

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-201691

(P2004-201691A)

(43) 公開日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09  
A 6 1 K 31/7088  
A 6 1 K 38/00  
A 6 1 K 48/00  
A 6 1 P 3/00

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
A 6 1 K 31/7088  
A 6 1 K 48/00  
A 6 1 P 3/00  
A 6 1 P 3/10

2 G O 4 5  
4 B O 2 4  
4 C O 8 4  
4 C O 8 6  
4 H O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-428433 (P2003-428433)  
(22) 出願日 平成15年12月24日 (2003.12.24)  
(31) 優先権主張番号 US60/436,386  
(32) 優先日 平成14年12月23日 (2002.12.23)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 000003311  
中外製薬株式会社  
東京都北区浮間5丁目5番1号  
(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志  
(74) 代理人 100108774  
弁理士 橋本 一憲  
(72) 発明者 宮本賢一  
徳島県徳島市中洲町2丁目38-502  
(72) 発明者 瀬川 博子  
徳島県徳島市佐古4番町11-16吉田ハ  
イツ202  
Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13  
DA36 FB02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I I 型 N a / P i 共輸送体発現調節因子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 Na/Pi II型輸送体の調節メカニズムを解明するとともに、II型輸送体の調節因子を提供する。また、II型輸送体発現を調節する因子に作用する物質のスクリーニング方法を提供する

【解決手段】 FGF23およびFGF23変異体 (R176Q、R179Qなど) がII型輸送体の発現を抑制し、腎臓におけるリン酸の再吸収を低下させていることを見出した。FGF23およびFGF23変異体からなるII型Na/Pi共輸送体発現調節因子を提供する。また、このFGF23またはその変異体に相互作用し得る物質のスクリーニング方法を提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (A) から (D) のいずれかのタンパク質からなる II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子。

(A) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列を備えたタンパク質 (FGF23 野生型)

(B) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、176 位のアルギニンがグルタミンに置換されたアミノ酸配列を備えたタンパク質

(C) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、179 位のアルギニンがグルタミンに置換されたアミノ酸配列を備えたタンパク質

(D) 上記 (A) から (C) のいずれかのアミノ酸配列において、一以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を有するアミノ酸配列を備えたタンパク質 10

## 【請求項 2】

下記 (a) または (b) からなる DNA であって、II 型 Na/Pi 共輸送体の発現を調節し得る蛋白質をコードした DNA を有効成分として含有する II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節剤。

(a) 配列番号：1 に示す塩基配列を有する DNA。

(b) 配列番号：1 に示す塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA。

## 【請求項 3】

DNA がベクターに担持された、請求項 2 記載の II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節剤。

## 【請求項 4】

請求項 1 記載の II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子を有効成分として含有する高リン酸血症の治療用薬剤。 20

## 【請求項 5】

請求項 2 または 3 記載の II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節剤を有効成分として含む、高リン酸血症の治療用薬剤。

## 【請求項 6】

以下の (A) および (B) を含む、II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子と相互作用する物質のスクリーニング方法。

(A) 請求項 1 記載の II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子に被検物質を作用させる工程

(B) 該被検物質と II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子との相互作用の有無を解析する工程 30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子に関し、特に、II 型 Na/Pi 共輸送体の発現に抑制的に作用する FGF23 およびその変異体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

食事に含まれるリン (Pi) の含有量は、近位尿細管の Pi 再吸収の主要な調節因子であり、単離された刷子縁膜 (BBM) および細胞培養を用いて広く研究されている (非特許文献 6)。これらの研究は、食事に含まれる Pi 含有量の変化によって誘導された近位 Pi 再吸収能の変化が、先端の Na<sup>+</sup> 依存的 Pi 共輸送体の速度の変化には反映されるが、Pi の見かけの K<sub>m</sub> 値の変化には反映されないことを示している。これらの適応性のある系 (食事に含まれる Pi) の調節因子には、副甲状腺ホルモン (PTH)、ビタミン D、成長ホルモン、甲状腺ホルモン、またはカルシトニンが含まれるが、それ以外にもまだ同定されていない物質が示唆されている (非特許文献 6)。 40

## 【0003】

最近、リン酸塩消耗障害である常染色体優性低リン酸血症性くる病 (ADHR) において変異している遺伝子が、線維芽細胞増殖因子 (FGF2) と配列相同性を有する蛋白質である FGF23 であると同定された (非特許文献 5、10)。FGF23 蛋白質は、推定の N-末端シグナルペプチド (残基 1~24 位) を含むアミノ酸 251 個からなる新規分泌型蛋白質である (非特許 50

文献10)。176Argおよび179Argにおけるこのミスセンス変異がADHRに関与している（非特許文献5、10）。これらのアミノ酸残基は、「RXXR」からなる蛋白質分解切断のコンセンサス配列に当たる。176Argおよび179Argにおける変異は、蛋白質分解切断を阻害し、その結果として大量の変異蛋白質が血液循環中に無傷の形で分泌される可能性がある（非特許文献12）。ADHR患者は腫瘍性低リン酸血症性骨軟化症（OH0）の患者において認められる臨床および実験的特徴の多くを示す（非特許文献11）。

#### 【0004】

最近、WhiteらおよびShimadaraらは、FGF23がPiの消耗を引き起こす腫瘍によって過剰発現される分泌型ポリペプチドであることを証明した（非特許文献9、11）。OH0患者は、低リン酸血症、1,25(OH)2D3血清中濃度が減少または不適當、骨軟化症、およびPi（TMP）の尿細管最大再吸収／糸球体濾過値（GFR）の減少を含む、ADHR患者との生化学的および臨床的類似性を有する（非特許文献5）。最近、われわれは、naked DNA（FGF23 R176Q）をマウスおよびラットに投与すると、腎Pi輸送活性の抑制および低リン酸尿症作用を引き起こすことを報告した（非特許文献7、特許文献1）。

#### 【0005】

近位尿細管において、Piは、Na<sup>+</sup>-依存的輸送系、すなわちNa/Pi輸送体によってBBMで再吸収される（非特許文献3、6）。いくつかの哺乳類腎Na/Pi共輸送体が最近単離され、特徴が調べられている（非特許文献3、6）。これらの輸送体のcDNAsは、腎皮質において三つのタイプ（I～III型）に分類することができる。II型輸送体は、近位尿細管における主要な機能的Na/Pi共輸送体であることが証明されている（非特許文献1、3、6）。I型輸送体は、さらに三つの群、すなわちIIa、IIb、およびIIc型に分類することができる（非特許文献3、6、8）。IIa型共輸送体は、腎臓の近位尿細管において発現されるのに対し、IIb型は肺および小腸のようないくつかの組織において発現される（非特許文献1-4、6）。さらに、ヒト、ラット腎臓から推定の増殖関連II型Na/Pi共輸送体（IIc型）がクローニングされた（非特許文献8）。IIc型Na/Pi共輸送体蛋白質は、離乳期および成人ラット腎臓の近位尿細管細胞の先端膜において高度に発現されている（非特許文献8）。食事のPi枯渇によって、IIa型およびIIc型輸送体の発現が顕著に誘導されたが、腎近位尿細管細胞の先端膜に存在するI型は誘導されなかった（非特許文献3、6、8）。対照的に、正常Piまたは高Pi食を与えると、IIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体の発現は抑制される（非特許文献3、6、8）。しかし、食事に含まれるPiによる両輸送体の調節メカニズムは、なおわかっていない。

#### 【特許文献1】国際公開 WO 02 05 20 09

【非特許文献1】Custer M, Lotscher M, Biber J, Murer H, and Kaissling B. Expression of Na-Pi cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am J Physiol* 266: F767-F774, 1994.

【非特許文献2】Feild JA, Zhang L, Brun KA, Brooks DP, and Edwards RM. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 578-582, 1999.

【非特許文献3】Hernando N, Forster I, Biber J, and Murer H. Molecular characteristics of phosphate transporters and their regulation. *Exp Nephrol* 8: 366-75, 2000.

【非特許文献4】Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, and Biber J. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14564-14569, 1998.

【非特許文献5】Kruse K, Woelfel D, and Storm TM. Loss of renal phosphate wasting in a child with autosomal dominant hypophosphatemic rickets caused by a FGF23 mutation. *Horm Res* 55: 305-308, 2001.

【非特許文献6】Murer H, Hernando N, Forster I, and Biber J. Proximal tubular ph

osphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev* 80: 1373-1409, 2000

【非特許文献 7】 Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H., Hirata M, Miyamoto K, and Fukushima N. Suppression of both Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transport activity and 1,25-hydroxyvitamin D3 production is induced by the human fibroblast growth factor-23 mutant. Submitted.

【非特許文献 8】 Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Ito M, Kuwahata M, Ohkido I, Tsumi S, and Miyamoto K. Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J. Biol. Chem.* 277: 19665-19672, 2002.

【非特許文献 9】 Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneda T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, and Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 6500-6505, 2001. 10

【非特許文献 10】 The ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet.* 26: 345-348, 2000.

【非特許文献 11】 White KE, Jonsson KB, Carn G, Hampson G, Spector TD, Mannstadt M, Lorenz-Depiereux B, Miyauchi A, Yang IM, Ljunggren O, Meitinger T, Strom TM, Juppner H, and Econs MJ. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide overexpressed by tumors that cause phosphate wasting. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 497-500, 2001.

【非特許文献 12】 Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, and Itoh N. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* In press, 2002. 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本願発明者らは、II型輸送体の調節メカニズムを解明するとともに、II型輸送体の調節因子を提供することを課題とする。また、II型輸送体発現を調節する因子に作用する物質のスクリーニング方法を提供することをも課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記目的を達成すべく、本願発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、FGF23がII型輸送体の発現を調節していることを見出し、以下に示す本発明を完成させた。

(1) 以下の(A)から(D)のいずれかのタンパク質からなるII型Na/Pi共輸送体発現調節因子。

(A) 配列番号2記載のアミノ酸配列を備えたタンパク質 (FGF23野生型)

(B) 配列番号2記載のアミノ酸配列において、176位のアルギニンがグルタミンに置換されたアミノ酸配列を備えたタンパク質

(C) 配列番号2記載のアミノ酸配列において、179位のアルギニンがグルタミンに置換されたアミノ酸配列を備えたタンパク質

(D) 上記(A)から(C)のいずれかのアミノ酸配列において、一以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を有するアミノ酸配列を備えたタンパク質 40

(2) 下記(a)または(b)からなるDNAであって、II型Na/Pi共輸送体の発現を調節し得る蛋白質をコードしたDNAを有効成分として含有するII型Na/Pi共輸送体発現調節剤。

(a) 配列番号: 1に示す塩基配列を有するDNA。

(b) 配列番号: 1に示す塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。

(3) DNAがベクターに担持された、上記(2)記載のII型Na/Pi共輸送体発現調節剤。

(4) 上記(1)記載のII型Na/Pi共輸送体発現調節因子を有効成分として含有する高リン血症の治療用薬剤。

(5) 上記(2)または(3)記載のII型Na/Pi共輸送体発現調節剤を有効成分として含 50

む、高リン酸血症の治療用薬剤。

(6) 以下の(A)および(B)を含む、II型Na/Pi共輸送体発現調節因子と相互作用する物質のスクリーニング方法。

(A) 請求項1記載のII型Na/Pi共輸送体発現調節因子に被検物質を作用させる工程

(B) 該被検物質とII型Na/Pi共輸送体発現調節因子との相互作用の有無を解析する工程

【発明の効果】

【0008】

上記発明により、II型Na/Pi共輸送体の発現を調節する因子、具体的にはFGF23であることが明らかとなった。このFGF23は、腎臓でのPi再吸収を調節、とりわけ、抑制する物質そのものであり、また、この腎臓でのPi再吸収を調節するターゲット物質として利用することができる。そのため、本発明によって、高リン酸血症あるいは低リン酸血症の予防、治療薬を開発する際の重要な因子が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は新規なII型Na/Pi共輸送体発現調節因子を提供する。本願発明者らはヒトFGF23が血中リン濃度を低下させることを報告しているが、更なる研究により、そのメカニズムとして、FGF23がII型Na/Pi共輸送体の発現を抑制し、これにより腎臓におけるリンの再吸収を抑制し、結果として血中リン濃度の低下がもたらされていることを見出した。すなわち、本発明は、ヒトFGF23およびその変異体がII型Na/Pi共輸送体発現調節因子として機能することを見出したことに基づき、ヒトFGF23およびその変異体をII型Na/Pi共輸送体発現調節因子として提供するものである。

【0010】

FGF23は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるが、本発明はこれに限定されず、II型Na/Pi共輸送体の発現を調節し得る類似の配列からなる蛋白質であってもよい。特にFGF23は、上述したように、配列番号2の176残基から179残基の配列がプロテアーゼによる切断を受ける領域を有する。この切断領域に変異を有しプロテアーゼによる消化されないFGF23変異体はFGF23によるII型Na/Pi共輸送体発現抑制活性がプロテアーゼ存在下においても維持され得る。このような変異体の例としては、ヒトFGF23タンパク質のアミノ酸配列において、176位のアルギニン残基がグルタミンへ置換された変異体、179位のアルギニン残基がグルタミンへ置換された変異体、および179位のアルギニンがトリプトファンへ置換された変異体（以下、それぞれ「R176Q変異体」、「R179Q変異体」、「R179W変異体」と称し、これらをまとめて「FGF23変異体」と称する）が含まれる。本発明のFGF23変異体はこれに限定されない。蛋白質には同一の機能を有する他の変異体の存在が予測され、また、蛋白質のアミノ酸配列を適宜改変することによって、同一の機能を有する変異体を得ることができる。従って、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつNa/Piコトランスポート機能を有する蛋白質も本発明の蛋白質に包含される。蛋白質のアミノ酸配列の改変は、部位特異的変異誘発法などの周知の手段により蛋白質をコードするDNAの塩基配列を改変し、塩基配列が改変されたDNAを発現させることによって得ることができる。得られた蛋白質がII型Na/Pi共輸送体発現を調節し得るかは、本願実施例に記載された解析法により確認することができる。

【0011】

ここで「調節」の例として、上記には負の作用を及ぼす「抑制」、「阻害」などを代表に説明したが、本書における「調節」は負の制御に限定されず正に制御する「促進」などを含めることができる。したがって、FGF23変異体であってII型Na/Pi共輸送体の発現を促進し得る蛋白質、例えば、FGF23のドミナントネガティブ変異体などをも本発明に含めることができる。

【0012】

負に制御する調節因子はII型Na/Pi共輸送体の発現を低下させ、これにより腎臓におけるPiの再吸収を抑制し、血中Pi濃度を低下させる。したがって、前者は、高リン酸血症を

伴うあるいは伴う傾向がある疾患などの予防、治療薬として利用することができる。高リン血症は、一般的に腎からの $\text{PO}_4$ 排泄の減少の結果として発症する。進行した腎不全(GFRが $20\text{mL/分未満}$ )は、血漿 $\text{PO}_4$ の上昇を導くに足る排泄の減少をもたらす。腎不全がなくとも、偽性副甲状腺機能低下症や副甲状腺機能低下症の場合には、腎の $\text{PO}_4$ 排泄に障害が起こることがある。高リン血症は経口 $\text{PO}_4$ の過剰投与や、ときにはリン酸塩を含有する浣腸の使いすぎからも発生することがある。高リン血症はまた、細胞内 $\text{PO}_4$ の細胞外への移動の結果生じることもある。これが頻繁に起こるのは、糖尿病ケトアシドーシス(全身の $\text{PO}_4$ 喪失にも関わらず)や、挫傷、非外傷性横紋筋融解症、それから全身性の感染症および腫瘍溶解症候群である。高リン血症は、二次性副甲状腺機能亢進症や、長期間透析を受けている患者の腎性骨ジストロフィの発症にも決定的な役割を演じている。

10

#### 【0013】

一方、正に制御する調節因子はII型Na/Pi共輸送体の発現を促進し、これにより血中Pi濃度を上昇させる。したがって、正に制御する調節因子は血中Piが低濃度になりやすい疾患や状態の予防、治療に用いることができる。ここで血中Piが低濃度になりやすい疾患・状態としては、骨軟化症、副甲状腺機能亢進、ビタミンD代謝異常症、吸収不全症候群、絶食時、糖尿時、慢性アルコール中毒などがある。よって、これら疾患・状態に対して、II型Na/Pi共輸送体の発現を正に制御する調節因子を用いることにより、血中のリン酸濃度の低下を予防・解消することができる。また、治療による合併症や副作用によって低リン血症になる場合もある。こうした低リン血症を伴う可能性がある治療には、腎移植、グルカゴン投与、グルコース投与がある。したがって、これら治療の際に、I型Na/Pi共輸送体の発現を正に制御する調節因子を用いることにより、血中リン酸濃度の低下という合併症や副作用を予防することが可能となる。

20

#### 【0014】

本発明は、上述したII型Na/Pi共輸送体発現調節剤としてFGF23およびその変異体をコードした遺伝子を提供する。FGF23をコードしたDNAは、例えば、ヒトFGF23cDNAである配列番号1に記載のDNAを挙げることができる。また、FGF23変異体をコードした配列は、FGF23をコードしたDNA(例えば、配列番号1に記載のDNA)を改変して作製することができる。

#### 【0015】

FGF23 cDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、FGF23を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、FGF23 cDNAの配列(配列番号: 1)の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えば、文献(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載の方法により調製してもよく、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、FGF23を発現している細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成した後、FGF23 cDNAの配列(配列番号: 1)に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のポリペプチドをコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

30

#### 【0016】

上記FGF23 cDNAの改変は、当業者によって一般的に行われるDNA変異導入(DNA Mutagenesis)技術によって実施することができる。上記FGF-23cDNA(配列番号1に記載のDNA)を鋳型に例えばFGF-23変異体R176Q、R179Q、R179Wの作製を一例として示す。PCRを用いた変異導入方法に従ってこれらを作製した。突然変異導入用のプライマーの塩基配列は次の通りである。

40

- ・ 5'- CACggCagCACACCCggAgC -3' (配列番号: 5)
- ・ 5'- CACggCggCACACCCAgAgC -3' (配列番号: 6)
- ・ 5'- CACggCggCACACCTggAgC -3' (配列番号: 7)
- ・ 5'- CACggCagCACACCCAgAgC -3' (配列番号: 8)
- ・ 5'- CACggCagCACACCTggAgC -3' (配列番号: 9)

#### 【0017】

変異導入(Mutagenesis)は1st PCRにおいて、変異導入のための部分フラグメントを作製

50

し、2nd PCRにより変異の入っている全長変異体の鋳型を作製し、最終的に3rd PCRにより完全な変異体を得るという3ステップによる方法により実施することができる。具体的には、上記Specific mutant primer（配列番号：5、6、7、8、9）、Specific Reverse PCR primer（50 $\mu$ M、配列番号：4）を用いて1stPCRを行い、PCR産物を電気泳動で分離し、目的の長さの断片を回収する。回収フラグメント（変異体部分配列）を用いて次に2nd PCR反応を行い変異体の全長の鋳型を作製する。引き続き、2ndPCR反応液にSpecific Forward PCR primer（配列番号：3）、Specific Reverse PCR primer（配列番号：4）を用いて、3rd PCR反応を行う。最終的に得られたPCR反応による増幅産物を電気泳動で確認し、特異的に増幅された約750bp付近のバンドを回収する。この一連の操作により上記FGF 23変異体をコードするDNAを得ることができる。ここでは、FGF-23変異体R176Q、R179Q、R179Wの特記して説明したが、これ以外の変異体も本記載を参考に当業者であれば容易に作製することができる。

10

#### 【0018】

上記II型Na/Pi共輸送体発現調節剤としてのFGF23またはその変異体をコードしたDNAはそのまま使用することも可能であるが、ベクターに担持させて使用してもよい。このようにベクターに保持させることは、宿主細胞内においてFGF23またはその変異体をコードしたDNAの維持、FGF23またはその変異体を発現させるために有用である。特に哺乳動物ベクターを用いた場合には、FGF23またはその変異体をヒトに導入するために利用することができ、高リン酸血症、低リン酸血症の予防、治療薬としての応用が期待できる。

#### 【0019】

20

上記ベクターの具体例を示せば、大腸菌を宿主とする場合には、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。大腸菌で本発明の蛋白質を発現させるためには、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature（1989）341、544-546；FASEB J.（1992）6、2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science（1988）240、1041-1043）、またはT7プロモーターなどを保持していることが好ましい。このような発現ベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（ファルマシア社製）、「QIAexpress system」（キアゲン社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

#### 【0020】

30

他の細胞で発現させるためには目的の細胞に応じてベクターを選択する必要がある。哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990、18(17),p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（ギブコBRL社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

#### 【0021】

40

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら、Nature（1979）277、108）、MMLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター（Mizushimaら、Nucleic Acids Res.（1990）18、5322）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

#### 【0022】

本発明は、上記FGF23またはその変異体遺伝子またはこれを保持するベクターにより形

50

質転換された形質転換体を提供する。この形質転換体は、主に本発明のNa/Pi共輸送体発現調節因子であるFGF23またはその変異体を生産する目的、FGF23またはその変異体をコードするDNAを増幅する目的で利用することができる。

#### 【0023】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌などの原核細胞から動物細胞などの真核細胞を用いることが可能である。真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

#### 【0024】

宿主細胞へのベクターの導入は、細胞の種類により適宜選択することができ、例えば、ウイルスベクターの場合にはウイルス粒子として細胞に感染させる方法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ベーリンガーマンハイム社製)、リポフェクション法などの生化学的な方法、エレクトロポレーション法などの物理的な方法などのいずれで行ってもよい。

#### 【0025】

本発明はまた、II型Na/Pi共輸送体発現調節因子であるFGF23またはその変異体、これらFGF23あるいはその変異体をコードするDNA、またはこのDNAを保持するベクターのいずれかを含有した医薬組成物、特に高リン酸血症の治療用薬剤を提供する。本発明のII型Na/Pi共輸送体発現調節因子は、II型Na/Pi共輸送体の発現を調節し、これにより血中のリン濃度を調節することができる。上述の通り、調節には正負のいずれの作用も含まれるため、II型Na/Pi共輸送体発現を負に調節する因子は、高リン酸血症の予防、治療薬として、あるいは、高リン酸血症に起因する他の疾患、例えば、腎不全進展抑制薬などの予防、治療薬として用いることができる。一方、II型Na/Pi共輸送体発現を正に調節する因子は、逆に低リン酸血症の予防、治療薬として、あるいは、低リン酸血症に起因する他の疾患の予防、治療薬として用いることができる。なお、この医薬組成物はヒト以外にもマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなどの医薬品として使用してもよい。

#### 【0026】

上記医薬組成物を患者に投与する方法としては、直接投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。

#### 【0027】

また、本発明のDNAを医薬組成物として用いる場合には、上述したように本発明のDNAを生体内でその発現が保証されたベクターに組み込み、例えば、レトロウィルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入すればよい。これにより、血中リン濃度の高低に起因して生じる疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。生体内への投与においては、ex vivo法やin vivo法を利用することができる。

#### 【0028】

本発明はII型Na/Pi共輸送体発現調節因子であるFGF23またはFGF23変異体と相互作用す

10

20

30

40

50



る物質のスクリーニング方法をも提供する。本発明のスクリーニング方法は、(A) 請求項 1 記載の II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子に被検物質を作用させる工程、(B) 該被検物質と II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子との相互作用の有無を解析する工程が含まれる。

#### 【0029】

スクリーニングに用いる II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子は、II 型 Na/Pi 共輸送体の発現を調節し得るものであれば、特によく、FGF23 野生型 (配列番号 2)、上述した FGF23 変異体 (FGF23R176Q、FGF23R179Q、FGF23R179W など) を用いることができる。

#### 【0030】

被検物質は、特に制限はなく、例えば、天然または合成化合物、各種有機化合物、コンビナトリアルライブラリー、天然または合成された糖類、核酸、蛋白質、ペプチド、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物あるいは菌体成分などを挙げることができる。被検試料としての蛋白質、ペプチドには、FGF23 の断片も一例であり、FGF23 の抗体であってもよい。核酸には、FGF23 に作用し得る aptamer RNA や FGF23 mRNA に作用するリボザイムおよび siRNA などを用いることができる。また、FGFR のチロシンキナーゼ阻害剤である SU5402 は、FGF23 の活性を阻害することが知られており、この SU5402 は本スクリーニングの被検物質として採用することができる。さらに FGF23 は、オポッサム腎 (OK) 細胞において主に発現される FGF 受容体 (FGFR) -3c に対して高親和性で結合することが知られている (前掲 Yamashita T ら, J Biol Chem. In press, 2002.) ことから、この FGFR-3c そのもの、あるいはその断片を本スクリーニングの被検物質とすることもできる。

#### 【0031】

II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子を被検物質に作用させるには、種々の方法があるが、I 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子の形態および被検物質の種類による。例えば、被検物質が発現ライブラリープラスミド DNA などの場合には、II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子を発現する細胞内に導入する。化合物、蛋白質、ペプチドなどは、II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子に直接作用させる他、該因子が発現している細胞の培地 (液体、寒天などの固体)、などに添加することにより実施することができる。被検物質が蛋白質、ペプチドである場合には、被検物質をコードする DNA と II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子とを細胞内に、導入し、細胞内で両物質を接触させてもよい。

#### 【0032】

被検物質と II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子を作用させた後、両者の相互作用の有無を解析する。この相互作用の解析は、例えば Two-Hybrid 法や、免疫沈降法により解析することができる。Two-Hybrid 法は、被検物質が蛋白質、ペプチドの場合に利用できる。Two-Hybrid 法を市販のキットを用いて実施することができる。免疫沈降法は、FGF23 に対する抗体で FGF23 を沈降させ、共に沈降した被検物質は相互作用し得ると判定される。また、細胞内での相互作用を検出する場合には、蛍光エネルギー移動 (FRET) を用いて実施することができる。FRET では、特定の蛍光分子から他の蛍光分子へ励起エネルギーが移動することで、細胞内で起こる蛋白質間の相互作用や分子レベルの事象を検出することができる。これら方法で、FGF23 などの II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節因子と相互作用し得ると選択された物質は、FGF23 等の作用、II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節活性に影響を与える可能性がある。こうした物質が、FGF23 などの II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節活性に影響を与えるか否かは、実施例に示した種々の解析方法に選択された被検物質を共存させて実施することにより調べることができる。そして、FGF23 などの II 型 Na/Pi 共輸送体発現調節活性に影響を与えると判定された物質は、FGF23 への作用を介して、II 型 Na/Pi 共輸送体発現に影響を与え、血中のリン酸の濃度を調節することができる。特に、FGF23R176Q、FGF23R179Q、FGF23R179W などは、プロテアーゼによる切断を受けずに II 型 Na/Pi 共輸送体発現に対し抑制的に作用し続け、結果として ADHR (常染色体優性低リン酸血症くる病) などを引き起こす。したがって、本スクリーニング方法により FGF23 に抑制的に作用する物質を見出すことができれば、FGF23 遺伝子の変異に起因する ADHR などの治療薬などに応用することができる。また、低リン酸血症及びビタミン D 代謝異常を呈する疾患として腫瘍性骨軟化症 (TIO) が知られているが、この疾患では腫瘍より FGF23 が過剰に分泌されていることが報告さ

れている(前掲Shimada T.らによるProc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6494-6499, 2001.)。そのため、FGF23に抑制的に相互作用する物質はこうした、FGF23発現亢進を伴う疾患の治療薬そのもの、あるいはリード化合物等にもなり得る。

#### 【実施例1】

##### 【0033】

低Pi食を与えたラットにおける血漿中のカルシウム、リン酸塩、およびPTHレベルに及ぼすFGF23(野生型、R176Q変異型)の影響について解析した。

##### 【0034】

本解析に用いる雄性Wister系ラット(生後5週齢)をSLC(静岡、日本)から購入した。動物をプラスチックケージに収容して、標準的なラット飼料(オリエンタル社、大阪、日本)を自由に与えた。動物に飼料を1週間与えた。この期間の後、動物に0.6%カルシウムおよび0.6%リンを含む飼料を5日間与えた。6日目、ラット各6匹の以下の4群を確立した；対照Pi群1群、ラットに0.6%Piを含む飼料を慢性的に与えた；低Pi群3群、ラットに低い割合(0.02%)のPi飼料を含む飼料(表2)を与えた。低含有飼料を与えた7日後に、全てのラットに以下に示すnaked DNAを導入した。

##### 【0035】

pCAGGS3発現プラスミドベクター中のウサギβ-グロビン遺伝子のCAGプロモーターと3'隣接配列のあいだの唯一のEcoRI部位に、hFGF23およびhFGF23変異体遺伝子をサブクローニングした(前掲Saito H.ら)。空のpCAGGS3プラスミド(Miyazaki博士から分与、大阪、日本)を対照として用いた。既知の方法(前掲Saito H.ら)でラットに各発現プラスミド10 μg、pCGF23(FGF23野生型)、pCGFM2(FGF23 R176Q変異体)、または空プラスミドを含むDNA溶液12 mlを静脈内注射した。各naked DNAを注射した4日後、エーテル麻酔下で血液試料を腹部静脈から採取した。採取した血液試料の血漿中カルシウム、無機リン酸塩(Pi)、およびPTHレベルを調べた(表1)。

##### 【0036】

##### 【表1】

|                                      | Normal Pi  | Mock<br>(low Pi) | FGF23<br>(low Pi) | FGF23 (R176Q)<br>(Low Pi) |
|--------------------------------------|------------|------------------|-------------------|---------------------------|
| Ca                                   | 9.8 ± 1.6  | 11.5 ± 1.3       | 8.5 ± 1.3         | 9.5 ± 1.3                 |
| Pi                                   | 8.4 ± 1.1  | 2.6 ± 0.1        | 2.2 ± 0.1         | 2.4 ± 0.1                 |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 50 ± 10    | 70 ± 11          | 40 ± 8*           | 20 ± 4**                  |
| PTH                                  | 21.5 ± 4.5 | 12 ± 3           | 16 ± 5            | 19 ± 6                    |

P<0.05\*, P<0.01\*\*

##### 【0037】

低Pi食を与えたラットでは、血漿中のカルシウムおよび1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>レベルは、正常Pi食を与えたラットと比較してわずかに増加した。対照的に、PiおよびPTHの血漿レベルは、低Pi食を与えたラットでは有意に減少した。

##### 【0038】

低Pi食を与えたラットに変異体FGF23を注射しても、偽注射対照と比較してPi、カルシウム、およびPTHの血漿レベルに影響を及ぼさなかった。対照的に、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の血漿レベルは、偽注射対照と比較してFGF23(野生型)およびFGF23(R176Q)変異体では低かった。

#### 【実施例2】

##### 【0039】

インビボでのラットへのnaked FGF23 DNA(野生型、R176Q)注射

10

20

30

40

50

以前、FGF23がインビボで腎Pi共輸送活性に影響を及ぼすか否かを調べたところ、naked DNA注射（FGF23R176Q）は、腎臓におけるナトリウム依存的Pi輸送活性および1-ヒドロキシビタミンD3産生を有意に抑制した（前掲Saito H.ら）。また、naked DNA（FGF23またはFGF23R176Q）を注射したラットでは、肝臓におけるFGF23転写物のレベルは無処置対照と比較して150倍増加した。対照的に偽注射対照（Mock）の肝臓ではFGF23転写物の発現を検出することができなかった（図1）。

#### 【0040】

上記実施例1の低Pi食を与えたラットから単離した腎BBMVにおけるナトリウム依存的Pi輸送体活性を調べた。輸送活性は、急速濾過技術による放射標識Piの取込みに基づいて測定した。小胞懸濁液10  $\mu$ lをインキュベーション溶液（100 mM NaCl、100 mMマンニトール、20 mM Hepes/Tris、および0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）90  $\mu$ lに加えた後、調製物を20°Cでインキュベートした。Na<sup>+</sup>-依存的Pi取り込みの測定は、既知の手段により実施した（Katai K, Segawa H, Haga H, Morita K, Arai H, Tatsumi S, Taketani Y, Miyamoto K, Hisano S, Fukui Y, and Takeda E. Acute regulation by dietary phosphate of the sodium-dependent phosphate transporter (NaP(i)-2) in rat kidney. J Biochem 121: 50-55, 1997、Takahashi F, Morita K, Katai K, Segawa H, Fujioka A, Kouda T, Tatsumi S, Nii T, Taketani Y, Haga H, Hisano S, Fukui Y, Miyamoto K, and Takeda E. Effects of dietary Pi on the renal Na<sup>+</sup>-dependent Pi transporter NaPi-2 in thyroparathyroidectomized rats. Biochem J. 333: 175-181, 1998.、Taketani Y, Segawa H, Chikamori M, Morita K, Tanaka K, Kido S, Yamamoto H, Iemori Y, Tatsumi S, Tsugawa N, Okano T, Kobayashi T, Miyamoto K, and Takeda E. Regulation of type II renal Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate transporters by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Identification of a vitamin D-responsive element in the human NaPi-3 gene. J Biol Chem. 273: 14575-14581, 1998）。輸送は氷冷生理食塩液3 mlによって急速に希釈することによって終了させた。次に、反応混合物を、真空下で維持して予め湿らせた濾紙（0.45  $\mu$ m）に移した。

#### 【0041】

図2aに示すように、Pi輸送体活性は、低Pi食を与えたラットにおいて増加した。さらに、IIa型およびIIc型蛋白質レベルは、正常Pi食を与えたラットと比較して低Pi食を与えたラットでは有意に増加した（図2b）。FGF23（R176Q）の投与後4日目に、ラットにおけるPi輸送体活性（/分）は、偽注射対照の60%に減少した（ $1.46 \pm 0.2$ 対 $0.85 \pm 0.2$ ）（図3）。Pi輸送体活性の減少は、V<sub>max</sub>の減少が原因であって、K<sub>m</sub>の減少が原因ではなかった（データは示していない）。対照的に、FGF23（野生型）は、BBMVsにおける腎Pi輸送体活性に影響を及ぼさなかった（図3a）。

#### 【実施例3】

#### 【0042】

BBMVsにおけるIIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体の発現に及ぼすFGF23の影響

次に、低Pi食を与えたラットにおけるI型、IIa型、およびIIc型Na/Pi共輸送体の発現に及ぼすFGF23（R176Q）の影響を分析した。

#### 【0043】

刷子縁膜小胞（BBMVs）は、既に記述されているCa<sup>2+</sup>沈殿法によってラット腎臓から調製した（16）。膜の純度を評価するために、ロイシンアミノペプチダーゼ、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPアーゼ、およびチトクロームCオキシダーゼのレベルを測定した。蛋白質試料を5%メルカプトエタノールの存在下または非存在下のいずれかで試料緩衝液中で95°Cで5分間加熱して、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った（前掲Segawa H.ら）。SDS-PAGEにて分離した蛋白質を、ハイボンド-Pポリビニリデンジフルオリド転写メンブレン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社）に転写した。メンブレンを抗IIa型（4,000倍希釈）またはIIc型（1,000倍希釈）Na/Pi共輸送体抗体によって処置した後、二次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG（ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズインク）によって処置した。シグナルは、ECLプラスシステムを用いて検出した（ア

10

20

30

40

50

マシャム・ファルマシア・バイオテック社）（前掲Segawa H.ら）。

【0044】

なお、本実施例および以下の実施例に用いた抗体は次の通り調製された。ラットIIa型のアミノ酸残基（626～637）に対応するオリゴペプチド（CLALPAHNATRL）およびラットIIc型Na/Pi共輸送体のアミノ酸残基（590～601）に対応するオリゴペプチド（CYENPQVIASQQL）を合成した。N-末端のシステイン残基は、キーホールリンペットヘモシアニンとの結合によって導入した。ウサギの抗ペプチド抗体は既に記述されているとおりに産生した（前掲Segawa H.ら）。産生された抗体をアフィニティ精製して用いた。

【0045】

FGF23（R176Q）処置Pi枯渇ラットにおけるIIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体の発現レベルはそれぞれ、偽注射対照の55%および20%に減少した（図4bおよびc）。一方、I型Na/Pi共輸送体の発現量は変化しなかった（図4a）。このことからFGF23は、II型Na/Pi共輸送体の発現に特異的に作用することが示された。

【0046】

さらに、上記ラットを用いて腎皮質におけるIIa型およびIIc型転写物レベルを次の通り、分析した（図5）。naked DNAを注射した動物における肝臓のトータルRNAは、ISOGEN（日本遺伝子、東京、日本）によって抽出した。各転写産物に特異的なプローブを用いてノザンプロットティングを行った。なお、ラットIIa型トランスポーターmRNAを検出するためのプローブには、sequence ac #L13257として登録されたラットIIa型トランスポーターcDNAの546-1639塩基に相当する1096 bp長の断片を用いた（配列番号：5）。ラットIIc型トランスポーターmRNAを検出するためのプローブには、sequence ac #AB077042として登録されたラットIIc型トランスポーターcDNAの82-517塩基に相当する436 bp長の断片を用いた（配列番号：6）。

【0047】

ノザンプロットティングによるシグナル強度からIIa型およびIIc型転写物の発現密度を測定したところ、それぞれ対照のラットと比較して80%および87%減少していることが判明した。

【実施例4】

【0048】

腎臓におけるIIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体の免疫組織化学分析

免疫組織化学に基づいてIIa型およびIIc型輸送体の分布および局在を分析した。ラット腎臓の免疫組織化学分析は、既に記述されている内容に軽微な変更を加えて行った（前掲Segawa H.ら）。

【0049】

免疫染色に用いる抗IIa型または抗IIc型Na/Pi共輸送体抗体を作製するために、それぞれラットIIa型のアミノ酸残基（626～637）に対応するオリゴペプチド（CLALPAHNATRL）またはラットIIc型Na/Pi共輸送体のアミノ酸残基（590～601）に対応するオリゴペプチド（CYENPQVIASQQL）を合成した。N-末端のシステイン残基は、キーホールリンペットヘモシアニンとの結合によって導入した。これらペプチドに対するウサギ抗体は既に記述されているとおりに産生した（前掲Segawa H.ら）。産生された抗体をアフィニティ精製した後、以下の解析にもちいた。

【0050】

免疫染色を行うために連続切片（5 μm）を抗IIa型（4,000倍希釈）または抗IIc型（1,000倍希釈）Na/Pi共輸送体抗体と共に4℃で一晩インキュベートした。その後、Envision（+）ウサギペルオキシダーゼ（Dako社）によって30分間処置した。免疫反応を検出するために、切片をジアミノベンジジン（0.8 mM）によって処置した。

【0051】

正常Pi食を与えたラットにおいて、IIa型およびIIc型免疫反応シグナルは、皮質中央のネフロン先端膜に検出された（データは示していない）。低Pi食を与えた後では、IIa型に対する免疫反応シグナルは、浅側および皮質中央のネフロンの近位尿細管（S1、S2、

10

20

30

40

50

およびS3)の先端膜において顕著に増加した。偽注射ラットでは、IIa型およびIIc型免疫反応性シグナルの発現は、浅側および皮質中央部ネフロンの先端膜におい影響を受けなかった(図6a、図6b、図7e、および図6f)。低Pi食を与えたラットにFGF23(R176Q)を投与すると、腎近位尿細管細胞の先端膜におけるIIa型輸送体に対する免疫反応シグナルの強度が減少した(図6cおよびd)。さらに、FGF23(R176Q)処置により、低Pi食を与えたラットにおける近位尿細管の先端膜におけるIIc型Na/Pi共輸送体の免疫反応シグナルをほぼ完全に消失させた(図7gおよびh)。

#### 【実施例5】

#### 【0052】

FGF23変異型(FGF23R179Q)投与による血清中リン及びカルシウム濃度の変化

10

体重200g前後のWistar系雄ラットを実験に用いた。ラットは恒温室の飼育室で明暗サイクルの条件下(8:00-20:00)、ステンレス製ゲージ内で個別に飼育した。表2に示すような低リン食(Pi:0.02%、Ca:0.6%)を与えた(前掲Takahashi F.ら. Biochem.J. 333:175-181, 1998.; Levi M., Lotscher M, Sorribas V., Custer M., et al: Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal Pi transporter to alterations in dietary Pi. Am J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol. 267: F900-F908, 1994.)。水は、微量元素としてカルシウム、リンを含む水道水を避け、蒸留水(distilled water)を自由摂取させた。1週間飼育後、Naked DNA注入法(TransIT In vivo Gene Delivery System TaKaRa)を用いて、FGF23変異型(FGF23R179Q)発現プラスミドあるいはMOCKプラスミドを投与した(Niwa H., Yamamura K., Miyazaki J.: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108:193-200, 1991.)。各プラスミドを10μg含むDNA Solution 12mlを調製し、ラット尾静脈より注入した。4日後にエーテル麻酔下で採血後屠殺し、直ちに腎臓及び小腸を摘出した。

20

#### 【0053】

#### 【表2】

| 飼料中濃度                           |         |       |
|---------------------------------|---------|-------|
| Ca (%)                          |         | 0.6   |
| P (%)                           |         | 0.02  |
| コーンスターチ                         | 39.7486 |       |
| 卵白カゼイン                          | 20.0000 |       |
| α化コーンスターチ                       | 13.2000 |       |
| 大豆油                             | 7.0000  |       |
| セルロースパウダー                       | 5.0000  |       |
| ミネラル混合                          | 1.5645  |       |
| ビタミン混合                          | 1.0000  |       |
| レーシスチン                          | 0.3000  |       |
| 重酒石酸コリン                         | 0.2500  |       |
| 第三ブチルヒドロキノン                     | 0.0014  |       |
| CaCO <sub>3</sub>               | 1.4984  |       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.0000  |       |
| シュクロース                          | 10.4371 |       |
|                                 |         | 100.0 |

30

AIN-93G精製飼料 改変  
AIN-93G-MIXよりCa P源除く

40

#### 【0054】

FGF23R179Q投与群及びMOCK投与群から得られた血清中のリン濃度とカルシウム濃度を、次の方法で測定した。血中リン濃度はホスファC-テストワコーKit(WAKO)を用いたp-メチルアミノフェノール還元法により測定した。また血中カルシウム濃度は、カルシウムE-テストワコーKit(WAKO)を用いたMXB(メチルキシレノールブルー)法で測定した。

#### 【0055】

血清中のリン濃度とカルシウム濃度の平均値を表3に示した。FGF23変異型投与群で血

50

清中リン濃度とカルシウム濃度は共に減少する傾向がみられた。

【0056】

【表3】

|                       | リン濃度 (mg/dl) | カルシウム濃度 (mg/dl) |
|-----------------------|--------------|-----------------|
| FGF23R179Q投与群平均 (n=6) | 4.27±0.770   | 10.99±1.512     |
| MOCK投与群平均 (n=4)       | 4.67±0.947   | 14.54±0.919     |

数値は平均値±標準偏差で示した

10

【実施例6】

【0057】

腎臓刷子縁膜小胞 (BBMV) におけるTypeIIa NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響

腎BBMVはCa<sup>2+</sup>沈殿法を用いて調製した (Kessler M., Acuto O., Storelli G, Murer M., et al: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. Biol.Biochem. 162: 156-159, 1987、Minami H., Kim J.R., Tada K., Takahashi F., et al: Inhibition of glucose absorption by phlorizin affects intestinal functions in rats. Gastroenterology 105: 692-697, 1993)。摘出した腎臓に臓器重量の30倍容のホモジネートバッファー (50mMマンニトール、2mM Tris-HCl pH7.5) を加え、ワーリングブレンダーを用いて2分間ホモジナイズした。このホモジネート液に最終濃度が10mMになるように塩化カルシウム溶液を加え、氷冷しながら15分間穏やかに攪拌した。その後5000 rpm 15分間遠心し、上清を濾過後、この濾液をさらに18000 rpm30分間遠心した。生じた沈殿にサスペンションバッファー (300 mMマンニトール、10mM Tris-HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) pH7.5) を加え懸濁し、さらにホモジナイザーでホモジナイズした後、18000 rpm 45分間遠心した。得られた沈殿を22G注射針を用いてサスペンションバッファーで懸濁し、さらに27G注射針で懸濁した後、BBMV標品とした。また、このBBMV標品は、BCA Protein Assay Kit (PIERCE)を用いてタンパク定量を行った。

20

30

【0058】

FGF23R179Q投与群及びMOCK投与群のラット腎から得たBBMVにサンプルバッファー (1M Tris-HCl pH6.8、10% SDS, グリセロール、プロモフェノールブルー、β-メルカプトエタノール) を等量混合し、95℃で5分間加熱した後、直ちに氷冷した。腎刷子縁膜小胞 (20 μg/ウェル) は、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロースメンブレンHybond-P (Amersham Pharmacia Biotech) に電氣的に転写した。5%スキムミルク/1×TBST (Tris-base, NaCl pH7.61/Tween20) を用いて、室温で1時間ブロッキングした後、抗TypeIIa NaPi共輸送担体抗体 (10,000倍希釈) と4℃で一昼夜インキュベートした。さらに、このメンブレンをHRP (Horse radish peroxidase) 標識した抗ウサギIgG抗体 (10,000倍希釈) と室温で1時間インキュベートした後、ECL+plus Kit (Amersham) を用いて1分間化学発光させ、X-Omatフィルム (Kodak) に感光させ検出した。

40

【0059】

上記ウェスタンブロット解析の結果、TypeIIaの抗体は30-40 kDaの蛋白質と反応することが示された (図8A)。この蛋白質について各群の比較検討を行った結果、FGF23R179Q投与群では、MOCK投与群と比較して約50%にまで発現が減少した (図8B)。

【実施例7】

【0060】

腎臓刷子縁膜におけるTypeIIc NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響

抗体として抗TypeIIa NaPi共輸送担体抗体ではなく抗TypeIIc NaPi共輸送担体抗体 (1,000倍希釈) を用いた点を除き、上記実施例6に示した同様の操作によりウェスタンブ

50

ット解析した。

#### 【0061】

TypeIIcの抗体は、75-80 kDaの蛋白質と反応することが示された。この蛋白質について各群の比較検討を行った結果、FGF23R179Q投与群では、ほとんど検出できない程度にまで発現が減少した（図9）。

#### 【実施例8】

#### 【0062】

腎臓刷子縁膜におけるTypeI NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響

抗体として抗TypeIIa NaPi共輸送担体抗体ではなく抗TypeI NaPi共輸送担体抗体（1,000倍希釈）を用いた点を除き、上記実施例6に示した同様の操作によりウェスタンブロット解析した。 10

#### 【0063】

TypeIの抗体は、85-90 kDaの蛋白質と反応することが示された。この蛋白質について各群の比較検討を行った結果、FGF23R179Q投与群は、MOCK投与群と比較して発現量に有意な差は観察されなかった（図10）。

#### 【実施例9】

#### 【0064】

FGF23R179Q投与による腎臓及び小腸の刷子縁膜におけるリン輸送活性の変化

FGF23R179Q投与群及びMOCK投与群のラット腎BBMVへの $^{32}\text{P}$ の輸送活性は、急速膜濾過法により測定した（前掲Katai K.らJ.Biochem. 121: 50-55, 1997、Nakagawa N., Arab N., Ghisham F.K.: Characterization of the defect in the  $\text{Na}^+$ -phosphate transporter in vitamin D-resistant hypophosphatemic mice. J.Biol.Chem. 266: 13616-13620, 1991）。BBMVは、最終的にサスペンションバッファー（300mMマンニトール、10mM Tris-HEPES pH7.5）に懸濁した。20  $\mu\text{g}$ のBBMV懸濁液と、100 mMの標識させていない $\text{H}_2\text{P}_4$ を加えた $^{32}\text{P}$ 溶液100  $\mu\text{l}$ （20  $\mu\text{Ci}$  / ml, 100 mMNaCl, 100 mM マンニトール, 20 mM Hepes / Tris pH7.5）を混合後、ニトロセルロース膜（pore size 0.45  $\mu\text{m}$ ）（ADVAVTEC）に滴下し吸引濾過した。氷冷した生理食塩水3mlで3回洗浄した後、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。なお、リン輸送活性は時間依存的に反応が進行後、飽和状態に達するので、30秒で検討を行った。 20

#### 【0065】

FGF23R179Q投与により、腎臓及び小腸でのリン輸送活性は有意に減少した（図11）（ $p < 0.05$ ） 30

#### 【実施例10】

#### 【0066】

腎臓におけるTypeIIa NaPi遺伝子発現に及ぼすFGF23R179Qの影響

FGF23R179Q投与群及びMOCK投与群のラット腎臓約0.5gの10倍容のISOGEN（WAKO社）を加え、ポリトロンを用いてホモジナイズし、22Gの注射針に通してさらに破壊した。加えたISOGEN 1mlにつき0.2mlのクロロホルムを加え、15秒程度混和し、2分間室温に静置した。12000 rpm, 10分間, 4°Cで遠心後、上清に2.5mlの2-プロパノールを加え、5分間室温に静置した。12000 rpm, 10分間, 4°Cで遠心し、生じた沈殿に75%エタノールを加え、7500 rpm, 6分間, 4°Cで遠心後、真空乾燥させた。得られた沈殿をDPC（Diethylpyrocarbonate）水250  $\mu\text{l}$ に溶解し、total RNAとした（Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987）。 40

#### 【0067】

上記精製されたtotal RNA（20  $\mu\text{g}$ ）を1.0%アガロースゲルで電気泳動した後、RNAをナイロンメンブレンフィルターHybond N<sup>+</sup>（Amersham Pharmacia Biotech）に一晩転写させた。このフィルターはRapid-hybridization buffer（Amersham pharmacia biotech）を用いて、65°Cで1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを加え、65°Cで4時間ハイブリダイズさせた。プローブ作成は、メガプラムDNAラベリングキット（Amersham 50

pharmacia biotech) を用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  存在下で合成した。鋳型として rat NaPi II a (20) 及び GAPDH cDNA を用いた。洗浄は、 $2\times\text{SSPE}$  (300mM 塩化ナトリウム, 23mM リン酸二水素ナトリウム, 2mMEDTA $\cdot$ 2Na) -0.1%SDS で1回,  $1\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS で2回,  $0.2\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS で3回,  $0.1\times\text{SSPE}$ -0.1%SDS で2回行った。1回の洗浄は室温で5分間行った。解析は、バイオイメージアナライザー Fujix BAS 2000 (富士フイルム) を使用した。

#### 【0068】

TypeIIa NaPi mRNA の発現量を検討した。TypeIIa NaPi mRNA は2.4 kb のサイズを有していた。MOCK 投与群の発現量と比較した結果、FGF23R179Q 投与群において発現の顕著な減少がみられた (図12)

#### 【実施例11】

#### 【0069】

#### 腎臓刷子縁膜における TypeIIa NaPi 共輸送担体の免疫組織化学染色解析

ラットをネブタール麻酔後 (1ml/kg) 直ちに開腹し、経心的にヘパリン 50 $\mu$ l、続いて生理食塩水 約40ml で灌流後、直ちに4%パラホルムアルデヒド溶液 約200ml で灌流固定した。灌流終了後、腎臓及び小腸を摘出し、適当な大きさに切断後、4 $^{\circ}\text{C}$  で4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬固定した。さらに固定した腎臓及び小腸を4 $^{\circ}\text{C}$  で20%シュクロース  $1\times\text{PBS}$  に一晩浸漬した後、-80 $^{\circ}\text{C}$  で OCT-Compound (SAKURA) に凍結包埋した。凍結切片は、クライオスタットで5 $\mu$ m 厚にスライスし、あらかじめシランコートしたスライドガラスにのせた。1mM クエン酸1水和物 (pH 6.0) でマイクロウェーブ処理し、抗原不活化反応を行った。次に5% goat serum / 0.05M TBST (Tris-base, NaCl pH7.61 / Tween20) を用い2時間室温にてブロッキングした後、抗ラット TypeIIa ナトリウム依存性リン酸トランスポーター抗体または TypeIIc ナトリウム依存性リン酸トランスポーター抗体と4 $^{\circ}\text{C}$  で一昼夜インキュベートした。二次抗体として Envision (+) rabbit peroxidase (Dako) を用いて30分間反応させた。その後、発色液 (DAB/PBS) と室温で5-10分インキュベートして発色させ、70% (1分)、80% (1分)、100% (1分) エタノール、キシレン (1分 $\times$ 3) で脱水し、マウントクイック (大通産業) を用いて封入した。

#### 【0070】

上記 TypeIIa NaPi 共輸送担体の特異抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、MOCK 投与群において、低リン食摂取により腎近位尿細管刷子縁膜における発現は明瞭に観察された。これらの発現は、FGF23R179Q 投与群において著しく減少した (図13)。

#### 【実施例12】

#### 【0071】

#### 腎臓刷子縁膜における TypeIIc NaPi 共輸送担体免疫組織化学染色解析

抗体として TypeIIc NaPi 共輸送担体の特異抗体を用いた点を除き、実施例11と同様の方法により免疫組織化学染色解析を実施した。TypeIIc NaPi 共輸送担体に対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、TypeIIc NaPi 共輸送担体の発現は、低リン食摂取により著しく増大した。MOCK 投与群と比較して FGF23R179Q 投与群では、腎刷子縁膜における発現は著しく低下した。特に表層部の減少は顕著であり、深部に若干の発現がみられる程度であった (図14)。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0072】

上記発明により明らかにされた II 型 Na/Pi 共輸送体の発現を調節する因子、具体的には FGF23 は、腎臓での Pi 再吸収を調節 (とりわけ抑制) することから、高リン酸血症や、高リン酸血症が起因する疾患 (腎疾患) の予防、治療薬として利用することができる。また、この FGF23 またはその変異体をコードした DNA、ベクターは、高リン酸血症や、高リン酸血症が起因する疾患 (腎疾患) の遺伝子治療薬として利用することができる。さらに、本発明の FGF23 あるいはその変異体と相互作用し得るスクリーニング法は、FGF23 等を介して II 型 Na/Pi 共輸送体の発現を調節し、さらには血中のリン濃度を調節するための医薬品を探索する方法として利用することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50



## 【0073】

【図1】ヒトFGF23 naked DNA等が導入されたPi枯渇ラット由来の肝臓におけるFGF23等の発現量を示すグラフである。n=4、値は平均値±SEである、 $p<0.01^{**}$ 。

【図2】低Pi食を与えたラットから単離した腎BBMVにおけるナトリウム依存的Pi輸送体活性を放射標識Piの取込みに基づいて測定した結果を示すグラフである。(a)ラット腎臓におけるNa/Pi共輸送体活性に及ぼす低Pi食の影響を示す。データはnmol/mg蛋白質/分で表す。(b)I型、IIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体のウェスタンブロッティング分析結果を示す。LP：低Pi食、CP：対照Pi食。

【図3】pCGF23 (FGF23野生型)、pCGFM2 (FGF23 R176Q変異体) または空プラスミド (Mock) 導入ラットの腎BBMVにおけるナトリウム依存性Pi輸送体活性を放射標識Piの取込みに基づいて測定した結果を示すグラフである。データは平均値±SEとして表す、n=4、 $p<0.05^{*}$ 。(a)BBMVsにおける1分でのPi輸送体活性、(b)BBMVsにおけるPi輸送体活性の時間経過。

【図4】FGF23 (R176Q) 処置Pi枯渇ラットにおけるI型、IIa型およびIIc型Na/Pi共輸送体の発現レベルをウェスタンブロッティング解析により測定した結果を示す。上のパネルは、ウェスタンブロッティングによる分析結果を示し、下のパネルは、BBMVsにおけるI型、IIa型およびIIc型輸送体蛋白質の相対強度を示す。(a)I型、(b)IIa型、および(c)IIc型Na/Pi共輸送体。Mock：偽注射対照。二つの独立した実験 (n=4) を行って、データをそれぞれのパネルに示す。データは平均値±SEとして表し、n=4、 $p<0.01^{**}$ 、 $p<0.05^{*}$ 。

【図5】腎皮質におけるIIa型およびIIc型輸送体遺伝子の転写レベルをノーザンブロッティングにより分析した結果を示す。ポリ(A)+RNA 3μgを各レーンにローディングした(左のパネル)。IIa型およびIIc型転写物の相対強度は右のパネルに表す。データは平均値±SE (n=4) を表す。GAPDHは、内部対照として用いた。

【図6】ラット腎近位尿細管細胞におけるIIa型Na/Pi共輸送体の免疫組織化学分析結果を示す写真である。偽注射対照(aおよびb)、FGF23 (R176Q) DNA (cおよびd)。倍率：40倍(aおよびc)、100倍(bおよびd)。

【図7】ラット腎臓におけるIIc型Na/Pi共輸送体の免疫組織化学分析結果を示す写真である。偽注射対照(eおよびf)。FGF23 (R176Q) DNA (gおよびh)。倍率：40倍(eおよびg)、100倍(fおよびh)。

【図8】TypeIIa NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を調べた結果を示す。(A)：FGF23R179Q発現プラスミド投与群および偽注射対照(MOCK) 群の腎近位尿細管刷子縁膜小胞におけるTypeIIa NaPi共輸送担体蛋白質発現をウェスタンブロット解析した結果を示す。(B)：(A)におけるウェスタンブロット解析の定量グラフを示す。

MOCK：MOCK プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞、FGF23：FGF23変異型 (FGF23R179Q) 発現プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞。

【図9】TypeIIc NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を調べた結果を示す。(A)：MOCK投与群及びFGF23R179Q投与群の腎近位尿細管刷子縁膜小胞におけるTypeIIc NaPi共輸送蛋白質発現をウェスタンブロット解析した結果を示す。(B)：(A)のウェスタンブロット解析の定量グラフを示す。MOCK：MOCK プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞、FGF23：FGF23変異型 (FGF23R179Q) 発現プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞。

【図10】TypeI NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を解析した結果を示す。(A)：MOCK投与群及びFGF23R179Q投与群の腎近位尿細管刷子縁膜小胞におけるTypeI NaPi共輸送蛋白質発現をウェスタンブロット解析した結果を示す。(B)：(A)のTypeI NaPi共輸送担体ウェスタンブロット解析の定量グラフを示す。MOCK：MOCK プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞、FGF23：FGF23変異型 (FGF23R179Q) 発現プラスミド投与群腎臓刷子縁膜小胞。

【図11】FGF23R179Q投与による(A)腎臓及び(B)小腸刷子縁膜小胞を用いたリン輸送活性を示すグラフである。MOCK：MOCK プラスミド投与群腎臓及び小腸刷子縁膜小胞、FGF23：FGF23変異型 (FGF23R179Q) 発現プラスミド投与群腎臓及び小腸刷子縁膜小胞。

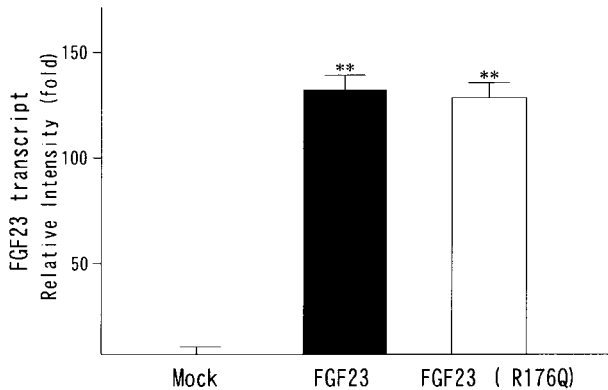
【図 1 2】腎臓におけるTypeIIa NaPi遺伝子発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を解析した結果を示す。(A) : TypeIIa NaPi共輸送担体ノーザンブロット解析結果を示し、(B) : (A) におけるTypeIIa NaPi共輸送担体ノーザンブロット解析の定量グラフを示す。MOCK : MOCK プラスミド投与群腎臓 total RNA、FGF23 : FGF23変異型 (FGF23R179Q) 発現プラスミド投与群腎臓 total RNA。

【図 1 3】TypeIIa NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を解析した結果を示す。(A) : MOCK投与群腎臓における免疫組織化学染色解析結果であり、腎臓刷子縁膜が明瞭に染まっていることが示されている。(B) : FGF23R179Q投与群腎臓における免疫組織化学染色解析結果であり、腎臓刷子縁膜が全体的に染まっているが、(A)と比較して薄いことがわかる。

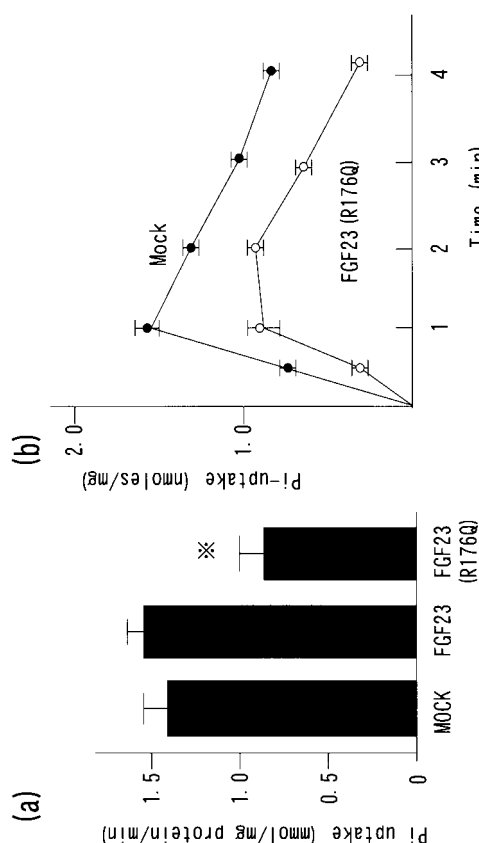
10

【図 1 4】TypeIIc NaPi共輸送担体蛋白質発現に及ぼすFGF23R179Qの影響を解析した結果を示す。(A) : MOCK投与群腎臓における免疫組織化学染色解析結果を示し、腎臓刷子縁膜が全体的に染まっていることが示されている。(B) : FGF23R179Q投与群腎臓における免疫組織化学染色解析結果を示し、(A)と比較して全体的に顕著に減少していることがわかる。

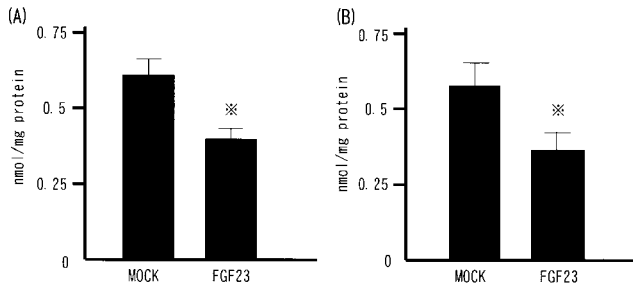
【図 1】



【図 3】

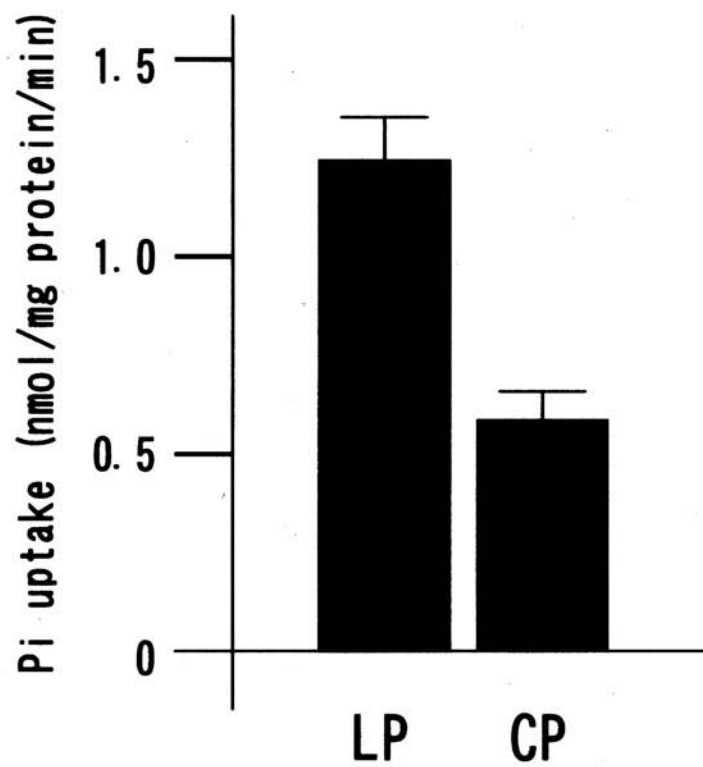


【図 1】

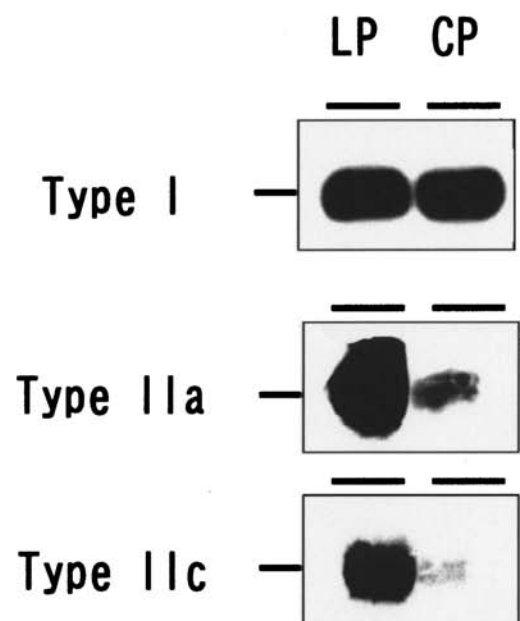


【図 2】

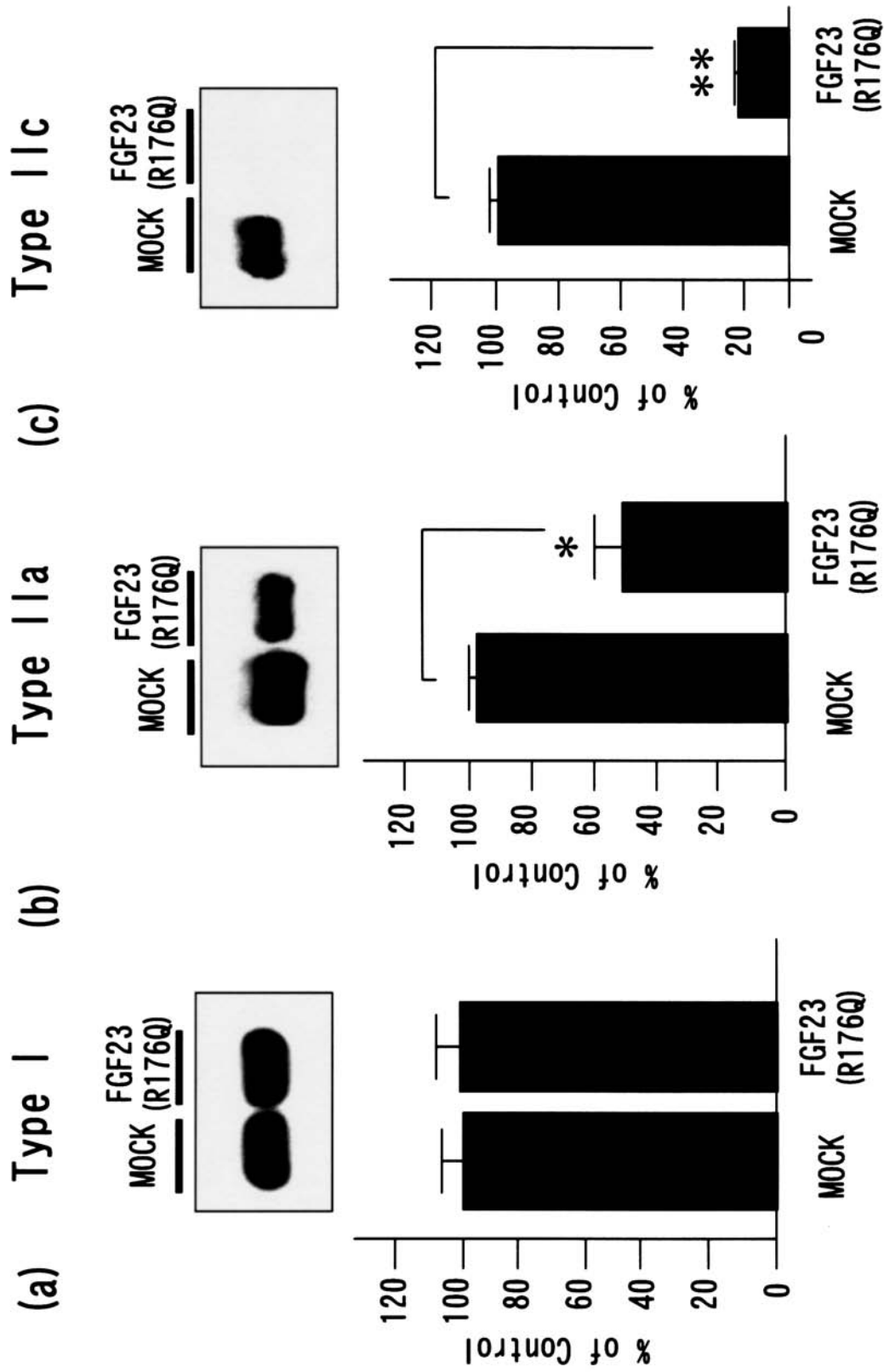
(a)



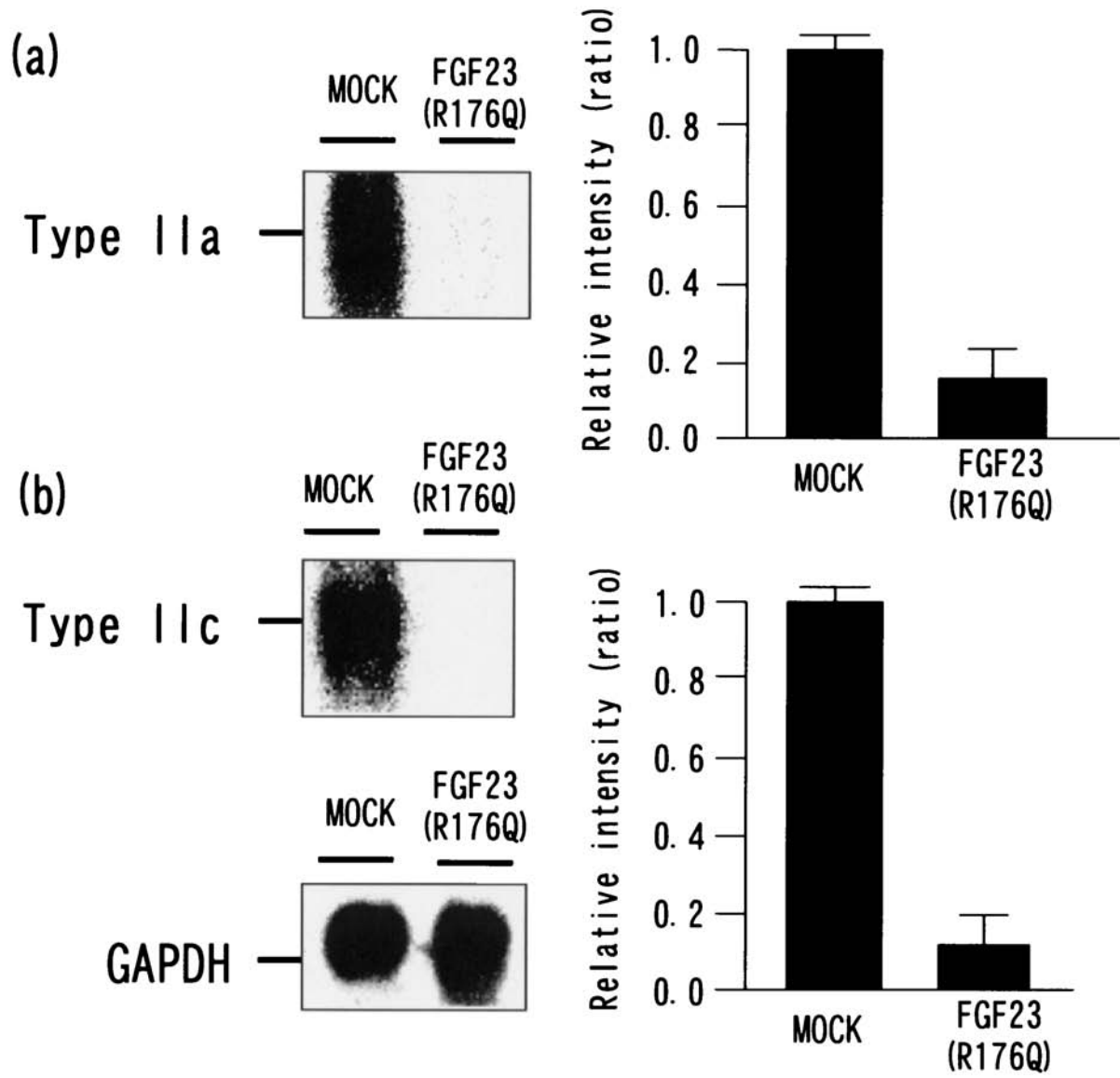
(b)



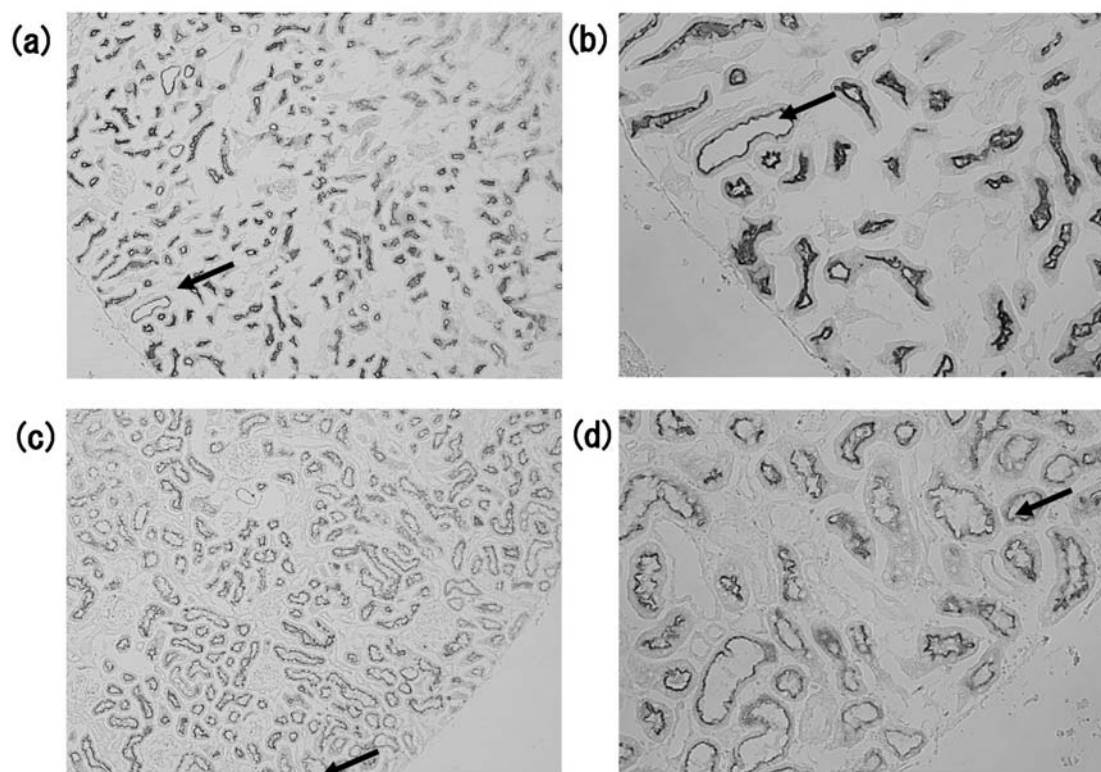
【図 4】



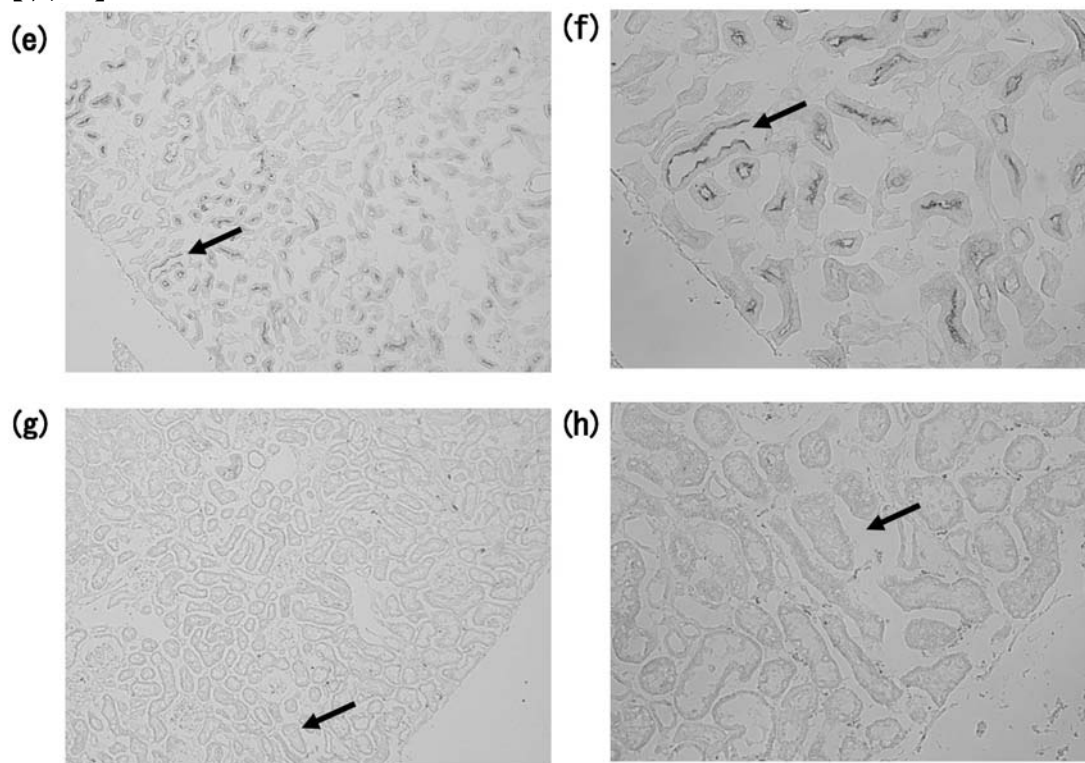
【 図 5 】



【図 6】

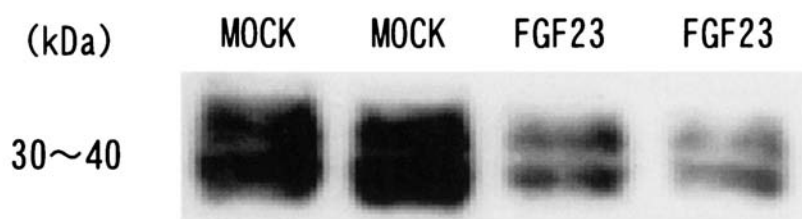


【図 7】

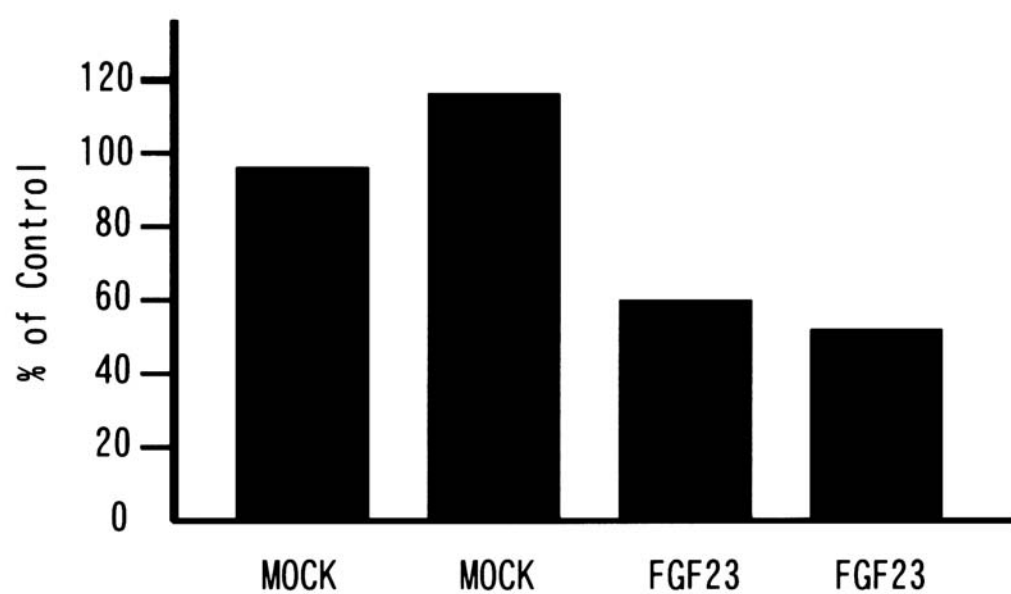


【図 8】

(A)

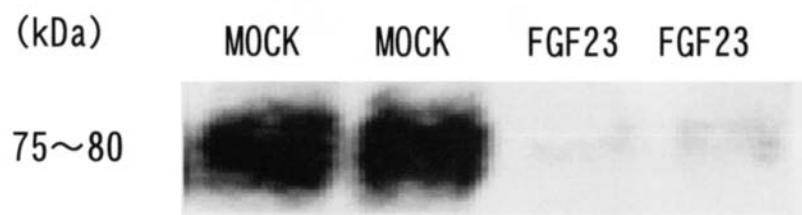


(B)

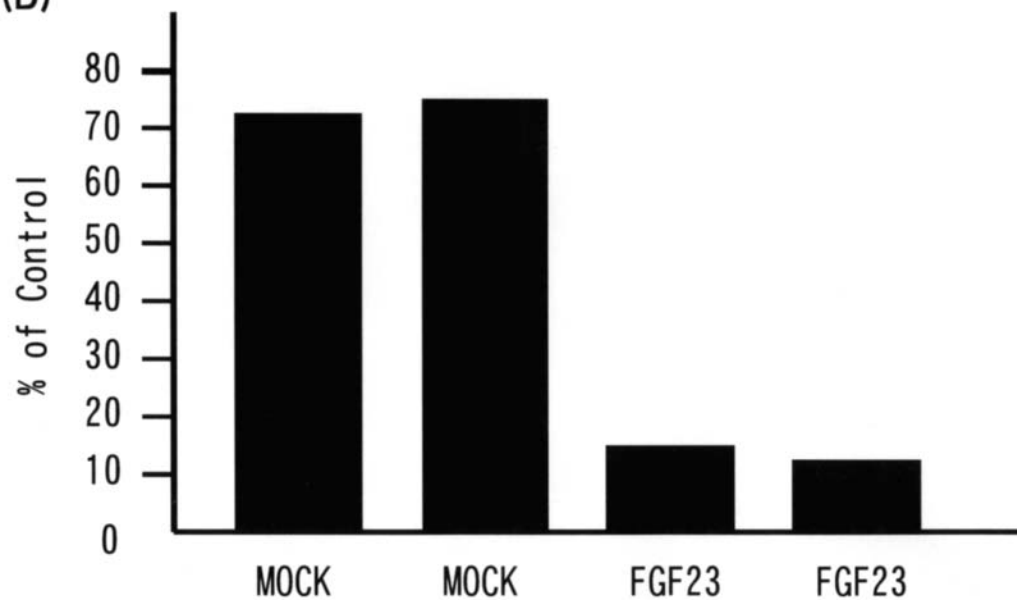


【図 9】

(A)



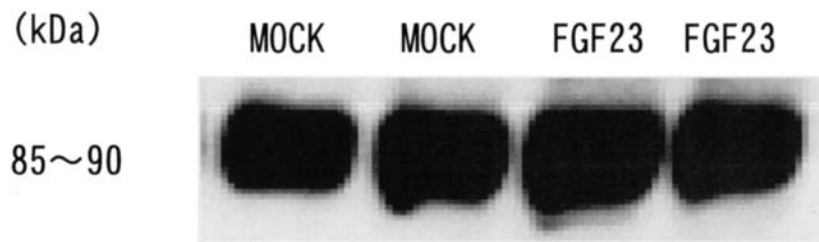
(B)



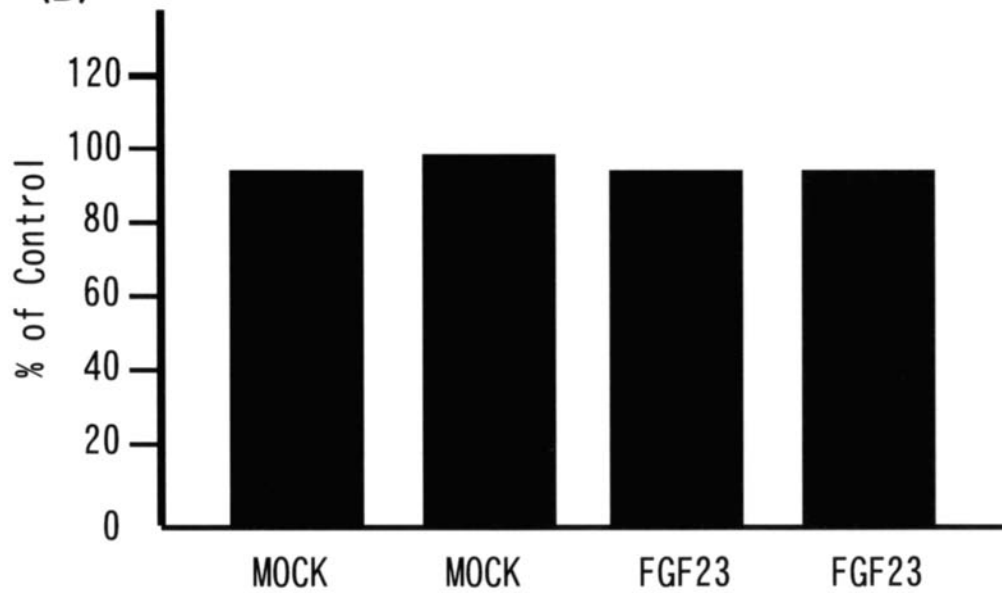


【図 10】

(A)

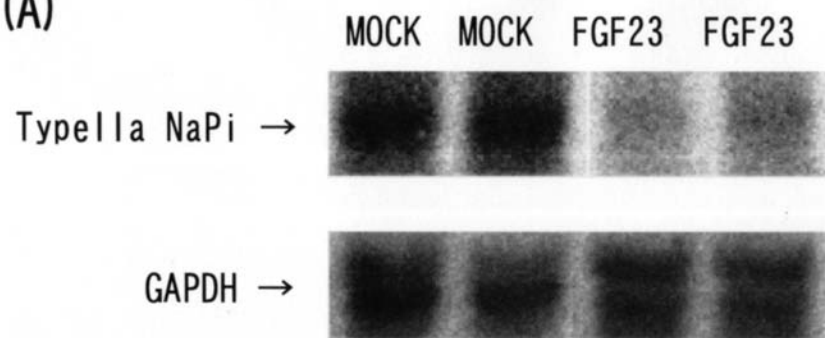


(B)

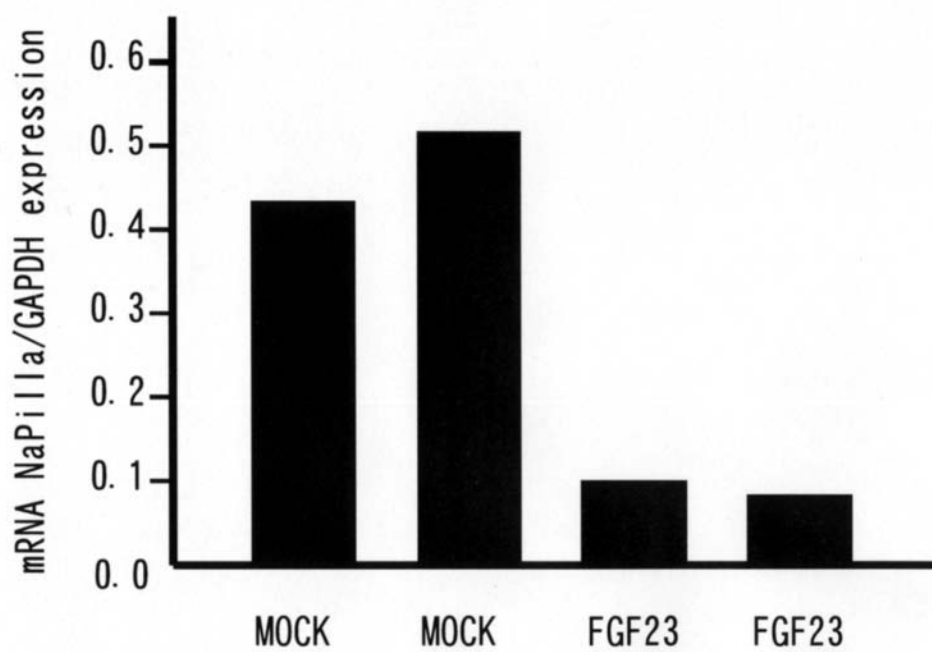


【図 1 2】

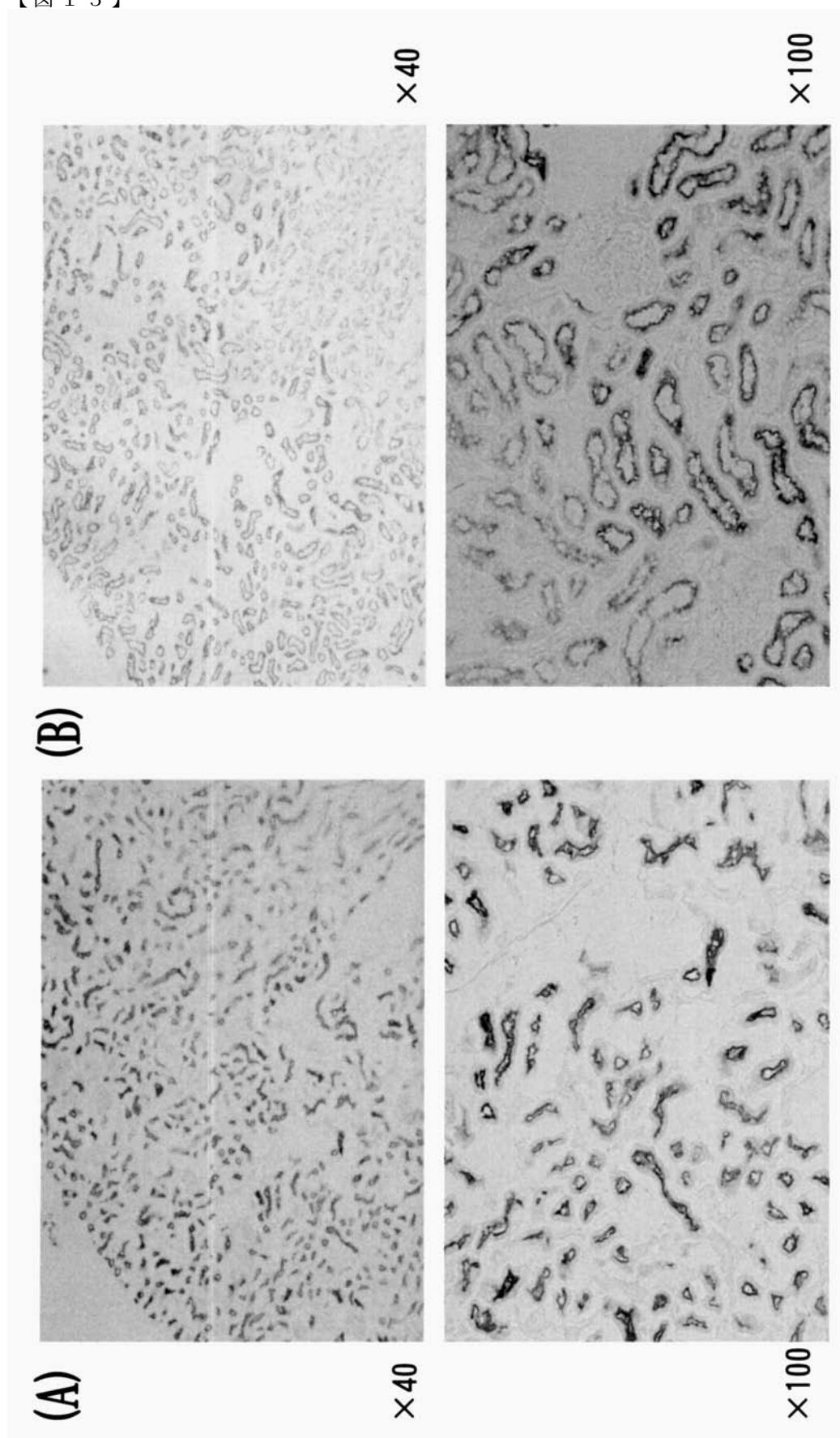
(A)



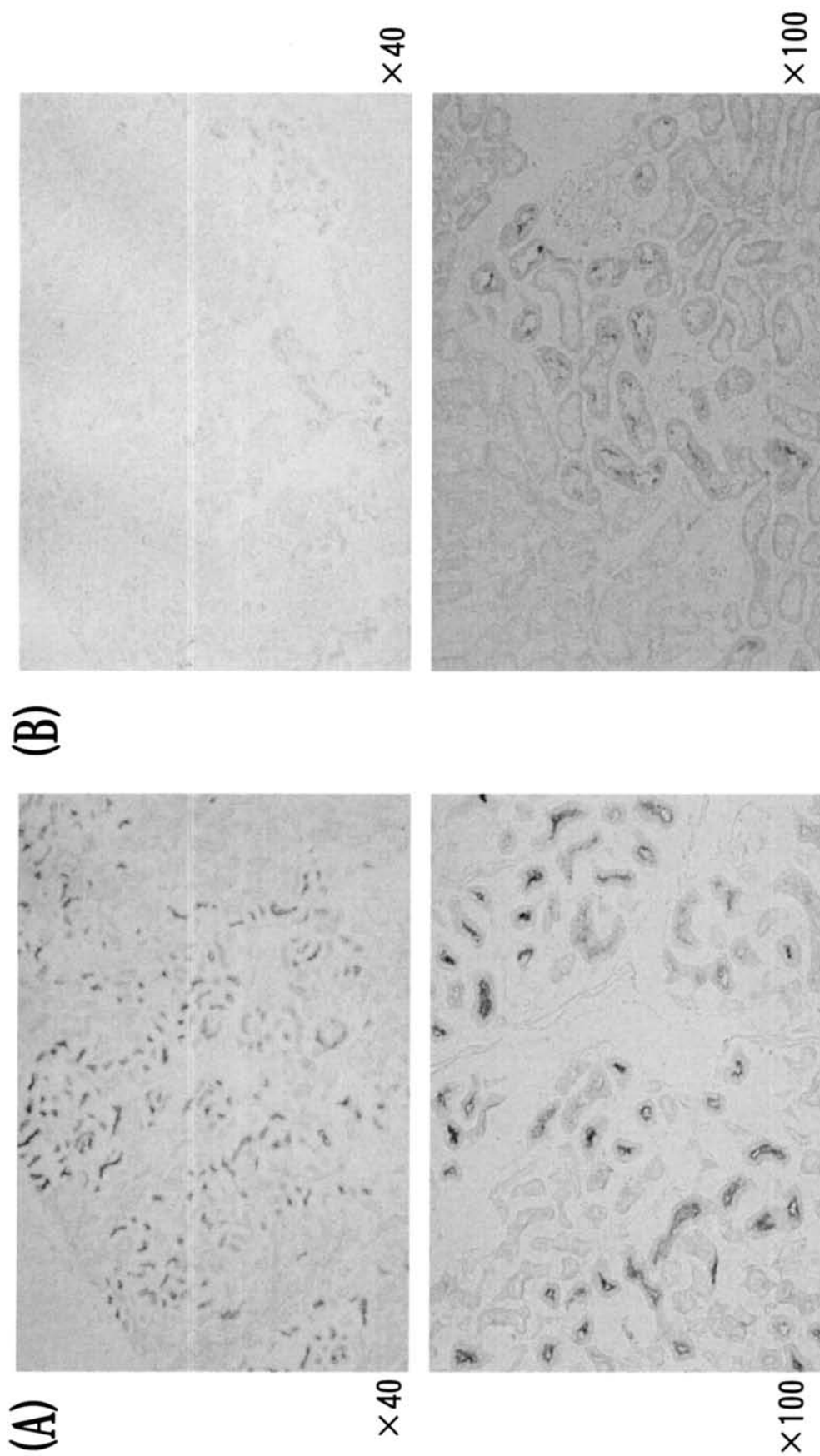
(B)



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

2004201691000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 P 3/10             | A 6 1 P 5/14   |             |
| A 6 1 P 5/14             | A 6 1 P 7/00   |             |
| A 6 1 P 7/00             | A 6 1 P 13/12  |             |
| A 6 1 P 13/12            | A 6 1 P 19/02  |             |
| A 6 1 P 19/02            | A 6 1 P 19/08  |             |
| A 6 1 P 19/08            | A 6 1 P 21/00  |             |
| A 6 1 P 21/00            | A 6 1 P 25/32  |             |
| A 6 1 P 25/32            | A 6 1 P 31/04  |             |
| A 6 1 P 31/04            | A 6 1 P 35/00  |             |
| A 6 1 P 35/00            | A 6 1 P 43/00  | 1 1 1       |
| A 6 1 P 43/00            | C 0 7 K 14/52  |             |
| C 0 7 K 14/52            | G 0 1 N 33/15  | Z           |
| G 0 1 N 33/15            | G 0 1 N 33/50  | Z           |
| G 0 1 N 33/50            | G 0 1 N 33/53  | D           |
| G 0 1 N 33/53            | G 0 1 N 33/53  | M           |
| G 0 1 N 33/566           | G 0 1 N 33/566 |             |
|                          | A 6 1 K 37/02  |             |

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA02 CA04 HA14 HA17  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA35 MA01 MA17 MA22 MA23  
 MA35 MA37 MA38 MA52 MA55 MA66 NA14 ZA512 ZA812 ZA942  
 ZA962 ZB262 ZB322 ZC062 ZC212 ZC352  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA17 MA22 MA23 MA35  
 MA37 MA38 MA52 MA55 MA66 NA14 ZA51 ZA81 ZA94 ZA96  
 ZB26 ZB32 ZC06 ZC21 ZC35  
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA01 EA23 EA50