

## 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 の発現調節に関する検討

氏名 堀 倫子

### A. 背景

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF)23 は、骨により産生され、リン、ビタミン D 代謝調節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 $\alpha$ -水酸化酵素の発現低下などによる血中 1,25-水酸化ビタミン D [1,25(OH) $_2$ D]濃度の低下を介し、血中リン濃度を低下させる。一方、FGF23 を恒常的に発現している細胞株が存在しないため、FGF23 の産生調節機構に関しては不明な点が多く残されている。FGF23 は 1,25(OH) $_2$ D を低下させ、1,25(OH) $_2$ D によって FGF23 の産生が増加することが報告されている。また FGF23 は血中リン濃度を低下させる一方、マウスやヒトでリンの負荷により血中 FGF23 が増加する。従ってリンによっても FGF23 の産生が正に制御されると予想されているが、現在のところリンが直接 FGF23 発現を変化させることを見いだした報告はない。また 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(CKD)、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。しかしこの CKD 患者における FGF23 高値の原因についても、必ずしも明らかではない。

### B. 目的

リンによる FGF23 産生調節は、in vivo での報告から正に制御されると予想されるが、生理的な FGF23 産生部位である骨由来の細胞、あるいは骨芽細胞系細胞においてリンが直接 FGF23 発現を変化させることを見いだした報告はない。そこで、慢性腎臓病患者の血中 FGF23 濃度規定因子とともに、骨芽細胞系細胞におけるリンによる FGF23 産生調節機構の有無を明らかにすることを目的とした。

### C. 方法

#### 1. 腹膜透析患者における FGF23 の評価

2011 年 10 月から 2012 年 1 月にかけて当院腎臓・内分泌内科の外来で腹膜機能評価を行った 44 名の血清を検体とし、血清 FGF23 値を測定した。また、同血清よりリン、アルブミン、カルシウム、アルカリフォスファターゼ(ALP)、骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)、インタクト PTH、TRACP-5b を測定した。これらの値と、年齢、性別、血圧、体重、尿量、残腎機能・腹膜機能の指標のうち、FGF23 値と有意な相関があった項目を独立変数として重回帰分析をおこなった。

## 2. 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによる *FGF23* mRNA 発現調節の検討

ラット骨肉腫細胞由来株である UMR-106 をそれぞれ 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンで刺激し、細胞溶解液中の *FGF23* mRNA 量を realtime PCR 法により定量した。

## 3. 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによるラット *FGF23* プロモーター活性の変化

ラット *FGF23* のプロモーター領域の塩基配列を -500, -1000, -2500, -3500bp の 4 種類の長さでルシフェラーゼベクターである PGL3basic にサブクローニングすることで、ラット *FGF23* プロモーターベクターを作成した。これを UMR-106 にトランスフェクトし、それぞれ 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンで刺激し、細胞溶解液を用いて luciferase reporter assay によりプロモーター活性を定量した。

## 4. 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによる *FGF23* mRNA 崩壊速度への影響

UMR-106 をそれぞれ 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンで刺激し、培養後に mRNA 合成阻害剤である actinomycin D を添加した。0, 1, 2, 4 時間後の細胞溶解液中の *FGF23* mRNA 量を realtime PCR 法により定量し、片対数グラフに経時的にプロットすることで、mRNA の半減期を求めた。

## 5. リンによる細胞内活性酸素の定量

UMR-106 をリンで刺激し、NBT 法により細胞内活性酸素量(ROS)を定量した。

## 6. リンと活性酸素合成阻害剤

UMR-106 をリンで刺激し、活性酸素合成阻害剤である Apocynin、Oxypurinol、Rotenone をそれぞれ添加し、細胞溶解液中の *FGF23* mRNA 量を realtime PCR 法により定量した。

## 7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による *FGF23* 発現調節の検討

UMR-106 を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で刺激し、細胞溶解液中の *FGF23* mRNA 量を realtime PCR 法により定量した。

## 8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるラット *FGF23* プロモーター活性の変化

実験 3 で用いたラット *FGF23* プロモーターベクターを UMR-106 にトランスフェクトし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で刺激した。細胞溶解液を用いて luciferase reporter assay によりプロモーター活性を定量した。

## D. 結果

### 1. 腹膜透析患者における *FGF23* の評価

単回帰解析では透析期間、体重、血圧、透析方法、血清リン値、血清クレアチニン値 (Cre)、骨型 ALP、腎尿素 Kt/V/週、総尿素 Kt/V/週、腎クレアチニンクリアランス、総クレアチニンクリアランスが *FGF23* と有意な相関を認めた。特に、リンに関しては相関係数 0.672 と最も強い相関を認めた。*FGF23* と有意な単相関を認めたこれらの変数を独立変数として変数増減法による重回帰分析を行った。標準偏回帰係数から、*FGF23* 値に対する影響は骨型 ALP、透析方法、P、Cre の順に高いという結果が得られた。

## 2. 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによる *FGF23* mRNA 発現調節の検討

*FGF23* mRNA 量は、1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 濃度依存性に増加し、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 100 nM 添加群では、0.1 nM 添加群と比較して *FGF23* mRNA 量は 3000 倍以上に増加した。また、P 5 mM 添加群では、P 添加 72 時間後より *FGF23* mRNA 量が増加し、0 時間後と比較して 72 時間、96 時間後で増加は有意であった。96 時間後の *FGF23* mRNA 量の増加は P の濃度依存性であり、P 3 mM 添加群、P 5 mM 添加群では、P 非添加群と比較して *FGF23* mRNA 量の増加は有意であった。

## 3. 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによるラット *FGF23* プロモーター活性の変化

1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 添加群では、-500 bp でコントロールのルシフェラーゼベクター-PGL3 basic の 4.65 倍と最も強い活性を呈し、1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 非添加群と比較すると、-500 bp で約 2.4 倍に上昇していた。P 5 mM 添加群でも 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 同様、-500 bp で最も強い活性を示した。P 非添加群と比較すると、-500 bp で約 1.7 倍、-1000 bp で約 1.3 倍であり、P 5 mM 添加群でのプロモーター活性の上昇は有意であった。また、この-500 bp でのプロモーター活性は、P 1, 3, 5 mM で濃度依存性に上昇し、P 非添加群と比較して、P 3 mM 添加群、P 5 mM 添加群では有意であった。

## 4. 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、リンによる *FGF23* mRNA 崩壊速度への影響

1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 1 nM 添加群では *FGF23* mRNA の半減期は 1.37 時間であったのに対し、100 nM 添加群では半減期は 2.35 時間であり、1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 濃度の上昇により、*FGF23* mRNA の半減期が有意に延長した。一方、P 5 mM 添加群では、崩壊速度、半減期ともに P 非添加群との間に有意差を認めなかった。

## 5. リンによる細胞内活性酸素の定量

P 5 mM 添加群で細胞内 ROS 活性は有意に上昇した。

## 6. リンと活性酸素合成阻害剤

P 5 mM 添加群では P 非添加群と比較して *FGF23* mRNA 量は有意に増加し、この増加は NADPH oxidase (NOX)阻害剤である apocynin 500 μM で有意に抑制された。P 非添加群では、apocynin の負荷による *FGF23* mRNA 量の低下を認めなかった。一方 P 5 mM に xanthine oxidase 阻害剤である oxypurinol 10 μM やミトコンドリア電子伝達系阻害剤の rotenone 1 μM を添加した群では、P 5 mM のみの群と比較して、*FGF23* mRNA 量の有意な低下を認めなかった。

## 7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による *FGF23* 発現調節の検討

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM 添加群では、24 時間後より *FGF23* mRNA 量の増加を認め、48 時間後に最多となった。48 時間後の *FGF23* mRNA 量の増加は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度依存性であり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM 添加群では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非添加群と比較して、有意に上昇した。

## 8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるラット *FGF23* プロモーター活性の変化

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非添加では実験 3 同様、-500 bp で最も強い活性を示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 非添加群と比較すると、約 20% 活性が上昇しており、有意であった。

## E. 考察

FGF23 は血清リン、ビタミン D 代謝を担う液性因子であるが、FGF23 の産生調節機構に関しては不明な点が多く残されている。FGF23 は  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  濃度を低下させ、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  は FGF23 を上昇させるというフィードバック機構が存在する。今回の検討で、UMR-106 を  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  で刺激すると濃度依存性に FGF23 mRNA 量が増加したが、この増加はプロモーター活性の上昇と、mRNA 崩壊の遅延の両者によるものと考えられた。一方 UMR-106 にリンを負荷すると、FGF23 mRNA が上昇し、FGF23 プロモーター活性も上昇するという結果が得られ、リンが直接 FGF23 発現を促進させることが示された。リンと ROS に関する報告が数多くあり、リンの負荷で細胞内 ROS 活性が上昇したことから  $\text{H}_2\text{O}_2$  で同様の実験を行ったところ、FGF23 遺伝子の転写が活性化され、ラット FGF23 プロモーター活性も上昇した。またリンによる FGF23 mRNA の増加は apocynin の同時添加により抑制されたことから、Nox を介するものと考えられた。以上の結果から、リンによる FGF23 の発現調節に活性酸素が介在している可能性が示唆された。リンが細胞内でどのように Nox に作用するのか、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が FGF23 転写調節する機序については、今後検討が必要である。

## F. 結語

今回の検討により、リンは骨芽細胞系細胞に作用し、FGF23 の転写促進を介して FGF23 発現を促進することが示された。さらに、リンによる FGF23 発現調節には酸化ストレスが介在する可能性が示された。CKD 患者において血中リン濃度と FGF23 に相関が認められることから、CKD 患者の FGF23 濃度上昇の少なくとも一部は、リンによる FGF23 発現変化によるものであると考えられる。