

審査の結果の要旨

氏名 山崎 雄司

「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」と題する本論文では、抗FGF23抗体を用いて低リン血症性くる病や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として行なわれた研究が記述されている。第1章は序論であり、リン代謝の調節と、FGF23の関与に関する研究の経緯が述べられている。第2章では、抗活性型FGF23モノクローナル抗体を作製して、活性型FGF23の血中測定系を樹立し、活性型FGF23の低リン血症性くる病・骨軟化症への直接の関与を検証し、病態診断に利用する可能性を検証した結果が述べられている。第3章では、これらのモノクローナル抗体がマウス内在性FGF23の中和活性を有することを見出し、これを利用してマウスにおける低リン血症性くる病・骨軟化症病態モデルを用いて、この疾患に対する新たな医薬品創出の可能性を検証した結果が述べられている。

第1章序論で述べられているポイントは、血中のリン濃度が FGF23 を介して複数の経路で調節されること、しかしながら FGF23 の測定が骨疾患の病態の検出に、また FGF23 の阻害が骨疾患の改善に、直接役立つかどうかは不明であったことである。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り、179 番目と 180 番目の間が切断されると活性が失われる。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かったため、血中の活性型 FGF23 に対する抗体を用いた診断法を考案することの意義が述べられている。さらに、FGF23 に対する中和抗体を用いて、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治療法の開発が求められる根拠が述べられている。

第2章では、抗活性型 FGF23 抗体を開発した経緯、これを用いた活性型 FGF23 検出系の構築、及び伴性家族性低リン血症性くる病・骨軟化症及び腫瘍性くる病・骨軟化症患者における血清 FGF23 濃度の解析結果が述べられている。マウスにヒト FGF23 を免疫し、活性型 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、活性型 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モノクローナル抗体を選抜した。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 は検出されることがなかったため、血中に活性型 FGF23 が存在するか不明であったが、これらの抗体を用いて腫瘍性くる病・骨軟化症患者血漿、およ

び比較対象として健常人の血漿を用いて免疫沈降法にて解析した。その結果活性型 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腫瘍性くる病・骨軟化症患者血清中で有意に上昇していた。複数の抗体を組み合わせ、サンドイッチ ELISA 法を樹立し、これを用いて健常成人と、原因腫瘍を摘出し病態が改善した腫瘍性くる病・骨軟化症患者の摘出手術前後の血清中の FGF23 濃度を測定した。血清 FGF23 濃度は術前全ての期間において健常人に比して有意に高値であり、腫瘍除去後には血中から消失することが観察された。腫瘍摘出後にはリン濃度の上昇が観察され、ビタミン D 代謝物である 1,25D の血中濃度改善が観察された。伴性家族性低リン血症性くる病・骨軟化症患者においても血清中の FGF23 濃度は健常成人に比べ高値を示した。これらの結果から、新たに開発した抗活性型 FGF23 モノクローナル抗体により、病態に対応した血清 FGF23 量の変化が検出されたことが明らかとなった。

第3章では、作製した抗 FGF23 抗体がマウス FGF23 に結合しその活性を阻害することを発見したこと、病態モデルマウスを用いてこの抗体投与の効果がどのように現れるかを検証したことが述べられている。FGF23 シグナルに關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ので、この系を *in vitro* アッセイとして用い、二種類の抗 FGF23 抗体である FN1 および FC1 がマウス FGF23 の中和活性について調べた。その結果マウス FGF23 シグナルを FN1 および FC1 抗体が抑制した。そこでこれらの抗体それぞれを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 1,25D の活性化の阻害の解除に伴う一過性の血清 1,25D 濃度上昇を誘導することがわかった。FGF23 の異なる領域を認識する二つの抗体がどちらも FGF23 を阻害する活性を有していたので、これらをマウスに共投与することにより、FGF23 の作用がどのように変化するか検証した。FN1 抗体と FC1 抗体を等量混合して共投与したとき、血清中のリン濃度および 1,25D 濃度上昇最高値および上昇維持期間に対する効果が相乗的であった。これらの結果から、両抗体は *in vivo* において内在性の FGF23 を中和していると考えられ、またこれらを混合することにより生体内における FGF23 中和活性を増大させることが示された。これらの知見は低リン血症性くる病・骨軟化症の治療薬創出に貢献すると考えられた。

以上のように、学位申請者は複数の抗ヒト FGF23 モノクローナル抗体を駆使して、血中測定系の研究から、低リン血症性くる病・骨軟化症の診断を行うための基盤を築いた。またこれらがマウス FGF23 を中和することを発見して、このことを利用した研究から、FGF23 を標的とする低リン血症性くる病・骨軟化症の治療法の開発に成功した。これらの成果はリン代謝異常疾患に対する診断薬および治療薬として新規であり、研究成果は病態医科学、創薬科学として価値の高いものである。従ってこの研究を行った山崎雄司は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。