

論文の内容の要旨

論文題目 線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor)23 蛋白の
生体内での存在様式とその作用

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 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 清水 祐一郎

A. 背景

1. FGF23 の機能

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF)23 は、血清リン、ビタミン D 代謝を担う液性因子である。FGF23 は常染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症(ADHR)の原因遺伝子として同定され、ほぼ同時期に腫瘍性くる病/骨軟化症(TIO)の低リン血症惹起液性因子であることも報告された。FGF23 の主な標的器官は腎臓で、近位尿細管での 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 β -水酸化酵素の発現低下を介し、血中リン濃度を低下させる。FGF23 は、腎臓で発現している Klotho と 1 型 FGF 受容体の複合体に結合することによって特異的に作用し細胞内へ情報を伝達する。また、FGF23 蛋白はスプチリシン様プロテアーゼ認識配列(RXXR)を有し、*in vitro* の発現実験では、一部の FGF23 蛋白が 179 番目のアルギニンと 180 番目のセリンの間でプロセッシングを受け、リ

ン利尿採用を有さないフラグメントに分解される。FGF23 は三つのムチン型 O 型糖鎖を有し、これらの糖鎖は FGF23 蛋白の 171、178、200 番目のスレオニンに付加されるが、一つあるいは二つの糖鎖を有する FGF23 蛋白はこのプロセッシングを受けるのに対し、三つの糖鎖を有するものはプロセッシングに抵抗性である。

2. リン代謝異常症と FGF23

ADHR や TIO に加え、*PHEX* 遺伝子異常による X 染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症 (XLH)や、*DMP-1*、*ENPP1* 遺伝子異常による常染色体劣性低リン血症性くる病/骨軟化症 (ARHR1, 2)も過剰な FGF23 活性により惹起されることが報告されている。一方、FGF23 作用障害では、家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症 (FHTC)が生じる。FHTC の原因遺伝子として *FGF23* 遺伝子、ppGalNAc-T3 をコードする *GALNT3* 遺伝子、および *Klotho* 遺伝子が報告されている。このうち ppGalNAc-T3 蛋白は、O 型糖鎖付加を媒介する酵素であり、*GALNT3* 遺伝子異常による糖鎖付加異常が FGF23 蛋白のプロセッシングを亢進させる。また、*FGF23* 遺伝子異常による FHTC でも体内に FGF23 フラグメントが著増していることから、蛋白構造異常によりプロセッシングが亢進しているものと考えられている。現在広く使用されている、血中 FGF23 の測定法には、活性を有する全長 FGF23 のみを測定する全長アッセイと、全長 FGF23 と共に C 端フラグメントを測定する C 端アッセイの二種類が存在する。*GALNT3*、*FGF23* 遺伝子異常による FHTC では、体内でのフラグメント増加を反映して、C 端アッセイ測定値が高値を示すのに対し、全長アッセイ測定値は低～基準値を示し解離する。しかしながら、過去に報告された両遺伝子異常による FHTC 症例の血中 FGF23、リン値を見ると、半数以上の症例は基準値内の全長 FGF23 測定値を示すにも関わらず、著明な高リン血症を呈している。

3. 慢性腎臓病と FGF23

FGF23 は、主に腎臓に作用し血中リン濃度を調節しているが、腎からのリン排泄が障害される慢性腎臓病、特に透析患者においては、FGF23 が高値となることが知られている。この原因として、体内へのリン貯留、高リン血症による FGF23 産生亢進が考えられている。同様に慢性腎臓病患者で高値となる副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)では、体内で分解された C 端側フラグメントが腎排泄性であるため、体内に蓄積していることが知られている。

B. 目的

健常人または FHTC 以外の FGF23 が高値となる疾患、また、腎機能が低下した状態における、体内での FGF23 蛋白存在様式は不明であることから、(1)体内での FGF23 蛋白の存在様式、(2)FGF23 フラグメントの生体内での存在意義を明らかにすることを目的とし、以下

の検討を行なった。

C. 方法

1. 体内での FGF23 存在様式の検討

FGF23 が高値となる血液透析(HD)施行中の末期腎不全(ESRD)、TIO 患者血漿を、全長アッセイと C 端アッセイの両者で血中 FGF23 濃度を測定し、比較検討した。さらに腹膜透析(PD)患者、健常人を加え血漿中の FGF23 蛋白を、免疫沈降-ウェスタンブロット法により検討した。各検体で得られた全長 FGF23 とフラグメントのバンドを、画像解析ソフトを用いて定量化した。

2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討

スチチリン様プロテアーゼ認識配列内の変異によりプロセッシング抵抗性を獲得した変異 FGF23 ベクター(RQ)と、同様に糖鎖付加障害によりプロセッシングを受けやすい変異 FGF23 ベクター(T178A)を作成した。それぞれの変異遺伝子を細胞に発現させ、培養上清を採取することによって、全長 FGF23 のみ、またはフラグメントのみを含む溶液を得た。各溶液による細胞内への情報伝達を、*Egr-1* 遺伝子レポーター活性により評価した。

3. 全長 FGF23、フラグメントの FGF23 mRNA 発現への影響

ラット骨肉腫細胞由来の UMR-106 細胞を 1, 25(OH)₂D₃ で刺激すると FGF23 mRNA 発現が誘導される。これを用いて、1, 25(OH)₂D₃ に、全長 FGF23 または FGF23 フラグメントを添加し、mRNA 発現に両者が及ぼす影響を検討した。

D. 結果

1. 体内での FGF23 存在様式の検討

全長アッセイ・C 端アッセイ測定値は ESRD、TIO いずれの群でも高値であった。両測定法による測定値は良好な相関を示し、その分布に ESRD 群、TIO 群で相違は認めなかった。免疫沈降-ウェスタンブロット法では、各群で約 32kDa の全長 FGF23 のバンドと、約 12kDa の FGF23C 端フラグメントのバンドが検出された。バンドの定量化により、比率を算出したところ、体内で約 30%の FGF23 はフラグメントとして存在しており、各群間で有意差は認めなかった。

2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討

Klotho 発現細胞において、RQ 蛋白は、*Egr-1* プロモーター活性を用量依存性に増加させたが、T178A 蛋白単独では *Egr-1* プロモーター活性を促進しなかった。次いで、T178A 蛋白

の RQ 蛋白による細胞内情報伝達系に与える影響を検討すると、過剰なフラグメントの存在下では RQ の活性を低下させることが明らかとなった。

3. 全長 FGF23、フラグメントの FGF23 mRNA 発現への影響

通常の状態では、UMR-106 細胞は FGF23 mRNA を発現していないのに対し、1, 25(OH)₂D₃ による 48 時間の刺激によって FGF23 mRNA 発現は顕著に誘導された。しかし、R176Q 蛋白、T178A 蛋白が 1, 25(OH)₂D₃ と共に細胞外に存在しても、FGF23 mRNA 発現量に変化は見られなかった。

E. 考察

FGF23 は血清リン、ビタミン D 代謝だけでなく、慢性腎臓病患者における血管の石灰化や骨折リスクと相関するなど、様々な点で注目を浴びている。PTH は ESRD において C 端フラグメントが体内に貯留することが知られているが、今回の我々の検討で、FHTC の様な特殊な病態でなくても、ヒト血漿中にプロセッシングを受けた FGF23 フラグメントが存在していることがわかった。その比率は、健常人、HD または PD 施行中の ESRD 症例、TIO 症例間で差を認めなかったことから、ESRD においても体内に C 端フラグメントが著増していることは無い、と考えられる。In vitro での FGF23-N/C 端フラグメント作用の検討では、FGF23-N/C 端フラグメント単独では *Egr-1* プロモーター活性を促進しなかったのに対し、過剰に存在する場合には全長 FGF23 による *Egr-1* プロモーター活性を阻害した。フラグメントの作用に関しては議論が分かれているが、過剰な FGF23 フラグメントが全長 FGF23 活性を抑制したことは FHTC の所見と合致する。従って、この機構の解明は FGF23 作用過剰疾患の治療法などにつながるものと思われる。

E. 結語

今回の検討により、FGF23 は、in vivo でもプロセッシングを受け、その約 3 割はフラグメントとして存在していることがわかった。また、PTH の C 端フラグメントとは異なり、ESRD 患者血中で FGF23 の C 端フラグメントが蓄積することは無いことが明らかとなった。FGF23 蛋白プロセッシングが亢進する FHTC では、過剰な FGF23 フラグメントによる全長 FGF23 作用の阻害が、高リン血症などの発症に関与している可能性があることがわかった。今後は、FGF23 が関与する低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、フラグメントの意義のさらなる解明が必要と考えられる。