The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Both FGF23 and Extracellular Phosphate Activate Raf/MEK/ERK Pathway via FGF Receptors in HEK293 Cells
Author(s)	山﨑, 美和
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58206
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【144】

氏　　名	山﨑（若林）美和（やまざき わかばやし みわ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４８０５　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	Both FGF23 and Extracellular Phosphate Activate Raf/MEK/ERK Pathway via FGF Receptors in HEK293 Cells （HEK293細胞においてFGF23と細胞外無機リン酸はともにFGF受容体を介してRaf/MEK/ERK経路を活性化する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　大薗　恵一 （副査） 教　授　吉川　秀樹　　教　授　楽木　宏実

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

FGF23は骨で産生され、腎臓および副甲状腺で作用するリン酸利尿因子で、FGF受容体およびKlothoに結合することにより細胞内にシグナルを伝達し作用を発揮する。また最近の研究で、骨芽細胞において細胞外無機リン酸濃度変化がシグナルとして細胞内に伝達され、遺伝子発現を誘導することが報告されている。このような細胞外無機リン酸に対する応答性は、FGF23の標的臓器においても維持されていることが推察される。本研究は、腎臓由来細胞株を用いて細胞外無機リン酸応答性を検討し、さらに、細胞外無機リン酸により惹起されるシグナルがFGF23シグナルに与える影響を検討することを目的として行った。

〔　方法ならびに成績　〕

ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293を使用し、はじめに、HEK293のFGF23応答性を検討した。HEK293に、機能獲得型変異体であるFGF23[R179Q]恒常的発現細胞の培養上清を作用させたところ、ERK1/2のリン酸化および標的遺伝子であるEGR1の発現が誘導された。HEK293においては内在性Klothoの弱い発現が確認され、Klothoの過剰発現によりFGF23応答性は増強した。一方、HEK293に0-10 mMの細胞外無機リン酸を添加したところERK1/2及び上流に存在するc-Rafのリン酸化が濃度依存的に誘導され、細胞外無機リン酸濃度の上昇が、Raf/MEK/ERK経路を活性化することが明らかとなった。さらに細胞外無機リン酸濃度の上昇はFGF23の標的遺伝子であるEGR1の発現を誘導し、MEK阻害剤であるPD98059によりその誘導が解除された。これらのことから、細胞外無機リン酸刺激はMEK/ERK経路を介してEGR1の発現を誘導することが示された。また、FGF23[R179Q]により誘導されるERK1/2のリン酸化と無機リン酸刺激により誘導されるERK1/2のリン酸化は時間的に一致していた。このことから、細胞外無機リン酸により惹起させるシグナルとFGF23により誘導されるシグナルの下流のカスケードの共通性が示唆された。

次に、細胞外無機リン酸応答性に対するナトリウム-リン酸（Na^+/Pi）共輸送担体の関与について検討した。Na^+/Pi共輸送担体に対する阻害剤phosphonoformic acid（PFA）により、細胞外無機リン酸に対する応答性は阻害された。HEK293における内在性Na^+/Pi共輸送担体の発現量を検討したところ、III型のNa^+/Pi共輸送担体であるPiT-1の発現が優位であった。siRNAを用いたPiT-1のノックダウンにより細胞内のリン酸の取り込みが減少し、無機リン酸濃度変化により誘導されるERK1/2のリン酸化が抑制されたことから、細胞外無機リン酸応答性におけるPiT-1の関与が示された。

細胞外無機リン酸とFGF23により誘導されるシグナルの収束点について解析を進めるため、FGF受容体とERK1/2の間に存在するシグナル伝達分子FGF receptor substrate 2α（FRS2α）のリン酸化誘導について検討した。FGF23[R179Q]刺激によりFRS2αのリン酸化が誘導されたが、細胞外無機リン酸濃度の上昇によっても同様にFRS2αのリン酸化が誘導され、このリン酸化はPFAを同時に添加することにより解除された。最後にHEK293の細胞外無機リン酸応答性に対するFGF受容体の関与について、siRNAを用いたノックダウン実験により検討した。HEK293にはFGFR1とFGFR2が内在性に発現しており、FGFR1 siRNAを用いてFGFR1遺伝子の発現をノックダウンしたところ、細胞外無機リン酸刺激で誘導されるFRS2αとERK1/2のリン酸化がいずれも減弱した。FGFR2遺伝子のノックダウンについても同様に検討したが、細胞外無機リン酸応答性に対する影響はより小さかった。さらに、PiT-1の発現をノックダウンしたHEK293において、FGFR1の過剰発現はリン酸により誘導される減弱したERK1/2のリン酸化を回復させた。これらのことから、細胞外無機リン酸濃度の上昇がFGFR1を介してFRS2αやERK1/2のリン酸化を誘導したことが示唆された。

〔　総　　括　〕

FGF23はKlothoの存在下で細胞内へシグナルを伝達し、FRS2αやERK1/2のリン酸化を介してEGR1の発現を誘導した。一方、細胞外無機リン酸濃度の上昇は、III型Na^+/Pi共輸送担体PiT1およびFGFR1を介して細胞内に伝達され、FRS2α、RafやERK1/2のリン酸化、EGR1の発現誘導を引き起こし、FGF23シグナルと下流のネットワークを共有して影響をおよぼす可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

最近、いくつかの細胞種において、細胞外の無機リン酸そのものがシグナル分子として作用することを示す知見が得られている。本論文においては、リン恒常性維持において中心的な役割を果たすFGF23の標的臓器においても細胞外無機リン酸に対する応答性が維持されている可能性に着目し、腎臓由来細胞株HEK293におけるリン酸応答性をRaf/MEK/ERKの活性化及び遺伝子発現変化から明らかにした。詳細な解析により、このリン酸応答性にはⅢ型ナトリウム-リン酸共輸送担体PiT-1が関与すること、さらにPiT-1がFGF23反応性を調節することを見出しており、PiT-1の新たな機能を証明した。また、FGF23シグナル伝達においてFGF受容体(FGFR)の下流に存在するシグナル伝達分子FRS2αのリン酸化が、細胞外リン酸刺激によっても誘導されることを初めて見出した。本論文は、HEK293において細胞外無機リン酸濃度変化は、PiT-1とFGFR1を介して細胞内へシグナルとして伝達され、FGF23シグナルに影響を及ぼすことを確実に証明した。本論文は研究の手法、論理の進め方ともに優れたレベルに達しており、学位の授与に値すると考えられる。