

氏名	やま した てつ お 山 下 哲 雄
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 568 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学 研究科 生命薬科学 専攻
学位論文題目	新規 FGF, FGF-23 の同定とリン酸代謝, 及び免疫応答調節における 役割に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 伊藤 信行 教授 川 寄 敏 祐 教授 中山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

FGF (Fibroblast Growth Factor) は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に対し、増殖活性や分化誘導等の作用を持つ細胞間シグナル伝達因子である。現在までに、胎児期では四肢の形成、成体では血管形成など多彩な生理活性を有することが明らかにされてきており、医薬品の開発、組織再生などへの応用が期待されている。FGF は、その構造上の類似性から、22種類のメンバーによりそのファミリーを形成していることが知られている。研究当初、FGF ファミリーとして多くの FGF が存在することが知られていた。申請者は、これら既知の FGF 以外にも重要な生理活性を持つ新規の FGF が存在することを期待し、それを単離し機能を詳細に解析することは、複雑な生命現象を理解する上で非常に有意義であると考え、新規の FGF の探索を試みた。その結果、申請者は新規の FGF である FGF23 を単離することに成功し、その活性、及び作用機構を明らかにした。

第一章 新規 FGF, FGF23 の同定

FGF 間によく保存されている領域をもとに、データベース上のゲノム配列に対し既知の FGF との相同性検索を行い、新規の FGF の同定を試みた。その結果、FGF21 と相同性を有する新規 FGF, FGF23 を同定することに成功した。FGF23 はその N 末端に典型的なシグナル配列を有していたこと、また昆虫細胞で発現させたところ、培養上清中に発現が確認されたことから、分泌タンパクであることが示された。FGF は一般的に FGF 間で50%以上の高い相同性を有しているのに対し、FGF23 は他の FGF との相同性の低いユニークな因子であり、最も高いもので FGF21 との35.1%であった。このような構造上の特異性から、FGF23 は他の FGF に見られない独自の機能を果たしている可能性が推測された。

第二章 リン酸再吸収調節因子としての FGF23

他のグループにより、腫瘍性骨軟化症の原因物質が FGF23 である可能性が報告された。腫瘍性骨軟化症とは、間葉系組織由来の腫瘍より分泌される未知因子の作用により、血中リン酸濃度が低下し、低リン酸血症、更に骨軟化症が引き起こされると考えられてきた疾患である。血中リン酸濃度は腎臓近位尿細管における再吸収により調節されており、また骨軟化症は骨の石灰化不全により引き起こされることから、この未知因子はリン酸の再吸収を抑制する、あるいは骨の石灰化を阻害する可能性が考えられた。その腫瘍では FGF23 が過剰に発現していたことが報告されたことから、FGF23 がその未知因子の候補物質として挙げられた。そこで申請者は、FGF23 がリン酸、及び骨代謝に関与することを期待し、それぞれの培養細胞を用いて、FGF23 のリン酸再吸収、及び骨の石灰化に与える影響について検討した。

まず申請者は腎臓近位尿細管の培養細胞である OK 細胞を用いて、FGF23 がリン酸吸収に及ぼす影響について検討した。その結果、FGF23 はリン酸の吸収を有意に抑制することが明らかになった。FGF は、その受容体である FGFR を介してその作用を及ぼしている。腎臓近位尿細管には主に FGFR-3c が発現していたこと、また BIAcore システムによる結合実験により、FGF23 と FGFR-3c が高い結合親和性を示したことから、FGF23 は FGFR-3c を介してリン酸吸収を抑制していることが示唆された。更に FGF23 の活性が PD98059 (MEK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor) により阻害

されたこと、FGF23がERK1/2, p38 MAPKのリン酸化を有意に亢進したことから、FGF23はMAPKを介してその作用を及ぼしていると考えられた。一方、FGF23は骨の石灰化に何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より、腫瘍性骨軟化症では、腫瘍で高発現したFGF23が腎臓特異的にリン酸の再吸収を抑制することで、病態の進行に関わっていると考えられる。

第三章 免疫応答調節因子としてのFGF23

第二章において病態時におけるFGF23の役割を明らかにした一方、正常時においてFGF23は生体内の主要な臓器における発現が極めて低かったことから、その生理的役割は不明であった。近年、申請者はESTデータベースのクローン情報より、FGF23が活性化免疫担当細胞に発現している可能性を見出した。そこで、FGF23が免疫反応に应答してその発現が誘導されることを期待し、*in vivo*においてlipopolysaccharideによりFGF23が誘導されるか検討した。その結果、FGF23はマクロファージ(MΦ)においてその発現が誘導されることを明らかにした。更にMΦの初代培養系において、FGF23刺激により種々のサイトカインの発現が誘導されることも明らかにした。これらの結果より、FGF23は、免疫反応、炎症反応に应答してその発現が誘導され、免疫応答を調節する重要な因子であることが示唆された。

以上、申請者は、FGF23が生体内のリン酸の再吸収を調節すること、その結果、病態時において過剰発現することで骨軟化症を引き起こすことを明らかにした。一方、FGF23が免疫応答に際してその発現が誘導され、免疫応答調節因子として働く可能性も明らかにした。本研究により、リン酸代謝をターゲットとして、それを特異的に制御する医薬品の開発、また複雑な免疫システムの調節機構の解明に重要な知見を与えるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

FGF (Fibroblast Growth Factor) は線維芽細胞をはじめとする様々な細胞に対し、増殖活性や分化誘導等の作用を持つ細胞間シグナル伝達因子である。現在までに、胎児期では四肢の形成、成体では血管形成など多彩な生理活性を有することが明らかにされてきており、医薬品の開発、組織再生などへの応用が期待されている。FGFは、その構造上の類似性から、23種類のメンバーによりそのファミリーを形成していることが知られている。研究当初、FGFファミリーとして20種類あまりのFGFが存在することが知られていた。申請者は、これら既知のFGF以外にも重要な生理活性を持つ新規のFGFが存在することを期待し、それを単離し機能を詳細に解析することは、複雑な生命現象を理解する上で非常に有意義であると考え、新規のFGFの探索を試みた。その結果、申請者は新規のFGFであるFGF23を単離することに成功し、その活性、及び作用機構を明らかにした。

FGF間によく保存されている領域をもとに、データベース上のゲノム配列に対し既知のFGFとの相同性検索を行い、新規のFGFの同定を試みた。その結果、FGF21と相同性を有する新規FGF、FGF23を同定することに成功した。FGF23はそのN末端に典型的なシグナル配列を有していたこと、また昆虫細胞で発現させたところ、培養上清中に発現が確認されたことから、分泌タンパクであることが示された。FGFは一般的にFGF間で50%以上の高い相同性を有しているのに対し、FGF23は他のFGFとの相同性の低いユニークな因子であり、最も高いものでFGF21との35.1%であった。このような構造上の特異性から、FGF23は他のFGFに見られない独自の機能を果たしている可能性が推測された。

他のグループにより、腫瘍性骨軟化症の原因物質がFGF23である可能性が報告された。腫瘍性骨軟化症とは、間葉系組織由来の腫瘍より分泌される未知因子の作用により、血中リン酸濃度が低下し、低リン酸血症、更に骨軟化症が引き起こされると考えられてきた疾患である。血中リン酸濃度は腎臓近位尿細管における再吸収により調節されており、また骨軟化症は骨の石灰化不全により引き起こされることから、この未知因子はリン酸の再吸収を抑制する、あるいは骨の石灰化を阻害する可能性が考えられた。その腫瘍ではFGF23が過剰に発現していたことが報告されたことから、FGF23がその未知因子の候補物質として挙げられた。そこで申請者は、FGF23がリン酸、及び骨代謝に関与することを期待し、それぞれの培養細胞を用いて、FGF23のリン酸再吸収、及び骨の石灰化に与える影響について検討した。

まず申請者は腎臓近位尿細管の培養細胞であるOK細胞を用いて、FGF23がリン酸吸収に及ぼす影響について検討した。その結果、FGF23はリン酸の吸収を有意に抑制することが明らかになった。FGFは、その受容体であるFGFRを介してその作用を及ぼしている。腎臓近位尿細管には主にFGFR-3cが発現していたこと、またBIAcoreシステムによる結合実

験により、FGF23とFGFR-3cが高い結合親和性を示したことから、FGF23はFGFR-3cを介してリン酸吸収を抑制していることが示唆された。更にFGF23の活性がPD98059 (MEK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor)により阻害されたこと、FGF23がERK1/2, p38 MAPKのリン酸化を有意に亢進したことから、FGF23はMAPKを介してその作用を及ぼしていると考えられた。一方、FGF23は骨の石灰化に何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より、腫瘍性骨軟化症では、腫瘍で高発現したFGF23が腎臓特異的にリン酸の再吸収を抑制することで、病態の進行に関わっていると考えられる。

正常時においてFGF23は生体内の主要な臓器における発現が極めて低かったことから、その生理的役割は不明であった。近年、申請者はESTデータベースのクローン情報より、FGF23が活性化免疫担当細胞に発現している可能性を見出した。そこで、FGF-23が免疫反応に応答してその発現が誘導されることを期待し、in vivoにおいてlipopolysaccharideによりFGF23が誘導されるか検討した。その結果、FGF23はマクロファージ(M Φ)においてその発現が誘導されることを明らかにした。更にM Φ の初代培養系において、FGF23刺激により種々のサイトカインの発現が誘導されることも明らかにした。これらの結果より、FGF23は、免疫反応、炎症反応に応答してその発現が誘導され、免疫応答を調節する重要な因子であることが示唆された。

以上、申請者は、FGF23が生体内のリン酸の再吸収を調節すること、その結果、病態時において過剰発現することで骨軟化症を引き起こすことを明らかにした。一方、FGF23が免疫応答に際してその発現が誘導され、免疫応答調節因子として働く可能性も明らかにした。本研究により、リン酸代謝をターゲットとして、それを特異的に制御する医薬品の開発、また複雑な免疫システムの調節機構の解明に重要な知見を与えるものと期待される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月1日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。