

論文の内容の要旨

生体のリン感知機構と線維芽細胞増殖因子 23 の活性調節機構

高士 祐一

序文：線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor; FGF)23 は、骨細胞より分泌され、腎臓近位尿細管に作用するホルモンであり、血中リン濃度を低下させることにより生体のリン代謝に中心的な役割を果たしている。FGF23 はスブチリシン様プロテアーゼ認識配列(RXXR)を有しており、¹⁷⁹アルギニンと¹⁸⁰セリンの間でプロセッシングを受ける。ホルモンとして活性を有するのは、このプロセッシングを免れた全長 FGF23 である。3カ所のトレオニン残基にムチン型 O-型糖鎖が付加された FGF23 蛋白は、このプロセッシングに抵抗性となる。FGF23 蛋白の¹⁷⁸トレオニンへの糖鎖付加を媒介しているのが、*UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine ; polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNT3)* 遺伝子産物である *UDP-N-acetylalpha-D-galactosamine ; polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNac-T3)* である。したがって FGF23 の作用は、その産生に加え、GalNac-T3 を介した翻訳後修飾機構によっても制御されていると考えられる。しかし、詳細なリンによる FGF23 活性調節機構は未だ不明である。

さらに、血中リン濃度が一定に維持されるためには、細胞外液中のリン感知機構が必要である。これまでに、*in vitro* の系では細胞外リン濃度の上昇により細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase; ERK)経路が活性化すると報告や、これらの活性化に FGF 受容体(FGF receptor; FGFR)や細胞膜上のリントランスポーターであるⅢ型ナトリウム-リン共輸送体(type Ⅲ sodium-phosphate cotransporter; type Ⅲ NaPi)が関与していることが報告されている。しかし、これらの系の生理学的意義や、これらの分子が実際にリンによる FGF23 活性の調節に直接関与しているかどうかは明らかではない。そこで、今回我々はリンによる FGF23 の活性調節機構およびリン感知機構の解明を目指した。

方法：マウスを用いた実験では、4週齢の ICR の雄を、リン含有量 1.2%の高リン食群(high phosphate; HP)、0.6%のコントロール食群(control phosphate; CP)、0.1%の低リン食群(low phosphate; LP)にそれぞれ割り付けし、2週間摂取させた。2週間後、ELISA 法で血清全長 Fgf23 濃度を、real-time PCR で大腿骨中の *Galnt3* および *Fgf23* の発現を評価した。

骨芽細胞様細胞株である UMR106 細胞を用いた実験では、まず UMR106 細胞にヒト FGF23 を過剰発現させ、培養液中に分泌される FGF23 蛋白の細胞外リン濃度の上昇によるプロセッ

シングの変化をウエスタンブロッティングで、*Galnt3*の発現について real-time PCR で評価した。次に、リンによる *Galnt3*の発現誘導に必要と考えられる未知の介在蛋白を検索するために DNA マイクロアレイ解析を行った。ここで見出した候補遺伝子について UMR106 細胞を用いた siRNA によるノックダウンで機能解析を行った。さらに、細胞外リンの細胞内シグナル伝達経路を解明するために、type III NaPi-Fgfr-Erk 経路につき各阻害剤を用いて評価するとともに、リンによる Fgfr substrate 2 alfa (Frs2 α)、Erk のリン酸化についてウエスタンブロッティングで検討した。

結果：マウスを用いた実験において、HP、CP、LP の各群で各食餌負荷 2 週間後の血清全長 Fgf23 濃度は、食餌中のリン含有量依存的に増加した。この時、大腿骨中の *Galnt3* 発現は食餌中のリン含有量依存的に増加した。一方、*Fgf23*は LP で減少したが、HP では CP に比して変化を認めなかった。これまでの結果より、高リン食負荷に対する血中全長 Fgf23 濃度の上昇は、骨での Fgf23 産生亢進によるものではなく、*Galnt3* のコードする GalNac-T3 を介した FGF23 蛋白のプロセッシング阻害によるものと考えられた。

ヒト *FGF23* を過剰発現させた UMR106 細胞において、細胞外リン濃度を 1 mM から 2 mM に上昇させると、培養液中に分泌された C 端フラグメント FGF23 蛋白に対する全長 FGF23 蛋白の割合が増加した。この時、細胞外リン濃度の上昇により *Galnt3* の発現が亢進していた。これまでの結果より、細胞外リン濃度の上昇は UMR106 細胞において、*Galnt3* の発現亢進を介して FGF23 蛋白のプロセッシングを阻害することが明らかとなった。

次に、DNA マイクロアレイ解析を用いてリンにより早期に発現が変化する遺伝子の網羅的解析を行った結果、*early growth response 1 (Egr1)*、*ETS variant 4 (Etv4)*、*ETS variant 5 (Etv5)* が候補遺伝子として見出された。これらは FGFR-ERK 経路の下流の転写因子であることが報告されている。*Egr1* および *Etv5* の siRNA によるノックダウンによりリン応答性の *Galnt3* の発現亢進は抑制されたが、*Etv4* のノックダウンでは抑制を認めなかった。したがって、*Egr1*、*Etv5* がリンによる *Galnt3* 発現亢進に関与していることが明らかとなった。

さらに、type III NaPi-FGFR-ERK 経路について、各阻害薬を用いて検討したところ、type III NaPi の阻害剤である phosphonoformic acid (PFA)、FGFR の阻害薬である PD173074、mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase (MEK) 1/2 の阻害薬である U0126 により、リン応答性の *Galnt3* の発現亢進は抑制された。したがって、リンに対する *Galnt3* 応答のシグナル伝達には、type III NaPi-Fgfr-Erk 経路が関与しているものと考えられた。次に、リンによる Erk のリン酸化をウエスタンブロッティングで評価したところ、リンはポジティブコントロールとして使用した Fgf2 同様に Erk のリン酸化を誘導した。しかし、Fgf2 は *Galnt3* の発現を誘導することはできなかった。そこで、リンと Fgf2 との間には Erk の活性化の様式に違いがあると考え、時間経過を検討することとした。Fgf2 では 5 分以内に速やかに Erk のリン酸化が誘導され、60 分まで維持される、いわゆる持続的な Erk の活性化が認められた。一方、リンによる Erk のリン酸化は Fgf2 よりも遅く 15 分で誘導され、30

分の段階ではすでに減弱するという一過性の Erk の活性化であった。さらに、FGFR-ERK 経路のシグナル伝達を仲介する FRS2 α (Tyr196) のリン酸化についても検討を加えた。Fgf2 では Frs2 α は Erk 同様に 5 分以内に速やかにリン酸化され、60 分までリン酸化は維持された。一方、リンでは Erk 同様に遅れて 15 分で Frs2 α のリン酸化が誘導されたが、以後は Erk とは異なり 60 分までそのリン酸化は維持され、持続的な Frs2 α の活性化のパターンをとった。そこで、Erk の一過性のリン酸化をもたらす要因を探るため、Frs2 α のリン酸化部位の違いに着目した。Fgf2 では Frs2 α の 2 カ所のリン酸化部位、Tyr196 および Tyr436 の双方がリン酸化されたのに対して、リンでは Frs2 α の Tyr196 のリン酸化が確認された一方、Tyr436 のリン酸化は確認されなかった。したがって、リンは Frs2 α の Tyr436 ではなく Tyr196 を特異的にリン酸化することで一過性の Erk の活性化を惹起していたものと考えられた。さらに、リンによる Frs2 α (Tyr196) および Erk のリン酸化は PFA によって消失した。これまでの結果より、細胞外リンは type III NaPi を介して細胞内に取り込まれた後に、FGFR-FRS2 α -ERK のリン酸化を誘導し、*EGR1* や *ETV5* といった転写因子の発現を介して、最終的に *GALNT3* のコードする GalNac-T3 によって、血中全長 FGF23 濃度が調節されるものと考えられる。

考察：FGF23 の活性調節は、その産生のみならず、*GALNT3* のコードする GalNac-T3 を介した翻訳後修飾によっても担われている。リン感知機構においては、type III NaPi を介したリンの細胞内への流入が契機となり、これが何らかの機序で FGFR を活性化し、FRS2 α -ERK-*EGR1/ETV5-GALNT3* という一連の系が作動する。リン感知機構の構成要素のうち、少なくとも FGFR はシグナルトランスデューサーとしての機能を有していると言える。そこで、本応答系を修飾する薬剤の開発によって本検討の成果の臨床応用が可能であると考えられる。例えば、高リン血症を呈する末期腎不全患者において、*GALNT3* のコードする GalNac-T3 の選択的阻害薬を投薬することで効率的に血中全長 FGF23 濃度の上昇を抑え、より良い腎不全管理を実現できる可能性がある。また、FGFR 阻害薬が少なくとも一部の FGF23 関連低リン血症性患者の治療薬となり得ることが予想される。本検討の成果が臨床応用され、末期腎不全患者、FGF23 関連低リン血症性疾患患者のより良い治療・管理方法の開発に繋がることを願う。