

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19528

研究課題名(和文) FGF23産生調節に関する新規遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel genes associated with regulation of FGF23 synthesis

研究代表者

木下 祐加 (Kinoshita, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00746729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Fibroblast growth factor 23 (FGF23) は骨細胞から産生されるリン調節ホルモンである。FGF23関連低リン血症性疾患に関与する新規責任遺伝子を同定し、FGF23産生調節機構を明らかにすることを目的に、本研究を行った。その結果、FGF23関連低リン血症性くる病患者8家系9例に新規または既報のPHEX遺伝子変異を同定し、日本人の遺伝性くる病においてX染色体優性低リン血症性くる病の頻度が高いことを確認した。また、腫瘍性骨軟化症患者1例を対象に腫瘍組織のRNAシーケンスを施行し、FGF23産生腫瘍における各種遺伝子の発現調節機構について検討した。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 23 is a bone-derived phosphaturic hormone. The purpose of this study was to clarify the mechanism of FGF23 synthesis by identifying novel genes associated with FGF23-related hypophosphatemic diseases. As a result, I have found 3 novel and 5 reported mutations in the PHEX gene in 9 patients from 8 families with FGF23-related hypophosphatemic rickets, and have confirmed that X-linked hypophosphatemic rickets is the most commonly inherited form of FGF23-related hypophosphatemic rickets in Japan. Additionally, I have performed RNA sequencing of a tumor responsible for tumor-induced osteomalacia and have analyzed the regulatory mechanisms of gene expression in the tumor.

研究分野：内分泌骨代謝異常疾患

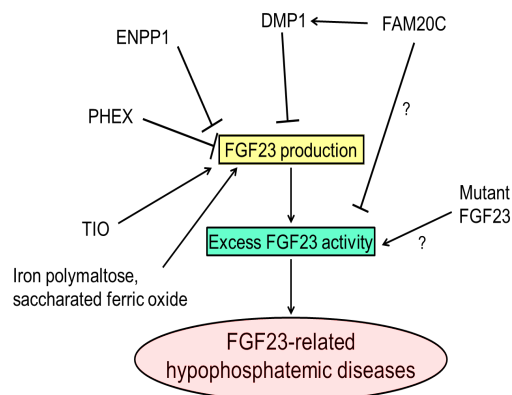
キーワード：FGF23関連低リン血症性疾患 責任遺伝子 エクソーム解析 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

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。FGF23 プロセシング部位の N 端側と C 端側に対するモノクローナル抗体を用いて、全長 FGF23 蛋白のみを検出する ELISA の開発により、健常人血中の全長 FGF23 濃度は性差なく約 30 ± 10 pg/ml の範囲に分布することが示されている (Endo *et al.* Bone 2008)。また、各種慢性低リン血症患者の血中全長 FGF23 濃度の検討により、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 (Endo *et al.* Bone 2008)。

FGF23 の作用過剰は、各種の低リン血症性くる病および骨軟化症を惹起する (図 1、表 1)。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: OMIM No. 307800)、*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: OMIM No. 193100)、*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: OMIM No. 241520)、*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: OMIM No. 613312) が知られている。さらに従来 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 (Rafaelsen *et al.* JBMR 2013)。

図1 FGF23関連低リン血症性疾患に関する分子



また、後天性に血中 FGF23 の上昇を伴う低リン血症を来す疾患として、腫瘍性骨軟化症 (tumor-induced osteomalacia: TIO) (Shimada *et al.* Endocrinology 2002) や、含糖酸化鉄およびポリマルトース鉄の静注による薬剤性低リン血症性骨軟化症が報告されている (Shimizu *et al.* Bone 2009) (図 1、表 1)。TIO の原因腫瘍の多くは、病理組織学的には phosphaturic mesenchymal tumor, mixed connective tissue variant (PMTMCT) と呼ばれる間葉系組織の腫瘍が多く、腫瘍による FGF23 産生は免疫染色や RT-PCR 法によって確かめることができる。

表 1 FGF23 関連低リン血症性疾患

|                             | 責任遺伝子             |
|-----------------------------|-------------------|
| 先天性疾患                       |                   |
| X染色体優性低リン血症性くる病: XLHR       | <i>PHEX</i>       |
| 常染色体優性低リン血症性くる病: ADHR       | <i>FGF23</i>      |
| 常染色体劣性低リン血症性くる病1: ARHR1     | <i>DMP1</i>       |
| 常染色体劣性低リン血症性くる病2: ARHR2     | <i>ENPP1</i>      |
| McCune-Albright症候群/線維性骨異形成症 | <i>GNAS1</i>      |
| 骨空洞性骨異形成症                   | <i>FGFR1</i>      |
| Jansen型骨幹端軟骨異形成症            | <i>PTH1R</i>      |
| Raine症候群に伴う低リン血症            | <i>FAM20C</i>     |
| 線状皮脂腺母斑症候群に伴う低リン血症          | <i>HRAS, NRAS</i> |
| 後天性疾患                       |                   |
| 腫瘍性骨軟化症: TIO                |                   |
| ポリマルトース鉄、含糖酸化鉄による低リン血症      |                   |

このように、リン代謝において重要な役割を持つ FGF23 であるが、その産生調節機序については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

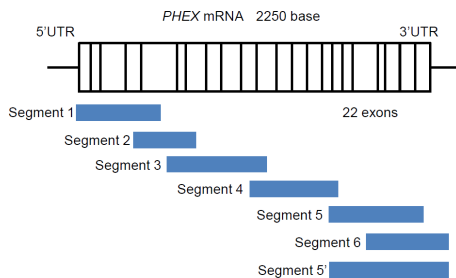
FGF23 関連低リン血症性疾患の発症に關与する新規責任遺伝子の同定とその遺伝子産物の機能解析を通じて、FGF23 産生調節機構を解明することを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

FGF23 産生調節解明のために、以下の方法で研究を行った。

(1) 慢性的な低リン血症に加えて、血中の FGF23 が 30 pg/ml 以上を示す先天性の FGF23 関連低リン血症性疾患の患者を対象とし、責任遺伝子の同定を行った。後天性疾患である腫瘍性骨軟化症や含糖酸化鉄投与に伴う FGF23 関連低リン血症患者は遺伝子検査の対象外とした。日本人の先天性 FGF23 関連低リン血症性疾患、特にくる病では *PHEX* 遺伝子異常による XLHR の頻度が高いと考えられることから、*PHEX* mRNA を用いた解析 (Kinoshita *et al.* Eur J Endocrinol 2012) (図 2) を第一に行った。

図2 PHEX mRNA の解析



(2) 既存の遺伝子に変異を認めない患者では、エクソーム解析などの次世代シーケンシングの活用により候補遺伝子を検索した。

(3) T10の原因腫瘍における体細胞変異を検索した。腫瘍組織および対照となる正常組織を用いて、エクソーム解析やMLPA解析を施行した。

(4) T10の原因腫瘍における遺伝子発現制御を明らかにするために、腫瘍組織と対照となる正常組織を用いてRNAシーケンスを施行した。

#### 4. 研究成果

(1) 8家系9例のFGF23関連低リン血症性くる病患者において、PHEX遺伝子のナンセンス変異5例、ミスセンス変異3例、一塩基欠損1例を認めた(新規変異5種類、既報変異3種類)。日本人の先天性FGF23関連低リン血症性くる病患者において、家族歴の有無によらずPHEX遺伝子変異によるXLHRの頻度が高いことや、PHEX mRNAを用いた解析の簡便性と有用性を確認した。

(2) PHEX遺伝子を含む既存の責任遺伝子に変異を認めないFGF23関連低リン血症性くる病患者1例、およびその家族に対してエクソーム解析を施行したが、責任遺伝子の同定には至らなかった。

(3) 腫瘍性骨軟化症患者4例を対象に、原因腫瘍のエクソーム解析とMLPA解析を施行したが、病態に関連する単一遺伝子変異の同定には至らなかった。

(4) 腫瘍性骨軟化症患者1例を対象に、原因腫瘍および正常組織を用いてRNAシーケンスを施行した。RNAシーケンスにおいて発現増加がみられた遺伝子群の転写調節について検討を行った。今後、他患者の腫瘍組織を用いてRNAシーケンスを追加するとともに、細胞実験にてFGF23産生調節に関連する転写因子を解析することを計画している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

(1) Kinoshita Y, Ito N, Makita N, Nangaku M, Fukumoto S. Changes in bone metabolic parameters following oral calcium supplementation in an adult patient with vitamin D-dependent rickets type 2A. *Endocr J.* 2017 Mar 31. [Epub ahead of print] doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0583. 査読有

(2) Takashi Y, Kinoshita Y, Ito N, Taguchi M, Takahashi M, Egami N, Tajima S, Nangaku M, Fukumoto S. Tumor-induced Osteomalacia Caused by a Parotid Tumor. *Intern Med.* 2017;56(5):535-539. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0583. 査読有

(3) Takashi Y, Kinoshita Y, Hori M, Ito N, Taguchi M, Fukumoto S. Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy. *Endocr Res.* 2017 42(2):132-137. doi: 10.1080/07435800.2016.1242604. 査読有

(4) Kinoshita Y, Arai M, Ito N, Takashi Y, Makita N, Nangaku M, Shinoda Y, Fukumoto S. High serum ALP level is associated with increased risk of denosumab-related hypocalcemia in patients with bone metastases from solid tumors. *Endocr J.* 2016 63(5):479-84. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0003. 査読有

[学会発表](計4件)

(1) 木下祐加、低カルシウム血症と低リン血症の鑑別診断、第26回臨床内分泌 Update 2016年11月18日大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

(2) 木下祐加、悪性腫瘍骨転移に対するデノスマブ投与後の低カルシウム血症発症予測因子の検討、第89回日本内分泌学会学術総会 2016年4月23日国立京都国際会館(京都府京都市)

(3) 木下祐加、The significance of serum FGF23 concentration in patients with hypocalcemia caused by vitamin D deficiency、第33回日本骨代謝学会 2015年7月25日京王プラザホテル(東京都新宿区)

(4) 木下祐加、Etiology and pathogenesis of FGF23-related hypophosphatemia、第33回日本骨代謝学会 2015年7月25日京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.todai-jinnai.com/kenkyu/g\\_endocrinology/g01\\_endocrinology](http://www.todai-jinnai.com/kenkyu/g_endocrinology/g01_endocrinology)

6．研究組織

研究代表者

木下 祐加 (KINOSHITA, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：746729