者複合体を形成することを発見した。即ち、FGFR1c-Klotho 複合体が FGF23 受容体として機能し、Klotho 発現の臓器特異性が FGF23 作用の臓器特異性を決定することが示唆された。

第 5 章では、総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、FGF23 と低リン血症性くる病の関連を示し、FGF23 の臓器特異的受容体機構を発見したもので、学術上ならびに応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。