

## 論文の内容の要旨

論文題目 FGF23 関連低リン血症性疾患の病因の検討

氏名 木下祐加

### 1. 背景

Fibroblast growth factor 23 (FGF23) は骨細胞で産生され、腎臓への作用により、リンとビタミン D 代謝を調節するホルモンである。正常人の血中には、全長 FGF23 蛋白に加えて N 端および C 端 FGF23 フラグメントが存在するが、低リン血症惹起作用を有するのは全長 FGF23 蛋白のみである。各種慢性低リン血症患者の血中全長 FGF23 濃度の検討から、全長 FGF23 が 30 pg/ml 以上では FGF23 関連疾患、30 pg/ml 未満ではその他の原因による低リン血症と鑑別可能であることが示されている。

FGF23 の作用過剰により、各種の低リン血症性くる病および骨軟化症が惹起される。先天性の FGF23 関連低リン血症性疾患の代表例として、*phosphate-regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)* 変異による X 染色体優性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets, XLHR)、*FGF23* 変異による常染色体優性低リン血症性くる病 (autosomal dominant hypophosphatemic rickets, ADHR)、*dentin matrix protein 1 (DMP1)* 変異による常染色体劣性低リン血症性くる病 1 型 (autosomal recessive hypophosphatemic rickets 1, ARHR1)、*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1)* 変異による常染色体劣性低リン血症性くる病 2 型 (autosomal recessive hypophosphatemic rickets 2, ARHR2) が知られている。XLHR は先天性の低リン血症性くる病の中で最も頻度が高いとされているが、病歴から XLHR が疑われた症例でも、ゲノム DNA を用いた PCR 産物の直接シーケンス法で *PHEX* 遺伝子変異が確認されるのは、60-70% にすぎない。残りの症例では、従来の検査方法の感度が十分でない可能性、あるいは、FGF23 発現に関与する新規遺伝子に変異を有する可能性が考えられる。

実際、従来は Raine 症候群の原因遺伝子とされていた *family with sequence similarity 20, member C (FAM20C)* 変異に伴う FGF23 関連低リン血症性疾患の存在が、エクソーム解析によって近年明らかになった。さらに、*FAM20C* ノックアウトマウスが FGF23 関連低リン血症性くる病を呈し、その骨組織で *DMP1* 発現低下を伴う *FGF23* 発現亢進が認められることが報告された。*DMP1* ノックアウトマウスでは *FGF23* 過剰発現が認められることから、Raine 症候群の *FAM20C* 変異による FGF23 関連低リン血症性疾患の発症機序には、*DMP1* 発現低下が関与している可能性が考えられた。

### 2. 目的

本研究では、FGF23 関連低リン血症性くる病の病因を明らかにすることを目的とした。また、ゲノム DNA を用いた既知の原因遺伝子の PCR 産物の直接シーケンス法で変異が同定されな

い症例に対して、*PHEX* mRNA を用いた解析や multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法が有用であるかどうかを検討した。さらに、異所性石灰化や歯異常を伴う FGF23 関連低リン血症の患者に対して *FAM20C* 遺伝子の解析を行い、*in vitro* で変異 *FAM20C* 蛋白の機能解析を行うことにより、本遺伝子異常により FGF23 関連低リン血症性疾患が発症する機序を検討した。

### 3. 方法

#### (1) FGF23 関連低リン血症性くる病の原因遺伝子の解析

臨床的に低リン血症性くる病を呈し、血中 FGF23 が 30 pg/ml 以上の患者およびその家族を対象として、末梢血ゲノム DNA を用いて、*PHEX* 遺伝子、*DMP1* 遺伝子、*ENPP1* 遺伝子、*FGF23* 遺伝子について、PCR 産物の直接シーケンス法を用いて解析した。変異が同定されない症例に対しては、*PHEX* mRNA の解析や MLPA 法による *PHEX* 遺伝子の解析を行った。*PHEX* mRNA の解析では、末梢血白血球より抽出した RNA を用いて、*PHEX* mRNA のコード領域を 5 つまたは 6 つの重複する RT-PCR 産物として増幅し、電気泳動および直接シーケンス法により解析した。

#### (2) *FAM20C* 変異と FGF23 関連低リン血症性疾患の関係の検討

異所性石灰化と歯異常を伴う FGF23 関連低リン血症性疾患の患者に対し、*FAM20C* 遺伝子の解析を行った。次に、Raine 症候群で既に報告のある 4 種類の変異型 *FAM20C* と本症例の変異型 *FAM20C* の機能解析を *in vitro* で行った。

##### ① *FAM20C* の局在の検討

*FAM20C* はゴルジ体で各種の分泌型蛋白をリン酸化し、分泌型蛋白と共に細胞外に分泌されると考えられている。そこで、HEK293 細胞に野生型および各種変異型 *FAM20C* を発現させ、培養上清と細胞内の *FAM20C* をウェスタンブロット法により検出した。

##### ② *FAM20C* のキナーゼ活性の検討

骨石灰化を調節する分泌型糖タンパクである small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) は *FAM20C* の基質であり、osteopontin (OPN) や *DMP1* などが含まれる。Raine 症候群の骨石灰化異常には SIBLINGs のリン酸化障害が関連していると考えられている。そこで、HEK293 細胞に osteopontin (OPN) あるいは *DMP1* と、各種 *FAM20C* を共発現させ、培養上清中の OPN あるいは *DMP1* のリン酸化をそれぞれウェスタンブロット法、アガロースゲル電気泳動法にて評価した。

##### ③ *FAM20C* 変異による FGF23 過剰発現の機序の検討

ヒト骨芽細胞様骨肉種細胞株 Saos-2 細胞に野生型あるいは変異型 *FAM20C* を発現させ、ヒト *DMP1* プロモーター活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて測定した。次に、HEK293 細胞に *FAM20C* siRNA を導入し、同様に *DMP1* プロモーター活性の変化を測定した。さらに、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 刺激による FGF23 mRNA の増加が報告されているラット骨肉腫細胞由来株 UMR-106 細胞を用いて、*Fam20c* siRNA 導入による *Dmp1* mRNA および *Fgf23* mRNA 量の変化や、*DMP1* 発現ベクターの導入に伴う *Fgf23* mRNA 量の変化を検討した。

#### 4. 結果

##### (1) FGF23 関連低リン血症性くる病の原因遺伝子の解析

32 家系 45 例 (家族例 8 家系 21 例、孤発例 24 例) の FGF23 関連低リン血症性くる病患者に対して遺伝子解析を行った。28 家系 41 例に *PHEX* 遺伝子の変異 (ミスセンス変異 8 家系 11 例、ナンセンス変異 5 家系 7 例、欠失 10 家系 15 例、重複 1 家系 2 例、スプライスサイト変異 3 家系 5 例、その他 1 例) を認めた。このうち、3 家系 5 例はゲノム DNA を用いた PCR 産物の直接シーケンシング法では診断がつかず、MLPA 法や *PHEX* mRNA の解析によって XLHR の診断に至った。*ENPP1* 変異による ARHR2 は 1 例あったが、*FGF23*、*DMP1* に変異を有する症例はなかった。3 家系 3 例では、いずれの方法によっても既知の原因遺伝子に変異を同定することができず、FGF23 上昇の原因は不明であった。

##### (2) *FAM20C* 変異と FGF23 関連低リン血症性疾患の関係の検討

異所性石灰化と歯異常を伴う FGF23 関連低リン血症性疾患の患者において、*FAM20C* 遺伝子の新規ミスセンス変異 c.1222C>T、R408W のホモ接合体を認めた。Raine 症候群で既報の 4 種類の変異と R408W の機能を *in vitro* で解析した結果、全ての変異型 *FAM20C* で野生型 *FAM20C* に比較して OPN や *DMP1* に対するキナーゼ活性の低下が認められた。一部の変異では、*FAM20C* の培養上清中への分泌も障害されていた。*DMP1* プロモーター活性への影響について検討した結果、野生型 *FAM20C* は *DMP1* プロモーター活性を有意に上昇させたが、変異型 *FAM20C* は上昇させなかった。また、*FAM20C* siRNA の導入により、*DMP1* プロモーター活性は有意に低下した。さらに、UMR-106 を用いた検討では、*Fam20c* siRNA 導入による *Dmp1* mRNA の減少および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 刺激によって増加した *Fgf23* mRNA のさらなる増加を認めた。また、*DMP1* 発現ベクターの導入により、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 刺激によって増加した *Fgf23* mRNA は有意に減少した。

#### 5. 考察

先天性の FGF23 関連低リン血症性くる病の患者を対象に遺伝子解析を行い、45 名中 42 名に原因と考えられる変異を同定した。*PHEX* 遺伝子変異または *PHEX* mRNA の異常による XLHR は 41 名 (91%) であり、これまでの報告と同様に、FGF23 関連低リン血症性くる病の中で XLHR が最も頻度の高い疾患であることが示された。また、*PHEX* mRNA の解析あるいは MLPA 法により、XLHR の診断率が向上すると考えられた。一方、3 家系において原因遺伝子を同定することができず、既知の遺伝子に変異を有するが検索方法に問題がある可能性、あるいは、FGF23 関連低リン血症の新規遺伝子に変異を有する可能性が示唆された。

また、異所性石灰化と歯異常を伴う FGF23 関連低リン血症性疾患の患者において、*FAM20C* 遺伝子に R408W 変異のホモ接合体を認めた。R408W 変異を有する *FAM20C* は、細胞外分泌とキナーゼ活性が野生型 *FAM20C* と比べて低下しており、R408W は Raine 症候群の新規変異と考えられた。さらに、今回検討した 5 種類の変異型 *FAM20C* の全てにおいてキナーゼ活性の低下が認められたことから、*FAM20C* 基質蛋白のリン酸化の変化が Raine 症候群の発症に関与していると推測された。また、*FAM20C* は *DMP1* 発現に促進的に作用し、*DMP1* は *FGF23* 発現に抑制

的に作用することから、FAM20C 機能異常に伴う *DMP1* 発現低下が Raine 症候群の FGF23 上昇に関与していると考えられた。

## 6、結語

今回の検討により、日本人における先天性の FGF23 関連低リン血症性くる病の中で、XLHR の頻度が最も高いことを確認した。また、末梢血 *PHEX* mRNA の解析は、従来のゲノム DNA を用いた PCR 産物の直接シーケンス法よりも簡便に変異を同定することができ、先天性の FGF23 関連低リン血症性くる病の鑑別診断方法の第一選択となり得ることを示した。

さらに、FGF23 関連低リン血症性疾患を呈する Raine 症候群の患者に新規 *FAM20C* 変異を同定し、その機能解析により、Raine 症候群の FGF23 上昇の少なくとも一部には *FAM20C* 機能異常に伴う *DMP1* 発現低下が関与していることを示した。

FGF23 関連低リン血症性疾患の病因の検討を通じて、*PHEX* および *DMP1* が FGF23 産生調節において重要な因子であることを確認したが、その詳細な機序については、今後さらに検討を加えたい。