

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF)23 は、生体内で血清リン、ビタミン D 代謝を担う液性因子である。FGF23 は腎臓に作用し、尿細管でのリン再吸収を抑制しリン利尿を促すことによって血清リンを低下させると共に、血中 1,25(OH)₂D₃ 濃度も低下させ、腸管リン吸収の抑制という観点からも血清リンを低下させる。In vitro の発現実験では、一部の FGF23 蛋白はプロセッシングを受け、リン利尿作用を有さない N 端、C 端フラグメントに分解することが知られている。FGF23 蛋白分解が亢進し、高リン血症、異所性石灰化を特徴とする家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症(FHTC)の一部では、体内に FGF23 フラグメントが著増していることが知られている。しかし、健常人や FHTC 以外の FGF23 が高値となる疾患、または、腎機能が低下した状態において、体内での FGF23 蛋白存在様式は不明である。さらに、過去の報告から、FHTC においては体内に蓄積したフラグメントが、全長 FGF23 作用を阻害している可能性が示唆されている。そこで、本研究では生体内での FGF23 蛋白の存在様式、また FGF23 フラグメントの存在意義を明らかにすることを目的とし、以下の検討を行った。

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)、腫瘍性骨軟化症(TIO)患者血漿を、全長 FGF23 蛋白のみを測定する全長アッセイと、全長 FGF23 蛋白と共に、分解された C 端フラグメントも測定する C 端アッセイの両方で測定し、比較検討した。さらに腹膜透析(PD)患者、健常人の血漿検体を加え 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。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ティングでは、各群で約 32kDa の全長 FGF23 蛋白のバンドと、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 蛋白はフラグメントとして存在しており、各疾患群間で有意差は認めなかった。これにより、FGF23 蛋白は、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、ESRD 患者血中で FGF23 の C 端フラグメントが蓄積していないことが明らかとなった。

2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討

スブチシ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 遺伝子プロモーター活性により評価した。

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 蛋白の活性を低下させることが明らかとなった。これにより、FHTC の高リン血

症発症機序に、体内で著増しているフラグメントによる全長 FGF23 作用阻害が関与している可能性が示唆された。

3. 全長 FGF23、フラグメントの *FGF23* mRNA 発現への影響

一部の FGF23 作用過剰疾患においては、体内での FGF23 フラグメント減少が FGF23 産生過剰に関与している可能性が示唆されている。ラット骨肉腫細胞由来の UMR-106 細胞を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ で刺激すると *FGF23* mRNA 発現が誘導される。この *FGF23* mRNA 発現系に、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。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、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による 48 時間刺激によって *FGF23* mRNA 発現は顕著に誘導された。しかし、RQ 蛋白、T178A 蛋白が $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と共に存在しても、*FGF23* mRNA 発現量に変化は見られなかった。

以上、本論文は生体内での FGF23 蛋白の存在様式および、全長 FGF23 蛋白、C 端フラグメントの比率に腎機能が影響しないことを明らかとした。さらに *in vitro* の検討により、過剰な FGF23 フラグメントは、全長 FGF23 蛋白作用を阻害する可能性があることがわかった。本研究が明らかにした、生体内での FGF23 蛋白の存在様式および C 端フラグメントの作用は、FGF23 作用過剰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有用と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。