

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

清水 祐一郎

目 次

| | ページ数 |
|--|------|
| A. 略語 | 3 |
| B. 要旨 | 5 |
| C. 序文 | |
| 1. FGF23 の機能 | 6 |
| 2. FGF23 蛋白の構造 | 7 |
| 3. FGF23 と FGF23 受容体 | 9 |
| 4. FGF23 の測定系 | 10 |
| 5. FGF23 作用過剰疾患 | 11 |
| 6. FGF23 作用障害疾患 | 13 |
| 7. FHTC 症例における血清 FGF23 値と存在様式 | 14 |
| 8. 慢性腎臓病と FGF23 | 15 |
| 9. FGF23 の産生調節機構 | 16 |
| D. 目的 | 18 |
| E. 方法 | |
| 1. 体内での FGF23 存在様式の検討 | |
| (1) 二つの FGF23 測定法の比較 | 19 |
| (2) 血漿中の FGF23 蛋白存在様式の検討 | 19 |
| 2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討 | |
| (1) 全長 FGF23、FGF23-N/C 端フラグメントを含む溶液の採取 | 20 |
| (2) FGF23 フラグメントの細胞内情報伝達系への影響 | 22 |
| 3. 全長 FGF23、フラグメントの <i>FGF23</i> mRNA 発現への影響 | 23 |
| F. 結果 | |
| 1. 体内での FGF23 存在様式の検討 | |
| (1) 二つの FGF23 測定法の比較 | 25 |
| (2) 血漿中の FGF23 蛋白存在様式の検討 | 25 |
| 2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討 | |
| (1) 全長 FGF23、FGF23-N/C 端フラグメントを含む溶液の採取 | 26 |
| (2) FGF23 フラグメントの細胞内情報伝達系への影響 | 27 |
| 3. 全長 FGF23、フラグメントの <i>FGF23</i> mRNA 発現への影響 | 27 |
| G. 考察 | 29 |
| H. 結語 | 33 |
| I. 謝辞 | 34 |
| J. 参考文献 | 35 |

| K. 図表 | ページ数 |
|--|------|
| 表1. FGF23作用異常による疾患 | 50 |
| 表2. ESRD群(30症例)、TIO群(3症例)の患者背景 | 51 |
| 図1. FGFsファミリー | 52 |
| 図2. FGF23の作用 | 53 |
| 図3. FGF23蛋白の構造 | 54 |
| 図4. ADHR惹起遺伝子変異 | 55 |
| 図5. 変異FGF23蛋白のプロセッシング抵抗性 | 56 |
| 図6. FGF23蛋白糖鎖付加の順序 | 57 |
| 図7. FGF23蛋白への糖鎖付加機構 | 58 |
| 図8. FGF23受容機構 | 59 |
| 図9. FGF23測定法の原理 | 60 |
| 図10. ppGalNAc-T3によるムチン型O型糖鎖付加機構 | 61 |
| 図11. FGF23作用障害による家族性高リン血症性腫瘍状 石灰沈着症(FHTC) | 62 |
| 図12. XLH、FHTC患者血漿の全長アッセイ、C端アッセイに よるFGF23測定値の比較 | 63 |
| 図13. <i>GALNT3</i> 遺伝子異常によるFHTC症例の血中FGF23と リン値の関係 | 64 |
| 図14. ESRD(HD、PD)、TIO、XLHの血清FGF23値 | 65 |
| 図15. 二つのFGF23測定法によるESRD(HD)とTIO症例の 血漿中FGF23 | 66 |
| 図16. 血漿中FGF23蛋白存在様式の検討 | 67 |
| 図17. 全長FGF23蛋白、FGF23-N/C端フラグメントの採取 | 68 |
| 図18. FGF23フラグメントの全長FGF23作用に対する影響 | 69 |
| 図19. 全長FGF23、フラグメントの <i>FGF23</i> mRNA発現への影響 | 70 |

A. 略語

ADHR; autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia

ARHR; autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia

DMP1; dentin matrix protein 1

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

Egr-1; early growth response-1

ENPP1; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1

ESRD; end-stage renal disease

FGF; fibroblast growth factor

FGFR; fibroblast growth factor receptor

FGFR1c; type1 fibroblast growth factor receptor IIIc subtype

FHTC; familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis

FRS2 α ; fibroblast growth factor receptor substrate 2 α

GALNT3; UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide

N-acetylgalactosaminyltransferase3 (GalNAc-T3)

HD; hemodialysis

NaPi; sodium-phosphate cotransporter

1, 25(OH) $_2$ D $_3$; 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$

PD; peritoneal dialysis

PHEX; phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the

X chromosome

ppGalNAc-T3; UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide

N-acetylgalactosaminyltransferase 3 protein

PTH; parathyroid hormone

RT-PCR; reverse transcription polymerase chain reaction

TIO; tumor-induced rickets/osteomalacia

UDP-GalNAc; UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine

XLH; X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia

B. 要旨

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor: FGF)23 は、骨細胞で産生され主に腎臓に作用し、リン・ビタミン D 代謝を調節するホルモンである。*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フラグメントに分解されることが知られている。一方、FGF23 蛋白の体内での存在様式やその作用には不明な点が残されている。私は、FGF23 が高値となる疾患群において体内での FGF23 蛋白の存在様式を検討し、生体内においても FGF23 フラグメントが存在していることを明らかにした。また過剰量のフラグメントが、FGF23 蛋白作用を抑制する可能性を明らかにした。

C. 序文

1. FGF23 の機能

線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor: FGF)23 は、FGF ファミリー最後のメンバーとしてマウス FGF15 に対するホモロジーによりクローニングされると共に[1]、常染色体優性低リン血症性くる病/骨軟化症(autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ADHR)の原因遺伝子としても同定された[2]。さらにほぼ同時に、FGF23 は腫瘍性くる病/骨軟化症(tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO)における低リン血症惹起液性因子であることも報告された[3]。FGFs は、ポリペプチド成長因子のファミリーで、ヒトには FGF15 以外の 22 種類のメンバーが存在している。FGF ファミリーメンバーはいくつかのサブファミリーに分類され、FGF23 は FGF19 や 21 と共に FGF19 サブファミリーに属している(図 1)[4]。従来、FGF は細胞の分化・増殖を制御する局所因子と考えられてきた。一方、FGF19 は胆汁酸代謝、FGF21 は糖・脂質代謝、そして FGF23 はリン代謝調節作用を有する全身性液性因子であることが分かってきた[5]。FGF23 は近位尿細管刷子縁膜上に存在する 2a 型、および 2c 型ナトリウム-リン共輸送体(sodium-phosphate cotransporter-IIa、IIc: NaPi- II a、NaPi- II c)発現の抑制により、リン再吸収を低下させる。同時に FGF23 は、25-水酸化ビタミン D-1 α -水酸化酵素発現の抑制などにより血中 1,25-水酸化ビタミン D [1,25(OH) $_2$ D]

濃度を低下させる[3, 6]。1,25(OH)₂D は腸管リン吸収を促進することから、FGF23 は腎尿細管リン再吸収と腸管リン吸収の抑制により、血中リン濃度を低下させることになる(図 2)。

2. FGF23 蛋白の構造

RT-PCR を用いた正常組織での *FGF23* mRNA 発現解析では、肝臓・リンパ節・心臓・胸腺で、わずかに *FGF23* mRNA 発現が確認されている[3]。ただし本検討では、骨における *FGF23* の発現は検討されていない。一方、*FGF23* 遺伝子座に *Lac-Z* を挿入したマウスを用いた実験や[7]、*FGF23* 過剰産生モデルマウスでは、*FGF23* 発現は骨、特に骨細胞で認められる[8]。従って *FGF23* は、骨により産生される液性因子と考えられている。*FGF23* は 251 個のアミノ酸からなる蛋白として合成され、N 端側に存在するシグナルペプチド 24 アミノ酸が遊離した後、227 アミノ酸、分子量約 32 kDa の蛋白質として分泌される(図 3a)[1]。*FGF23* 蛋白は、スブチリシン様プロテアーゼの認識配列(RXXR)を持ち、*in vitro* での *FGF23* 発現実験では、一部の *FGF23* 蛋白が、179 番目のアルギニン(Arg: R)と 180 番目のセリン(Ser: S)の間でプロセッシングを受けることが知られている(図 3a)[9]。このうち全長 *FGF23* はリン利尿作用を有するが、プロセッシングを受けた後の N 端や C 端フラグメントは、マウスに投与しても低リン血症をもたらさ

ないことから、少なくとも血中リン濃度低下活性は喪失しているものと考えられる(図 3b)[10]。また、この切断点の N 端側に他の FGF ファミリーメンバーと相同性を示す FGF 相同領域が存在し、切断部位の C 端側のアミノ酸配列は FGF23 に特異的である(図 3a)。この、FGF23 蛋白プロセッシング異常によると考えられる疾患が報告されている。*FGF23* 遺伝子発見の契機となった疾患 ADHR では、現在までにスブチリシン様プロテアーゼ認識配列内のアルギニンをコードするコドンの 3 種類の変異が報告されている(図 4)[10, 11]。*In vitro* で、この ADHR を惹起する変異 FGF23 を発現させた検討では、変異 FGF23 蛋白が野生型(WT)と比べプロセッシングに抵抗性であることがわかっている(図 5)[10]。この変異 FGF23 蛋白の全長に相当する部分をより詳しく検討すると、WT で得られるバンドが 1 本であるのに対し、変異 FGF23 蛋白では 3 本のバンドが得られる。これらのバンドを切り出してトリプシンで切断し、各フラグメントの質量分析を行った実験から、FGF23 蛋白は三つのムチン型 O 型糖鎖を有することが判明している(図 6)[12]。また、WT の全長 FGF23 は 3 種類の糖鎖を有する変異 FGF23 と同一の分子量を示し、糖鎖の少ないバンドが検出されないことから、変異 FGF23 蛋白だけでなく、一つ、あるいは二つの糖鎖を有する野生型 FGF23 蛋白も、プロセッシングを受けるものと考えられている(図 7)。

3. FGF23 と FGF23 受容体

FGF23 の主な標的器官は腎臓であり、腎臓には FGF23 に対する受容機構が存在していると考えられる。*In vivo* での検討で、FGF23 投与により早期から発現が変化する遺伝子がスクリーニングされ、*early growth response-1(Egr-1)*が同定された[13]。この FGF23 による細胞内シグナルの活性化は大部分の臓器では認められず、腎臓など限られた臓器でしか認められなかった。FGF ファミリーメンバーは、FGF 受容体(FGFRs)に結合することにより、その作用を発揮する。FGFRs をコードする遺伝子には *FGFR1* から 4 までの 4 種類が存在し[4]、それぞれの遺伝子からの選択的スプライシングなどにより、多くの FGFR サブタイプが産生される。そこで、腎臓において FGF23 に結合する蛋白が検索され、膜蛋白である *Klotho* が結合することが明らかされた[13, 14]。*Klotho* は老化に関与すると考えられていた遺伝子で、*Klotho* 蛋白発現を抑制させたマウスモデルである *Klotho* マウスは、高リン血症、高 1,25(OH)₂D 血症を示し[15]、これらの所見は、FGF23 ノックアウトマウスの表現型と類似している[16]。さらに *Klotho* を発現させた培養細胞に FGF23 による刺激を加えることで、fibroblast growth factor receptor substrate 2α(FRS2α)のリン酸化、およびその下流で制御されている MAP キナーゼの活性化が検出される。一方、この FGF23 による細胞内シグナルの活性化は、*Klotho* を発現していない細胞では認められなかった[14]。従って FGF23 は、腎

臓において Klotho を介して細胞内へ情報を伝達しているものと考えられるに至った(図 8)。また、FGF 受容体には多くのサブタイプが存在するが、FGF23 は 1 型 FGF 受容体Ⅲc サブタイプ(FGFR1c)-Klotho 複合体と結合することがわかった [13, 14]。さらに抗 FGF23 抗体を用いた検討より、FGF23 蛋白の N 端側に存在する FGF 相同領域が FGFR1c-Klotho 複合体の FGFR1c と、C 端側が Klotho と結合することがわかっている(図 8)[17]。

4. FGF23 の測定系

血液中の FGF23 測定には、いくつかの ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)キットが開発されている。現在使用されている FGF23 測定キットの主なものには、FGF23 ELISA Kit (Kainos 社)、と Human FGF23(C-term) ELISA Kit (Immutopics 社)がある。これらの測定方法は、いずれも固相サンドイッチ ELISA 法である。このうち前者のキットでは、FGF23 蛋白プロセッシング部位の N 端側と C 端側に対するモノクローナル抗体を使用し、リン利尿作用を持つ全長 FGF23 のみを測定する[18]。これに対し後者のアッセイは、プロセッシング部位 C 端側に対する 2 種類のポリクローナル抗体を使用しているため、全長 FGF23 に加え、プロセッシングを受けたリン利尿作用を有さない C 端フラグメントも測り込む (図 9)。全長アッセイの基準値は 10~50 pg/ml、C 端アッセイの基準値

は 150 RU/ml 以下と報告されている[18, 19]。いずれの測定法でも、FGF23 の性差や年齢差は報告されていない(以後 KAINOS 社の FGF23 ELISA Kit による測定を全長アッセイ、Immutopics 社の Human FGF23(C-term) ELISA Kit による測定を C 端アッセイと呼ぶ)。

5. FGF23 作用過剰疾患

FGF23 の同定後、過剰な FGF23 活性により低リン血症と低 1,25(OH)₂D 血症を特徴とするいくつかの低リン血症性くる病/骨軟化症が惹起されることが明らかにされた(表 1)。

まず、腫瘍性くる病/骨軟化症(tumor induced osteomalacia: TIO)は、腫瘍随伴症候群の一つで、原因腫瘍による FGF23 過剰産生が低リン血症を招く。本症では低リン血症に起因する筋力低下や骨痛、骨軟化が問題となる。本症惹起原因腫瘍としては、良性中胚葉系腫瘍の報告が多い。これらの腫瘍は一般に成長が遅い小腫瘍であることから、その発見が困難なことが多い。TIO は原因腫瘍の摘出により完治し、一部の患者では術後 FGF23 が測定感度以下にまで低下する[20]。

遺伝性疾患では、前述の *FGF23* 遺伝子異常による ADHR、歯牙や骨の非コラーゲン性基質蛋白をコードする *DMP-1*(dentin matrix protein 1)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 1(autosomal recessive

hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ARHR1) [21, 22]、エンドペプチダーゼ類似蛋白をコードする *PHEX*(phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)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 (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia: XLH) がある [19]。頻度は XLH が最も多く、基本的には小児期に低リン血症・下肢の骨変形・成長障害を三徴とするくる病として発症するが、稀に成人発症例も報告されている。さらに近年、細胞外ピロリン酸合成に関わる *ENPP1*(ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase)遺伝子異常が ARHR2 の原因であることが報告されている [23, 24]。いずれの遺伝性疾患においても、FGF23 の高値・作用過剰が低リン血症性くる病/骨軟化症発症を惹起していると推測されるが、その詳細な経路はわかっていない。ADHR 惹起変異 *FGF23* 遺伝子からは、プロセッシング抵抗性の FGF23 蛋白が合成される。この変異蛋白のリン利尿作用は、マウスへの投与実験より、野生型の FGF23 蛋白と同等と考えられている [10]。従って、プロセッシング抵抗性がリン利尿作用を有する全長 FGF23 蛋白の増加を招き、低リン血症が惹起されると当初は推測された。しかし、ADHR 症例を長期間観察すると、経過中に血清リン、FGF23 共に基準値内の期間が存在する [25]。従って ADHR では、*FGF23* 遺伝子の変異だけでは FGF23 濃度の高値を説明できず、FGF23 産生調節機構の異常が存在しているものと考えられるに至った。この産

生調節異常の原因の一つのとして、FGF23 フラグメントが FGF23 産生に影響する可能性が考えられる。

また、本邦で鉄欠乏性貧血に対して汎用されている鉄静注製剤(含糖酸化鉄)が高率に低リン血症を招き、これが FGF23 高値に起因していることを我々は明らかにしている[26]。これらの疾患では、腎尿細管リン再吸収障害を伴う低リン血症と、低リン血症存在下には不相応な 1,25(OH)₂D 濃度の低値、および FGF23 濃度上昇が認められる。一方、Fanconi 症候群やビタミン D 欠乏など、その他の原因による低リン血症では、代償的に全長 FGF23 はむしろ低値である[27]。全長アッセイでの FGF23 濃度 30 pg/mL を境として、過剰な FGF23 活性による疾患と、その他の原因による低リン血症の鑑別が可能である[27]。

6. FGF23 作用障害疾患

一方、FGF23 作用障害による疾患で、ADHR や ARHR、XLH と鏡像をなす疾患として、家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症(familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis: FHTC)がある(表 1)。本疾患は、近位尿細管でのリン再吸収亢進による高リン血症と、高 1,25(OH)₂D 血症を示し、軟部組織の異所性石灰化を特徴とする。本症の原因遺伝子としては、*GALNT3*[28-30]、*FGF23*[31-33]、および *Klotho*[34] が報告されている。*GALNT3* 遺伝子産物

(UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase3: ppGalNAc-T3)は、蛋白のムチン型 O 型糖鎖付加を媒介する酵素である。蛋白の糖鎖付加には、N 型糖鎖付加と O 型糖鎖付加が存在することが知られている。蛋白の翻訳後修飾の中で最も頻度の高いムチン型 O 型糖鎖付加では、蛋白中のセリン(Ser)やスレオニン(Thr)残基に、初めに UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine (UDP-GalNAc)の一部である N-acetylgalactosamine が付加され、それに引き続いて糖鎖が連鎖的に付加されていく。このとき、始めの UDP-GalNAc からの N-acetylgalactosamine 付加を媒介する酵素が ppGalNAc-Ts であり、ppGalNAc-T3 はその一つのサブタイプである(図 10) [35]。この ppGalNAc-T3 は、FGF23 蛋白プロセッシング部位近傍のスレオニンへの糖鎖付加を媒介することが判明している。すなわち *GALNT3* 遺伝子異常は、FGF23 蛋白の翻訳後修飾である糖鎖付加異常を招く。このため FGF23 蛋白のプロセッシングが亢進し、全長 FGF23 濃度が低下すると考えられている[12, 30]。また、腫瘍状石灰沈着症を惹起する *FGF23* 遺伝子異常では、FGF23 蛋白構造の変化によりプロセッシング亢進がもたらされ[32, 33, 36]、*Klotho* 遺伝子変異では受容体異常により FGF23 への抵抗性が生じることも報告されている(図 11) [34]。

7. FHTC 症例における血清 FGF23 値と存在様式

前述の様に、FGF23 の測定方法には全長アッセイと C 端アッセイが存在する。我々の XLH 症例での血中 FGF23 の検討では、両者の測定値は良好な相関を示している(図 12)[37]。一方、体内で合成される FGF23 蛋白がプロセッシングを受けてやすい *GALNT3* 遺伝子異常、*FGF23* 遺伝子異常症例においては、両者の測定値は解離する。すなわち、増加した FGF23 C 端フラグメントを反映して C 端アッセイ測定値は高値を示すのに対し、全長アッセイ測定値は高値を示さない[12, 31]。また、*Klotho* 遺伝子異常による FHTC 患者では、全長アッセイ・C 端アッセイ測定値は共に高値を示す[34]。しかしながら、過去に報告されている *GALNT3* 遺伝子異常による FHTC 症例の全長アッセイによる血中 FGF23 測定値をまとめると、半数以上の症例で全長アッセイの測定値が基準値内であるにも関わらず、高リン血症が存在している(図 13)[28, 38-44]。つまり、FHTC 症例の中には体内に全長 FGF23 が健常人と同程度存在していても、その作用が不十分であるため高リン血症を呈している症例が少なからず存在している可能性が考えられる。

8. 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。FGF23 が高値となる疾患では腎からのリン排泄が亢進し低リン血症を来たす。しかし、腎からのリン排泄が障害される慢性腎臓病では、FGF23 が高値となることが知られて

いる。特に透析患者においては、FGF23 は著明な高値となる[45-47]。この原因としては、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。近年の報告では、慢性腎臓病患者において副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)より早期から FGF23 が上昇していることが報告されている[48]。慢性腎臓病では、低 1,25(OH)₂D 血症や高リン血症などにより PTH が高値となる。この際、体内で分解された PTH の C 端側フラグメントが腎排泄性であるため、PTH の C 端側フラグメントをも測り込む測定法では、実際に体内で生理活性を持つ全長 PTH のみを反映していないことが知られている[49]。一方、同様に高値となる FGF23 のフラグメントに関しては、腎機能の変化による変動の検討はなされていない。

9. FGF23 の産生調節機構

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。ADHR では、FHTC とは対照的に体内の FGF23 フラグメント量が減少していると推測される。前述のように ADHR では、FGF23 産生調節機構に異常が存在するものと考えられるが、FGF23 産生調節機構に与える FGF23 フラグメントの影響に関しては検討されていない。現在までの報告では、*in vivo* で、正常健常人における高リン負荷、低リン食で

FGF23 がそれぞれ増減するとの報告がある[50]。また、マウスにおいて経口リン負荷が、ラットでは 1,25(OH)₂D₃ 負荷により FGF23 が上昇することが知られている[51-53]。 *In vitro* では、ヒト赤白血病細胞 K-562 で、リンや 1,25 (OH)₂D₃ の刺激により、マウス *FGF23* 遺伝子のプロモーター活性が上昇するという報告や[54]、ラット骨芽細胞様細胞株 ROS においては、1,25 (OH)₂D₃ の刺激により、マウス *FGF23* 遺伝子のプロモーター活性が上昇するという報告がなされている[8]。また、ラット骨肉腫細胞由来株である UMR-106 において、1,25 (OH)₂D₃ 刺激が *FGF23* mRNA 発現を誘導すると報告されている[55]。

D. 目的

FHTC においては、変異 FGF23 蛋白の体内での存在様式が検討されている。一方、健常人または FHTC 以外の FGF23 が高値となる疾患においては、FGF23 蛋白の存在様式は不明である。また、腎機能の低下した状態において、FGF23 蛋白の存在様式が変化するののかも検討されていない。プロセッシングを受けた FGF23 蛋白はリン利尿作用を有さないことが知られている。これに対し、FHTC の生化学所見より、FGF23 フラグメントは全長 FGF23 の作用阻害など、生体内においてなんらかの役割を担っていることが推測される。さらに、ADHR では FGF23 フラグメントが少ないことが、FGF23 産生調節に影響を及ぼしている可能性がある。

そこで、本研究では

- (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
- を明らかにするため、以下の検討を行なった。

E. 方法

ヒトでの検討においては、東京大学倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得て行った。

1. 体内での FGF23 存在様式の検討

(1) 2 つの FGF23 測定法の比較

まず始めに、FGF23 が高値となることが明らかにされている血液透析 (hemodialysis: HD) 施行中の末期腎不全 (end-stage renal disease: ESRD) 患者 47 例 47 検体、TIO 患者 25 例 54 検体、XLH 患者 37 例 57 検体の血清を全長アッセイ (FGF23 ELISA Kit: KAINOS 社) を用いて測定した。C 端アッセイ (Human FGF23 (C-Term) ELISA Kit: Immutopics 社 第一世代) では血漿を用いるため、血漿の採取が可能であった HD 中の ESRD30 症例、TIO3 症例の患者血漿を用いて全長アッセイと C 端アッセイの両方で血中 FGF23 濃度を測定し、比較検討した。各キットの測定方法は添付文書に従い、両群の患者背景の比較には unpaired T-test を、関連に関する統計学的処理は Pearson's correlation により行なった。

(2) 血漿中の FGF23 蛋白存在様式の検討

さらに詳細に体内での FGF23 蛋白の存在様式を検討するため、十分量の血漿

検体が採取できた症例に対して次の検討を行なった。前述の HD 施行中 ESRD 症例の一部 20 症例と、新たに症例を加えた TIO11 症例、腹膜透析(peritoneal dialysis: PD)施行中 ESRD9 症例、健常人(control: Ctl)6 名の血漿を、FGF23 蛋白の C 端側を認識する抗体付きのレジンを用いて免疫沈降した。血漿サンプル 500 μ l に対して 1 mg/ml 濃度に調整したレジンを 20 μ l 添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間緩徐に攪拌した後 PBS で 5 回洗浄、 β メルカプトエタノール入りのサンプルバッファーを加え 99 $^{\circ}$ C 5 分間で蛋白を溶出、ウェスタンブロット法で FGF23 蛋白を検出した。FGF23 蛋白の検出には免疫沈降に用いた抗体と同部位を認識し、biotin で標識された FGF23C 端抗体を用い、二次抗体には抗 biotin 抗体(Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP: Thermo SCIENTIFIC 社)を使用、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE ヘルスケア社)を用いて化学発光法でバンドの有無を検出した。各検体において得られた全長 FGF23 と C 端フラグメントのバンドを、画像解析ソフト(Scion Image: Scion corporation)を用いて定量化し、全長 FGF23 と C 端フラグメントの存在比率を算出した。各群間の全長 FGF23、C 端フラグメントの存在比率の比較には repeated one-way ANOVA と Bonferroni 法を用いた。

2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討

(1) 全長 FGF23 または FGF23-N/C 端フラグメントを含む溶液の採取

前述の様に FGF23 蛋白のスブチリシン様プロテアーゼ認識配列に変異が生じると変異 FGF23 蛋白はプロセッシング抵抗性となり、ムチン型 O 型糖鎖付加異常ではプロセッシングを受けやすくなる。そこで、pEAK8 ベクター(Edge BioSystems 社)に FGF23 遺伝子をサブクローニングし、さらにスブチリシン様プロテアーゼ認識配列内に存在する 176・179 番目のアルギニン(Arg: R)を QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社)を用いてグルタミン(Glu: Q)に変異させることによって、プロセッシング抵抗性を獲得した変異 FGF23 ベクター(以後 RQ と記載)を作成した。同様に、178 番目のスレオニン(Thr: T)をアラニン(Aln: A)に変異させ、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 蛋白を合成するベクター(以後 T178A と記載)を作成した。それぞれのベクターを Chinese hamster ovary(CHO)細胞に FuGene HD transfection reagent (Roche 社)を用いてトランスフェクションし、48 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の FGF23 蛋白は、C 端側に対する一次抗体を用いたウェスタンブロットと、全長アッセイを用いて確認した。T178A ベクターから得られた培養上清中には N 端フラグメントも含まれていると推測されるが、N 端側に対する抗体に適切なものがないため、C 端フラグメントと等モル数含まれているものと仮定した。コントロールとして、pcDNA3.0 (Invitrogen 社)をトランスフェクトした培養上清を採取した(以後コントロール溶液と記す)。

(2) FGF23 フラグメントの細胞内情報伝達系への影響

FGF23 は FGFR1c-Klotho 複合体を介して細胞内へ情報を伝達し、*Egr-1* 遺伝子を発現させる。そこで、*Egr-1* 遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼベクター-PGL3 basic (Promega 社)にサブクローニングし、FGFR1c が恒常的に存在していることが確認されている CHO 細胞に、Klotho 発現ベクター、内部コントロールとしてのレニラベクターと共に FuGene HD transfection reagent (Roche 社)を用いて共発現させた(96 穴プレート 10,000 個/75 μ l/ウェル)。24 時間後に培養上清を除去し、PBS で 2 回洗浄後、予め採取してあった T178A 蛋白を含む、またはコントロール溶液 75 μ l で置換した。また、RQ 蛋白に関しては、置換する溶液中に RQ 蛋白を含む溶液が 1%、20%、60%、100%となるように、コントロール溶液で希釈し、75 μ l で置換、用量依存性を確認した。48 時間後に Dual-luciferase reporter assay (Promega 社)を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、レニラ活性で補正した。

さらに、フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響を検討するため、置換する培養液中の RQ 蛋白溶液量を固定し、T178A 蛋白、すなわちフラグメントのみを含む溶液を添加して、*Egr-1* 遺伝子の活性化に与える影響を検討した。前述のように 96 穴プレートに 10,000 個/75 μ l/ウェルで CHO 細胞を撒き、ルシフェラーゼベクター、Klotho 発現ベクター、レニラベクターを共発現させた。24 時

間後に培養上清を除去し、PBS で 2 回洗浄後、RQ 蛋白溶液と T178A 蛋白溶液の比率を変え混合した 75 μ l で置換した。RQ 蛋白溶液量は 75 μ l 中 5 μ l に固定し、T178A 蛋白溶液をそれぞれ 0 μ l、2.1 μ l、5 μ l、45 μ l 加えることによって、溶液中の総 FGF23 蛋白量(全長 FGF23 と FGF23 フラグメント量の合計)に対するフラグメント量が 0%、約 30%、50%、90%を占めるようにし、残りはコントロール溶液を加えることによって 75 μ l とした。同様に 48 時間後に Dual-luciferase reporter assay (Promega 社)を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、レニラ活性で補正した。各群間の *Egr-1* 遺伝子活性を repeated one-way ANOVA と Bonferroni 法を用いて比較検討した。各群 n=4 で検討した。

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

前述の様に、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。まず、UMR-106 細胞(48 穴プレート 30,000 個/300 μ l/ウェル)を 10⁻⁹~10⁻⁸ M の 1,25(OH)₂D₃ (CALBIOCHEM社)で刺激し、48 時間後に細胞を採取した。RNAqueous[®] 4PCR Kit (Ambion社)を用いて細胞から RNA を分離し、得られた RNA 5 μ g を Super Script III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen社)を用いて逆転写し、complementary DNA(cDNA)とした。cDNA 100ng を Applied Biosystems社から購入したラット *FGF23* mRNA リアルタイム PCR 用プライマー・

® Fast Advanced Master Mix)を用いてリアルタイムPCRを行い、*FGF23* mRNA発現量を定量化した。内在性コントロールにはGAPDHを用い(TaqMan Gene Expression Assay: Rn99999916_s1)、GAPDHの発現量で補正した。さらに、UMR-106 細胞の 1, 25(OH)₂D₃ 刺激による*FGF23* mRNA発現を確認後、全長*FGF23*、*FGF23* フラグメントの*FGF23* mRNA発現に与える影響を検討した。前項で記したRQ変異*FGF23* ベクター、T178A変異*FGF23* ベクターをUMR-106 細胞に同様の手法でトランスフェクションし、ほぼ全長*FGF23* を含むと考えられる培養上清と、ほぼ*FGF23* フラグメントのみからなると考えられる培養上清を採取した。RQ蛋白溶液、T178A蛋白溶液はそれぞれコントロール溶液で 0.25%、2.5%、25%の濃度になるように希釈した。UMR-106 細胞を48穴プレートに30,000個/300μl/ウェルで撒き、24時間後に細胞培養液を吸引後PBSで2回洗浄し、0.25%、2.5%、25%に希釈し、かつ10⁻⁹ Mの1, 25(OH)₂D₃ を含むRQ蛋白溶液、またはT178A蛋白溶液 300μlで置換した。48時間後細胞を採取、同様にリアルタイムPCRで*FGF23* mRNA発現量を定量化した。各群間の*FGF23* mRNA発現量の比較にはrepeated one-way ANOVAとBonferroni法を用いた。各群n=4で実験を行なった。

F. 結果

1. 体内での FGF23 存在様式の検討

(1) 二つの FGF23 測定法の比較

まず、FGF23 が高値となることが報告されている HD または PD 施行中の ESRD 患者、TIO 患者、XLH 患者の血中 FGF23 を全長アッセイで測定し、これらの疾患において FGF23 が異常高値となっていることを確認した(図 14)。次いで、一部の症例で二つの FGF23 測定法を比較した。HD 施行中の ESRD 患者、TIO 患者背景を表 2 に示す。FGF23 測定値は、全長アッセイ・C 端アッセイいずれでも高値であった。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(図 15)。

(2) 血漿中の FGF23 蛋白存在様式の検討

さらに血中の FGF23 蛋白存在様式をより明らかにするため、健常人 6 名、HD 中の ESRD20 症例、PD 中の ESRD9 症例、TIO11 症例の血漿を FGF23 蛋白 C 端側に対する抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロットにより C 端側に対する抗体で FGF23 蛋白、C 端フラグメントを検出した。FGF23 が高値ではない健常人を含め、各群で約 32 kDa の全長 FGF23 のバンドと、約 12 kDa の FGF23C 端フラグメントのバンドが検出された。これらのバンドを定量化し、比率を算

出したところ、FGF23C 端フラグメント量の総 FGF23 量(=全長 FGF23+FGF23C 端フラグメント)に対する比率は、健常人群では 0.29 ± 0.04 、HD 中の ESRD 群 0.24 ± 0.03 、PD 中の ESRD 群 0.24 ± 0.06 、TIO 群で 0.25 ± 0.05 と、30%弱存在することが明らかとなった。またこれらの比率には、各群間で有意差は認めなかった(図 16 ウェスタンブロットは代表的な結果のみ示した)。

2. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響の検討

(1) 全長 FGF23 または FGF23-N/C 端フラグメントを含む溶液の採取

野生型 *FGF23* 遺伝子(WT)、*FGF23* RQ または T178A 変異遺伝子を発現させた CHO 細胞の培養上清を採取し、FGF23C 端側に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。WT 蛋白では、全長 FGF23 蛋白に相当する約 32 kDa のバンドと、C 端フラグメントに相当する約 12 kDa のバンドの両者を認めた。一方、RQ 蛋白はプロセッシングに抵抗性であり、全長 FGF23 と考えられるバンドのみが得られたのに対し、T178A 蛋白では全長 FGF23 に相当する位置にバンドは無く、C 端フラグメントのみが検出された。このことから、それぞれの培養上清を全長 FGF23 蛋白溶液、FGF23-N/C 端フラグメント溶液として扱うことが可能と考えた(図 17)。RQ 蛋白溶液の全長アッセイ測定値は約 31284 pg/ml であり、30000 pg/ml に希釈して以下の検討に使用した。

(2) FGF23 フラグメントの細胞内情報伝達系への影響

まず Klotho 発現細胞において、FGF23 蛋白による細胞内情報伝達系の活性化を、RQ 蛋白と T178A 蛋白を用いて *Egr-1* プロモーター活性で評価した。RQ 蛋白溶液含有量が 1、20、60、100% となるように希釈した溶液の FGF23 濃度は全長アッセイにてそれぞれ 300、6000、18000、30000 pg/ml に相当する。RQ 蛋白は、*Egr-1* プロモーター活性を用量依存性(RQ 蛋白溶液含有量が 1、20、60、100%) に増加させたが、T178A 蛋白は、単独では *Egr-1* プロモーター活性を促進しなかった(図 18)。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した。75 μ l 中の RQ 蛋白溶液を 5 μ l とすると、全長アッセイによる FGF23 濃度は 2000 pg/ml に相当する。前項で得られた体内での C 端フラグメント量である、約 30% の T178A 蛋白では RQ 蛋白の活性に影響を与えなかった。一方、等量(50%)以上添加した場合には T178A 蛋白は RQ の活性を低下させることが明らかとなった (図 18)。

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

通常の状態(vehicle)では UMR-106 細胞は *FGF23* mRNA を発現していないのに対し、1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 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(図 19)。しかし、RQ 蛋白、T178A 蛋白が 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 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(図 19)。

G. 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。FGF23 の同定後、様々なリン代謝異常症の原因として FGF23 が関与していることが明らかにされてきた。また、慢性腎臓病において FGF23 が高値となることも判明している。この機序は明らかにされてはいないが、恐らく慢性的な高リン血症が刺激となっていると考えられる。近年では、血液透析導入時の血清リン値と C 端アッセイによる FGF23 測定値が有意な相関を示し、共に予後に関係する独立した因子であることが報告されている[56]。また、高リン血症が血管の石灰化と関係しているという観点から FGF23 も注目され、慢性腎臓病患者における心血管イベントや血管の石灰化、左室肥大、および慢性腎臓病の進行との関係も見出されている[56-59]。しかし、これらの慢性腎臓病患者に関する報告の一部は、リン利尿作用を持たない C 端フラグメントも測定する C 端アッセイでの測定値を用いている。FGF23 も PTH の様に、慢性腎臓病患者において、C 端フラグメントが体内に蓄積している可能性があるため、C 端アッセイ測定値が実際の体内での FGF23 活性を反映していない可能性があった。今回の我々の検討で、血漿の免疫沈降-ウェスタンブロッティングの結果から、FHTC の様な特殊な病態でなくとも、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、その比率は総 FGF23 量の約 30%であることがわかった。そしてその比率は、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。従って 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。ESRD 患者におけるは、FGF23 の著明高値は、全長アッセイ測定値は勿論、C 端アッセイ測定値も、測定法上の問題ではなく、FGF23 の産生亢進を反映しているものと考えられる。

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。FGF23C 端フラグメントはマウスに投与してもリン利尿作用を有さないとのデータがある[10]。しかし、FGF23 の 180 番目から 251 番目のアミノ酸に相当するペプチドがラットの血清リンを低下させたとの報告もある[60]。さらに、180 番目から 205 番目に相当する短いペプチドが、FGF23 ノックアウトマウスの高リン血症を低下させたとも報告されている[60]。しかし、FGF23 のプロセッシング部位より N 端側が FGFR1c と、C 端側が Klotho と結合することが報告されていることから [17]、C 端側のみペプチドでは本来の全長 FGF23 が引き起こす細胞内情報伝達が生じないと考えられ、その機序は明かではない。一方、合成された FGF23C 端フラグメントが Klotho に結合し、全長 FGF23 の結合を阻害することも報告されている[61]。今回の検討では、健常人、ESRD、TIO の体内での FGF23C 端フ

ラグメントの存在比率と同じく、約 30%がフラグメントとして存在している状態では、*in vitro* で全長 FGF23 作用を阻害しなかったが、過剰(50%以上)に存在する場合には、全長 FGF23 作用が阻害され、前述の報告と一致する成績であった。従って、FGF23 フラグメントが著増する *GALNT3* や *FGF23* 遺伝子異常による FHTC では、FGF23 蛋白プロセッシングの亢進による全長 FGF23 蛋白の減少に加え、FGF23 フラグメントによる全長 FGF23 蛋白活性の阻害が、FGF23 作用障害の発現に関与している可能性が考えられる。逆に、FGF23 蛋白のスブチリン様プロテアーゼ認識配列変異による ADHR では、FGF23 蛋白がプロセッシングに抵抗性であり、FGF23 フラグメントが減少していると推測される。Fanconi 症候群やビタミン D 欠乏など、過剰な FGF23 活性以外の原因による低リン血症では、FGF23 は低値である[27]。一方 ADHR 患者では、低リン血症が存在する際には血中 FGF23 濃度が高値を示すが、前述のように経過中に血清 FGF23、リン値ともに基準値である期間も存在する[25]。従って、ADHR における FGF23 の作用過剰は、プロセッシング抵抗性のみが原因ではなく、ADHR 惹起 *FGF23* 遺伝子変異により、何らかの機序で FGF23 産生調節機構に異常が生じているもの、と考えられる。ADHR において体内で減少しているであろう FGF23 フラグメントの FGF23 産生に影響を及ぼす可能性を考え、ラット骨肉腫由来細胞 (UMR-106)を用い、FGF23 フラグメントの *FGF23* mRNA 発現への影響を評価し

た。Klotho は骨において発現していないことから、FGF23 フラグメントが FGF23 産生に影響を及ぼすとしても、その作用は Klotho 非依存性と考えられる。本検討では FGF23 フラグメントの影響は見られなかったが、UMR-106 細胞が実際に *in vivo* で FGF23 産生を担っている細胞の特徴をどの程度反映しているかは不明である。FGF23 産生調節機構については不明な点が多く、ADHR における高 FGF23 血症の発症機序に解明のためにも、今後の検討が必要である。

FGF23 の C 端側は FGFR1c-Klotho 複合体の Klotho 部分と結合する。この結合は、FGF23 蛋白の 180 番目のアルギニンから 194 番目のリジンまでの配列を認識する抗 FGF23 抗体によって阻害される[17]。この抗体は、XLH のモデルマウスである *Hyp* マウスにおいて、低リン血症と低 1,25(OH)₂D 血症、および筋力低下などの症状を改善する[62]。また、腎不全モデルラットにおいても低 1,25(OH)₂D 血症を改善することによって PTH を低下させることが示されている[63]。我々の検討では、過剰な C 端フラグメントは抗体と同様に全長 FGF23 作用を阻害した。従って、生体内での C 端フラグメントの意義の検討は、FGF23 作用過剰疾患への治療法開発につながるものと考えられる。

H. 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た。

I. 謝辞

ご指導いただきました藤田敏郎教授、福本誠二先生、伊東伸朗先生、鈴木尚宜先生、他所属研究室の諸先生方に深謝申し上げます。

J. 参考文献

1. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 494-498, 2000.
2. The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 26: 345-348, 2000.
3. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6500-6505, 2001.
4. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20: 563-569, 2004.
5. Moore DD. Physiology. Sister act. *Science* 316: 1436-1438, 2007.
6. Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, Kato S, Kanayama HO, Miyamoto K. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J* 390: 325-331, 2005.
7. Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, Juppner

- H, Lanske B. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biol* 23: 421-432, 2004.
8. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 17: 1305-1315, 2006.
 9. Benet-Pages A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, White KE, Econs MJ, Strom TM. FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX. *Bone* 35: 455-462, 2004.
 10. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143: 3179-3182, 2002.
 11. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int* 60: 2079-2086, 2001.
 12. Frishberg Y, Ito N, Rinat C, Yamazaki Y, Feinstein S, Urakawa I, Navon-Elkan P, Becker-Cohen R, Yamashita T, Araya K, Igarashi T, Fujita T, Fukumoto S.

- Hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome: a congenital disorder of O-glycosylation associated with augmented processing of fibroblast growth factor 23. *J Bone Miner Res* 22: 235-242, 2007.
13. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444: 770-774, 2006.
 14. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 281: 6120-6123, 2006.
 15. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51, 1997.
 16. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113: 561-568, 2004.
 17. Yamazaki Y, Tamada T, Kasai N, Urakawa I, Aono Y, Hasegawa H, Fujita T,

- Kuroki R, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T. Anti-FGF23 neutralizing antibodies show the physiological role and structural features of FGF23. *J Bone Miner Res* 23: 1509-1518, 2008.
18. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, Hasegawa Y, Satoh K, Tajima T, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Yamashita T, Fukumoto S. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4957-4960, 2002.
19. Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J, Juppner H. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med* 348: 1656-1663, 2003.
20. Takeuchi Y, Suzuki H, Ogura S, Imai R, Yamazaki Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Okazaki H, Nakamura K, Nakahara K, Fukumoto S, Fujita T. Venous sampling for fibroblast growth factor-23 confirms preoperative diagnosis of tumor-induced osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3979-3982, 2004.
21. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. Loss of DMP1

- causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 38: 1310-1315, 2006.
22. Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Muller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Juppner H, Strom TM. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet* 38: 1248-1250, 2006.
23. Levy-Litan V, HersHKovitz E, Avizov L, Leventhal N, Bercovich D, Chalifa-Caspi V, Manor E, Buriakovsky S, Hadad Y, Goding J, Parvari R. Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene. *Am J Hum Genet* 86: 273-278, 2010.
24. Lorenz-Depiereux B, Schnabel D, Tiosano D, Hausler G, Strom TM. Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 86: 267-272, 2010.
25. Imel EA, Hui SL, Econs MJ. FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *J Bone Miner Res* 22: 520-526,

2007.

26. Shimizu Y, Tada Y, Yamauchi M, Okamoto T, Suzuki H, Ito N, Fukumoto S, Sugimoto T, Fujita T. Hypophosphatemia induced by intravenous administration of saccharated ferric oxide: another form of FGF23-related hypophosphatemia. *Bone* 45: 814-816, 2009.
27. Endo I, Fukumoto S, Ozono K, Namba N, Tanaka H, Inoue D, Minagawa M, Sugimoto T, Yamauchi M, Michigami T, Matsumoto T. Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. *Bone* 42: 1235-1239, 2008.
28. Garringer HJ, Fisher C, Larsson TE, Davis SI, Koller DL, Cullen MJ, Draman MS, Conlon N, Jain A, Fedarko NS, Dasgupta B, White KE. The role of mutant UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in regulating serum intact fibroblast growth factor 23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein in heritable tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4037-4042, 2006.
29. Kato K, Jeanneau C, Tarp MA, Benet-Pages A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM, Clausen H. Polypeptide GalNAc-transferase T3 and

- familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *J Biol Chem* 281: 18370-18377, 2006.
30. Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrachi M, Khamaysi Z, Behar D, Petronius D, Friedman V, Zelikovic I, Raimer S, Metzker A, Richard G, Sprecher E. Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat Genet* 36: 579-581, 2004.
 31. Araya K, Fukumoto S, Backenroth R, Takeuchi Y, Nakayama K, Ito N, Yoshii N, Yamazaki Y, Yamashita T, Silver J, Igarashi T, Fujita T. A novel mutation in fibroblast growth factor 23 gene as a cause of tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5523-5527, 2005.
 32. Benet-Pages A, Orlik P, Strom TM, Lorenz-Depiereux B. An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum Mol Genet* 14: 385-390, 2005.
 33. Larsson T, Yu X, Davis SI, Draman MS, Mooney SD, Cullen MJ, White KE. A novel recessive mutation in fibroblast growth factor-23 causes familial tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2424-2427, 2005.
 34. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R,

- Mohammadi M, White KE, Econs MJ. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 117: 2684-2691, 2007.
35. Hang HC, Yu C, Ten Hagen KG, Tian E, Winans KA, Tabak LA, Bertozzi CR. Small molecule inhibitors of mucin-type O-linked glycosylation from a uridine-based library. *Chem Biol* 11: 337-345, 2004.
36. Lammoglia JJ, Mericq V. Familial tumoral calcinosis caused by a novel FGF23 mutation: response to induction of tubular renal acidosis with acetazolamide and the non-calcium phosphate binder sevelamer. *Horm Res* 71: 178-184, 2009.
37. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Yasuda T, Hasegawa Y, Takemoto F, Tajima T, Dobashi K, Yamazaki Y, Yamashita T, Fujita T. Comparison of two assays for fibroblast growth factor (FGF)-23. *J Bone Miner Metab* 23: 435-440, 2005.
38. Bergwitz C, Banerjee S, Abu-Zahra H, Kaji H, Miyauchi A, Sugimoto T, Juppner H. Defective O-glycosylation due to a novel homozygous S129P mutation is associated with lack of fibroblast growth factor 23 secretion and tumoral calcinosis. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4267-4274, 2009.
39. Dumitrescu CE, Kelly MH, Khosravi A, Hart TC, Brahim J, White KE, Farrow EG, Nathan MH, Murphey MD, Collins MT. A case of familial tumoral

- calcinosis/hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome due to a compound heterozygous mutation in GALNT3 demonstrating new phenotypic features. *Osteoporos Int* 20: 1273-1278, 2009.
40. Garringer HJ, Mortazavi SM, Esteghamat F, Malekpour M, Boztepe H, Tanakol R, Davis SI, White KE. Two novel GALNT3 mutations in familial tumoral calcinosis. *Am J Med Genet A* 143A: 2390-2396, 2007.
41. Ichikawa S, Baujat G, Seyahi A, Garoufali AG, Imel EA, Padgett LR, Austin AM, Sorenson AH, Pejin Z, Topouchian V, Quartier P, Cormier-Daire V, Dechaux M, Malandrino F, Singhellakis PN, Le Merrer M, Econs MJ. Clinical variability of familial tumoral calcinosis caused by novel GALNT3 mutations. *Am J Med Genet A* 152A: 896-903, 2010.
42. Ichikawa S, Guignon V, Imel EA, Courouble M, Heissat S, Henley JD, Sorenson AH, Petit B, Lienhardt A, Econs MJ. Novel GALNT3 mutations causing hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome result in low intact fibroblast growth factor 23 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1943-1947, 2007.
43. Ichikawa S, Imel EA, Sorenson AH, Severe R, Knudson P, Harris GJ, Shaker JL, Econs MJ. Tumoral calcinosis presenting with eyelid calcifications due to novel

- missense mutations in the glycosyl transferase domain of the GALNT3 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4472-4475, 2006.
44. Olauson H, Krajsnik T, Larsson C, Lindberg B, Larsson TE. A novel missense mutation in GALNT3 causing hyperostosis-hyperphosphataemia syndrome. *Eur J Endocrinol* 158: 929-934, 2008.
 45. Gupta A, Winer K, Econs MJ, Marx SJ, Collins MT. FGF-23 is elevated by chronic hyperphosphatemia. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4489-4492, 2004.
 46. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int* 64: 2272-2279, 2003.
 47. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res* 18: 1227-1234, 2003.
 48. Ix JH, Shlipak MG, Wassel CL, Whooley MA. Fibroblast growth factor-23 and early decrements in kidney function: the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 25: 993-997, 2010.
 49. Freitag J, Martin KJ, Hruska KA, Anderson C, Conrades M, Ladenson J, Klahr S,

- Slatopolsky E. Impaired parathyroid hormone metabolism in patients with chronic renal failure. *N Engl J Med* 298: 29-32, 1978.
50. Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1519-1524, 2005.
51. Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* 146: 5358-5364, 2005.
52. Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J Biol Chem* 280: 2543-2549, 2005.
53. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1088-1095, 2005.
54. Ito M, Sakai Y, Furumoto M, Segawa H, Haito S, Yamanaka S, Nakamura R,

- Kuwahata M, Miyamoto K. Vitamin D and phosphate regulate fibroblast growth factor-23 in K-562 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1101-1109, 2005.
55. Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR, Ghishan FK. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G1036-1042, 2005.
56. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 359: 584-592, 2008.
57. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F, Kuen E, Konig P, Kraatz G, Mann JF, Muller GA, Kohler H, Riegler P. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 18: 2600-2608, 2007.
58. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collierone G, Sarwar

- A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* 119: 2545-2552, 2009.
59. Hsu HJ, Wu MS. Fibroblast growth factor 23: a possible cause of left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Am J Med Sci* 337: 116-122, 2009.
60. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, Lanske B, Sitara D, Razzaque MS, Pragnell M, Bowe AE, O'Brien SP, Schiavi SC, Kumar R. Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch* 454: 615-623, 2007.
61. Goetz R, Nakada Y, Hu MC, Kurosu H, Wang L, Nakatani T, Shi M, Eliseenkova AV, Razzaque MS, Moe OW, Kuro-o M, Mohammadi M. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 407-412, 2010.
62. Aono Y, Yamazaki Y, Yasutake J, Kawata T, Hasegawa H, Urakawa I, Fujita T, Wada M, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T. Therapeutic effects of anti-FGF23 antibodies in hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Bone Miner Res* 24: 1879-1888, 2009.
63. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita

T, Fukumoto S, Shimada T. Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease. *Kidney Int* 78: 975-980, 2010.

K. 図表

表1. FGF23作用異常による疾患

表2. ESRD群(30症例)、TIO群(3症例)の患者背景

図1. FGFsファミリー

図2. FGF23の作用

図3. FGF23蛋白の構造

図4. ADHR惹起遺伝子変異

図5. 変異FGF23蛋白のプロセッシング抵抗性

図6. FGF23蛋白糖鎖付加の順序

図7. FGF23蛋白への糖鎖付加機構

図8. FGF23受容機構

図9. FGF23測定法の原理

図10. ppGalNAc-T3によるムチン型O型糖鎖付加機構

図11. FGF23作用障害による家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症(FHTC)

図12. XLH、FHTC患者血漿の全長アッセイ、C端アッセイによるFGF23測定値
の比較

図13. *GALNT3*遺伝子異常によるFHTC症例の血中FGF23とリン値の関係

図14. ESRD(HD, PD)、TIO、XLHの血清FGF23値

図15. 二つのFGF23測定法によるESRD(HD)とTIO症例の血漿中FGF23

図16. 血漿中FGF23蛋白存在様式の検討

図17. 全長FGF23蛋白、FGF23-N/C端フラグメントの採取

図18. FGF23フラグメントの全長FGF23作用に対する影響

図19. 全長FGF23、フラグメントの*FGF23* mRNA発現への影響

表 1. FGF23 作用異常による疾患

| | | |
|--|---|----------------------------------|
| FGF23作用過剰 | ・・・ | 低リノ血症、低1,25(OH) ₂ D血症 |
| 腫瘍性くる病/骨軟化症 | | |
| | (Tumor-induced rickets/osteomalacia: TIO) | |
| X染色体優性低リノ血症性くる病/骨軟化症 | (<i>PHEX</i> 遺伝子異常) | |
| | (X-linked hypophosphatemic rickets/osteomalacia: XLH) | |
| 常染色体優性低リノ血症性くる病/骨軟化症 | (<i>FGF23</i> 遺伝子異常) | |
| | (Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ADHR) | |
| 常染色体劣性低リノ血症性くる病/骨軟化症 | (<i>DMP1</i> ・ <i>ENPP1</i> 遺伝子異常) | |
| | (Autosomal recessive hypophosphatemic rickets/osteomalacia: ARHR) | |
| McCune-Albright症候群/線維性骨異形成症に伴う低リノ血症性くる病/骨軟化症 | | |
| | (<i>GNAS1</i> 遺伝子異常) (McCune-Albright syndrome: MAS) | |
| 薬剤性低リノ血症(含糖酸化鉄静注製剤) | | |
| FGF23作用障害 | ・・・ | 高リノ血症、高1,25(OH) ₂ D血症 |
| 家族性高リノ血症性腫瘍状石灰沈着症 | (<i>GALNT3</i> 遺伝子異常) | |
| 家族性高リノ血症性腫瘍状石灰沈着症 | (<i>FGF23</i> 遺伝子異常) | |
| 家族性高リノ血症性腫瘍状石灰沈着症 | (<i>Klotho</i> 遺伝子異常) | |
| | (Familial hyperphosphatemic tumoral calcinosis: FHTC) | |

| | ESRD (HD) | TIO |
|------------------------|---------------|---------------|
| n | 30 | 3 |
| 年齢 | 60.2±9.5 | 59.0±12.3 |
| 女：男 | 14：16 | 2：1 |
| 全長FGF23アッセイ (pg/ml) | 5917.8±1350.6 | 4277.8±3346.5 |
| FGF23C端アッセイ (RU/ml) | 6525.2±1296.3 | 2555.7±1782.4 |
| Pi (mg/dl) | 5.6±1.1* | 1.9±0.5 |
| Ca (mg/dl) | 9.2±0.6 | 8.9±0.5 |
| Cr (mg/dl) | 12.3±1.9* | 0.9±0.5 |

(平均 ± 標準誤差)

(*: $P < 0.05$)

表 2. ESRD 群 (30 症例)、TIO 群 (3 症例) の患者背景

両群とも FGF23 は、全長アッセイ、C 端アッセイいずれでも高値を示し、これらの測定値間に有意差は認められなかった。ESRD 群では血清 Pi 値、Cr 値が有意に高値であった。

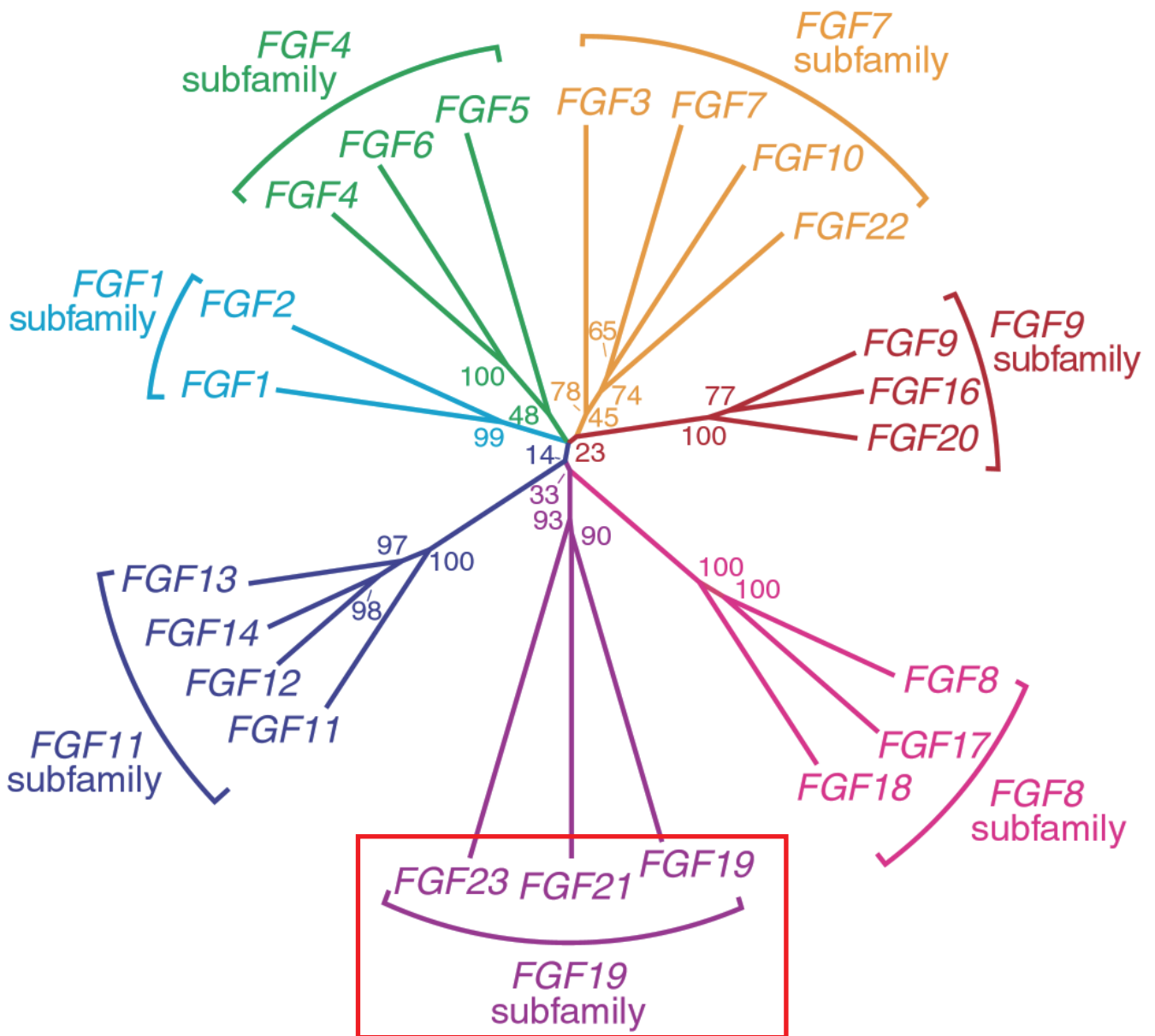


図 1. FGFs ファミリー

FGFs ファミリーメンバーは、いくつかのサブファミリーに分類され、FGF23 は FGF19 や 21 と共に FGF19 サブファミリーに属している (文献 4 より引用)。

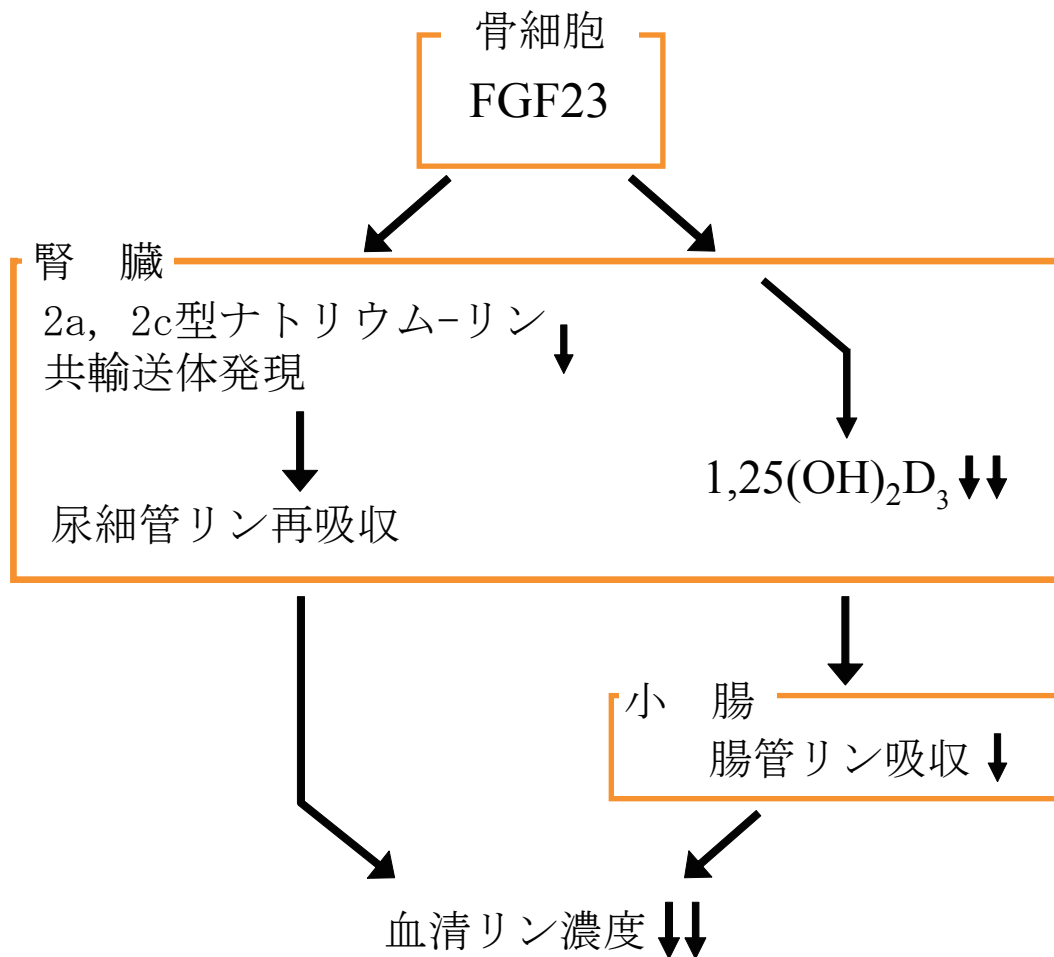


図 2. FGF23 の作用

FGF23 は 2a 型、および 2c 型ナトリウム - リン共輸送体の発現を低下させることにより腎近位尿細管でのリン再吸収を抑制する。FGF23 はまた、ビタミン D 代謝酵素の発現を変化させることにより血中 1,25- 水酸化ビタミン D 濃度 [1,25(OH)₂D₃] を低下させる。1,25(OH)₂D₃ は腸管リン吸収を促進することから、FGF23 作用による 1,25(OH)₂D₃ 濃度の低下も低リン血症の発症に寄与することになる。

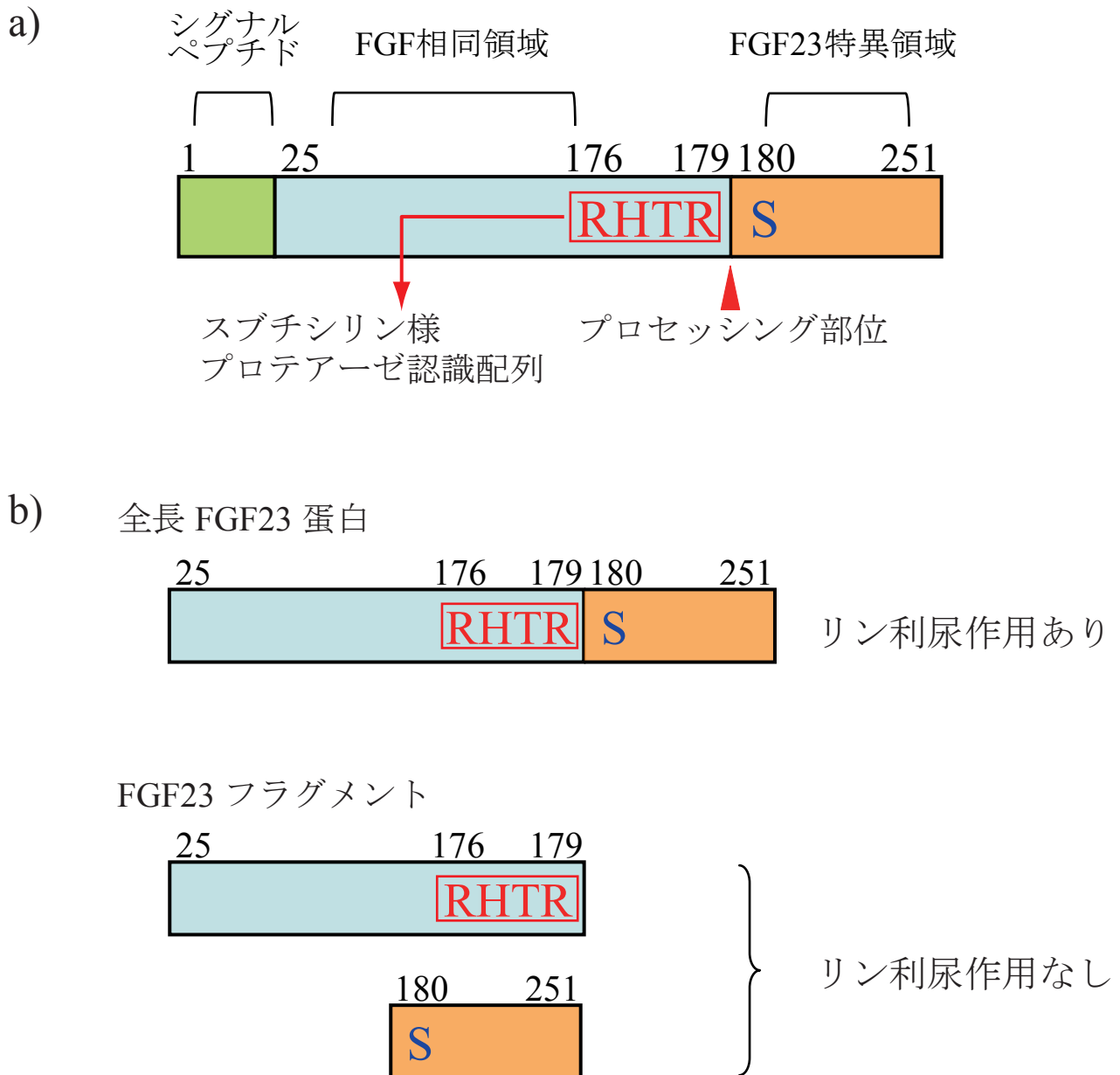
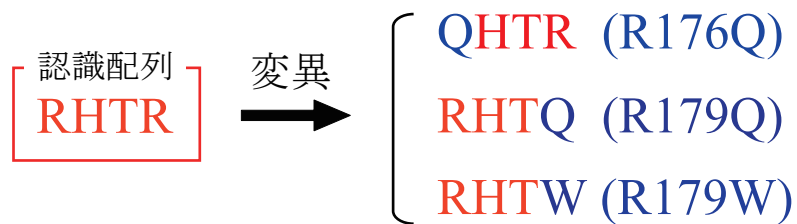
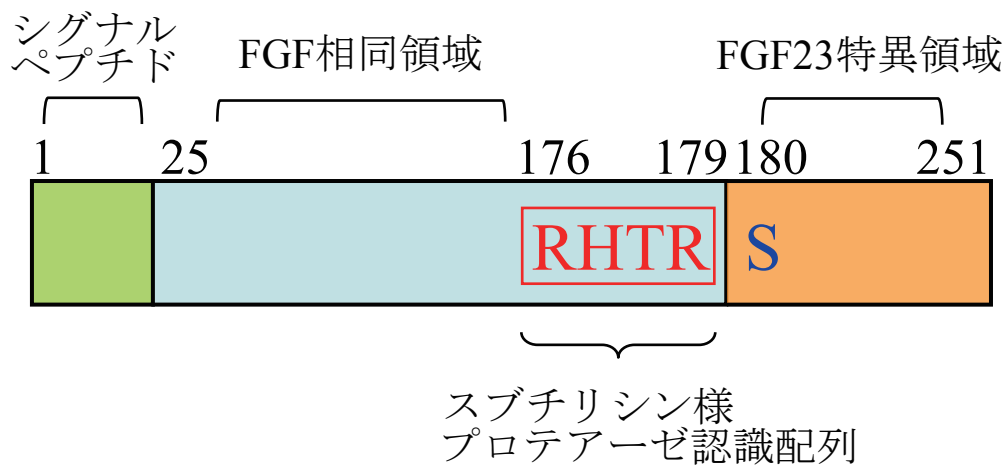


図 3. FGF23 蛋白の構造

a) FGF23 蛋白はスブチシリン様プロテアーゼ認識配列 (RXXR) を有している。*In vitro* の発現実験では、一部の蛋白質が 179 番目のアルギニン (R) と 180 番目のセリン (S) の間でプロセッシングを受けることが知られている。

b) プロセッシングを受けた FGF23 フラグメントは、リン利尿作用を有さない。



R: アルギニン, H: ヒスチジン, T: スレオニン, Q: グルタミン, W: トリプトファン

図 4. ADHR 惹起遺伝子変異

スブチリシン様プロテアーゼ認識配列の変異により、プロセッシングを受けにくい FGF23 蛋白が産生される (文献 10、11 より引用)。

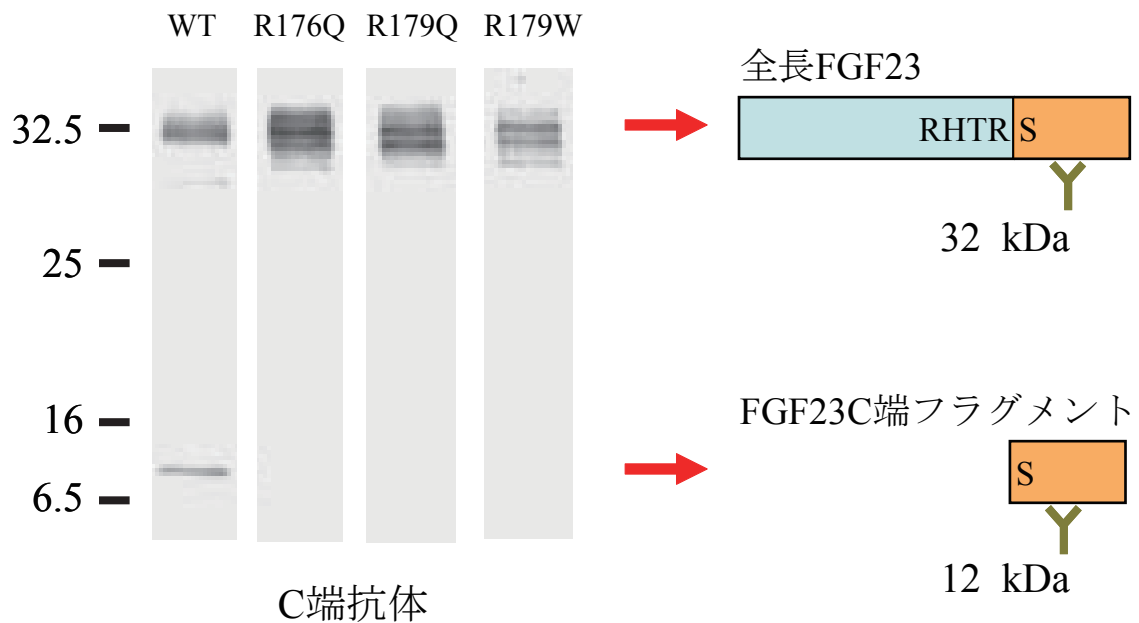


図 5. 変異 FGF23 蛋白のプロセッシング抵抗性

ADHR を惹起する変異遺伝子を発現させ、採取し培養上清を FGF23 蛋白の C 端側に対する抗体でウェスタンブロッティングした。野生型 (wild type: WT) では約 32 kDa の全長 FGF23 のバンドと約 12 kDa の C 端フラグメントのバンドが得られるが、変異 FGF23 蛋白ではいずれも C 端フラグメント量が著しく減少することから、変異 FGF23 蛋白がプロセッシング抵抗性であることがわかる (文献 10 より引用)。

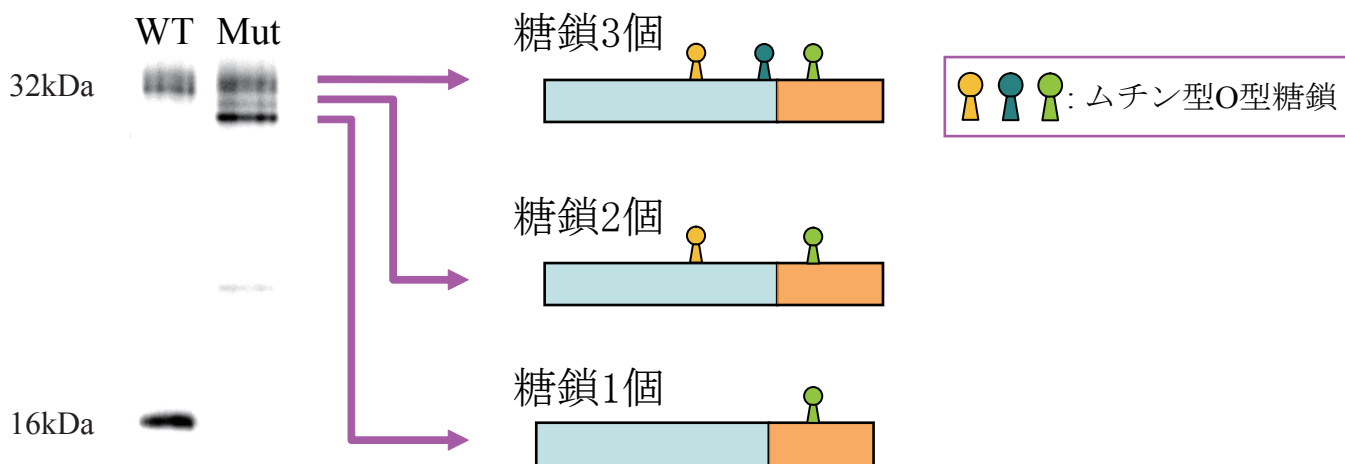
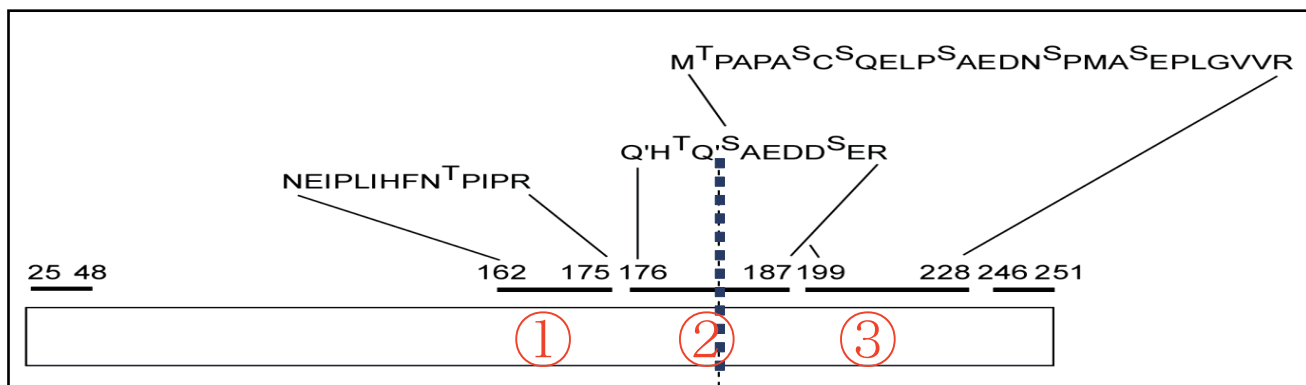
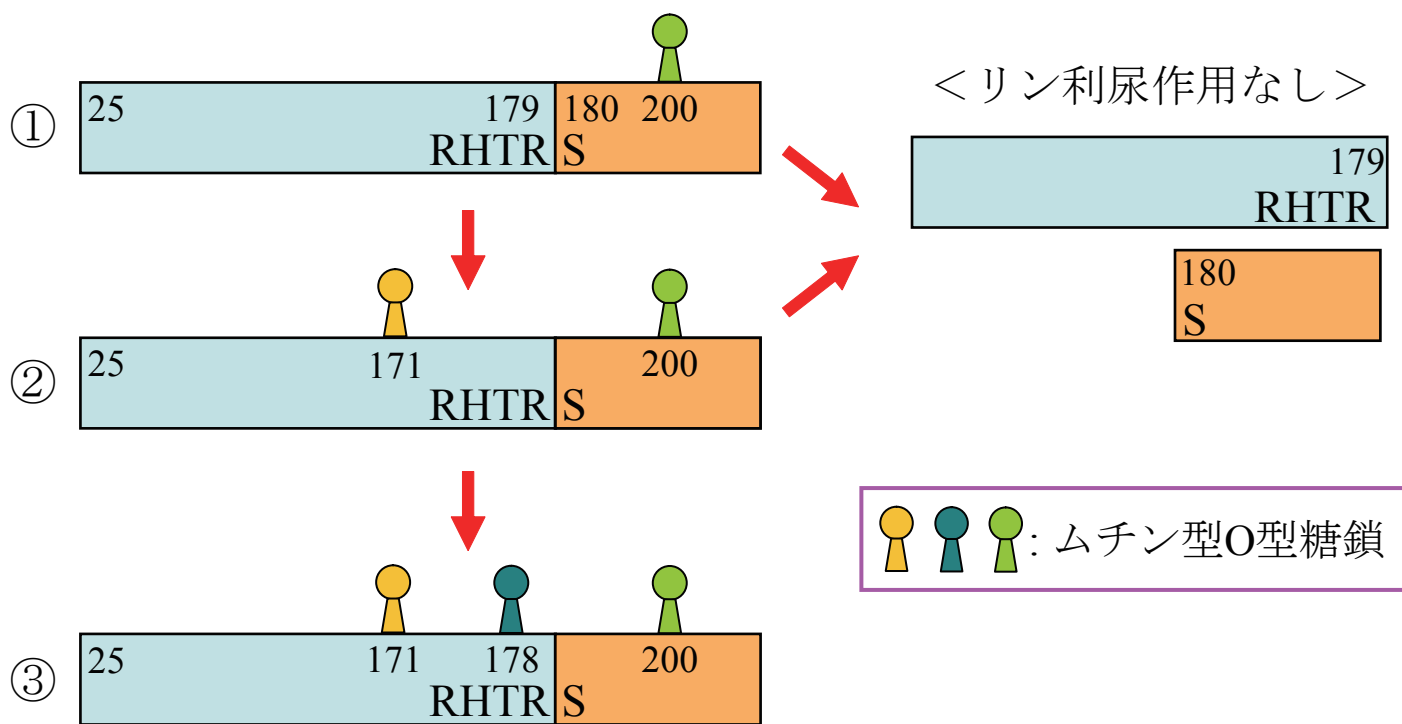


図 6. FGF23 蛋白糖鎖付加の順序

プロセッシング抵抗性の変異 FGF23 蛋白 (Mut) では三つの異なる分子量のバンドが得られる。各バンドを切り出し、トリプシンで処理することによって変異 FGF23 蛋白を切断し、各フラグメントの質量分析を行なうと、FGF23 蛋白が三つのムチン型 O 型糖鎖を有することがわかった (文献 12 より引用)。



プロセッシング抵抗性

<リン利尿作用あり>

図 7. FGF23 蛋白への糖鎖付加機構

FGF23 蛋白は三つのムチン型 O 型糖鎖を有し、200 番目、171 番目、178 番目のスレオニンに順次付加されていく。一つ、あるいは二つの糖鎖しか有さない FGF23 蛋白はプロセッシングを受けるのに対し、三つの糖鎖を有する FGF23 蛋白はプロセッシングを受けない。

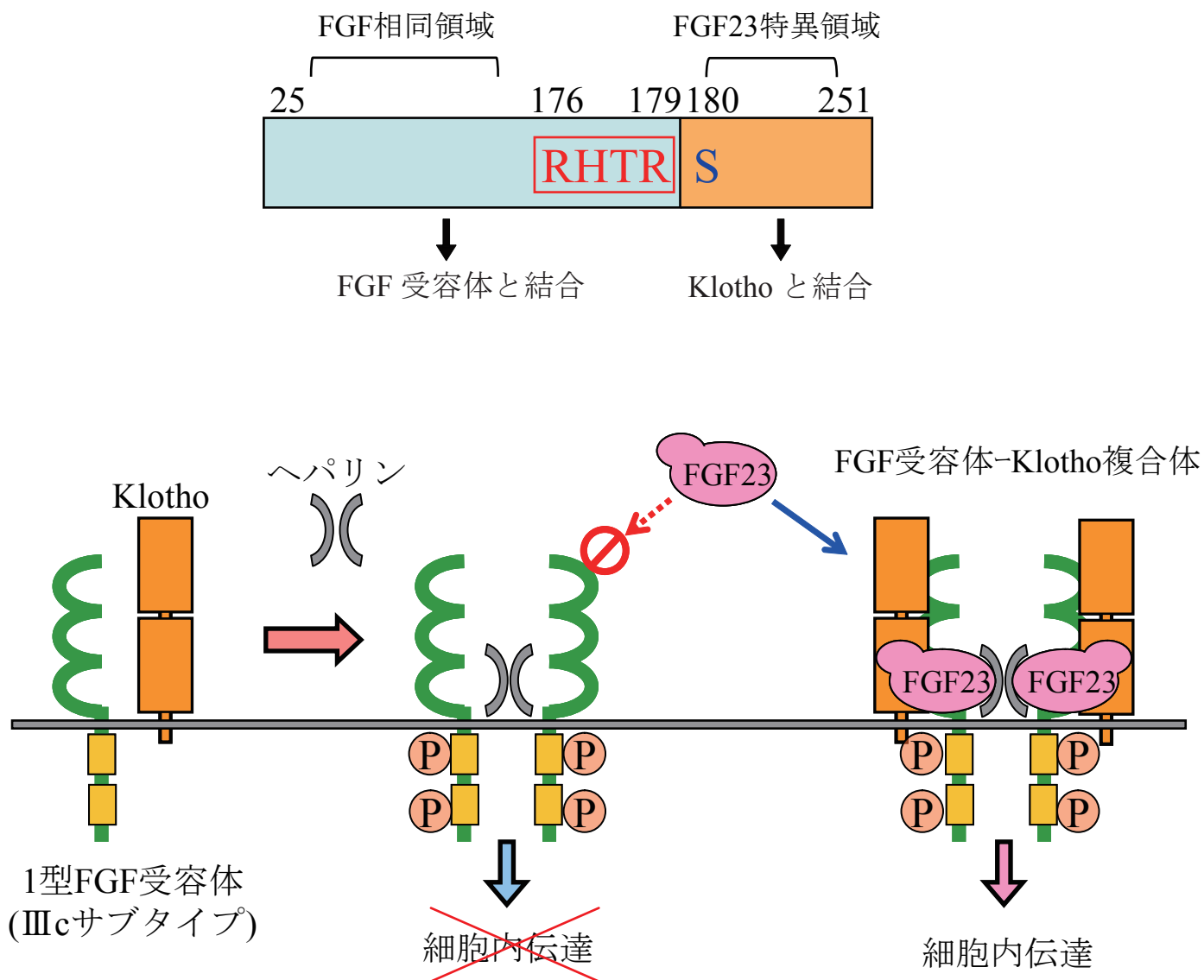


図 8. FGF23 受容機構

腎臓において1型 FGF 受容体IIIc サブタイプは、Klotho と複合体を形成する。FGF23 はこの複合体を介して、細胞内に情報を伝達する。FGF23 蛋白の N 端側が FGF 受容体と、C 端側が Klotho と結合する (文献 13 より引用)。

① 全長アッセイ (Kinos社)
(基準値: 10-50 pg/ml)



② C端アッセイ (Immutopics社)
(基準値: < 150 RU/ml)

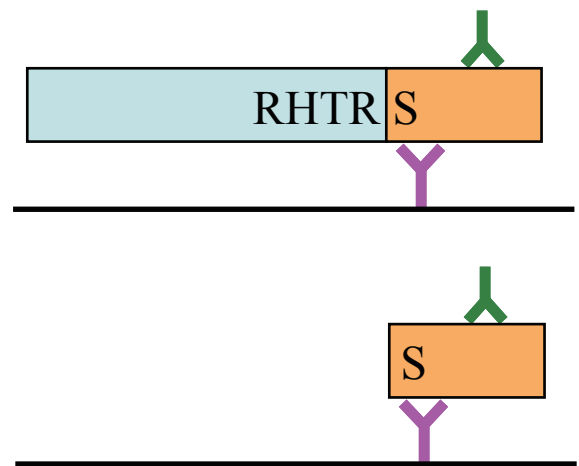


図 9. FGF23 測定法の原理

現在主に使用されている FGF23 の測定法には、全長アッセイと C 端アッセイの 2 種類がある。全長アッセイはリン利尿作用を持つ全長 FGF23 のみを測定するが、C 端アッセイではリン利尿作用を有さない C 端フラグメントも同時に測定される。

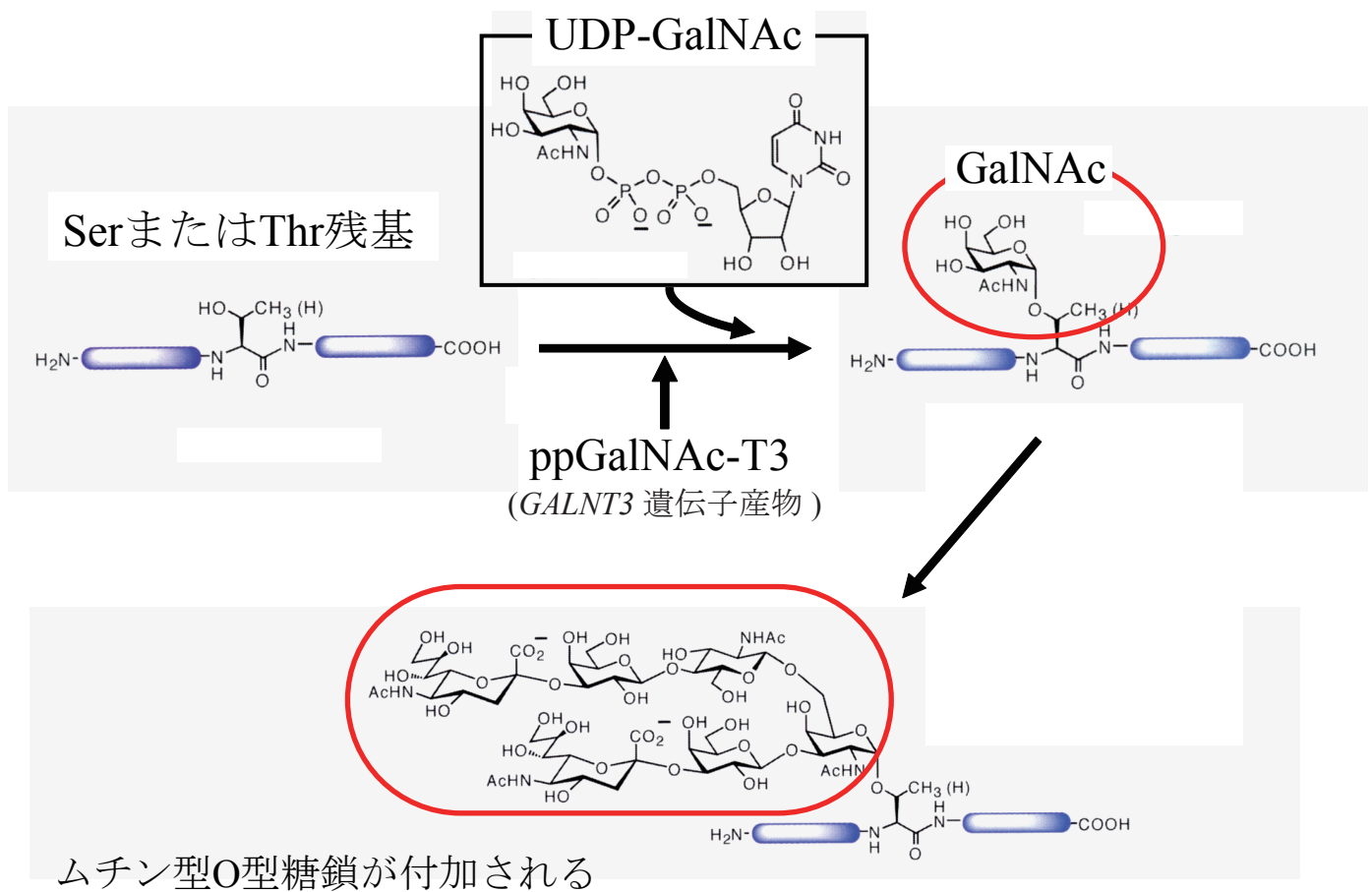
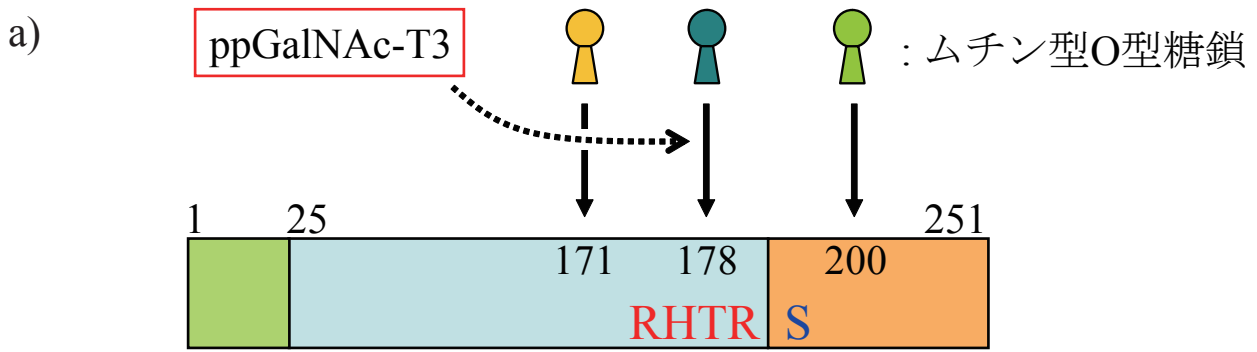


図 10. ppGalNAcT-3 によるムチン型 O 型糖鎖付加機構

ムチン型 O 型糖鎖付加では、セリン (Ser) またはスレオニン (Thr) 残基に対してまずはじめに UDP-GalNAc が付加され、それに引き続き糖鎖が連鎖的に付加されていく。GALNT3 遺伝子産物である ppGalNAc-T3 は、始めの GalNAc 付加を媒介する酵素であり、FGF23 蛋白の 178 番目の Thr へムチン型 O 型糖鎖を付加する (文献 34 より引用、一部改変)。



ppGalNAc-T3をコードする *GALNT3* 遺伝子変異

FGF23 遺伝子変異

→ FGF23 蛋白のプロセッシング亢進

受容体異常 (*Klotho* 遺伝子変異)

→ FGF23 作用障害

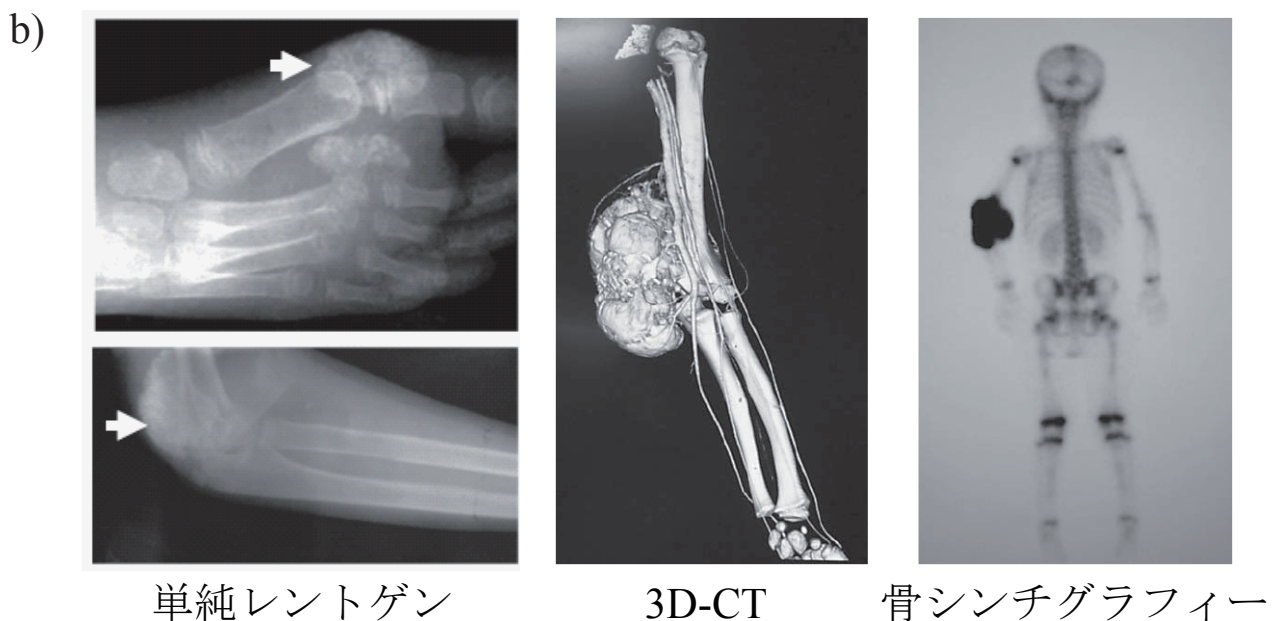


図 11. FGF23 作用障害による家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症 (FHTC)

a) *GALNT3* 遺伝子、*FGF23* 遺伝子変異では FGF23 蛋白プロセッシングが亢進し、全長 FGF23 蛋白が減少する。一方、*Klotho* 遺伝子異常では、受容体異常により FGF23 抵抗性が惹起される。

b) FHTC は、高リン血症、高 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 血症、および異所性石灰化を特徴とする疾患である。左上下図は、*GALNT3* 遺伝子異常による FHTC 症例 (文献 37 より引用)、中・右図は *FGF23* 遺伝子異常による FHTC 症例 (文献 32 より引用) の異所性石灰化画像所見。

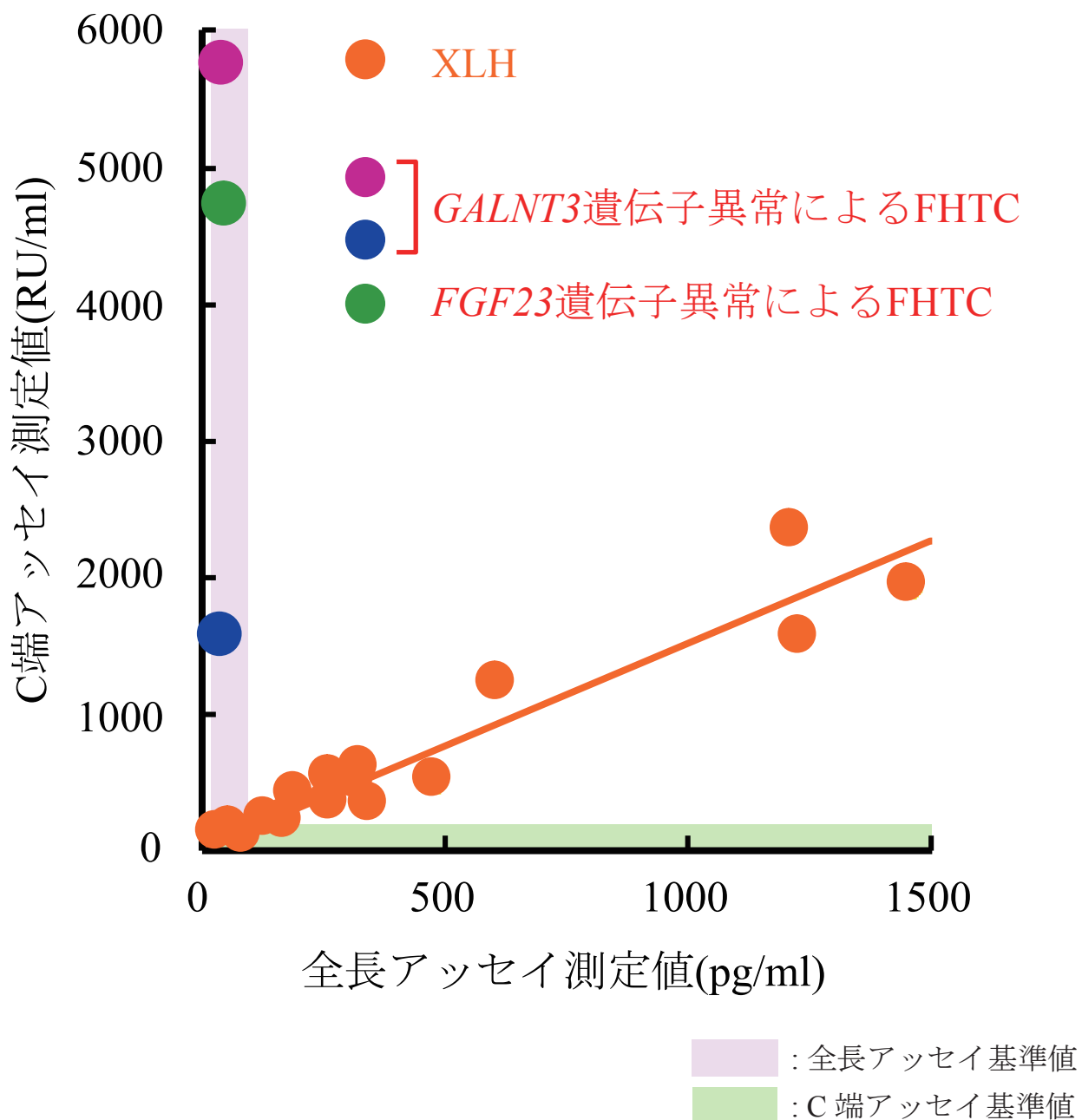


図 12. XLH、FHTC 患者血漿の全長アッセイ、C 端アッセイによる FGF23 測定値の比較

XLH では全長アッセイ測定値と C 端アッセイ測定値は良好な相関を示す ($R=0.96$)。一方、*GALNT3* 遺伝子異常、*FGF23* 遺伝子異常による FHTC では、両者の測定値が解離する (文献 12、31、37 から引用)。

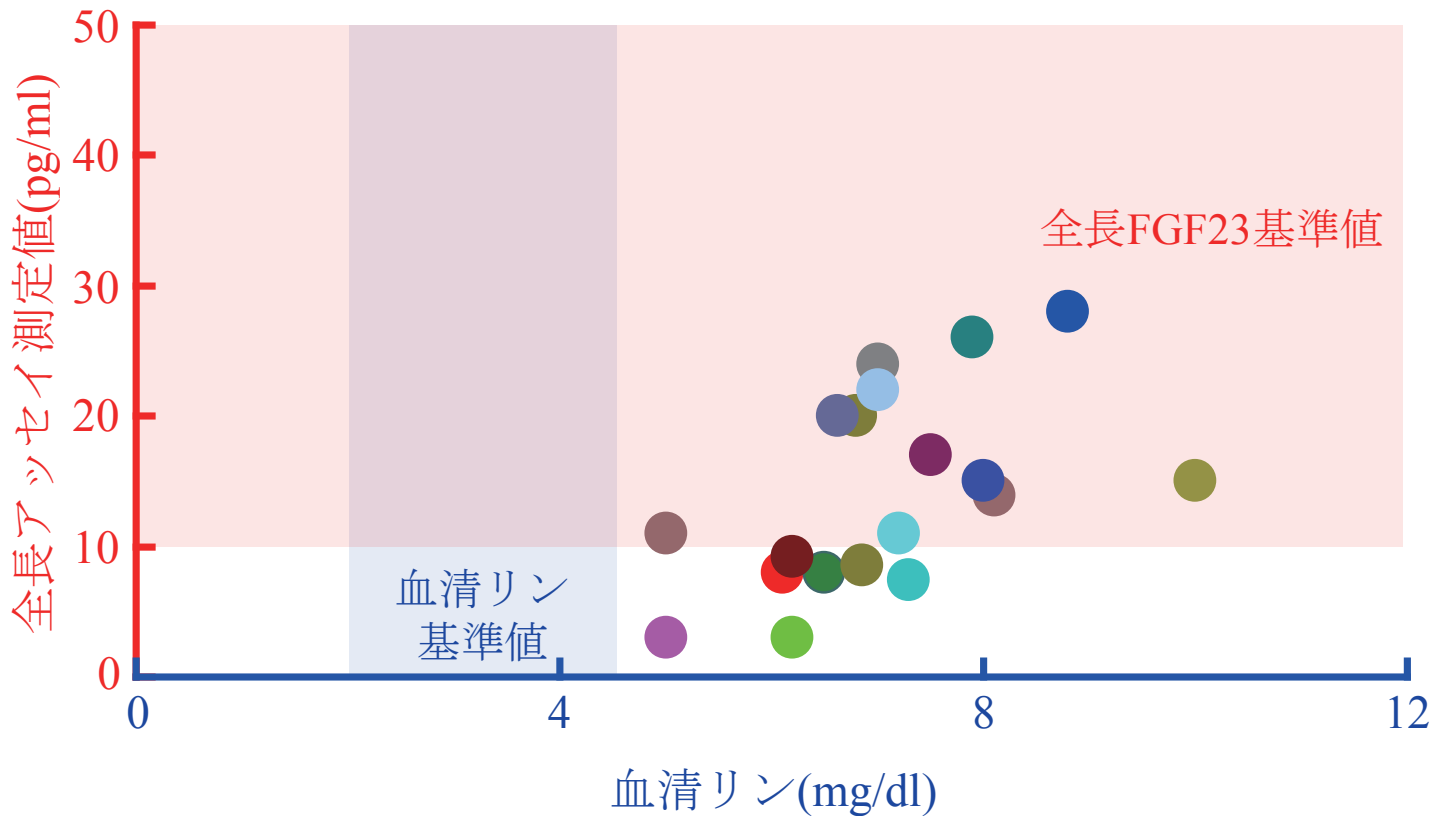
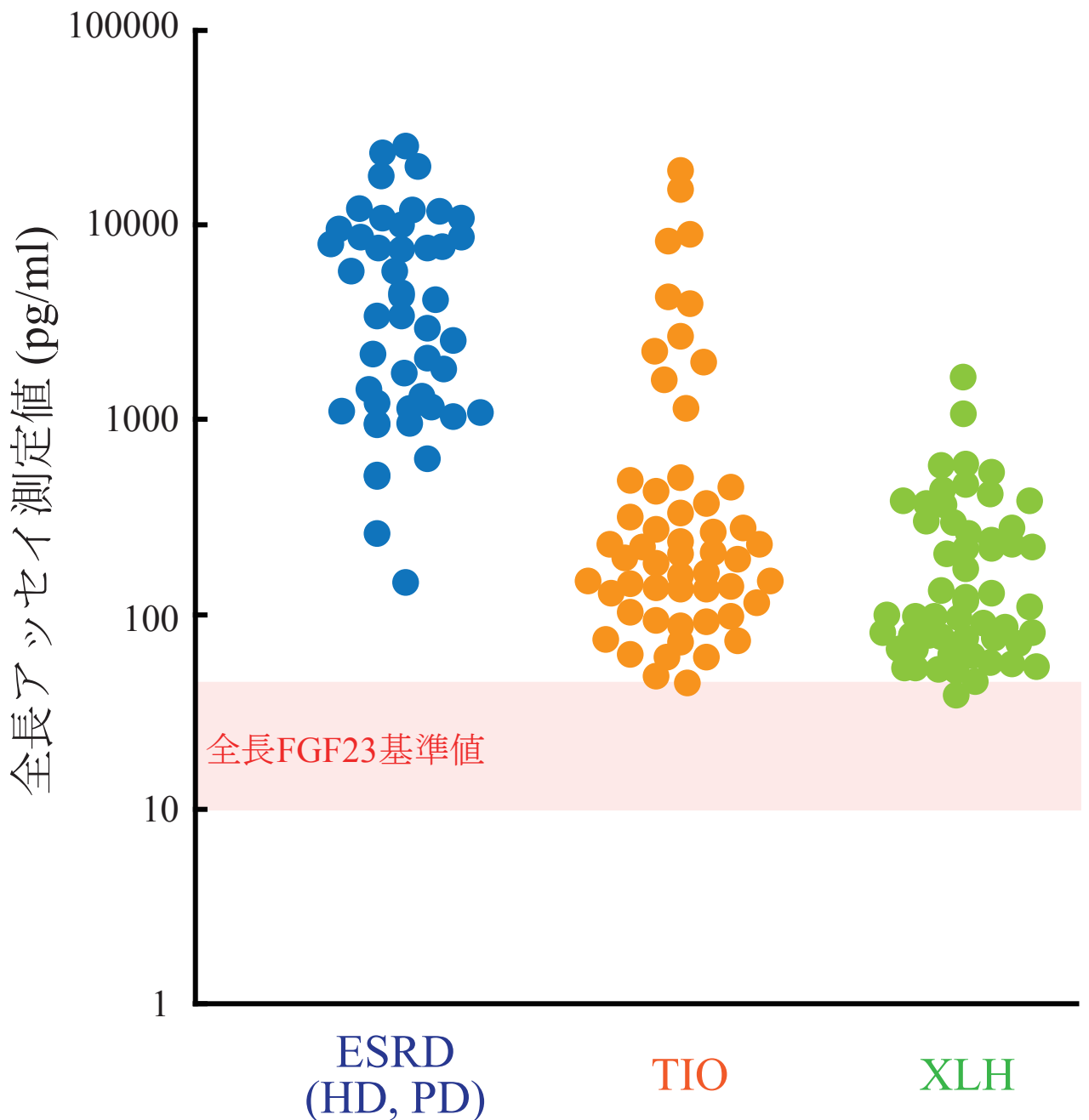


図 13. *GALNT3* 遺伝子異常による FHTC 症例の血中 FGF23 とリン値の関係

GALNT3 遺伝子異常では、FGF23 蛋白の糖鎖付加異常により FGF23 蛋白プロセッシングが亢進し、フラグメントが増加する。そのため、リン利尿作用を持つ全長 FGF23 のみを測定する全長アッセイによる測定値は高値を示さないが、半数以上の症例では全長アッセイによる測定値は基準値内 (ピンク枠) を示す。しかしながら、これらの症例でも、顕著な高リン血症が存在している (文献 28、38-44 から引用)。



| | | | |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 症例数(検体数) | 47 (47) | 25 (54) | 37 (57) |
| 平均年齢(歳) | 52.5 ± 2.6 | 49.4 ± 3.2 | 26.4 ± 7.6 |
| 男女比 | 30 : 17 | 16 : 9 | 12 : 25 |
| 全長FGF23(pg/ml) 平均±標準誤差 (最低値-最高値) | 5749.4 ± 873.9 (142.0-24598.3) | 1411.8 ± 482.1 (44.1-18738.9) | 223.9 ± 36.5 (38.4-1654.1) |

図 14. ESRD(HD、PD)、TIO、XLH の血清 FGF23 値

HD または PD 中の ESRD、TIO、XLH 症例の血中 FGF23 を、全長アッセイで測定すると、ほぼ全ての症例で FGF23 は高値を示した。

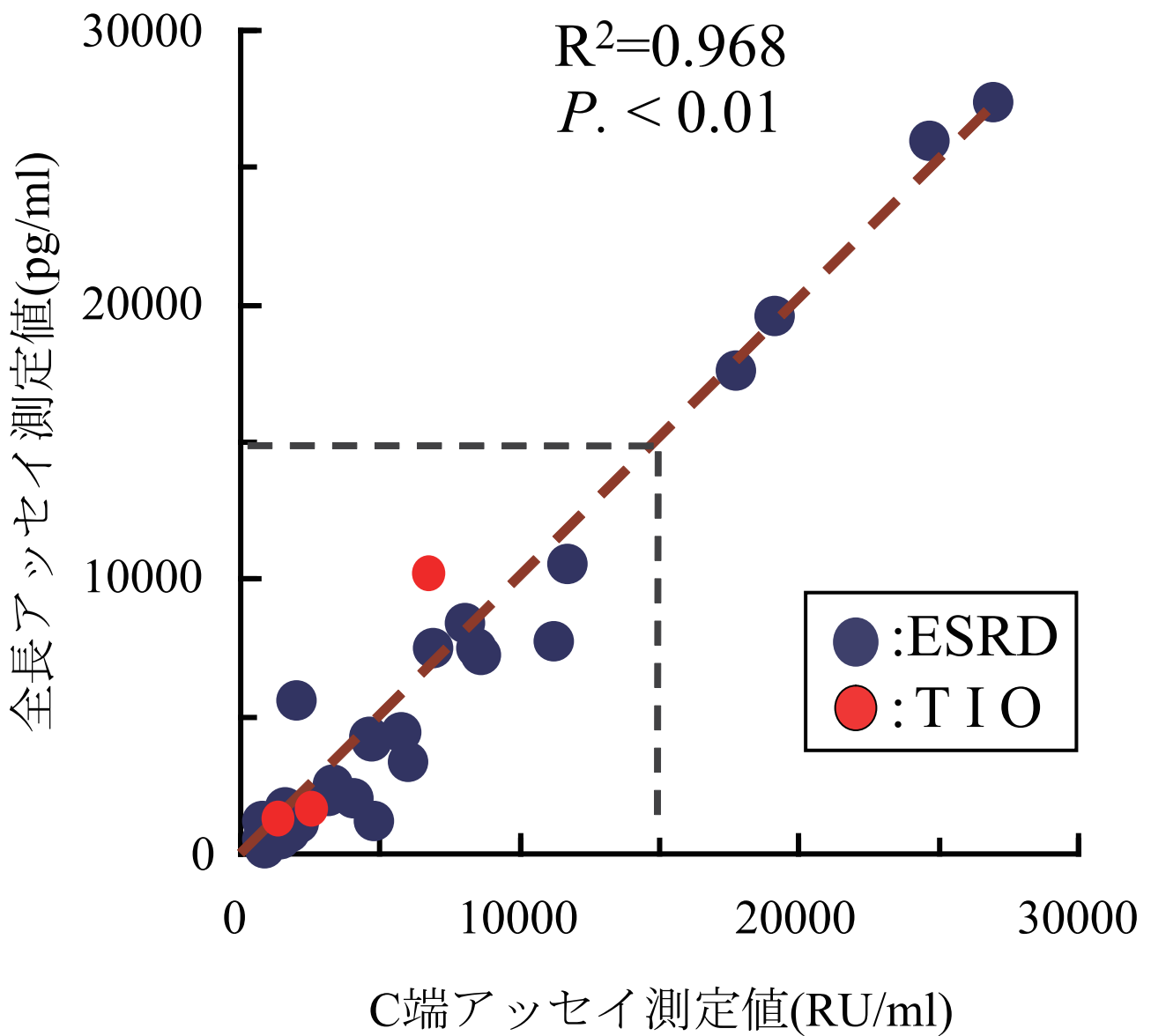


図 15. 二つの FGF23 測定法による ESRD(HD) と TIO 症例の血漿中 FGF23
 両測定法による測定値は良好な相関を示し、その分布に両疾患群で相違は認め
 なかった。

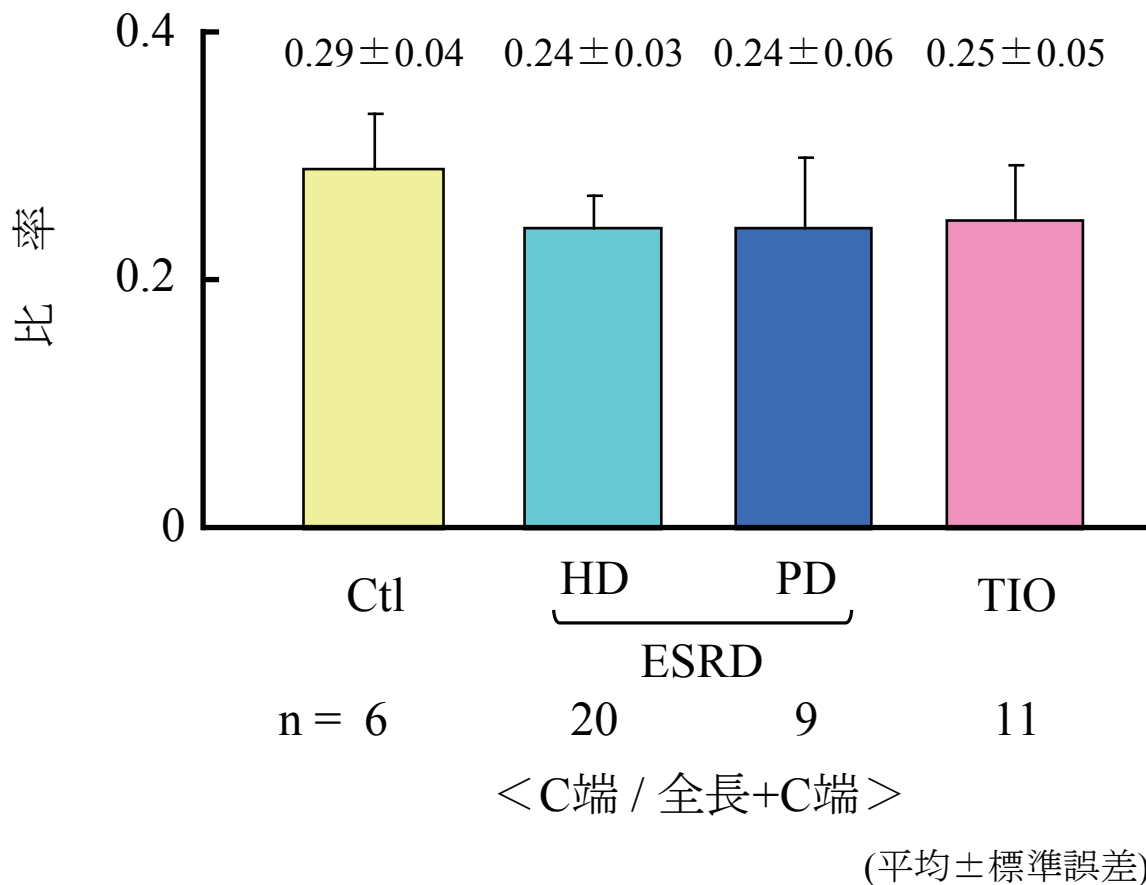
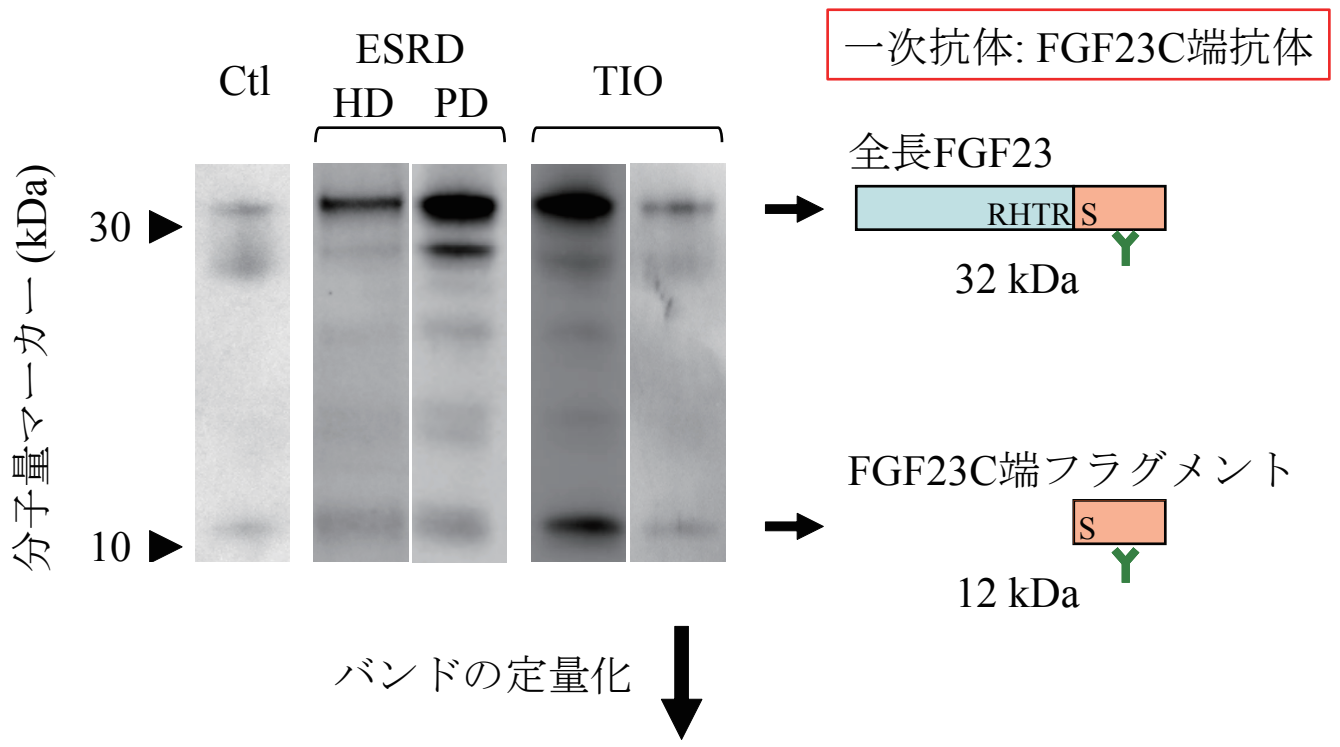
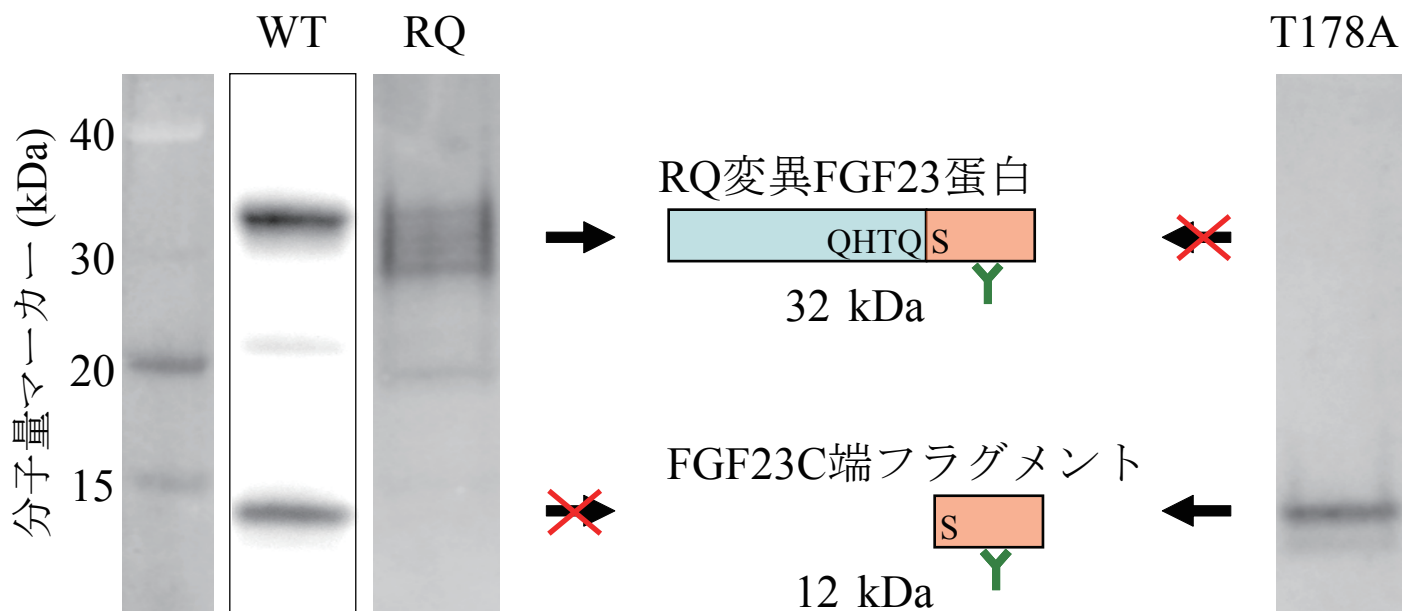


図 16. 血漿中 FGF23 蛋白存在様式の検討

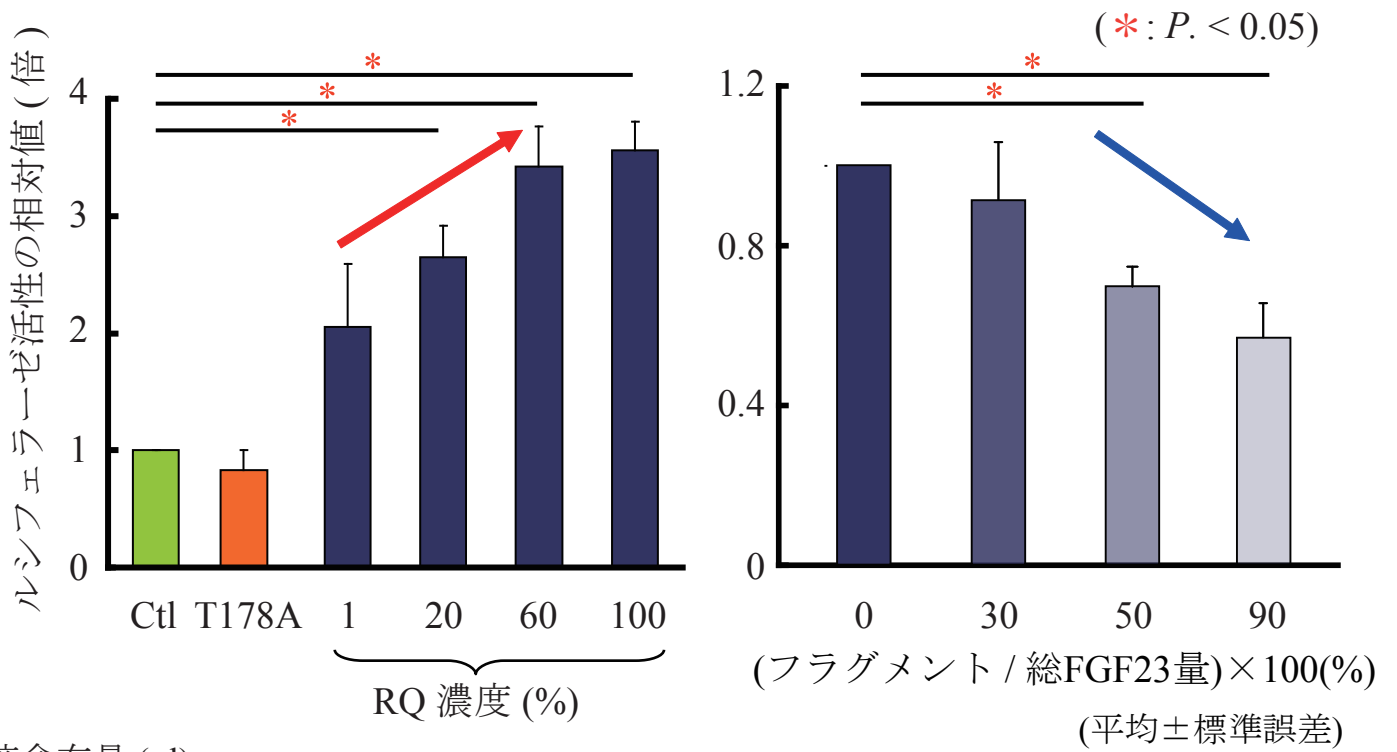
ウェスタンブロットにより、全ての群で約 32 kDa の全長 FGF23 と約 12 kDa の FGF23C 端フラグメントのバンドが検出された。バンドを定量化しフラグメントの存在比率を算出すると、総 FGF23 の約 30%は体内でフラグメントとして存在していることがわかり、各群間でその存在比率に差異は認めなかった。



R176Q培養上清 ≡ 全長FGF23
 T178A培養上清 ≡ FGF23 N + C端フラグメント

図 17. 全長 FGF23 蛋白、FGF23-N/C 端フラグメントの採取

野生型 *FGF23*(WT) 遺伝子を高発現させた CHO 細胞の培養上清中には全長 FGF23 蛋白に相当する約 32 kDa のバンドと、C 端フラグメントに相当する約 12 kDa のバンドの両者を認めた。一方、FGF23 蛋白のスブチリシン様プロテアーゼ認識配列部位にあるアルギニン (R) を、グルタミン (Q) に置換した変異 FGF23(RQ) 蛋白は、プロセッシングに抵抗性で、C 端フラグメントは殆ど存在しなかった。さらに、ムチン型 O 型糖鎖付加部位である 178 番目のスレオニン (T) をアラニン (A) に置換した変異 FGF23(T178A) 蛋白は、ほぼすべての全長 FGF23 がプロセッシングを受け、FGF23 フラグメントのみが検出された。



溶液含有量 (μl)

| | | | | | | | | | | | |
|-------|----|----|-------|----|----|----|--|----|------|----|----|
| RQ | 0 | 0 | 0.75 | 15 | 30 | 75 | | 5 | 5 | 5 | 5 |
| T178A | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 2.1 | 5 | 45 |
| Ctl | 75 | 0 | 74.25 | 60 | 45 | 0 | | 70 | 67.9 | 65 | 25 |

図 18. FGF23 フラグメントの全長 FGF23 作用に対する影響

RQ 蛋白は、Klotho 発現細胞において *Egr-1* プロモーター活性を用量依存性に増加させた。一方 T178A 蛋白は、単独では *Egr-1* プロモーター活性を示さなかった。また、RQ 蛋白と等量以上の T178A 蛋白を添加した場合には RQ 蛋白の活性を低下させた。

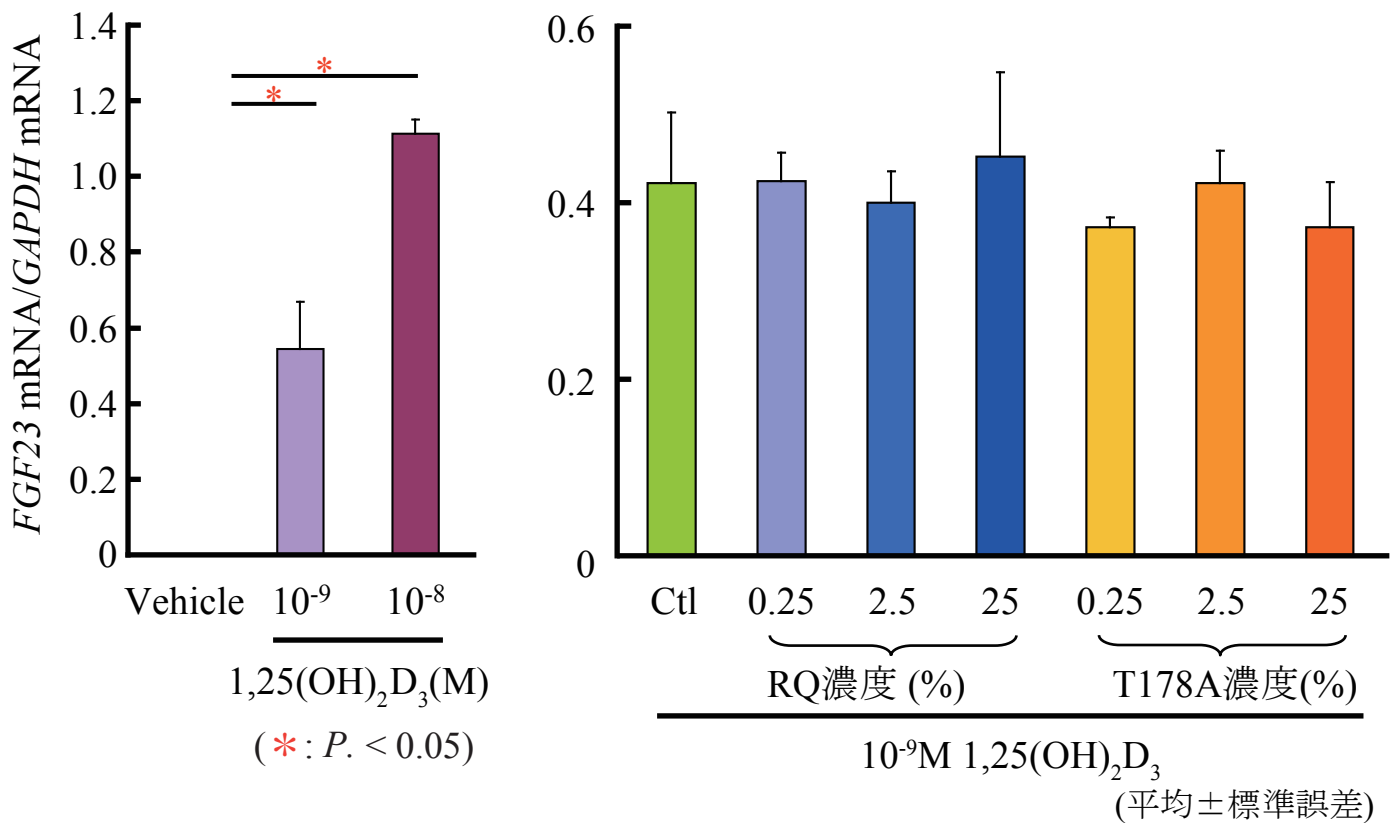


図 19. 全長 FGF23、フラグメントの *FGF23* mRNA 発現への影響

1, 25(OH)₂D₃ は UMR-106 細胞において容量依存性に *FGF23* mRNA 発現を誘導した。10⁻⁹M の 1, 25(OH)₂D₃ で刺激した UMR-106 細胞の培養液中に RQ 蛋白 (全長 FGF23)、T178A 蛋白 (FGF23 フラグメント) を添加しても *FGF23* mRNA 発現に影響を与えなかった。