

論文の内容の要旨

論文題目 抗 FGF23 抗体によるリン代謝異常疾患の診断と治療の可能性の検証

氏名 山崎雄司

<背景>

血中のリン濃度の制御は主に小腸と腎臓で行われているが、腎臓に作用する新規のリン代謝制御ホルモンとして線維芽細胞増殖因子 (FGF) 23 が発見された。

FGF23 は腎系球体で過剰なリンが、尿細管のナトリウム・無機リン酸共輸送体 NaPi2a で再吸収されるのを阻害し、また CYP27b1 の発現を低下させ CYP24 の発現を上昇させることにより、活性型ビタミン D である 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D) を減少させる。

FGF23 は N 末側領域に既知の FGF ファミリーと相同性を有する全長 251 アミノ酸の分泌タンパク質である。FGF23 は 179 番目と 180 番目の間に furin 感受性部位を持ち、in vitro で発現させると多くが切断される。また切断された N または C 末側断片にはリン・ビタミン D 代謝制御活性がない。

本研究では、FGF23 の過剰作用が予想されている腫瘍性骨軟化症 (TIO) 及び家族性低リン血症性くる病 (XLH) と呼ばれる 2 種の低リン血症性くる病・骨軟化症に着目した。これらの疾患においては、腎臓からのリンの過剰漏出およびビタミン D 活性化不全によって低リン血症およびくる病・骨軟化症が誘導されると考えられている。TIO では腫瘍によって病態が惹起され、その原因腫瘍を除去すると完治することから、腫瘍での原因物質の過剰分泌が予想されたが、実際、その腫瘍において FGF23 mRNA が過剰発現している因子として見出されていた。一方で、XLH では、FGF23 との関連については全く不明であった。

低リン血症性くる病・骨軟化症の疾患の診断方法としては、直接的なものは存在しない。また、これらの疾患の内科的治療法としては、腎臓から漏出するリンを補充するために、大量のリンを経口摂取する対症療法が中心となる。よって、原因物質の定量を用いた直接的な診断法や原因物質の作用を抑制し過剰なリンの漏出を抑制するような治療法が求められている。

そこで、FGF23 に対する抗体を用いて、低リン血症性くる病・骨軟化症を含むリン代謝異常疾患の新たな診断法および治療法の可能性を検証することを目的に研究を行うこととした。

抗 FGF23 抗体を用いた活性型 FGF23 検出系の構築と低リン血症性くる病・骨軟化症における血清 FGF23 濃度の解析

<仮説>

血清中に存在する FGF23 は活性型の intact 体と不活性型の断片からなる。さらに低リン血症性くる病・骨軟化症においては、血清中の活性型である intact FGF23 濃度が上昇し病態を惹起している。

<目的>

活性を有する FGF23 濃度の血中測定系を用いて、低リン血症性くる病・骨軟化症の診断方法を確立する。

<解決方法>

高いアフィニティを有する抗 FGF23 抗体を取得し、得られた抗体を用いてヒト血清中の活性型 FGF23 のみを認識し、健常人の濃度の検出および定量が可能な高感度な系を確立する。その後、TIO および XLH 患者の血清中の活性型 FGF23 濃度を健常人と比較する。

<結果>

マウスにヒト FGF23 を免疫し、intact FGF23 精製物を固相化した ELISA でスクリーニングを行うことで複数の抗ヒト FGF23 マウスモノクローナル抗体を取得した。これらの抗体の認識部位を確認した後、intact FGF23 精製物に対してサンドイッチ ELISA を行い、有用な組み合わせの抗体を選抜した。その結果、FGF23 の N 末側もしくは C 末側を認識する FN1 および FC1 抗体を得た。

これまで血中の FGF23 は検出されなかったことがないため、実際の血中に FGF23 が、とくに intact 体と断片の両者が存在するか不明であった。そこで、FN1 および FC1 抗体を用いて免疫沈降することで調べた。血液サンプルは、FGF23 濃度が上昇していることが予想されている TIO 患者血漿、および比較対象として健常人の血漿を用いた。それぞれの抗体の免疫沈降物を FC1 抗体で検出したところ、32kD に intact FGF23 と思われるバンドが観察され、その強度は健常人に比べ TIO 患者血清中で 7.9 倍と上昇していた。また、この実験より血中にも不活性と思われる断片が存在することが示されたことから、断片を認識せず、活性を有する intact FGF23 のみを検出する系の必要性が示された。

そこで FN1 抗体を固相化抗体に、FC1 抗体を検出抗体として組み合わせ、サンドイッチ ELISA を構築し 104 名の健常成人の血清を測定したところ、平均値±SE が $28.9 \pm 1.1 \text{ ng/L}$ 、最低値 8.2 ng/L 、最大値 54.3 ng/L だった。

次に、原因腫瘍を摘出し病態が改善した TIO 患者の摘出手術前後の血清 FGF23 濃度を測定した。血清 FGF23 とリン濃度を経時的に測定した結果、FGF23 は術前 80 日に渡り $130\text{-}300 \text{ ng/L}$ と全ての期間において、健常人 ($< 54.3 \text{ ng/L}$) に比して高値であることが確認され、また腫瘍除去後には血中からの消失が観察された。一方、リン濃度は腫瘍摘出後には上昇が観察された。また、腫瘍摘出直後を詳細に調べると、FGF23 は半減期 20-30 分という速やかな消失が観察され、その後、リンやビタミン D 代謝物の血中濃度改善が観察された。

さらに、XLH 患者、計 6 名においても同様に血清の FGF23 濃度を測定した。その結果、ほぼ全ての患者血中の FGF23 濃度は健常成人に比べ高値を示した。

<結論と考察>

低リン血症性・くる病・骨軟化症の診断が可能な検出および測定レベルの活性型 FGF23 測定系の構築に成功したと考えられる。また、まだ課題は残るもののこれまで報告のなかった TIO や XLH において血中の過剰な FGF23 が原因の疾患であることを示唆する知見を得ることが出来た。

中和活性を有する抗 FGF23 抗体の発見とマウスにおけるそれらの中和活性の解析

<仮説>

FGF23 活性を中和する抗体は低リン血症性くる病・骨軟化症においてリンの過剰漏出を防ぎ病態を改善させる。

<目的>

FGF23 をターゲットとした低リン血症性くる病・骨軟化症の治療薬としての検証を可能とするような、in vivo で FGF23 中和活性を有する抗 FGF23 抗体を取得する。

<解決方法>

in vitro アッセイにおいて FN1 および FC1 抗体が FGF23 阻害活性を有することを確認し、これらの抗体をマウスに投与し、マウス内在性の FGF23 阻害活性を観察する。FGF23 シグナルに関与すると報告されている Klotho という一回膜貫通型の分子を HEK293 細胞に導入することにより、FGF23 特異的なシグナルが誘導され、初期応答遺伝子である Egr-1 の mRNA が上昇することが明らかになっていた。そこで in vitro アッセイとしてマウス内在性 FGF23 刺激時のリポーターアッセイ (Klotho-Egr-1 アッセイ) を構築し、FN1 および FC1 抗体の in vitro における中和活性について調べる。さらに、これらの抗体を正常マウスに投与した後のリン・ビタミン D 代謝に関与する血清・尿パラメーターを観察し、内在性のマウス FGF23 を中和しているかを検討する。

<結果>

Klotho-Egr-1 アッセイにおいて、内在性マウス FGF23 シグナルを FN1 および FC1 抗体はどちらも抑制した。よってこれらの抗体が in vivo においてマウス FGF23 の活性も抑制すると予想した。そこで、FN1 および FC1 抗体をそれぞれマウスに投与したところ、両者とも腎での再吸収促進を伴う血清リン濃度上昇、および $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の活性化の阻害の解除を伴う一過性の血清 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度上昇を誘導することが分かった。

同一分子内における異なる領域を認識する二つの中和抗体が存在することは一般的なリガンドはもちろん他の FGF ファミリーではこれまで報告がないことからこの結果は興味深く思われた。そこで、FN1 および FC1 抗体をマウスに共投与することにより、これらの作用がどのように変化するのか検証した。FN1 と FC1 抗体を等量混合した抗体を共投与したとき血清リンおよび $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度上昇最高値および上昇維持期間において相乗的に活性が増加した。

<結論と考察>

FN1 および FC1 抗体のリン・ビタミン D 代謝における作用はこれまで報告のある FGF23 投与と完全にミラーイメージであったことから、これらの抗体は内在性の FGF23 を中和していると考えられた。よって FGF23 をターゲットとした治療薬としての検証を可能とするような、2 種類の FGF23 中和抗体の取得に成功したと考えられる。また中和抗体の薬効を増強させることは重要であるが、今回の研究において、生体内における FGF23 中和活性を簡便に飛躍的に増大させる方法のひとつを発見したことは今後の治療薬創出に大きく貢献すると考えられる。さらに簡便な in vitro スクリ

ーニング系を用いて、生体内において FGF23 を中和する抗体を効率よく取得する可能性を見出すことができた。

<まとめ>

血中測定系の研究からは、低リン血症性くる病・骨軟化症の診断の基盤を築くことが出来た。また中和抗体の研究からは、FGF23 をターゲットとした低リン血症性くる病・骨軟化症の原因療法的な治療法の可能性を強く示すことが出来た。抗 FGF23 抗体を用いた、低リン血症性くる病・骨軟化症の診断法および治療法はこれまで報告がないことから、これらの抗体はリン代謝異常疾患に対する画期的な診断薬および薬剤もしくはそれらの検証材料として有望であると考えられる。