

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年6月28日(28.06.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/086809 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079927
- (22) 国際出願日: 2011年12月22日(22.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-287953 2010年12月24日(24.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).

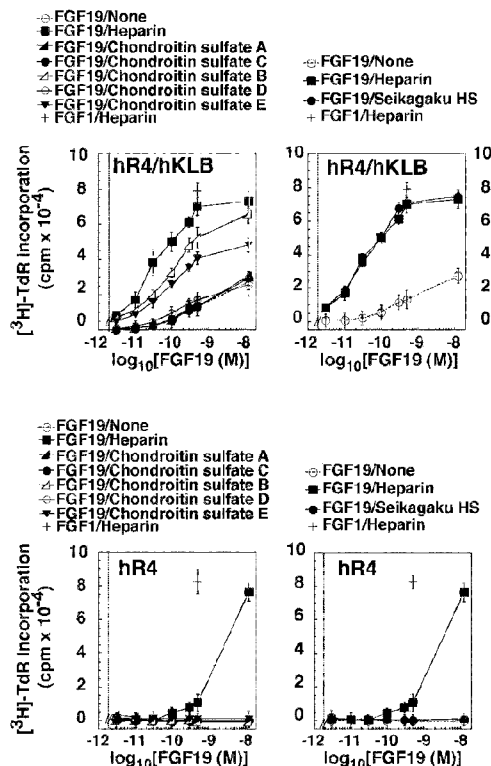
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 鈴木 理(SUZUKI Masashi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 今村 亨(IMAMURA Toru) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 中村 真男(NAKAMURA Masao) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 浅田 眞弘(ASADA Masahiro) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 倉持 明子(KURAMOCHI Akiko) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 本田 絵美(HONDA Emi) [JP/JP]; 〒3058566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 上原 ゆり子(UEHARA Yuriko) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: ACCURATE AND HIGHLY SENSITIVE METHOD FOR MEASURING ACTIVITY OF HUMAN FGF19 AND AGENT FOR REGULATING ACTIVITY OF HUMAN FGF19

(54) 発明の名称: ヒト FGF19 活性の正確で高感度な測定方法ならびにヒト FGF19 活性の制御剤

[図3]



(57) Abstract: Provided is a method for accurately measuring the activity of human FGF19 through human FGFR in an in vivo human environment. Also provided are a screening method for a human FGF19-like substance or a substance which selectively enhances or suppresses only the activity of human FGF19 to activate human FGFR4 in the coexistence of human beta-Klotho, a kit therefor, and an agent for selectively enhancing or suppressing the activity of human FGF19 to activate human FGFR4 in the coexistence of human beta-Klotho.

(57) 要約: ヒト生体内環境下でのヒト FGFR を介したヒト FGF19 活性を正確に測定する方法を提供し、ヒト FGF19 によるヒト betaKlotho の共存下でのヒト FGFR4 への活性化作用のみを選択的に増強もしくは抑制する物質又はヒト FGF19 様物質のスクリーニング方法、及びキットと共に、ヒト FGF19 のヒト betaKlotho の共存下でのヒト FGFR4 活性化作用の選択的増強剤又は抑制剤を提供する。



〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央
第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内
Ibaraki (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

ヒトFGF19活性の正確で高感度な測定方法ならびにヒトFGF19活性の制御剤 技術分野

[0001] 本発明は、ヒトFGF19の発揮する生物活性を正確で高感度に測定する方法、この方法を利用した、ヒトFGF19によるヒトbetaKlothoが存在したときのみの選択的なヒトFGF受容体4（FGFR4）活性化作用を増強もしくは抑制する物質又はヒトFGF19様物質のスクリーニング方法及びキット、並びにこの方法により得られたヒトFGF19活性の選択的な制御剤に関する。

背景技術

[0002] ヒトFGF19は、ヒトの体内で合成される内分泌因子である。マウスへの投与実験から胆汁酸の合成や血糖の調節などメタボリズムを調節する重要な因子であると考えられ、その活性を利用、増強、阻害することは、メタボリズムに関わる様々な疾病の治療に有用と考えられてきた。このため、ヒトFGF19の活性を利用、増強、阻害することを目指した創薬・治療方法の開発が活発に行われている。

その際、ヒトFGF19の研究開発のツールとしては、医学薬学研究に於いてヒトの疾患のモデルとして最も多用され、研究ツールの充実した実験動物のマウスが利用されている。

マウスにおいては、ヒトFGF19と生理的に同等な機能を有し、染色体上も対応する位置に、ortholog遺伝子が存在するが、この遺伝子には研究歴史上の理由により、Fgf15という名称が与えられている（すなわち、ヒトにはFGF15が存在せず、マウスにはFGF19が存在しない）（非特許文献1）。そこで、実験動物マウスにヒトFGF19を投与したり（非特許文献9，22，23）、FGF19の遺伝子を発現させたり（非特許文献8，11）することによって、その効果を解析している。また、マウスの体内でFgf15遺伝子からFGF15タンパク質が生理的に作り出されることを阻害することによって、ヒトにおけるFGF19の

生理活性を解析または推定しており（非特許文献4）、細胞レベルでも、マウスやラットなどヒト以外の動物由来の培養細胞に対してヒトFGF19を与えた場合の反応（非特許文献22, 25）やヒト細胞にマウス由来の補助受容体を発現させた場合の反応（非特許文献21）を解析している。

通常、ヒトとマウスの間でortholog分子の生理機能を研究する場合には、種の違いはあまり問題にならないことが多かった。このため、現段階においても、ヒトFGF19の多くの研究に於いて、種の違いを意識した研究は行われていない。本発明者らも以前、ヒトFGF19のFGFR4に選択的な活性化方法及び抑制方法を開発してきたが、その際に用いたFGFR/betaKlotho発現系としては、マウスbetaKlothoと共にマウス由来のFGF受容体を発現させた細胞系であり、当該細胞系に対してヒトFGF19を添加する実験を行った（特許文献6）。このように、ヒトFGF19が、ヒトの各種FGF受容体それぞれに対して、どのような環境下でどのような生物作用を及ぼすかは、厳密には確認されたことがなかった。

また、ヒトFGF19の多くの研究に於いて、ヒトFGF19活性というとき、培養細胞に与えるヒトFGF19の濃度としては10nM程度以上の濃度で測定されており（非特許文献22）、また、実験動物個体に投与する場合には、50nM程度の濃度で効果を解析されている（非特許文献9）。本発明者らの上記特許文献中における0.5nMを超える濃度での測定が最低濃度であり、0.5nM以下の微量のヒトFGF19活性が測定された例はない。一方、ヒトの血液中濃度が0.03nM~0.1nM程度であり（非特許文献20, 24）、ヒトの体内各組織中のFGF19の存在量も同程度に微量であると考えられることから、ヒトFGF19が0.03nM~0.1nM程度の低濃度において発揮する生物活性も正確で高感度に測定する方法が求められていた。そして、この方法を用いて選択されたヒトFGF19活性の制御剤が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：W02003011213

特許文献2 : W0200118210

特許文献3 : 米国公開2002155543

特許文献4 : 米国公開2007248604

特許文献5 : 特開2006-158339号公報

特許文献6 : 特開2010-150232号公報

特許文献7 : 特開2008-99837号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : ItohN, OrnitzDM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet. 2004 Nov;20(11):563-9.

非特許文献2 : Yu X, White KE. FGF23 and disorders of phosphate homeostasis. Cytokine Growth Factor Rev. 2005 Apr; 16(2):221-32. Epub 2005 Feb 5.

非特許文献3 : Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, MehrbodF, Jaskunas SR, Shanafelt AB. FGF-21 as a novel metabolic regulator. J Clin Invest. 2005 Jun; 115(6):1627-35. Epub 2005 May 2.

非特許文献4 : Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. Cell Metab. 2005 Oct; 2(4):217-25.

非特許文献5 : Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. Trends Endocrinol Metab. 2008 Sep; 19(7):239-45. Epub 2008 Aug 7.

非特許文献6 : Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. J

Biol Chem. 2007 Sep 14; 282(37):26687-95. Epub 2007 Jul 10.

非特許文献7 : Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, Asada M, Komi-Kuramochi A, Oka S, Imamura T. betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. Mol Endocrinol. 2008 Apr; 22(4):1006-14. Epub 2008 Jan 10.

非特許文献8 : Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D, Stewart TA. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. Endocrinology. 2002 May; 143(5): 1741-7.

非特許文献9 : Fu L, John LM, Adams SH, Yu XX, Tomlinson E, Renz M, Williams PM, Soriano R, Corpuz R, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Foster J, Stephan JP, Tsai SP, Stewart TA. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. Endocrinology. 2004 Jun; 145(6):2594-603. Epub 2004 Feb 19.

非特許文献10 : Strack AM, Myers RW. Modulation of metabolic syndrome by fibroblast growth factor 19(FGF19)? Endocrinology. 2004 Jun; 145(6):259 1-3.

非特許文献11 : Nicholes K, Guillet S, Tomlinson E, Hillan K, Wright B, Frantz GD, Pham TA, Dillard-Telm L, Tsai SP, Stephan JP, Stinson J, Stewart T, French DM. A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. Am J Pathol. 2002 Jun; 160(6):2295-307.

非特許文献12 : Desnoyers LR, Pai R, Ferrando RE, Hotzel K, Le T, Ross J, Carano R, D'Souza A, Qing J, Mohtashemi I, Ashkenazi A, French DM. Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. Oncogene. 2008 Jan

3; 27(1):85-97. Epub 2007 Jun 25.

非特許文献13 : Pai R, Dunlap D, Qing J, Mohtashemi I, Hotzel K, French DM. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2008 Jul 1; 68(13):5086-95.

非特許文献14 : Jones S. Mini-review: endocrine actions of fibroblast growth factor 19. *Mol Pharm.* 2008 Jan-Feb; 5(1):42-8. Epub 2008 Jan 8.

非特許文献15 : McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C. A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1. *Development.* 1997 Sep; 124(17):3221-32.

非特許文献16 : Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 18; 1444(1):148-51.

非特許文献17 : Yu S, Zheng L, Asa SL, Ezzat S. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) mediates signaling to the prolactin but not the FGFR4 promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Sep; 283(3):E490-5.

非特許文献18 : Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev.* 2000 Nov; 98(1-2):115-9.

非特許文献19 : Ito S, Fujimori T, Furuya A, Satoh J, Nabeshima Y, Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaklotho. *J Clin Invest.* 2005 Aug; 115(8):2202-8.

非特許文献20 : Walters JR, Tasleem AM, Omer OS, Brydon WG, Dew T, le

Roux CW, Walters JR, Tasleem AM, Omer OS, Brydon WG, Dew T, Le Roux CW. A new mechanism for bile acid diarrhea: defective feedback inhibition of bile acid biosynthesis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov ; 7(11):1189-94. Epub 2009 May 6.

非特許文献21 : Luo Y, Yang C, Lu W, Xie R, Jin C, Huang P, Wang F, McKeel an WL. Metabolic regulator betaKlotho interacts with fibroblast growth factor receptor 4(FGFR4) to induce apoptosis and inhibit tumor cell proliferation. *J Biol Chem*. 2010 Sep 24; 285(39):30069-78. Epub 2010 Jul 23.

非特許文献22 : Wu X, Ge H, Lemon B, Weizmann J, Gupte J, Hawkins N, Li X, Tang J, Lindberg R, Li Y. Selective activation of FGFR4 by an FGF19 variant does not improve glucose metabolism in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25; 106(34):14379-84. Epub 2009 Aug 12.

非特許文献23 : Tomiyama K, Maeda R, Urakawa I, Yamazaki Y, Tanaka T, Ito S, Nabeshima Y, Tomita T, Odori S, Hosoda K, Nakao K, Imura A, Nabeshima Y. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26; 107(4):1666-71. Epub 2010 Jan 8.

非特許文献24 : Lundasen T, Galman C, Angelin B, Rudling M. Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med*. 2006 Dec; 260(6):530-6.

非特許文献25 : Wu X, Ge H, Lemon B, Vonderfecht S, Weizmann J, Hecht R, Gupte J, Hager T, Wang Z, Lindberg R, Li Y. FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *J Biol Chem*. 2010 Feb 19; 285(8):5165-70. Epub 2009 Dec 15.

非特許文献26 : Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009 Oct; 50(10):1955-66. Epub 2009 Apr 3. Review.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明者らは、最近、これまで多くの研究でヒトFGF19の生物活性として報告されてきた生物活性が、実際にヒトの体内でヒトFGF19が発揮する活性とは異なることを強く示唆する結果を得た。このことは、従来ヒトFGF19の活性を利用、増強、阻害することを目指した創薬・治療方法の開発において広く用いられてきたヒトFGF19活性の測定法、評価法に問題があったことが強く示唆される。本発明は、ヒトFGF19がヒトの体内で発揮する生物活性を正確で高感度に測定する方法を確立することを課題とするものである。

また当該測定法を用いて、ヒトFGF19の特定のヒトFGFRへの活性化作用のみを選択的に増強又は抑制する物質、及び本来のヒトFGF19と同様の活性を示すヒトFGF19様物質を検索するための手法を確立しようとするものである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、従来ヒト生体内でのヒトFGF19活性に起因する現象を解析するための研究ツールとしてマウスの系を用いていたことに疑問を抱いた。マウスにおいてもヒト細胞が有するヒトFGF19の受容システム（ヒトFGF受容体とヒトbetaKlothoの補助受容体）に関わる全てのortholog遺伝子が存在している。そのため、他のヒトFGFの生体内でのモデル実験結果と同様に、ヒトFGF19活性に関しても、マウス細胞が有する受容システム（マウスFGF受容体とマウスbetaKlothoの補助受容体）を用いた解析、又はスクリーニングの系が十分にモデル実験ツールとして機能することに関しては、当該分野の研究者は本発明者らも含め従来は誰も疑ってこなかったことである。

本発明者らは、ヒトFGF19とヒトFGF受容体との結合には、ヒトbetaKlothoの補助受容体が必須であり、ortholog遺伝子とはいえ、マウスFGF15とヒトFGF19とはアミノ酸配列に違いがあることから明らかに立体構造的なゆがみを有する可能性は高く、マウスbetaKlothoを介したマウスFGF受容体という2種類のタンパク質が形成する受容システムとの結合状態にもずれが生じる可能性に思い至った。

そこで、先に特許文献6で開発した、BaF細胞を用いたFGF受容体及びbetaKlothoの発現系の作製方法を、ヒトFGF受容体及びヒトbetaKlotho遺伝子に対して適応して、各種ヒトFGF受容体及びヒトbetaKlothoを発現する形質転換BaF細胞の系を構築した。当該ヒトFGF19受容システムを用いた実験によると、驚くべきことに、従来のマウス受容システムによるヒトFGF19の生理活性解析結果とは著しく異なることを見出し、従来マウス受容システムを用いて推定されていたヒトFGF19の生理活性が、実際にヒトの生体内で発揮されるヒトFGF19の活性と著しく異なることを実証した。

このことは、ヒトFGF19のヒトFGF受容体を介した活性化作用が、ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）を選択的に活性化させる作用であることを実証したことでもある。

また、当該形質転換BaF細胞系を用いることで、0.1nM以下の低濃度のヒトFGF19の活性も正確に測定することに成功した。そして、この方法を用いて選択されたヒトFGF19活性の制御剤を見出した。

以上の知見を得たことで、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は以下を包含する。

[1] ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19による選択的なヒトFGFR4の活性化作用を増強又は抑制する物質のスクリーニング方法であって、下記（1）～（8）の工程を含む方法：

（1）FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する工程、

（2）ヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、各宿主細胞に1種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する工程、

（3）ヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの1種類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を、各宿主細胞に導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する工程、

(4) 工程(2)及び工程(3)で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下でヒトFGF19を作用させる工程、

(5) 各細胞系でのヒトFGF19による、ヒトFGFR活性化作用を比較する工程、

(6) 被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGF19の活性化作用を示すことを確認する工程、

(7) 被検物質存在下でのヒトFGF19の活性化作用が被検物質非存在下の場合と比較したときに、当該活性化作用を増強又は抑制している被検物質を選択する工程、

(8) 工程(7)で選択した被検物質を、ヒトFGF19によるヒトFGFR4を介した生物活性の活性化作用のみを選択的に増強または抑制する物質であると判定する工程。

〔2〕 前記工程(7)における被検物質の存在下及び非存在下での比較が、前記工程(4)において、ヒトFGF19の培地中での濃度を0.001~0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整した系が用意されており、その各々の系でのヒトFGFR4の活性値を計測して濃度依存的な変化量を観測することで行われることを特徴とする、前記〔1〕に記載のスクリーニング方法。

〔3〕 前記スクリーニング方法が、造腫瘍性活性を有さない胆汁酸性下痢治療剤の候補物質を検索するためのものである、前記〔1〕又は〔2〕に記載のスクリーニング方法。

〔4〕 前記〔1〕~〔3〕のいずれかに記載のスクリーニング方法に用いるためのキットであって、ヒトFGF19と共に、下記(1)及び(2)の細胞系のセットを含むことを特徴とするキット；

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他のヒトFGFRが1種類ずつ発現している形質転換細胞系のセット、

(2) (1)の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

〔５〕 0.001～0.5nMの濃度のヒトFGF19水溶液を含む、前記〔４〕に記載のキット。

〔６〕 前記〔２〕に記載のスクリーニング方法により検索されたグリコサミノグリカンを有効成分とする、ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19のヒトFGF4を介した生物活性の選択的増強剤。

〔７〕 ヒトbetaKlothoが存在したときのみに選択的にヒトFGFR4を活性化するヒトFGF19様受容体活性化作用を有する物質のスクリーニング方法であって、下記（１）～（７）の工程を含む方法：

（１）FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する工程、

（２）各宿主細胞にヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、１種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する工程、

（３）各宿主細胞にヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの１種類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する工程、

（４）（２）及び（３）で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下で被検物質を作用させる工程、

（５）各細胞系でのヒトFGFR活性化作用を比較する工程、

（６）被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGFR4活性化作用を示す物質を選択する工程、

（７）（６）で選択した被検物質を、ヒトFGF19様受容体活性物質であると判定する工程。

〔８〕 前記（４）における被検物質を添加する工程において、培地中にグリコサミノグリカンを添加することを特徴とする、前記〔７〕に記載の方法。

〔９〕 前記〔７〕又は〔８〕に記載のスクリーニングのためのキットであって、下記（１）及び（２）の細胞系のセットを含むキット；

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他のヒトFGFRが1種類ずつ発現している形質転換細胞系のセット、

(2) (1)の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

〔10〕 さらに、(3)グリコサミノグリカンを含む前記〔9〕に記載のキット。

〔11〕 ヒトFGF19がヒトの体内濃度でヒトbetaKlotho存在下にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる生物活性値を正確かつ高感度に測定する方法であって、内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず外来性のヒトFGFR4とヒトbetaKlothoとを発現する細胞系を構築し、当該細胞系の培地中にグリコサミノグリカンを添加すると共に、培地中のヒトFGF19濃度が0.5nM以下となるように調整し、ヒトFGFR4の生物活性値を計測することを含む測定方法。

〔12〕 培地中のヒトFGF19濃度を0.001~0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整したそれぞれの場合のヒトFGFR4の活性値を計測し、濃度依存的な変化量を観測することを特徴とする、前記〔11〕に記載の測定方法。

〔13〕 前記〔11〕又は〔12〕に記載の測定方法に使用するためのキットであって、下記(1)~(4)を含むことを特徴とするキット；

(1) 培地中のヒトFGF19濃度を0.001~0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整するためのヒトFGF19水溶液、

(2) グリコサミノグリカン、

(3) 内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず、外来性のヒトFGFR4を発現する形質転換細胞系、

(4) (3)の細胞系にさらにヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系。

発明の効果

〔0008〕 本発明により提供されたヒトFGF受容体4(ヒトFGFR4)単独又はさらにヒトbetaKlothoを発現させた細胞系を用いることで、従来多用されていたマウス細

胞やマウス個体を用いた実験では得られないヒトFGF19の関わる生理作用の異常に起因した疾患、たとえば胆汁酸性下痢の治療用候補物質を、ヒトの系において再評価することができ、その結果真にヒトに対して有効性の高いヒトFGF19関連の医薬組成物を提供できる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]マウスbetaKlotho及びグリコサミノグリカン存在下でのヒトFGF19による各種マウスFGF受容体の活性化 (A) マウスFGFR (mFGFR1c、R2c、R3c、R4) 及びマウスbetaKlothoを発現しているBaF3細胞 (mFGFR/mbetaKlotho発現細胞) をグリコサミノグリカン (ヘパラン硫酸●、コンドロイチン硫酸B△、D▲、E□) の存在下 (終濃度5μg/ml) に種々の濃度のヒトFGF19で刺激して、チミジンの取り込み能を測定した。 (B) ヘパリン5μg/mlの存在下 (■) で (A) と同様の実験を行った。 (マウスFGFRの受容システムの場合、マウスbetaKlotho非存在下ではヒトFGF19がヘパリンを添加した場合のみmFGFR4を特異的に活性化させる点、及びマウスbetaKlotho存在下でヘパリンを添加するとヒトFGF19が非特異的に全てのmFGFRを活性化する場合のみヒトFGFRの受容システムと共通する。しかし、マウスFGFRの受容システムでのマウスbetaKlotho存在下において大きな相違があり、ヘパリンを添加した際の特異的な活性化を除きヒトFGF19はマウスFGFR4を活性化させることはできず、グリコサミノグリカンを添加した場合にはむしろマウスFGFR2及マウスFGFR3を活性化する場合もある。)

[図2]ヒトbetaKlotho及びグリコサミノグリカン存在下でのヒトFGF19による各種ヒトFGF受容体の活性化 (A) ヒトFGFR (ヒトFGFR1c、R2c、R3c、R4) を発現しているBaF3細胞にヒトbetaKlothoの発現ベクターを導入し、各ヒトFGFR/ヒトbetaKlotho発現細胞をグリコサミノグリカン (ヘパラン硫酸●、コンドロイチン硫酸B△、D▲、E□) の存在下 (終濃度5μg/ml) に種々の濃度のヒトFGF19で刺激して、チミジンの取り込み能を測定した。○はコントロール (グリコサミノグリカン無添加)。(ヒトFGF19は、ヒトbetaKlotho存在下では、ヒトFGFR4を特異的に活性化させ、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫

酸B及びEはその際のヒトFGF19の活性化作用を増強する。ヒトbetaKlotho非存在下では、グリコサミノグリカンを追加してもいずれのヒトFGFRも活性化させることができない。) (B)ヘパリン5 μ g/mlの存在下(■)で(B)と同様の実験を行った。(ヘパリンを追加した場合には、ヒトbetaKlotho非存在下ではヒトFGFR4を特異的に活性化させてしまうが、ヒトbetaKlotho存在下では、全てのヒトFGFRを活性化させる。)

[図3]低用量(0.5nM以下)のヒトFGF19がヒトFGFR4を特異的に活性化させる際のグリコサミノグリカン添加量が及ぼす影響 微量のヒトFGF19がヒトbetaKlotho存在下又は非存在下でヒトFGFR4を活性化させる際のグリコサミノグリカンの添加量が活性化に及ぼす影響。(ヒトFGF19の添加量が0.5nM以下、特に1pM~0.1nMの場合に、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸B及びEと共に、ヘパリンがヒトbetaKlotho存在下でのヒトFGFR4活性化作用を用量依存的に増強する。ヒトFGF19が0.5nM以下では、ヒトbetaKlotho非存在下でのヒトFGFR4への活性化作用はヘパリンを含め、いずれのグリコサミノグリカンも有さない。)

[図4]低用量(0.5nM以下)のヒトFGF19がヒトFGFR4を特異的に活性化させる際のウシ肝臓由来のグリコサミノグリカン添加が及ぼす影響 ヒトFGFR4/ヒトbetaKlotho発現BaF3細胞を、肝臓由来グリコサミノグリカン(●)の存在下(終濃度5 μ g/ml)に種々の濃度のヒトFGF19で刺激して、チミジンの取り込み能を測定した。■はヘパリン5 μ g/ml添加のポジティブコントロール、○はグリコサミノグリカン無添加のネガティブコントロール。(ウシ肝臓由来のグリコサミノグリカンは、ヒトFGF19の添加量が0.5nM以下、特に1pM~0.1nMの場合に、ヒトbetaKlotho存在下でのヒトFGFR4活性化作用をヘパリンと同程度に増強する。一方、ヒトbetaKlotho非存在下でのヒトFGFR4への活性化作用は有さない。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

[1] ヒトFGF19の作用について

1. ヒトFGF19とその胆汁酸合成抑制作用について

ヒトFGF19は、マウスFGF15をコードするDNAの塩基配列（非特許文献15）に基づいて設計されたプローブの配列を基にその相同因子として発見された物質である（非特許文献16）。ヒトFGF19はシグナル配列の22アミノ酸を含む216アミノ酸からなり、ヒトのFGF19はマウスのFGF15に相当すると考えられている。当初は脳での発現が報告された。その後Fgf15遺伝子のノックアウトマウスやFgfr4遺伝子のノックアウトマウスの解析等から、FGF15は小腸から分泌され門脈を介して肝臓に運ばれ、肝臓での胆汁酸の合成を、胆汁酸合成の律速酵素であるcholesterol 7- α hydroxylase (CYP7A1)を負に制御することが明らかとなっている。ヒトFGF19に関しても胆汁酸の類似化合物の投与により血中FGF19レベルが有意に減少することや胆汁酸を吸収するコレステラミン樹脂の処理により、血中FGF19レベルが有意に上昇すること、さらに培養ヒト肝細胞をFGF19で刺激すると用量依存的にCYP7A1の発現が抑制されることなどから、ヒトにおいてもFGF19は胆汁酸合成を調節する生理作用を有することが示されている（非特許文献26）。また、下痢の一種である慢性特発性の胆汁酸性下痢が、FGF19の欠乏によって引き起こされる可能性があるとの報告があり、多くの慢性下痢患者のQOL改善に有効な治療の開発につながると期待されている（非特許文献20）。

本発明において「ヒトFGF19のヒトFGF受容体を介した活性化作用」又は「ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19の生物活性」というとき、ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）を選択的に活性化させる作用、具体的には図2に示されるようにヒトbetaKlotho非存在下では、ヒトFGFR1～4のいずれも活性化させず、ヒトbetaKlotho存在下ではヒトFGFR4のみを活性化させる作用をいう。そうであるから、この「ヒトbetaKlotho非存在下では、ヒトFGFR1～4のいずれも活性化させず、ヒトbetaKlotho存在下ではヒトFGFR4のみを活性化させる作用」を有している物質は、ヒト生体内で「ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19の生物活性」と同様の作用を引き起こす物質であるといえるから、本発明においてはそのような特性を有する物質を「ヒ

トFGF19様物質」と呼ぶこともある。

従来、「ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19の生物活性」といわれる活性のうち、好ましい生物活性の例としては、肝細胞内でCYP7A1の発現を低下させる活性が典型的であり、胆汁酸性下痢の改善効果が期待されているが、下記4. で詳述するように、従来ヒトFGFR4を介した腫瘍誘導活性も、ヒトbetaKlotho非存在下でヒトFGF19が誘起する作用であったにもかかわらず、ヒトFGF19活性の1つに数えられていた。

しかし、本発明により、ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性が、上述のように「ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用」であることが確定できたため、ヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性というときに「腫瘍誘導活性」は含まれないと解される。したがって、ヒトFGF19様活性物質（以下、「ヒトFGF19様受容体活性物質」ともいう。）を検索すること、及びヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性を増強する物質を検索することはきわめて有用であるといえることができる。

本発明では、ヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性である「ヒトbetaKlotho存在下でヒトFGFR4のみを活性化させる作用」を測定する手法は、当該活性化作用のうち、ヒト生体にとって望ましい活性化作用を増強し、望ましくない作用のみを選択的に抑制する物質、すなわちヒトbetaKlotho存在下でのヒトFGF19によるヒトFGFR4のみを活性化させる作用の増強剤又は抑制剤を得るためのスクリーニング法に適用することができる。

上述のように、ヒトの血液中濃度は0.03nM～0.1nM程度であり（非特許文献20, 24）、ヒトの体内各組織中のFGF19濃度の存在量も同程度に微量であると考えられる。したがって、本発明において、ヒトの生体内の環境下でのヒトFGF19活性、ヒトFGF19が生体内で発揮する生物活性、などというときのヒトFGF19濃度は、0.5nM以下、好ましくは1pM～0.3nM、さらに好ましくは1pM～0.1nM、最も好ましくは0.03nM～0.1nMの濃度を指す。本発明におけるヒトFGF19活性の測定方法は、ヒトFGF19が0.03nM～0.1nM程度の低濃度の場合に発揮する生物活性も正確で高感度に測定することができる。

本発明におけるヒトFGF19としては、ヒト由来の天然FGF19（例えば、GenBankアクセッション番号：NM_005117参照）が好ましいが、これに限られるものでなく、組換えFGF19であってもよく、さらに上記ヒトFGF19活性を有していれば、そのアミノ酸配列の一部が改変されたものであってもよい。組換えヒトFGF19を作製するためには、大腸菌や哺乳動物細胞などの通常の形質転換宿主／ベクター系を適宜用いることができる。

[0011] 2. FGF受容体について

FGF受容体(FGFR)は細胞表面に存在する膜一回貫通型のタンパク質である。哺乳動物のFGFRは高い相同性を有するortholog分子であり、一般にマウスFGFRでの知見はきわめて優れたヒトFGFRのモデルとなる。本発明において用いるFGFRはヒトFGFRであるが、以下単にFGFRというときは、ヒトFGFR及びマウスFGFR共通の知見を指す。現在、マウスと共にヒトでも、FGFR1～5の5種類が同定されている。そのうちFGFR1～4はチロシンキナーゼ型受容体であり、FGFが結合することにより二量体化・自己リン酸化により活性化される。活性化されたFGFRは細胞内のシグナリング分子と相互作用し、複数のシグナル伝達経路を活性化させる。FGFR1～3には選択的スプライシングにより主に2種類のアイソフォーム(FGFR1b、FGFR1c、FGFR2b、FGFR2c、FGFR3b、FGFR3c)が存在する。

それぞれの受容体の特異的な機能、活性は完全には解明されていないが、R1は主に間葉系、神経外胚葉の組織、R2は加えて外胚葉由来の組織での発現が報告されている。R3は骨や軟骨、中枢神経系での発現が多く見られる。R4は肝臓、筋肉、肺、膵臓等での発現が高い。R1からR3までのスプライシングフォームのうち、“c”フォームは、間葉系組織で、“b”フォームは上皮系組織でそれぞれ特異的に発現される。

本発明者らは、特許文献6においてヒトFGF19がマウスbetaKlothoの存在下マウスFGFR1c、マウスFGFRc、マウスFGFR3cを活性化することを見出している。またマウスFGF15が肝臓に作用して胆汁酸の合成を抑制する際に、betaKlothoの存在下FGFR4を介して作用することが明らかとなっている。またヒトFGFR

4を発現するマウスの解析からFGF19によるCYP7A1の発現にヒトFGFR4が必要であることが示されている。したがって、今回の具体的な実施態様として、ヒトFGF19によるヒトFGF受容体活性化作用の選択性を観察するにあたり、ヒトFGFR1c、ヒトFGFR2c、ヒトFGFR3cと、上述の通りヒトFGF19の生理作用に重要でヒトFGF19の腫瘍誘導活性と関連性が高いと考えられているヒトFGFR4を用いた。その際、各ヒトFGF受容体のリガンド結合に関与するそれぞれの細胞外部分を有しつつ、かつ細胞内キナーゼ部分によるDNA合成の活性化程度を比較しやすくするために、細胞内部分をヒトFGFR1の細胞内部分と交換・統一した上で4種類のヒトFGF受容体として用いた。なお、ヒトFGFR1c、ヒトFGFR2c、ヒトFGFR3c、ヒトFGFR4の遺伝子配列はGenBankアクセッション番号NM_015850.3 (ヒトFGFR1c)、NM_000141.3 (ヒトFGFR2c)、NM_000142.2 (ヒトFGFR3c)、NM_002011.3 (ヒトFGFR4)で入手できる。

[0012] 3. 補助受容体betaKlothoについて

ヒトFGF19が作用を発揮するためにはFGF受容体のみでは不十分で、一回膜貫通型タンパク質であるbetaKlothoが補助受容体として機能することが必要であることが報告されている（非特許文献6）。またbetaKlotho非依存的にもFGFR4を活性化しうるとの報告もある（非特許文献17）。

betaKlothoは、Klothoのホモログとしてクローニングされた物質であり（非特許文献18）、マウス由来betaKlotho遺伝子の塩基配列は例えばGenBankアクセッション番号：NM_031180に、対応するアミノ酸配列は例えばGenBankアクセッション番号：NP_112457に示され、ヒトbetaKlothoの塩基配列は例えばGenBankアクセッション番号：NM_175737に、対応するアミノ酸配列は例えばGenBankアクセッション番号：NP_783864に示される。発達中のマウス胎児の脂肪組織などで発現していることが知られており、他生物種からの遺伝子取得方法と共に、種々の改変体、変異体などの製造方法も記載されている（非特許文献18, 19、特許文献5）。

本発明の実施例では、ヒト由来のbetaKlotho遺伝子をクローニングしたcDNAの全長を用いているが、ヒトbetaKlotho活性を損なわない限り、1部分を欠

失または改変されてもよい。

[0013] 3. ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19活性の測定

一般に、各FGFは、細胞表面のFGF受容体に結合し、FGF受容体を活性化させ、細胞内での各種シグナル伝達機構を活性させることで、当該細胞に何らかの作用・機能を引き起こすことになるため、当該観察された作用・機能をFGF活性として測定することになる。

汎用的な測定法としては、Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.*, 271, 15292-15297. に記載されている細胞増殖刺激活性測定法が挙げられる。その概要は以下の通りである。表面にFGF受容体を有する培養細胞の培養液内に測定対象のFGFを加え、一定時間培養後標記チミジンを培養液中添加しさらに一定時間培養を行う。この際、各種FGF受容体の活性化の程度を相互に比較しやすくするため、FGFR1c以外のFGF受容体も、細胞内キナーゼ部分がFGFR1の細胞内キナーゼに交換・統一されたハイブリッド分子として細胞に強制発現されている。そして培養中に起こる標識チミジンの高分子DNAへの取り込みを測定することで、FGFによるDNA合成の活性化程度を評価する。本発明でも、ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19の活性を測定する際にこの手法を採用した。ヒトの生体内の環境下でヒトFGF19が生物活性を発揮する際の濃度である、0.5nM以下、例えば1pM~0.3nM、好ましくは1pM~0.1nM、さらに好ましくは0.03nM~0.1nMでのヒトFGF19活性の値も同様の手法で測定できる。

すなわち、ヒトFGF19がヒトの体内濃度でヒトbetaKlotho存在下にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる生物活性値を正確かつ高感度に測定するための具体的な測定方法は以下の通りである。

内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず外来性のヒトFGFR4とヒトbetaKlothoとを発現する細胞系を構築し、当該細胞系の培地中にグリコサミノグリカンを追加すると共に、培地中のヒトFGF19濃度が0.5nM以下（例えば1pM~0.3nM、好ましくは1pM~0.1nM、さらに好ましくは0.03nM~0.1nM）となるよ

うに調整し、ヒトFGFR4の生物活性値を計測することを含む測定方法であり、例えば、培地中のヒトFGF19濃度を0.001~0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整したそれぞれの場合のヒトFGFR4の活性値を計測し、濃度依存的な変化量を観測する。

そのためのキットとしては、下記（１）～（４）を組み合わせたセットが好ましい。

（１）培地中のヒトFGF19濃度を0.001~0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整するためのヒトFGF19水溶液。

（２）グリコサミノグリカン。

（３）内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず、外来性のヒトFGFR4を発現する形質転換細胞系。

（４）（３）の細胞系にさらにヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系。

[0014] ４．ヒトFGF19の腫瘍誘導作用について

前述のヒトFGF19発現トランスジェニックマウスでは10ヶ月程度で肝細胞癌が形成されることも報告されている（非特許文献１４）。またリコンビナント・ヒトFGF19タンパク質を投与したマウスでは肝細胞の増殖が認められている（非特許文献９）。ヒトFGFR4はヒトで大腸癌、肝癌、乳癌、膵臓癌など様々なタイプの癌において高発現がみられる。またヒトFGF19とヒトFGFR4が共に発現が見られることもある（非特許文献１２，１４）。またヒトFGFR4の発現をRNA干渉法や、抗体で抑制すると、癌の増殖が抑制されることなどから、ヒトFGF19がヒトFGFR4を活性化することで、腫瘍が誘導される可能性が考えられている（非特許文献１２，１３，１４）。最近マウスbetaKlothoがマウスFGFR4と共に発現することにより癌の増殖が抑制されることが見出されている（非特許文献２１）。

従来は、このようなヒトFGFR4を介した腫瘍誘導活性もヒトFGF19活性の１つに数えられていたが、本発明により、ヒトFGF受容体を介したヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性が、上述のように「ヒトbetaKlothoが存在する場合に

のみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用」であることが確定できたため、ヒトFGF19活性又はヒトFGF19様活性というときには、むしろ「腫瘍誘導活性」は含まれないと解される。特にヒトFGFR4を介した造腫瘍性を排除して、胆汁酸合成抑制作用のみを利用して胆汁酸性下痢等の予防あるいは治療に用いるためには、「ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用」というヒトFGF19の受容体特性を増強する制御物質、又は、選択的にヒトbetaKlothoに依存したヒトFGFR4への作用を誘発し、かつヒトbetaKlothoに依存しないヒトFGFR4への作用は誘発しないヒトFGF19様の制御物質を見出す必要がある。そして、そのような制御物質としては、特に、ヒトの生体内の環境下でヒトFGF19が生物活性を発揮する濃度範囲である、0.5nM以下、例えば1pM~0.3nM、好ましくは1pM~0.1nM、さらに好ましくは0.03nM~0.1nMで上記したような選択的な作用を有する物質であることが望ましい。

本発明において、各種グリコサミノグリカンについて検討したところ、0.5nM以下のヒトFGF19濃度条件下では、ヘパリンも含めいずれのグリコサミノグリカンもヒトbetaKlotho非存在下でのヒトFGFR4への活性化作用は無かったことから、グリコサミノグリカンを用いればヒトFGF19による造腫瘍性活性が排除できるといえる。

[0015] 先の本発明者らの出願（特許文献6）において、マウスFGF受容体とマウスbetaKlothoを用いた系ではヒトFGF19とヘパリン以外の各種グリコサミノグリカンを組み合わせ反応させたところ、コンドロイチン硫酸（特にB、およびE）を作用させた場合に、ヒトFGF19はマウスbetaKlothoの共存下マウスFGF受容体のうちマウスFGFR4は活性化せず、マウスFGFR2cのみを選択的に活性化することを見出していた。次いで、マウスbetaKlothoの共存下でヒトFGF19をヘパリン硫酸（ウシ腎臓由来）と組み合わせて作用させた場合には、マウスFGF受容体R1c、R2c、R3cは活性化するものの、マウスFGF受容体R4は全く活性化しないことを見出していた。

これに対して、本発明においてヒトFGF受容体とヒトbetaKlothoを用いた系

では、まず上記の系にさらにヘパリンを添加して観察したところ、マウスの系と同様にヒトbetaKlothoの非共存下ではヒトFGF19はヒトFGF受容体R4のみを活性化させ、ヒトbetaKlothoの共存下ではいずれのヒトFGF受容体も活性化した。しかし、ヒトFGF19と、ヘパリン以外の各種グリコサミノグリカンを組み合わせて反応させたところ、いずれのグリコサミノグリカンを組み合わせた場合でもヒトFGF19はヒトbetaKlothoの非共存下ではどのヒトFGF受容体も活性化しなかったが、驚くべきことにヒトbetaKlothoの共存下では、マウスの系とは全く異なり、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸の場合には、ヒトFGF受容体R1c、R2c、R3cは活性化せず、ヒトFGF受容体R4の活性化を増強することを見出した。

一方、ヒト体内の生理的環境に合わせ、低用量（0.5nM以下、特に1pM～0.1nM）のヒトFGF19を添加した場合について検討した結果は、ヘパリンを含めいずれのグリコサミノグリカンを組み合わせてもヒトbetaKlothoの非共存下ではヒトFGFR4を活性化せず、ヒトbetaKlothoの存在下においては、ヘパリンと共に、グリコサミノグリカンのうちで、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸のいずれかと組み合わせた場合に、ヒトFGFR4を用量依存的に活性化することを見出した。

[0016] このことは、ヒトの生体内環境下での本来のヒトFGF19濃度範囲では、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸のみならず、ヘパリンもヒトFGF19に対してヒトbetaKlotho共存下でのヒトFGFR4への活性化のみを選択的に増強する物質であるといえる。特に、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸は、ヒトFGF19濃度が高い状態となってもヒトbetaKlotho共存下でのヒトFGFR4への選択的活性化効果を保持している優れたヒトFGF19活性制御剤であることを示している。

そして、上記のような、ヒトbetaKlotho遺伝子は導入せずヒトFGFR4のみを発現する細胞系、またはヒトbetaKlotho遺伝子とヒトFGFR4を発現させた細胞系を必須とし、さらに好ましくは他のヒトFGFRにおける発現系を組み合わせたセットとして用い、低用量（例えば0.05nM程度）での実験をあわせて行う

ことにより、本来のヒトFGFR4に特異的なヒトFGF19活性を増強又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。例えば、前述のコンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸と同様の挙動を示す物質が検索することができれば、当該物質はヒトbetaKlotho共存下でヒトFGFR4を選択的に活性化する優れたヒトFGF19活性制御剤であり、造腫瘍性を持たず胆汁酸合成抑制作用のみを有することが期待できるから、胆汁酸性下痢等の予防あるいは治療剤の候補物質であるといえる。

[0017] [2] グリコサミノグリカンについて

糖鎖のなかで、最も構造的多様性を有し、種々の細胞活動に多大な影響を与える物質の一つがグリコサミノグリカンである。この分子の典型的なものとして、ヘパリンと共に、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸等の硫酸化されたグリコサミノグリカンが挙げられる。

ヘパリンおよびヘパラン硫酸は、ウロン酸残基とグルコサミン残基を含んだ、二糖単位の繰り返し構造によって出来ている。ウロン酸はC-5の立体配置により、 α -D-グルクロン酸(GlcUA)と β -L-イズロン酸(IdoA)とに区別され、IdoAの一部は2-O-硫酸基(IdoA(2S))を有する。グルコサミン残基は、N-アセチル基(GlcNAc)あるいはN-硫酸基(GlcNS)を有する。グルコサミン残基は、C-6に硫酸基を有しているものもある。これらに比較して、含量は低い2-O-硫酸化 α -D-グルクロン酸(GlcUA(2S))および3-O-硫酸化GlcNS(GlcNS(3S))あるいは3-O,6-O-ジ硫酸化GlcNS(GlcNS(3,6S))が存在する。これらの残基から構成される数十から数百からを越える二糖の繰り返し構造を、ヘパリンおよびヘパラン硫酸は有している。したがって、上記の様々な二糖単位の組合せにより、ヘパリンおよびヘパラン硫酸の構造的多様性が形成されている。

一方コンドロイチン硫酸はウロン酸とガラクトサミン残基を含んだ、二糖単位の繰り返し構造によって出来ている。硫酸化される位置によって以下の異なる型が存在し、いずれも既に市販されている。

A型：ガラクトサミンの4位が硫酸化されている。

B型：ガラクトサミンの4位が硫酸化され、グルクロン酸がエピマー化してイ

ズロン酸になっている（デルマタン硫酸とも呼称する）。

C型：ガラクトサミンの6位が硫酸化されている。

D型：ガラクトサミンの6位とグルクロン酸の2位が硫酸化されている。

E型：ガラクトサミンの4位と6位が硫酸化されている。

これらの残基から構成される数十から数百を越える二糖の繰り返し構造を有する。（なお、均一にすべての二糖単位が同じ構造で繰り返されているわけではない。）

本発明におけるヘパリン、グリコサミノグリカン（ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸）としては一般に、二糖の繰り返しが1回である低分子のものから数百の高分子の構造を持つものを含むが、本研究の実施例で用いたグリコサミノグリカンは、二糖単位が20～100個程度繰り返した構造を持つものの混合物である。

グリコサミノグリカンはその薬学的に許容される塩の状態で用いられている。例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等の無機塩基との塩、またはジエタノールアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、アミノ酸塩等の有機塩基との塩のうち、薬学的に許容される塩を用いることができる。なかでもナトリウム塩であることが好ましい。

本発明の実施例で、本来のヒトFGF19濃度範囲において、ヒトbetaKlotho共存下でのヒトFGFR4への活性化のみを選択的に増強したグリコサミノグリカンは、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸、及びヘパリンであった。特に、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸は、ヒトFGF19のどのような濃度範囲でも優れた選択性を有するヒトFGF19活性制御剤であることが実証された。

他のグリコサミノグリカン、又は硫酸化されたグリコサミノグリカンなどの中にも、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸と同様の挙動を示す物質は多数存在すると考えられ、これらは本発明のスクリーニング法を適用することで、簡単に検索することができる。したがって、本発明のスクリーニ

ング法の対象物質の典型的な物質は各種グリコサミノグリカンである。

[0018] [3] 本発明の胆汁酸性下痢治療にかかわる医薬組成物について：

本発明の剤は、コンドロイチン硫酸B、E及びヘパラン硫酸から選択されるグリコサミノグリカン、または本発明のスクリーニング方法により、本来のヒトFGF19濃度範囲において、ヒトFGF19によるヒトbetaKlotho共存下でのヒトFGFR4への活性化のみを選択的に増強する物質として検索された物質、又はヒトbetaKlotho共存下でのヒトFGFR4への活性化のみを選択的に活性化するヒトFGF19様物質として検索された物質を有効成分とし、医薬上許容され得る担体を含む。具体的には、造腫瘍性活性を有さない胆汁酸性下痢の治療用組成物などである。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウムグリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

[0019] 経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水のような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁

液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

非経口的な投与（例えば、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

本発明の剤の投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001～約500mg/kgである。

[0020] [4] 本発明のスクリーニング方法及びキット

本発明のスクリーニング方法及びキットは、ヒトbetaKlotho存在下もしくは非存在下でのヒトFGFR4を含む複数のヒトFGFRに対する活性化作用を観察することで、ヒトFGF19と同様の「ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用」を有する物質の検索をするためのものであり、またヒトFGF19が本来有している「ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用」のみを増強又は抑制する物質を検索するものでもある。

そして、以下、スクリーニング方法、及びキットとして詳細に説明するが、この方法及びキットは、従来特定FGFRを介したヒトFGF19活性を増強または抑制するための物質、及び／又はヒトFGF19活性に関連した医薬組成物の有効成分として同定されていた物質を、再評価するための方法又はキットとして用いることもできることは当然である。

[0021] 本発明のスクリーニング方法においては、ヒト由来のみならず全くFGF受容体もbetaKlothoも内在的に発現していない細胞の系を用いることが必要である。

FGF受容体もbetaKlothoも内在的に発現していない細胞としては、典型的にはマウス白血病ProB細胞であるBaF3細胞が用いられるので、以下BaF3細胞を用いて説明する。ただし、他の細胞でもこれらいずれの遺伝子も細胞表面に発現しておらず、かつこれら遺伝子で形質転換された場合に細胞表面に発現することができる細胞であれば、同様に用いることができるので、BaF3細胞には限られない。

当該BaF3細胞に対して、ヒトFGFR1c、R2c、R3c及びR4をコードする遺伝子をそれぞれ含む発現ベクターを導入し（特許文献6の手法による。）、ヒトFGFR1c、R2c、R3c及びR4をそれぞれ発現する形質転換BaF3細胞系を得ることができる。そして、それぞれにさらにヒトbetaKlotho遺伝子を導入することで、各ヒトFGF受容体と共にヒトbetaKlothoも発現している形質転換BaF3細胞系を作製できる。その際、ヒトbetaKlotho遺伝子を導入したBaF3細胞に対してヒトFGFR1c、R2c、R3c及びR4をコードする遺伝子を導入しても、又は両遺伝子を同時に導入してもよい。

このようにして得られる各ヒトFGF受容体をそれぞれ発現しているBaF3細胞の系と共に、各ヒトFGF受容体と共にヒトbetaKlothoも発現しているBaF3細胞の系をセットで用意することで、本来の生体内環境の状態におけるヒトFGF19によるヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる作用を増強もしくは抑制する物質のスクリーニングに用いることができる。またこの系を用いることで、ヒトbetaKlothoが存在する場合にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させるヒトFGF19様の作用を有する物質をスクリーニングすることができる。

[0022] ヒトbetaKlotho存在下でのみ選択的にヒトFGFR4に対してのヒトFGF19活性の増強作用又はヒトFGF19様受容体活性を有する物質のスクリーニングにおいては、ヒトFGFR4を含む複数の異なる種類のヒトFGFRをそれぞれ発現している

細胞系及び当該細胞系に対応するさらにヒトbetaKlothoも発現している細胞系のセットを用い、被検物質の存在下でのヒトFGF19の各ヒトFGFR活性化作用を比較して評価する。

本発明のスクリーニング法の被検物質は、各種グリコサミノグリカン類の中から検索するのが最も確実性は高いが、これに限られるものではなく、タンパク質、脂質、糖類などどのような物質も対象となる。ヒトFGF19と同時に形質転換細胞系の培地に添加する場合は、水溶性の物質が好ましい。また、被検物質が遺伝子の形態であれば、ヒトFGF19を作用させる前に、各形質転換細胞系に当該遺伝子を導入して、安定に発現させておく必要がある。

具体的には、例えば、まずヒトFGF受容体と共にヒトbetaKlothoを細胞表面に発現しているBaF3細胞の系、次いでヒトFGF受容体のみを発現している系に対して被検物質と共に0.5nM以下、好ましくは1pM~0.3nM、さらに好ましくは1pM~0.1nM、最も好ましくは0.03nM~0.1nMのヒトFGF19を作用させる方法を用いることができる。その際、被検物質とヒトFGF19の添加順序は、同時でも、何れが先でもよい。あわせて、1nM以上の高濃度のヒトFGF19を添加する場合のデータを取っておくことが好ましい。

[0023] ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19による選択的なヒトFGFR4の活性化作用を増強又は抑制する物質のスクリーニング方法の具体的な手順は以下の通りである。

当該スクリーニング方法により、造腫瘍性活性を有さない胆汁酸性下痢治療剤の候補物質を検索することができる。

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する工程。なお、当該工程で用いる典型的な宿主細胞としては、ヒトBaF3細胞がある。

(2) ヒトFGF受容体4 (ヒトFGFR4) 遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、各宿主細胞に1種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する工程。なお、当該工程で用いるヒトFGFR4遺伝子以外のヒトFGF受容体遺伝子としては、ヒトFGFR1c遺伝子、ヒトFGFR2c遺伝子、及びヒ

トFGFR3c遺伝子を用いることが好ましく、工程（2）で用いるヒトFGFR遺伝子としては、これらの4種類の全ての遺伝子を用いることが最も好ましい。

（3）ヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの1種類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を、各宿主細胞に導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する工程。

（4）工程（2）及び工程（3）で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下でヒトFGF19を作用させる工程。なお、当該工程では、ヒトFGF19の培地中での濃度を0.001～0.5nM、好ましくは0.001～0.1nMの範囲内で複数の濃度条件に調整した系を用意することが好ましい。

（5）各細胞系でのヒトFGF19による、ヒトFGFR活性化作用を比較する工程、

（6）被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGF19の活性化作用を示すことを確認する工程、

（7）被検物質存在下でのヒトFGF19の活性化作用が被検物質非存在下の場合と比較したときに、当該活性化作用を増強又は抑制している被検物質を選択する工程。なお、上記工程（4）において複数の濃度条件に調整した系が用意され、これら複数の系でヒトFGF19の活性化作用が確認されている場合には、各々の系でのヒトFGFR4の活性値を計測して濃度依存的な変化量を観測することにより、被検物質の存在下及び非存在下での比較が行われることが好ましい。

（8）工程（7）で選択した被検物質を、ヒトFGF19によるヒトFGFR4を介した生物活性の活性化作用のみを選択的に増強または抑制する物質であると判定する工程。

また、上記スクリーニング用キットとしては、具体的には、ヒトFGF19と共に、下記（1）及び（2）の細胞系のセットを用意すればよい。なお、ヒトFGF19は、例えば1pM～0.5nM、好ましくは1pM～0.1nM、さらに好ましくは0.03nM～0.1nMの濃度のヒトFGF19水溶液として組み合わせる。

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他の1種類以上のヒトFGFRがそれぞれ発現している形質転換細胞系のセット。なお、ここで用いる典型的な宿主細胞としては、ヒトBaF3細胞がある。

(2) (1)の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

[0024] また、上記した、ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19による選択的なヒトFGFR4の活性化作用を増強又は抑制する物質のスクリーニング方法の各工程中の、工程(4)において、ヒトFGF19を培地中に添加せずに、各細胞系でのヒトFGFR活性化作用を比較することで、ヒトbetaKlothoが存在したときのみに選択的にヒトFGFR4を活性化するヒトFGF19様受容体活性化作用を有する物質をスクリーニングすることができる。ヒトbetaKlothoが存在したときのみに選択的にヒトFGFR4を活性化するヒトFGF19様受容体活性化作用を有する物質をスクリーニングする具体的な方法は、下記(1)～(7)の手順で行う。

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する。

(2) ヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、各宿主細胞に1種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する。

(3) ヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの1種類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を、各宿主細胞に導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する。

(4) (2)及び(3)で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下で被検物質を作用させる。なお、当該工程において、培地中にあらかじめグルコサミノグルカン類を添加しておくことで、被検物質のFGF19様活性化作用の測定感度が高まるので好ましい。

(5) 各細胞系でのヒトFGFR活性化作用を比較する。

(6) 被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGFR4活性化作用を示す物質を選択する。

(7) (6) で選択した被検物質を、ヒトFGF19様受容体活性物質であると判定する。

また、そのためのキットとしては、ヒトFGF19を組み合わせないこと以外は、上記ヒトFGF19による選択的なヒトFGFR4の活性化作用を増強又は抑制する物質のスクリーニング用キットと同じ細胞系セットを用いることができる。具体的には、下記(1)及び(2)の細胞系のセットを用意すればよい。さらに、(3) グリコサミノグリカンセットに追加することが好ましい。

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他のヒトFGFRが1種類ずつ発現している形質転換細胞系のセット。なお、ここで用いる典型的な宿主細胞としては、ヒトBaF3細胞がある点でも同様である。

(2) (1) の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

[0025] なお、実際のスクリーニングに際しては、BaF3細胞の増殖能を、被検物質を添加しない系などのコントロールの系と比較して評価することができる。BaF3細胞の増殖能は、標識チミジンの取り込み量の測定など常法により測定する。他のスクリーニング方法においても同様である。

また、実際のスクリーニングに際しては、BaF3細胞の増殖シグナル伝達の活性化を、被検物質を添加しない系などのコントロールと比較して評価することもできる。BaF3細胞の増殖シグナル伝達の活性化は、FGF受容体のチロシンリン酸化、FGF受容体基質2 (FRS2) のチロシンリン酸化、マップキナーゼ (ERK1/2) のリン酸化など常法により測定する。他のスクリーニング方法においても同様であった。

各ヒトFGF受容体及びヒトbetaKlothoを細胞表面に発現しているBaF3細胞の系、各ヒトFGF受容体のみを発現している系をヒトFGF19と組み合わせることで、ヒトFGF19活性の調節作用に係る促進物質もしくは阻害物質のスクリーニ

ング用のキットとすることができる。またこの系によりヒトbetaKlothoが存在したときのみにヒトFGFR4選択的にヒトFGF19の作用を発揮させる物質のスクリーニング用のキットとすることができる。

そして、これらスクリーニングにより得られた物質は、いずれもヒトbetaKlothoの共存下のヒトFGFR4で発揮されるヒトFGF19活性の調節剤、または胆汁酸性下痢治療にかかわる医薬組成物として用いることができる。

実施例

[0026] 以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

なお、本発明を実施するために使用する技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能であり、例えば、遺伝子工学的技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning : A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) などに記載の方法又はそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。また、本発明で引用した先行文献又は特許出願明細書の記載内容は参照して本明細書の記載として組み入れるものとする。

[0027] [参考例] グリコサミノグリカンの存在によるヒトFGF19のFGF受容体に対する選択的活性化作用の「マウスFGFR／マウスbetaKlotho系」を用いた解析（特許文献6の追試）

特許文献6の実施例1で作成した4種類のマウスFGF受容体（マウスFGFR1c、FGFR2c、FGFR3cあるいはFGFR4）のそれぞれをマウスbetaKlothoとともにあるいは単独に強制発現させた4種類のBaF3細胞を用い、これらの細胞に対するヒトFGF19の反応性が、各種グリコサミノグリカンの存在下でどのように変わるかを解析した。

4種類のマウスFGF受容体（マウスFGFR1c、R2c、R3cあるいはR4）のそれぞ

れをマウスbetaKlothoとともにあるいは単独に強制発現させた計8種類のBaF3細胞の具体的な構築方法は以下の通りである。

元来はFGF受容体を持たない細胞であるBaF3細胞に、まず各マウスFGFR (mFGFR1c、R2c、R3c、R4) のcDNAを動物細胞発現ベクター (Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.*, 271, 15292-15297. に記載されている) に組み込み、これをエレクトロポレーション法によりマウスBaF3細胞に導入した。G418存在下で約2週間培養を行い、薬剤耐性クローンを得た後、ヒトFGF1刺激により増殖させることができるクローンとして取得した。各マウスFGFRとマウスbetaKlothoを共に発現するBaF3細胞は、動物細胞用発現ベクターにマウスbetaKlothoの全長cDNAをクローニングし、これを各マウスFGFR発現BaF3細胞に導入した後、Puromycin及びG418存在下で約2週間培養を行い、耐性クローンとして取得した。これらの遺伝子導入したBaF3細胞は10%FBSとインターロイキン3 (IL3、WEHI-3細胞のコンディショニングメディウムを10%加えることにより供給)、Puromycin及びG418を含むRPMI1640培地で維持した。スクリーニングにおける増殖刺激実験時は細胞をRPMI1640培地で洗浄後10%FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し培養プレートに播種した。

次いで、各細胞を各種グリコサミノグリカン (ヘパリン、シグマ 製品番号H3393; ヘパラン硫酸、生化学工業株式会社 製品番号400700; コンドロイチン硫酸B、生化学工業株式会社 製品番号400660; コンドロイチン硫酸D、生化学工業株式会社 製品番号400676; コンドロイチン硫酸E、生化学工業株式会社 製品番号400678) 存在下で、ヒトFGF19の量を図のように変化させて刺激し、DNA合成を測定した。解析結果を、図1に示す。マウスFGFR単独に発現させた細胞の場合、図に示されるように、いずれのグリコサミノグリカンの存在下でもヒトFGF19はマウスFGFR1c、R2c、R3cを活性化しなかった、マウスFGFR4に対してはヘパリンの存在下でのみ活性化した。マウスFGFRとマウスKLB共発現細胞に対してはヘパリンの存在下でヒトFGF19はいずれのマウスFGF

Rを発現している細胞に対しても活性を示すのに対して、ヘパラン硫酸存在下ではマウスFGFR4とマウスbetaKlotho (mR4/mbetaKlotho) 発現細胞のみが活性化されないことが明らかとなった。

またコンドロイチン硫酸Bあるいはコンドロイチン硫酸Eの存在下では、mR2c/mbetaKlotho発現細胞のみが活性化されることが明らかとなった。

下記実施例2のヒトFGFRの受容システムの場合と比較すると、マウスFGFRの受容システムの場合、マウスbetaKlotho非存在下ではヒトFGF19がヘパリンを添加した場合のみマウスFGFR4を特異的に活性化させる点、及びマウスbetaKlotho存在下でヘパリンを添加するとヒトFGF19が非特異的に全てのマウスFGFRを活性化する点ではヒトFGFRの受容システムと共通する。しかし、マウスbetaKlotho存在下において大きな相違があり、ヘパリンを添加した際の特異的な活性化を除きヒトFGF19はマウスFGFR4を活性化させることはできず、グリコサミノグリカンを添加した場合には、むしろマウスFGFR2及びマウスFGFR3を活性化する場合もある。

[0028] 〔実施例1〕 BaF3細胞を用いたスクリーニング系の構築（ヒトFGFR／ヒトbetaKlotho系）

参考例1と同様の手法を用いてBaF3細胞にヒトFGF受容体とヒトbetaKlothoを強制発現させた細胞を作出し、ヒトFGF19の反応性とそれを増強あるいは抑制する物質を検出する系を構築した。

各FGFR及びbetaKlotho発現BaF3細胞は以下のように調製した。まず各ヒトFGFR（ヒトFGFR1c、hR2c、hR3c、hR4）のcDNAを参考例で用いたと同じ動物細胞発現ベクターに組み込み、エレクトロポレーション法によりマウスBaF3細胞に導入した。G418存在下で約2週間培養を行い、薬剤耐性クローンを得た後、ヒトFGF1刺激により増殖させることができるクローンとして取得した。各ヒトFGFRとヒトbetaKlothoを共に発現するBaF3細胞は、動物細胞用発現ベクターにヒトbetaKlothoの全長cDNAをクローニングし、これを各ヒトFGFR発現BaF3細胞に導入した後、Puromycin及びG418存在下で約2週間培養を行い、耐性クローンとして取得した。これらの遺伝子導入したBaF3細胞は10%FBSとイン

ターロイキン3（ヒトIL3、WEHI-3細胞のコンディションメディウムを10%加えることにより供給）、Puromycin及びG418を含むRPMI1640培地で維持した。スクリーニングにおける増殖刺激実験時は細胞をRPMI1640培地で洗浄後10%FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し培養プレートに播種して用いた。

[0029] 〔実施例2〕グリコサミノグリカンの存在によるヒトFGF19のヒトFGF受容体に対する選択的活性化作用の解析（ヒトFGFR／ヒトbetaKlotho系）

〔実施例1〕で作成した4種類のヒトFGF受容体（ヒトFGFR1c、ヒトFGFR2c、ヒトFGFR3cあるいはヒトFGFR4）のそれぞれをヒトbetaKlothoとともにあるいは単独に強制発現させた4種類のBaF3細胞を用い、これらの細胞に対するヒトFGF19の反応性が、各種グリコサミノグリカンの存在下でどのように変わるかを解析した。まず細胞をRPMI1640培地で洗浄後10%FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し培養プレートに播種し、各種グリコサミノグリカン存在下で、ヒトFGF19の量を図2のように変化させて刺激し、DNA合成を測定した。解析結果を、図2に示す。ヒトFGFR単独に発現させた細胞では図に示されるように、いずれのグリコサミノグリカンの存在下でもヒトFGF19はヒトFGFR1c、R2c、R3cを活性化しなかったが、ヒトFGFR4に対してはヘパリンの存在下でのみ活性化した。これらの結果は参考例で示したマウスの系での結果と同様であった。一方ヒトFGFRとヒトbetaKlotho共発現細胞に対してはヘパリンの存在下でヒトFGF19はいずれのヒトFGFRを発現している細胞に対しても活性を示す（参考例で示すとおり、これもマウスの系と概ね同様）ことに対して、ヘパリン以外のグリコサミノグリカン存在下では、ヒトFGFR4／ヒトbetaKlotho発現細胞以外は活性化されないことが明らかとなった。

つまり、ヒトFGF19は、ヒトbetaKlotho存在下では、ヒトFGFR4を特異的に活性化させ、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸B及びEはその際のヒトFGF19の活性化作用を増強する。ヒトbetaKlotho非存在下では、グリコサミノグリカンを追加してもいずれのヒトFGFRも活性化させることができない。一方、ヘパリンを追加した場合には、ヒトbetaKlotho非存在下ではヒトFGFR4を特異的に活性化させてしまうが、ヒトbetaKlotho存在下では、全てのヒトFGFRを

活性化させる。

[0030] 〔実施例3〕低用量ヒトFGF19によるヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）に対する活性化作用に対するヒトbetaKlothoとグリコサミノグリカンの効果

前記〔実施例1〕で作成したヒトFGFR4をヒトbetaKlothoと共に、あるいはヒトFGFR4単独で発現するBaF3細胞を用いて、〔実施例2〕と同様の手順で、各種グリコサミノグリカン存在下でヒトFGF19の量を図のように低用量（生理的）領域で変化させて刺激し、DNA合成を測定した。解析結果を、図3に示す。なお、コンドロイチン硫酸Aは、生化学工業株式会社製（製品番号400658）、コンドロイチン硫酸Cは、生化学工業株式会社製（製品番号400670）を用いた。他のグリコサミノグリカンは、参考例及び実施例2で用いたものと同じものを用いた。

図3に示されるように、0.5nM以下、特に1pMから0.1nM程度までの低用量において、ヒトFGF19はいずれのグリコサミノグリカンの存在下でも、ヒトFGFR4単独に発現した細胞を活性化しないが、ヒトFGFR4／ヒトbetaKlotho発現細胞に対しては、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸B、ヘパラン硫酸、ヘパリンの存在下で、細胞を活性化することが明らかとなった。肝臓由来のグリコサミノグリカンの存在下でも同様の結果が得られた。グリコサミノグリカンの低用量ヒトFGF19の作用の増強効果は、コンドロイチン硫酸E、コンドロイチン硫酸B、に対しヘパラン硫酸、ヘパリンがより強力であった。

以上のように、ヒトFGF19の発揮する生物活性を正確で高感度に測定する方法が得られた。特に肝臓におけるヒトFGF19の作用がヒトbetaKlothoの存在下、ヒトFGFR4を活性化することによりコレステロールからの胆汁酸合成を抑制する作用であることから、本方法をヒトFGF19の作用の増強剤のスクリーニング系として適用することにより、胆汁酸性下痢の病態を改善する医薬品の開発に適用できることが示された。

[0031] 〔実施例4〕低用量ヒトFGF19の生物活性に対する肝臓から調製したグリコサミノグリカンの効果（ヒトFGFR4／ヒトbetaKlotho系）

ウシ肝臓よりグリコサミノグリカンを次のとおり調製した。肝臓組織を細

切、煮沸した後、ホモジナイズして肝臓細胞を粉砕した。その後、粉砕した肝臓はアセトン、クロロホルム-メタノール処理により脱脂を行った。溶媒の減圧留去後に、2mM CaCl_2 と50mM Tris-HCl (pH8.0) 中で50℃、48時間アクチナーゼによるタンパク質の消化処理を行った。その後、アクチナーゼを熱失活させ、遠心し上清を回収した。上清は純水に対して透析を行い、DEAEセファロースFast Flowカラムにアプライし、塩化ナトリウムの段階的塩濃度勾配によりグリコサミノグリカンを含む画分を分離した。得られた画分を水素化ホウ素ナトリウム溶液中で処理し、グリコサミノグリカン鎖をベータ脱離によりタンパク質から遊離させた。得られたグリコサミノグリカン鎖は、塩酸で中和した後、過塩素酸を加えて混在するタンパク質を沈殿除去した。その後、純水に対して透析を行い、0.22 μm のフィルターにより濾過滅菌を施した。調製したグリコサミノグリカンの濃度はカルバゾール硫酸法により決定した。

〔実施例1〕～〔実施例3〕で作成したスクリーニング系を、上記のように調製した肝臓由来グリコサミノグリカンに適用して、ヒトFGF19の生物活性に対する増強効果を評価した。

図4に示されるように、5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の肝臓由来グリコサミノグリカンは、ヒトFGFR4／ヒトbetaKlotho発現細胞に対しては、ヒトFGF19を0.5nM以下、特に1pMから0.1nM程度の低用量添加した場合でもヘパリンと同程度に顕著に活性化を増強するのに対して、ヒトFGFR4単独の発現細胞に対しては、同じヒトFGF19を同じ低用量での添加の場合では活性化増強作用がないことが示された。

以上の結果は、本スクリーニング系（ヒトFGFR4／ヒトbetaKlotho発現系）が、ヒトFGF19の選択的なヒトFGFR4を介した生物活性を増強する活性化剤のスクリーニングに有効であることが実証された。

請求の範囲

[請求項1]

ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19による選択的なヒトFGFR4の活性化作用を増強又は抑制する物質のスクリーニング方法であって、下記（１）～（８）の工程を含む方法：

（１）FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する工程、

（２）ヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、各宿主細胞に１種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する工程、

（３）ヒトFGF受容体4（ヒトFGFR4）遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの１種類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を、各宿主細胞に導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する工程、

（４）工程（２）及び工程（３）で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下でヒトFGF19を作用させる工程、

（５）各細胞系でのヒトFGF19によるヒトFGFR活性化作用を比較する工程、

（６）被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGF19の活性化作用を示すことを確認する工程、

（７）被検物質存在下でのヒトFGF19の活性化作用が被検物質非存在下の場合と比較したときに、当該活性化作用を増強又は抑制している被検物質を選択する工程、

（８）工程（７）で選択した被検物質を、ヒトFGF19によるヒトFGFR4を介した生物活性の活性化作用のみを選択的に増強または抑制する物質であると判定する工程。

[請求項2]

前記工程（７）における被検物質の存在下及び非存在下での比較が、前記工程（４）において、ヒトFGF19の培地中での濃度を0.001～0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整した系が用意されており、その

各々の系でのヒトFGFR4の活性値を計測して濃度依存的な変化量を観測することで行われることを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。

[請求項3] 前記スクリーニング方法が、造腫瘍性活性を有さない胆汁酸性下痢治療剤の候補物質を検索するためのものである、請求項1又は2に記載のスクリーニング方法。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載のスクリーニング方法に用いるためのキットであって、ヒトFGF19と共に、下記(1)及び(2)の細胞系のセットを含むことを特徴とするキット；

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他のヒトFGFRが1種類ずつ発現している形質転換細胞系のセット。

(2) (1)の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

[請求項5] 0.001～0.5nMの濃度のヒトFGF19水溶液を含む、請求項4に記載のキット。

[請求項6] 請求項2に記載のスクリーニング方法により検索されたグリコサミノグリカンを有効成分とする、ヒトbetaKlothoが存在したときのみに発揮されるヒトFGF19のヒトFGFR4を介した生物活性の選択的増強剤。

[請求項7] ヒトbetaKlothoが存在したときのみに選択的にヒトFGFR4を活性化するヒトFGF19様受容体活性化作用を有する物質のスクリーニング方法であって、下記(1)～(7)の工程を含む方法：

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞を複数個用意する工程、

(2) ヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子を、各宿主細胞に1種類ずつ導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRを発現する細胞系を構築する工程、

(3) ヒトFGFR4遺伝子及び他のヒトFGF受容体遺伝子のうちの1種

類と共にヒトbetaKlotho遺伝子を、各宿主細胞に導入し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoを発現する細胞系を構築する工程、

(4) (2) 及び (3) で得られた全ての細胞系に対して、被検物質の存在下及び非存在下で被検物質を作用させる工程、

(5) 各細胞系でのヒトFGFR活性化作用を比較する工程、

(6) 被検物質が、ヒトbetaKlothoと共にヒトFGFR4を発現している細胞系でのみヒトFGFR4活性化作用を示す物質を選択する工程、

(7) (6) で選択した被検物質を、ヒトFGF19様受容体活性物質であると判定する工程。

[請求項8] 前記(4)における被検物質を添加する工程において、培地中にグリコサミノグリカンを添加することを特徴とする、請求項7に記載の方法。

[請求項9] 請求項7又は8に記載のスクリーニングのためのキットであって、下記(1)及び(2)の細胞系のセットを含むキット；

(1) FGF受容体及びbetaKlothoを内在的に発現していない宿主細胞表面に、外来性のヒトFGFR4及び他のヒトFGFRが1種類ずつ発現している形質転換細胞系のセット、

(2) (1)の形質転換細胞系に対応し、各々が異なる種類のヒトFGFRと共にヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系のセット。

[請求項10] さらに、(3) グリコサミノグリカンを含む請求項9に記載のキット。

[請求項11] ヒトFGF19がヒトの体内濃度でヒトbetaKlotho存在下にのみヒトFGFR4を選択的に活性化させる生物活性値を正確かつ高感度に測定する方法であって、内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず外来性のヒトFGFR4とヒトbetaKlothoとを発現する細胞系を構築し、当該細胞系の培地中にグリコサミノグリカンを添加すると共に、培地中のヒトFGF19濃度が0.5nM以下となるように調整し、ヒトFGFR4の生物活性値

を計測することを含む測定方法。

[請求項12] 培地中のヒトFGF19濃度を0.001～0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整したそれぞれの場合のヒトFGFR4の活性値を計測し、濃度依存的な変化量を観測することを特徴とする、請求項11に記載の測定方法。

[請求項13] 請求項11又は12に記載の測定方法に使用するためのキットであって、下記(1)～(4)を含むことを特徴とするキット；

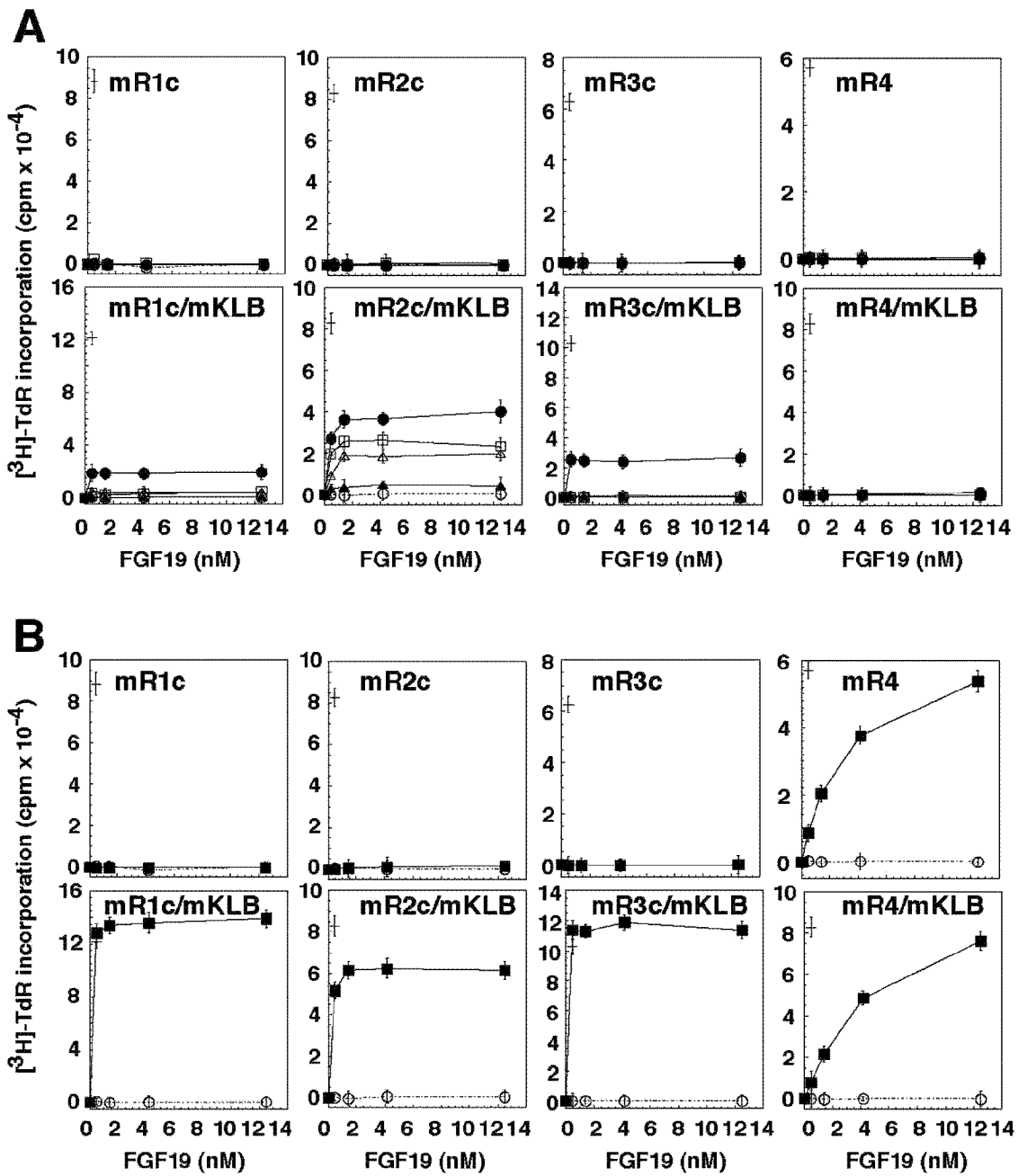
(1) 培地中のヒトFGF19濃度を0.001～0.5nMの範囲内で複数の濃度条件に調整するためのヒトFGF19水溶液、

(2) グリコサミノグリカン、

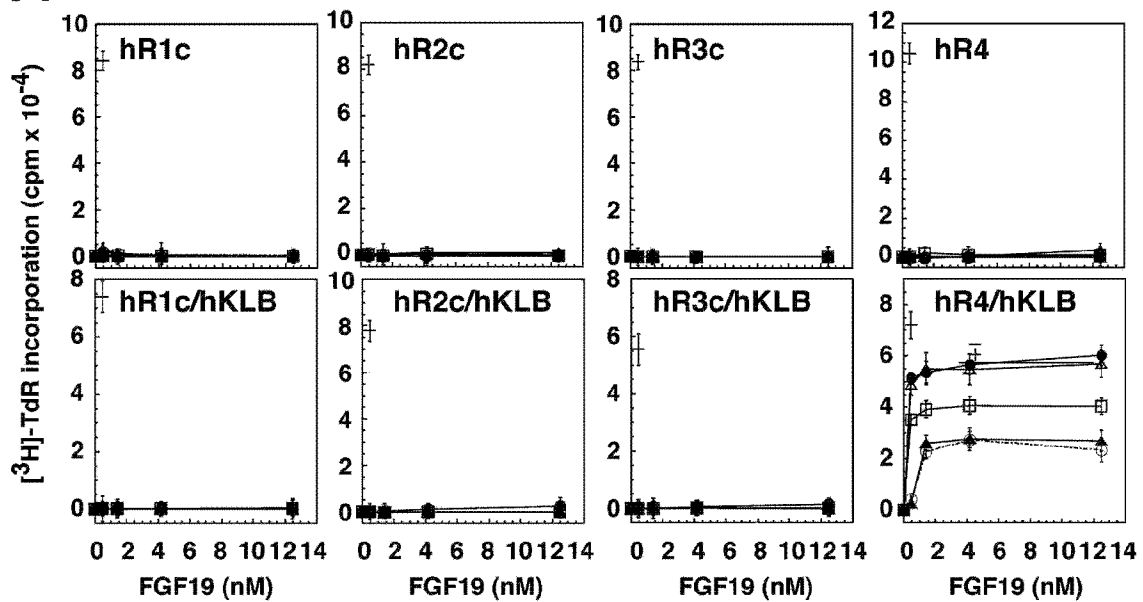
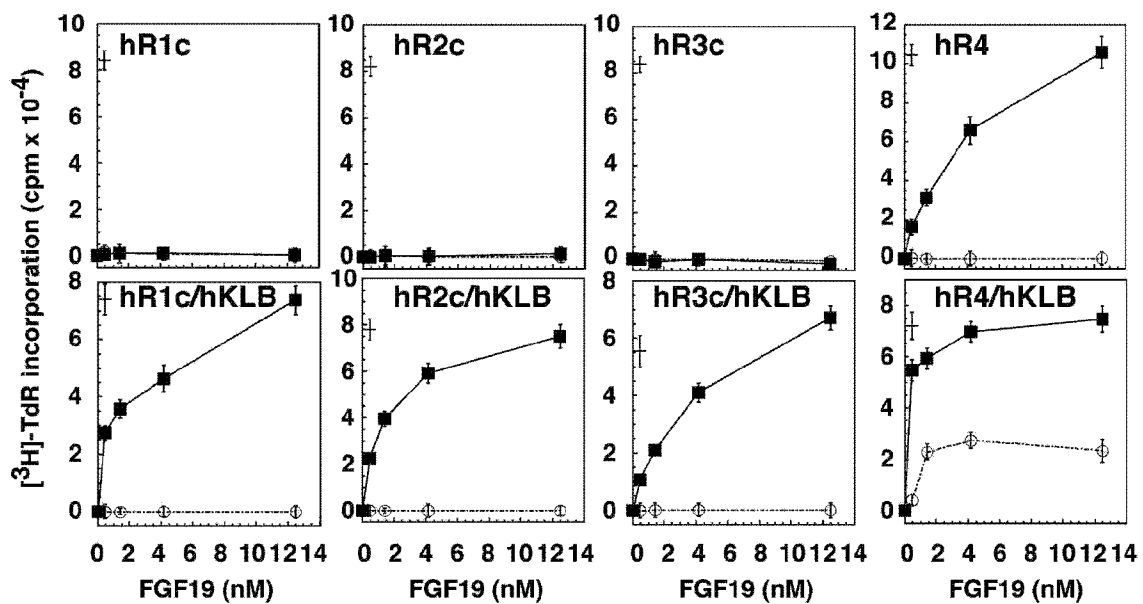
(3) 内在性のFGF受容体及びbetaKlothoを発現せず、外来性のヒトFGFR4を発現する形質転換細胞系、

(4) (3)の細胞系にさらにヒトbetaKlothoが発現している形質転換細胞系。

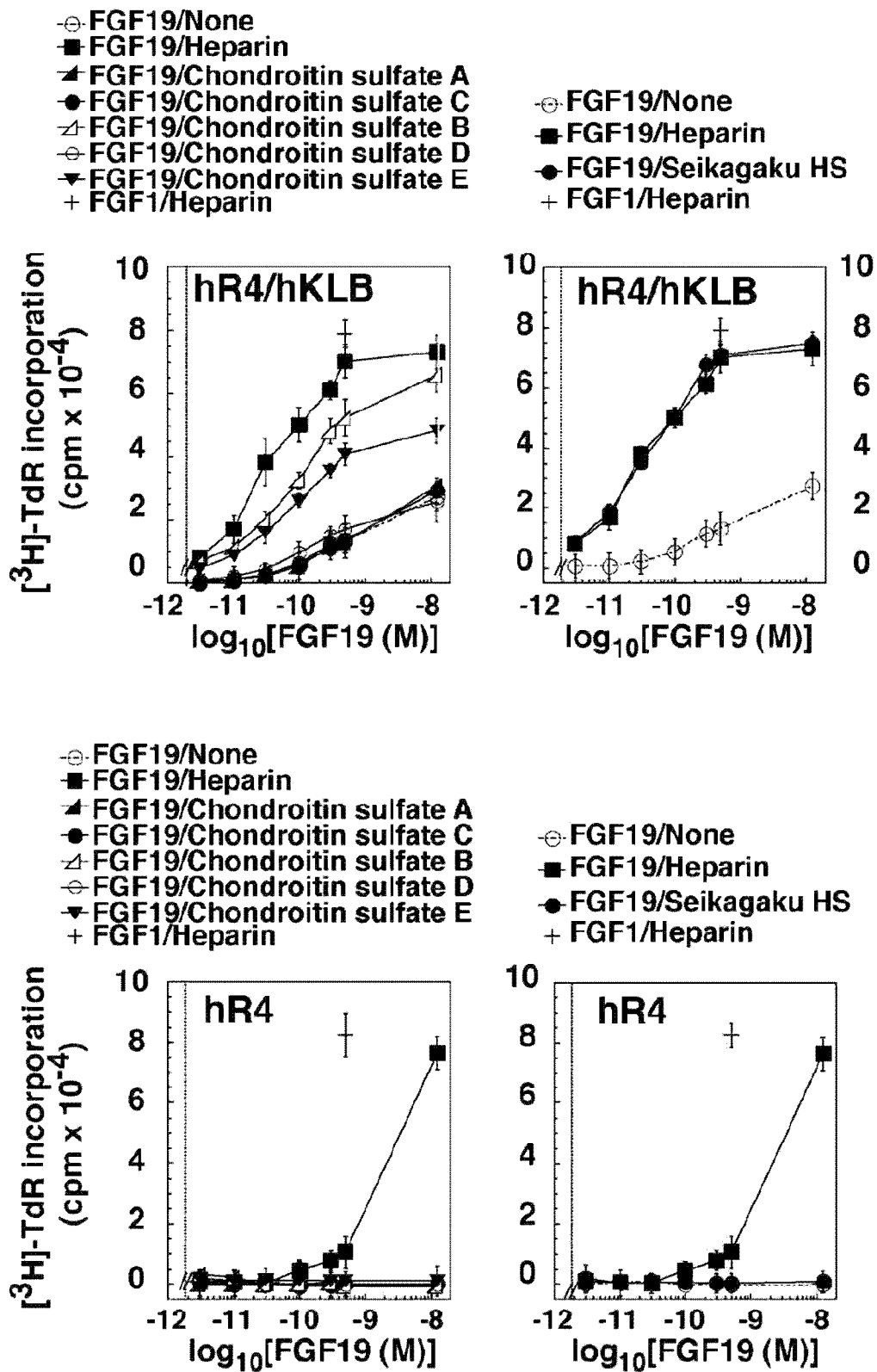
[図1]



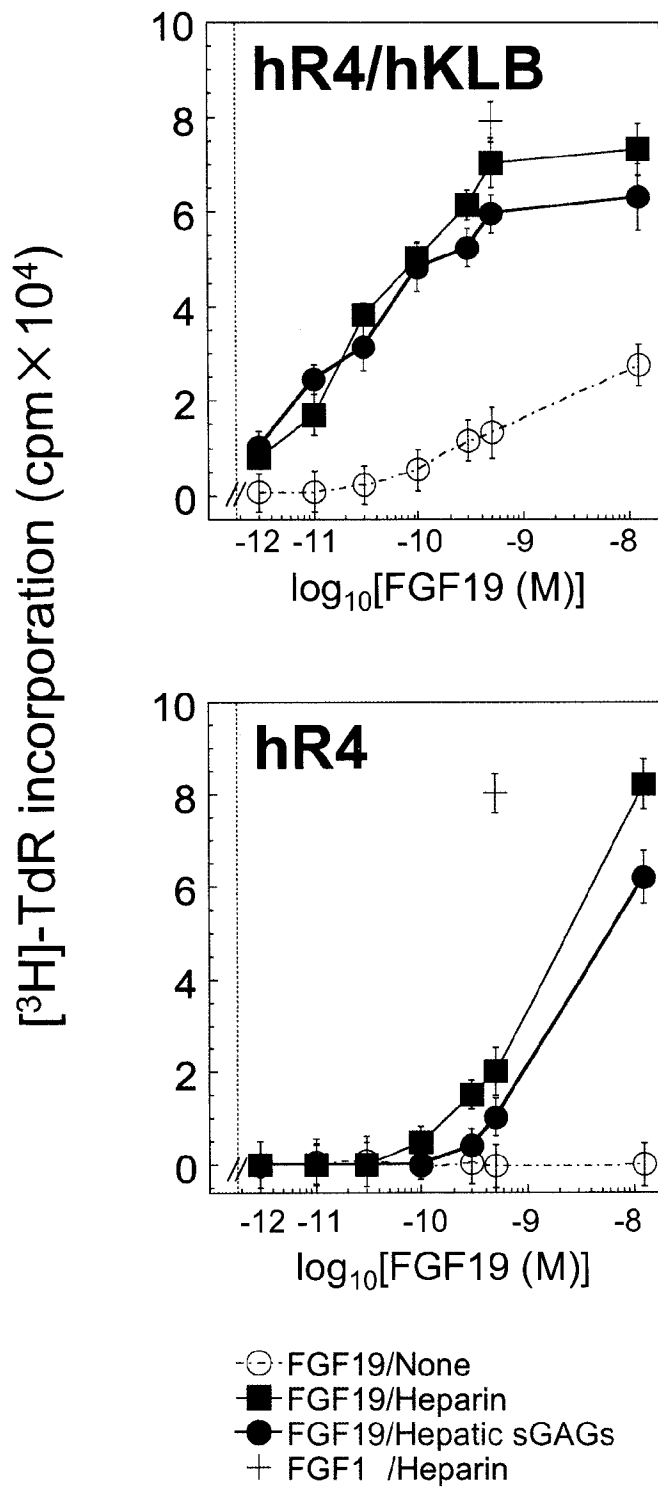
[図2]

A**B**

[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, A61K31/726(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/12(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/02, A61K31/726, A61K45/00, A61P1/12, G01N33/15, G01N33/50, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2010-150232 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 July 2010 (08.07.2010), paragraphs [0011] to [0013], [0015]; examples 1, 2, 4 (Family: none)	1,3-10/2, 11-13
Y/A	WALTERS JR, et al., A new mechanism for bile acid diarrhea: defective feedback inhibition of bile acid biosynthesis, Clin Gastroenterol Hepatol., 2009.11, Vol.7, No.11, p.1189-1194	1,3-10/2, 11-13
Y/A	LUO Y, et al., Metabolic regulator betaKlotho interacts with fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) to induce apoptosis and inhibit tumor cell proliferation, J Biol Chem., 2010.09.24, Vol.285, No.39, p.30069-30078	1,3-10/2, 11-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 February, 2012 (08.02.12)

Date of mailing of the international search report

21 February, 2012 (21.02.12)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	ZHANG Y, et al., Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family, Gene, 1999.04.01, Vol. 230, No.1, p.69-79	1, 3-10/2, 11-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, A61K31/726(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/12(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/02, A61K31/726, A61K45/00, A61P1/12, G01N33/15, G01N33/50, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	JP 2010-150232 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2010.07.08, 段落【0011】-【0013】及び【0015】、並びに実施例1、2及び4 (ファミリーなし)	1, 3-10/ 2, 11-13
Y/A	WALTERS JR, et al., A new mechanism for bile acid diarrhea: defective feedback inhibition of bile acid biosynthesis, Clin Gastroenterol Hepatol., 2009.11, Vol.7, No.11, p.1189-1194	1, 3-10/ 2, 11-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長谷川 茜

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 8 6 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	LUO Y, et al., Metabolic regulator betaKlotho interacts with fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) to induce apoptosis and inhibit tumor cell proliferation, J Biol Chem., 2010.09.24, Vol.285, No.39, p.30069-30078	1, 3-10/ 2, 11-13
Y/A	ZHANG Y, et al., Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family, Gene, 1999.04.01, Vol.230, No.1, p.69-79	1, 3-10/ 2, 11-13