

(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2009-145116

(P2009-145116A)

(43) 公開日 平成21年7月2日(2009.7.2)

| (51) Int.Cl.            | F I                | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/50 (2006.01)  | GO 1 N 33/50 Z     | 2 G O 4 5   |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/02 Z N A | 4 B O 2 4   |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A    | 4 B O 6 3   |
| GO 1 N 33/15 (2006.01)  | GO 1 N 33/15 Z     |             |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)  | GO 1 N 33/53 D     |             |

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2007-320976 (P2007-320976)

(22) 出願日 平成19年12月12日 (2007.12.12)

特許法第30条第1項適用申請有り 掲載者: Wiley-Liss, Inc. 掲載物: Hippocampus 掲載アドレス: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/117858867/ABSTRACT> 電気通信回線発表日: 平成19年12月6日

(71) 出願人 504160781

国立大学法人金沢大学  
石川県金沢市角間町ヌ7番地

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(72) 発明者 山嶋 哲盛

石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内

Fターム(参考) 2G045 CB01 DA36 DB07 FB03

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GPR40を利用した脳機能改善薬の評価方法

(57) 【要約】

【課題】GPR40を介したニューロン新生のメカニズムを解明し、脳機能低下や脳機能障害を改善するための新たな手段を提供すること。

【解決手段】被験物質によるGPR40の発現あるいは活性化レベルの変化を指標として、該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験物質によるGPR40の発現または活性化レベルの変化を指標として、該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価する方法。

## 【請求項 2】

以下の工程を含む、請求項 1 に記載の方法：

- 1) GPR40発現細胞を被験物質の存在下と非存在下で培養する；
- 2) 上記細胞におけるGPR40の発現または活性化レベルを測定する；
- 3) 被験物質の存在下におけるGPR40の発現または活性化レベルが、該被験物質の非存在下におけるGPR40の発現または活性化レベルと比較して有意に向上する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

10

## 【請求項 3】

GPR40発現細胞が神経幹細胞、新生ニューロン、または骨髄の間葉系幹細胞である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

GPR40発現細胞が遺伝子導入によりGPR40を強制発現させた組換え細胞である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

GPR40の活性化レベルを、細胞内カルシウム、cAMP、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロールを含むセカンドメッセンジャー濃度、または膜電位によって測定することを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

GPR40の発現レベルを、抗GPR40抗体を用いた免疫学的方法またはそのmRNAの定量的解析法によって測定することを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

以下の工程を含む、請求項 1 に記載の方法：

- 1) 動物に被験物質を投与する；
- 2) 被験物質の投与および非投与条件下における、当該動物の脳内におけるGPR40の発現レベルを測定する；
- 3) 被験物質の投与条件下におけるGPR40発現レベルが、非投与条件下におけるGPR40発現レベルと比較して有意に増加する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

30

## 【請求項 8】

動物が霊長類である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

動物が正常動物および/または脳虚血負荷後の動物を用いて実施することを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

動物の海馬あるいは脳室下帯におけるGPR40の発現レベルを測定することを特徴とする、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

動物の大脳皮質または大脳基底核のニューロンにおけるGPR40の発現レベルを測定することを特徴とする、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

GPR40発現レベルを、抗GPR40抗体を用いた免疫学的方法またはそのmRNAの定量的解析法によって測定することを特徴とする、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

神経幹細胞、新生血管細胞、新生グリア細胞および新生ニューロンから選ばれるいずれか 1 または 2 以上におけるGPR40の特異的発現レベルを評価することを特徴とする、請求項 7 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

## 【請求項 1 4】

前記GPR40の特異的発現レベルの評価が、神経幹細胞、新生血管細胞、新生グリア細胞および新生ニューロンの特異的マーカーに対する抗体と抗GPR40抗体を用いた二重染色によって行なわれることを特徴とする、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

抗GPR40抗体を含む、脳機能改善薬のスクリーニング用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明はGPR40を利用した脳機能改善薬の評価方法に関する。より詳しくは、GPR40の発現または活性化レベルを指標として、被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価する方法に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

遺伝子の存在だけが知られていて実際の生理機能が不明な受容体は「オーファン受容体 (orphan receptor)」と呼ばれる。リガンド (ホルモンなどの反応物質) が特定されていない受容体であるオーファン受容体は、その未知のリガンドを探索することが新規医薬品や先進医療技術の開発に直結するため、国際的に注目されている。

## 【0 0 0 3】

7回膜貫通型受容体ファミリーであるGタンパク質共役受容体 (GPCR: G-protein coupled receptor) は、遊離脂肪酸と反応して生理学的役割を発揮することで知られている。GPCRもオーファン受容体の1つで、特定のリガンドの結合によって細胞内のカルシウム濃度が上昇し、細胞の機能が発揮される。現在使用されている臨床薬の半分以上はこのGPCRをターゲットにしており、GPCRのリガンド探索は公的研究機関だけでなく創薬をめざす製薬会社、ベンチャー企業において盛んに行なわれている。

20

## 【0 0 0 4】

GPR40はGタンパク質共役受容体の1つで、GPR41とGPR43を含んだGPRと相同性のあるサブファミリーである。GPR40は、GPR41-43に沿って、ヒトの遺伝子座19q13.1、CD22の下流に局在する。2003年に膵臓と脳にGPR40の遺伝子が発現していることが報告されているが (非特許文献1および2)、最近では、GPR40のリガンドがアラキドン酸 (20:4 (n-6)) やドコサヘキサエン酸 (DHA) (22:6 (n-3)) のような中鎖、長鎖の不飽和脂肪酸であることがわかってきた (非特許文献1~3)。伊藤らは、膵臓におけるインスリンの分泌に脂肪酸とGPR40が関与していることを報告しており、膵臓でのインスリン分泌におけるGPR40の役割に関する論文が、ここ3、4年NatureやScienceなどに相次いで報告されている。

30

## 【0 0 0 5】

多価不飽和脂肪酸 (Poly unsaturated fatty acid: PUFA) は細胞増殖や体重の調節、エネルギーの補充などのためにいろいろ重要な生理学的役割を果たすにもかかわらず、詳細な機能やメカニズムは未だに不明である。最近のin vitroの研究で、PUFAはヒト乳癌細胞株の培養系でGPR40を経由して細胞増殖を刺激、または抑制することが示された (非特許文献4)。

40

## 【0 0 0 6】

動物モデルを使った疫学研究で、PUFAは脳の正常な機能においても重要な役割を果たすことが実証された。具体的な例を挙げると、加齢と共に低下した老齢ラットの海馬の長期増強 (LTP) や空間記憶は、栄養補助食品であるアラキドン酸によって改善することが可能であった。DHAは脳の発達や神経機能の維持に不可欠で、脳虚血の損傷の予防や神経細胞死の一機序であるアポトーシスの防止にも寄与する。さらにPUFAには神経保護作用があることも示唆されている。よって、GPR40は脳の生理的状態と病的状態との両方において、有意かつ実用的な価値があるといえる。

## 【0 0 0 7】

50

遊離脂肪酸に反応するGPR40のメカニズムは膵臓やエネルギー恒常性については解明されつつあるものの、脳におけるGPR40の機能については未だに明らかになっていない。

【0008】

発明者らはアラキドン酸やDHAなどのPUFAが、経口投与により器質的脳障害に起因する高次脳機能ことに記憶力の低下を改善する作用があることをすでに報告している（特許文献1）。さらに、発明者らはニホンザル（*Macaca fuscata*）の中樞神経系でGPR40が発現していることを報告している（非特許文献5）。

【0009】

以上の知見は、PUFAが細胞外シグナル伝達分子として作用し、GPR40を介して神経細胞の調節を行っているという可能性を示唆する。

10

【0010】

【特許文献1】特開2007-8863号公報

【非特許文献1】Itoh Y, et al., 2003, Nature 422:173-176.

【非特許文献2】Briscoe CP, et al., 2003, J Biol Chem 278:11303-11311

【非特許文献3】Kotarsky K, et al., 2003, Pharmacol Toxicol. 93:249-258

【非特許文献4】Hardy S, et al., 2000, Cancer Res 60:6353-6358

【非特許文献5】Ma D, et al., 2007, Neurosci Res 58:394-401

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、GPR40を介したニューロン新生のメカニズムを解明し、脳機能低下や脳機能障害を改善するための新たな手段を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記課題を解決するため、発明者らは正常ザルと虚血ザルとを用いて、神経再生ニッシュである海馬におけるGPR40の発現について研究した。その結果、正常ザルに比較して虚血ザルではGPR40陽性の新生ニューロンが有意に増加することを見出した。

【0013】

このことは、PUFAが細胞外シグナル伝達分子として作用し、GPR40受容体を通して神経細胞の調節を行っているという可能性を示唆する。

30

【0014】

以上の知見に基づき、本発明者らは、GPR40を介したニューロン新生の促進により、高次脳機能障害の予防や治療が可能になると考えた。

【0015】

すなわち、本発明は、被験物質によるGPR40の発現または活性化レベルの変化を指標として、該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価する方法に関する。

【0016】

1つの実施形態において、本発明の方法は以下の工程で実施する：

1) GPR40発現細胞を被験物質の存在下と非存在下で培養する；

2) 上記細胞におけるGPR40の発現または活性化レベルを測定する；

40

3) 被験物質の存在下におけるGPR40の発現または活性化レベルが、該被験物質の非存在下におけるGPR40の発現または活性化レベルと比較して有意に向上する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

【0017】

用いるGPR40発現細胞としては、たとえば神経幹細胞、新生ニューロンあるいは骨髄の間葉系幹細胞（将来的にニューロンに分化し得る）、遺伝子導入によりGPR40を強制発現させた組換え細胞を挙げることができる。

【0018】

前記方法において、GPR40の活性化レベルは、たとえば、細胞内カルシウム、cAMP、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロール等のセカンドメッセンジャー濃度あるいは膜

50

電位によって測定することができる。

【0019】

またGPR40の発現レベルは、たとえば、抗GPR40抗体を用いた免疫学的方法（ウエスタンブロッティング等）またはそのmRNAの定量的解析法（RT-PCR等）によって測定することができる。

【0020】

別な実施形態において、本発明の方法は以下の工程で実施する：

- 1) 動物に被験物質を投与する；
- 2) 被験物質の投与および非投与条件下における、当該動物の脳内におけるGPR40の発現レベルを測定する；
- 3) 被験物質の投与条件下におけるGPR40発現レベルが、非投与条件下におけるGPR40発現レベルと比較して有意に変化する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

10

【0021】

上記方法では、記憶や情動に関わる脳機能の評価には海馬や脳室下帯を対象としてGPR40の発現レベルを測定するが、高次脳機能全般にわたる評価の場合は大脳皮質や大脳基底核などのニューロンを対象として行なう。

【0022】

用いる動物としては霊長類が好ましい。動物は正常動物であっても、実験的脳虚血負荷後の動物であっても、両者を比較してもよい。

20

【0023】

前記方法において、GPR40発現レベルは、たとえば抗GPR40抗体を用いた免疫学的方法（ウエスタンブロッティング等）またはそのmRNAの定量的解析法（RT-PCR等）によって測定することができる。

【0024】

評価は、神経幹細胞、新生血管細胞、新生グリア細胞、および新生ニューロンから選ばれるいずれか1または2以上におけるGPR40の特異的発現レベルをみることによって行なってもよい。そのようなGPR40の特異的発現レベルは、神経幹細胞、新生血管、新生グリア、および新生ニューロンの特異的マーカーに対する抗体と抗GPR40抗体を用いた二重染色によってみることができる。

30

【0025】

本発明はまた、上記のような方法に用いることができる、抗GPR40抗体を含む、脳機能改善薬のスクリーニング用キットも提供する。前記抗GPR40抗体は適当なラベルで標識されていてもよく、ラベル体の検出のための試薬、二次抗体、反应用緩衝液、酵素、基質等、本発明の実施に必要な他の要素を含んでいてもよい。

【発明の効果】

【0026】

本発明によれば、GPR40を介したニューロン新生の促進を標的とした新たな脳機能改善薬の探索および開発が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0027】

1. 定義

本発明は、被験物質によるGPR40の発現または活性化レベルの変化を指標として、該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価する方法に関する。

【0028】

「GPR40」

本発明にかかる「GPR40」とは、Gタンパク質共役受容体の1つで、膵臓と脳での発現が確認されている。GPR40のリガンドは、アラキドン酸やDHAなどの多価不飽和脂肪酸であることが知られている。膵臓では、インスリンの分泌に脂肪酸とGPR40が機能していることが知られているが、脳におけるGPR40の機能についてはほとんど報告がない。

50

## 【 0 0 2 9 】

GPR40の遺伝子は、すでにマウス (GenBank Accession No. AF539809)、ラット (GenBank Accession No. AF539810)、ヒト (GenBank Accession No. AF024687)、サル等で解析され、その配列も上記のとおり公共のデータベースに登録されているため、容易に入手可能である。

## 【 0 0 3 0 】

本発明において「GPR40の発現レベル」とは、当該タンパク質の量に限定されず、これを間接的に示すすべての値を包含する。後述するように、GPR40の発現レベルは、GPR40に特異的な抗体を用いて、免疫化学的に測定することができる。

## 【 0 0 3 1 】

また、本発明において「GPR40の活性化レベル」とは、リガンドや薬剤が作用してGPR40が活性化される度合いを定量的に示す値であって、GPR活性化に続いて起きるシグナリングカスケードのセカンドメッセンジャー (cAMP、cGMP、カルシウムイオン、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロールなど) の濃度、あるいは、GPR40の活性化による細胞の興奮を示す膜電位として間接的に測定できる。

## 【 0 0 3 2 】

## 「脳機能改善薬」

本発明の方法において、「脳機能改善薬」とは、認知、記憶、情動、運動、感覚、睡眠、覚醒といった様々な脳機能の低下や障害に対し、これを改善あるいは治療する作用のある物質を意味する。特に、高次脳機能障害は、脳梗塞、一過性脳虚血発作などの虚血性脳卒中、脳出血、くも膜下出血などの出血性脳卒中や脳震盪や脳挫傷などの外傷性疾患、あるいは加齢により、脳の器質的障害が生じた際に認められる。脳機能障害としては、たとえば、半側身体失認、地誌的障害、失認症、失語症、記憶障害、失行症、注意障害、遂行機能障害や行動や情緒の障害などが挙げられる。

## 【 0 0 3 3 】

脳機能障害 (特に高次脳機能障害) の評価法としては、現在、ミニメンタルステイツ検査 (MMSE)、改訂長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R) やウェクスラー知能検査 (WAIS-R)、およびウェクスラーメモリースケール (WMS-R) などが用いられている。しかし、MMSEやHDS-Rは、精度と再現性に欠け、WAIS-RやWMS-Rは時間と労力がかかり過ぎるといった欠点がある。近年、高次脳機能をより高精度に再現性を持って評価する方法としてRBANS (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status) 神経心理テストがRandolphにより開発された。RBANS神経心理テストは、短時間 (30分程度) で、老人性認知症や統合失調症に代表される精神神経疾患などの早期診断や経過観察、および治療効果の判定ができ、脳血管障害や頭部外傷後の後遺症、すなわち高次脳機能障害の判定にも有用である (Yamashima et al., 脳と神経 Vol.54 463-471 (2002))。しかし、これらの心理テストは開発された脳機能改善薬の評価のためのものであって、薬剤候補のスクリーニング段階における、簡便かつ客観的手段とはならない。

## 【 0 0 3 4 】

## 「被験物質」

本発明で評価の対象となる「被験物質」は、生体に投与可能である限り特に限定されず、合成物であっても天然物であってもよい。被験物質は、細胞への添加あるいは動物への投与に適した形で調製され、適当な濃度で本発明の方法に適用される。

## 【 0 0 3 5 】

## 2. GPR40を利用した脳機能改善薬の評価方法

## 2.1 細胞を用いたin vitro評価系

培養細胞系を用いたin vitro評価系は以下の工程を含む：

- 1) GPR40発現細胞を被験物質の存在下と非存在下で培養する；
- 2) 上記細胞におけるGPR40の発現レベルあるいは細胞の興奮レベルを測定する；
- 3) 被験物質の存在下におけるGPR40の発現レベルあるいは細胞の興奮レベルが、該被験物質の非存在下におけるGPR40の発現レベルあるいは細胞の興奮レベルと比較して有意に

10

20

30

40

50

向上する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

【0036】

(1) GPR40発現細胞

本発明で用いられる細胞は、GPR40を発現している細胞であれば特に限定されず、例えば神経幹細胞、新生ニューロン、または骨髄の間葉系幹細胞（将来的にニューロンとなる）等を用いることができる。細胞は、ヒトに近い霊長類の細胞がよく、具体的には、サルの骨髄から採取した間葉系幹細胞や虚血海馬から採取した神経幹細胞や血管外皮細胞などを用いることができる。

【0037】

GPR40の遺伝子配列は公知であるため、GPR40を強制発現させた組換え細胞も用いることができる。たとえば、神経細胞のモデル細胞株として広く用いられているPC12細胞にGPR40遺伝子を導入し強制発現させた組換え細胞を用いることができる。そのような組換え細胞は、常法に従い例えば、(Molecular Cloning, A Laboratory Manual” Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照)、クローニングされたGPR40のcDNAを、適当なベクターを用いて導入して作製される。

10

【0038】

上記のようにして得られる組換え細胞は、常法にしたがって培養することにより、その細胞膜上に目的のGPR40を発現する。培養に用いられる培地は、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種培地を適宜選択して用いればよい。

【0039】

前記のようにして作製した、GPR40を安定的に発現している組換え細胞を被験物質の存在下と非存在下（添加条件または非添加条件下）で培養し、後述のようにGPR40の発現あるいは活性化レベルを測定する。

20

【0040】

(2) GPR40の発現レベルの測定

被験物質の作用によるGPR40の発現レベルの変化は、目的とするGPR40に特異的な抗体を用いて、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、またはRIA法等の免疫学的方法によって評価できる。

【0041】

検出に用いられる抗体は、公知の方法にしたがって調製できるし、市販のものを用いてもよい。抗体は、常法により、抗原となるGPR40、あるいはそのアミノ酸配列から選択される適当な断片を用いて動物を免疫し、該動物生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Pre num Press, N.Y.）にしたがって、特異的抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、これよりモノクローナル抗体を得ることもできる。

30

【0042】

抗体作製の抗原は、抗原であるGPR40またはその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド（エピトープ部分のポリペプチド）、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体（例えば、N末端付加するキーホールリンペットヘモシアニン）が付加された誘導体を挙げることができる。

40

【0043】

前記抗原ポリペプチドは、GPR40を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、GPR40をコードする遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させればよい。

【0044】

抗GPR40抗体は、それを直接標識するか、または該抗体を一次抗体とし、該一次抗体を特異的に認識する（抗体を作製した動物由来の抗体を認識する）標識二次抗体と協同で検出に用いられる。

50

## 【0045】

前記標識の種類として好ましいものは、酵素（アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）またはビオチン（ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる）であるが、これらに限定されない。標識二次抗体（または標識ストレプトアビジン）としては、予め標識された抗体（またはストレプトアビジン）が、各種市販されている。なお、RIAの場合は<sup>125</sup>I等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンター等を用いて行う。

## 【0046】

これら標識された酵素の活性を検出することにより、GPR40の発現量が測定される。アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合、これら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

10

## 【0047】

発色する基質を用いた場合、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法を利用すれば、目視で検出できる。ELISA法では、市販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度（測定波長は基質により異なる）を測定し、定量することが好ましい。また上述の抗体作製に使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行い、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することも可能である。

## 【0048】

一方、発光する基質を使用した場合は、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては、X線フィルムまたはイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができる。また、デンシトメトリーやモレキュラー・イメージャー-Fxシステム（パイオラッド社製）等を利用した定量も可能である。さらに、ELISA法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー（例えば、パイオラッド社製等）を用いて酵素活性を測定する。

20

## 【0049】

あるいは、GPR40のmRNAの発現レベルを定量的に解析することにより、GPR40の発現レベルを解析してもよい。mRNAの発現レベルは、当該mRNAを特異的に増幅または検出するプライマーやプローブを用いて、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、クロスハイブリダイゼーション法、または遺伝子チップ、cDNAアレイ、およびメンブレンフィルター等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法によって評価できる。

30

## 【0050】

## (3) GPR40の活性化レベルの測定

被験物質の作用によりGPRが刺激（活性化）されると、シグナリングカスケードが活性化され、セカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンをはじめ、cAMP、cGMP、イノシトール三リン酸、ジアシルグリセロールなどのセカンドメッセンジャーの細胞内濃度が高まるとともに、細胞の膜電位を変化させる。したがって、被験物質のGPR40に対する作用は、上記セカンドメッセンジャーの濃度やカルシウムイオン（Ca<sup>2+</sup>）濃度、膜電位の変化等を指標として評価することができる。

40

## 【0051】

細胞内cAMP濃度は、例えば、抗cAMP抗体を用いた競合的ELISA等により測定することができる。そのような方法は当該技術分野で周知であり、そのためのキット（HitHunter<sup>TM</sup> FC cAMP Assay : Applied Biosystems等）も市販されている。

## 【0052】

また、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化の測定は、例えばFLIPR（Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Device）を利用して行うことができる。FLIPRは細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を96穴または384穴プレート上でハイスループットに測定可能な装置である。蛍光試薬（Fluo3）を取り込ませた細胞にリガンド刺激した際に上昇する蛍光強度を測定することによって、その物質が細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に及ぼす影響を調べることができる。

50

## 【0053】

膜電位は、常法にしたがい、パッチクランプ法や膜電位プローブを用いた光学測定法等により測定することができる。たとえば、被検ニューロンに膜電位感受性色素であるdi-8-ANEPPSを局所注入法により取り込ませて、頻回刺激中によって生じる電位変化を光学的測定法により可視化する。

## 【0054】

## (4) 判定評価

被験物質の存在下におけるGPR40の発現あるいは活性化レベルが、非存在下におけるGPR40の発現あるいは活性化レベルと比較して有意に(たとえば $p < 0.05$ )向上する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

10

## 【0055】

評価は、被験物質によるGPR40の発現あるいは活性化に及ぼす効果を、比較対照なしに評価するものであってもよいし、適当な対照と比較評価するものであってもよい。例えば、被験物質の存在しない条件下でのGPR40の発現量や細胞内cAMP濃度や $Ca^{2+}$ 濃度、膜電位(正常値)がわかっているならば、この正常値と被験物質の投与条件下による発現量や細胞の興奮を比較することで、比較対照なしに当該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価することができる。しかしながら、より正確な評価のためには、被験物質の存在(投与)および非存在(非投与)条件下において、比較評価することが好ましい。

## 【0056】

## 2.2 動物を用いたin vivo評価系

20

動物を用いたin vivo評価系は以下の工程を含む：

1) 動物に被験物質を投与する；

2) 被験物質の投与および非投与条件下における、当該動物の脳内におけるGPR40の発現レベルを測定する。

3) 被験物質の投与条件下におけるGPR40発現レベルが、非投与条件下におけるGPR40発現レベルと比較して有意に変化する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

## 【0057】

上記方法では、記憶や情動に関わる脳機能の評価には海馬や脳室下帯を対象としてGPR40の発現レベルを測定するが、高次脳機能全般にわたる評価の場合は大脳皮質や大脳基底核などのニューロンをも対象として行なう。

30

## 【0058】

## (1) 動物

動物はヒトに近い霊長類、たとえばサルが好ましい。動物は、正常動物であっても、脳虚血負荷後の動物でもよいが、正常および脳虚血負荷後の動物を比較評価することがより好ましい。その理由は、正常動物に比べて虚血動物では、海馬および脳室下帯におけるニューロン新生が亢進しているため、GPR40を発現する細胞が増加している、評価しやすいからである。また、被検動物の記憶機能は脳虚血負荷により低下するので、記憶障害をきたすヒトの病気を念頭に置きつつ、治療効果の判定がしやすいという利点もある。

## 【0059】

40

動物への被験物質の投与方法は特に限定されず、用いる被験物質の性質に応じて、経口、静注、脳内投与あるいは脳脊髄腔内投与など適宜選択し、その投与経路と動物の体重、年齢、被験物質の種類に応じて被験物質の投与量を適宜決定する。

## 【0060】

## (2) GPR40発現レベルの測定

つぎに、上記動物の脳を摘出し、海馬や脳室下帯など関心部位でのGPR40発現レベルを測定する。GPR40の発現レベルの変化は、前述したとおり、目的とするGPR40に特異的な抗体を用いて、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、またはRIA法等の免疫学的方法によって評価できる。

## 【0061】

50

あるいは、GPR40のmRNAの発現レベルを定量的に解析することにより、GPR40の発現レベルを解析してもよい。mRNAの発現レベルは、当該mRNAを特異的に増幅または検出するプライマーやプローブを用いて、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、クロスハイブリダイゼーション法、または遺伝子チップ、cDNAアレイ、およびメンブレンフィルター等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法によって評価できる。

【0062】

本発明では、特に海馬の歯状回あるいは脳室下帯におけるGPR40発現レベルを評価する。なぜなら、神経幹細胞からのニューロンの新生は、哺乳類成体の中枢神経系では、側脳室の脳室下帯と海馬の歯状回の顆粒下帯に限られているからである。

10

【0063】

さらに、上記領域において、脳機能に重要な神経幹細胞、新生血管、新生グリア、新生ニューロン等における特異的発現をみることにより被験物質のGPR40発現に対する効果をより詳細に評価してもよい。各細胞に特異的な発現は、神経幹細胞であればネスチンやムサシ1、新生血管細胞であれば第8因子(フォンビレブランド因子)、新生グリア細胞(アストロサイト)であればS100、新生ニューロンであればPSA-NCAMやIIIツブリン、ダブルコルチンなどをマーカーとして抗GPR40抗体との二重染色によりみることができ。

【0064】

(3) 判定評価

被験物質の投与条件下におけるGPR40発現レベルが、非投与条件下におけるGPR40発現レベルと比較して有意に(たとえば $p < 0.05$ )変化する場合、該被験物質を脳機能改善薬として有効と判定する。

20

【0065】

In vitroでの方法と同様、評価は被験物質がGPR40の発現レベルに及ぼす効果を、比較対照なしに評価するものであってもよいし、適当な対照と比較評価するものであってもよい。例えば、生理的条件下でのGPR40の発現量(正常値)がわかっているならば、この正常値と被験物質の投与条件下による発現量や細胞の興奮を比較することで、比較対照なしに当該被験物質の脳機能改善薬としての効果を評価することができる。しかしながら、より正確な評価のためには、被験物質の投与および非投与条件下で比較評価したり、脳虚血の前後において比較評価することが好ましい。さらに、二重染色によって各細胞におけるGPR40の特異的発現量を見てもよい。

30

【0066】

3. 検査用キット

本発明はまた、本発明の方法に用いられる、脳機能改善薬のスクリーニング用キットも提供する。本発明のキットは、必須の構成要素として抗GPR40抗体を含む。

【0067】

前記抗GPR40抗体の由来は、対象とする動物のGPR40が検出可能であれば特に限定されないが、抗ヒトGPR40抗体が好ましい。抗ヒトGPR40抗体は、前述した方法により作製することができる。

【0068】

さらに、本発明のキットは、前述した二重染色に用いられる、他の細胞特異的マーカー(たとえば、神経幹細胞であればネスチンやムサシ1、新生血管細胞であれば第8因子、新生グリア細胞(アストロサイト)であればS100、新生ニューロンであればPSA-NCAMやIIIツブリン、ダブルコルチンなど)に対する抗体を含んでいてもよい。

40

【0069】

前記した各種抗体は、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてもよいし、ビオチン等により適当に修飾されていてもよい。また、前記抗体やサイトカインあるいはその断片は、適当な支持体に固相化されていてもよいし、あるいは固相化可能なように別個に支持体がキットに含まれていてもよい。そのような支持体としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリメタ

50

クリレート、ポリアクリルアミド等の蛋白を付着可能な合成樹脂、ガラス、ニトロセルロース、セルロース、およびアガロース製の支持体、あるいはゲル型支持体を使用することができる。支持体の形態は特に限定されないが、極小球あるいはビーズ（例えば、“ラテックス”ビーズ）などの微粒子、微量遠心チューブなどのチューブ（内壁）、マイクロタイタプレート（ウェル）等の形態で提供される。

【0070】

本発明のキットは上記した構成要素のほか、必要に応じて、ラベル体の検出のための試薬、二次抗体、反応用緩衝液、酵素、基質等、本発明の実施に必要な他の要素を含んでいてもよい。

【0071】

4. その他

GPR40の発現は、脳機能と関連する。発明者らはアラキドン酸やDHA等のPUFAが脳機能を改善することを実証しているが、アラキドン酸やDHA等のPUFAはGPR40のリガンドでもある。したがって、GPR40の制御は脳機能や脳疾患治療のターゲットとして重要であり、たとえば、脳脊髄液中に遊離したGPR40を指標として脳機能や脳疾患を診断できる可能性もある。

【実施例】

【0072】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

【0073】

実施例1：脳虚血による海馬でのGPR40発現の変化

1. 材料および方法

(1) 動物

ニホンザル (*Macaca fuscata*) は、空調が効いたケージ内で、水および餌は自由摂取の状態に飼育し、金沢大学学際科学実験センターにある実験動物研究施設で後述する一過性脳虚血処置を施した。全ての実験手順は、金沢大学とNIHの動物研究室の利用およびケアのガイドラインに厳密に従って行った。

【0074】

(2) 虚血ザルの作製

体重5-10kg、若齢または青年のサルを合計27匹用いて、ウエスタンプロットティング（15匹、コントロール、day 4、7、9、15のグループに対しそれぞれn=3）と免疫蛍光組織化学法（12匹、コントロール、day 4、9、15のグループに対しそれぞれn=3）を実施した。21匹のサルは、GOF全身麻酔下で無名動脈と左鎖骨下動脈を20分間クランプし、完全な一過性の全脳虚血状態を起こさせた (Yamashima T. et al., 1998, Eur J Neurosci 10:1723-1733, Yamashima T. et al., 2000, Prog Neurobiol 62:273-295)。対照群として、6匹のサルには偽手術を行った。

【0075】

免疫蛍光組織化学法については、サンプリングの日に、それぞれの動物に対して、常法にしたがいGOF全身麻酔下で心臓内に生理食塩水を灌流し、次いで4%パラフォルムアルデヒドを灌流した後、開頭し脳を摘出する。海馬の組織片を採取した後、凍結保護のため30%スクロースに浸してから、O.C.T. mediumで凍結し、40μmの厚さの冠状切片を作製した。ウエスタンプロットティングについては、全身麻酔下で脱血後、心臓内に冷たい生理食塩水を灌流し、素早く開頭し脳を摘出した。新鮮なサンプルはすぐに液体窒素に浸漬し、検索に使用するまで-80℃で保存した。

【0076】

(3) GPR40抗体の調製

ヒトGPR40 (CAARTQGGSQK: 配列番号1) のC末端には、289-300位に相当する12個のアミノ酸のペプチドが局在している。この配列はGPR41、GPR43、GPR120には見られず、GPR40に特異的に見られる配列である。このペプチドはABI 430A peptide synthesizer (Appli

10

20

30

40

50

ed Biosystems, Foster city, USA) を使って合成し、そのN末端にスルフヒドル基を介して maleimidyl keyhole limpet hemocyanin を接合させた。免疫化は、既報 (Ma et al., 2007, 前掲) の方法にしたがい実施した。すなわち、前述のペプチドを乳化したものとフロイトアジュバンドを日本産のホワイトラビットの皮下に注射し、血清を分離し、ELISA で確認した。最後に、硫酸アンモニウム沈殿 (40% 飽和) 後に、粗製 IgG 画分を GPR40 ペプチドと接合し、約 5.9 mol peptide/column に濃縮し、Affi-Gel 102 (Aminoalkylagarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で精製した。免疫前のラビット血清と吸着前の抗体をネガティブコントロールとして、ウエスタンブロッティングでバンドが検出されないことを確認した。

【0077】

10

#### (4) 免疫組織化学

全ての染色は凍結薄切切片で行った。細胞の BrdU 取り込みを明らかにするために、DNA を HCL とホルムアミド処理して変性させた (Tonchev AB, et al., 2003, Mol Cell Neurosci 23:292-301.)。氷結切片は Triton X-100 (TBS-T) を含んだトリス緩衝液 (TBS) 内でインキュベートし、一次抗体とインキュベーションの前に標準血清でブロックした。一次抗体としては、ウサギポリクローナル抗ヒト GPR40 (1:100)、マウスモノクローナル抗ヒトネスチン (1:200, Chemicon)、マウスモノクローナル抗ヒト CD31 (1:50, Dako, Denmark)、マウスモノクローナル抗 S100 (1:800, Sigma)、マウスモノクローナル抗 NeuN (1:50, Chemicon)、マウスモノクローナル抗ヒトグリア繊維性酸性タンパク質 (GFAP) (1:1000, Dako, USA)、ポリシアル酸化神経細胞接着分子 (PSA-NCAM) (1:500, Seki and Arai, 1999)、マウスモノクローナル抗  $\beta$ -tubulin (1:400, Sigma)、ヤギポリクローナル抗ダブルコルチン (Doublecortin: DCX) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) などの抗体を使用した。

20

【0078】

一次抗体を Alexa Fluor 488, 546 (Molecular probes, Eugene, OR, USA) を結合させた二次抗体を用いて可視化した。二重染色のため、それぞれ一次抗体とは異なる免疫動物種を用いた。ネガティブコントロールとしては、一次抗体を除いた実験を行ったが、陽性所見は見られなかった。

【0079】

30

#### (5) ウエスタンブロッティング

サンプルをプロテアーゼ阻害剤、Triton-X と PIPA Buffer (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% NaDOC, 0.05% SDS) (Sigma) の混合物中で 30 分間、氷中で溶解した。組織はホモジナイズし、4℃ で 20 分間 12000 rpm で遠心、細胞可溶化液を得た。タンパク濃度はブラッドフォード法により決定した。

【0080】

タンパク質を電気泳動し、110mA、1時間 semi-dry 方式 (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて Hybond PVDF 膜 (Amersham Pharmacia Biotech) に移動させた。その後ブロッキングし、ウサギポリクローナル抗ヒト GPR40 抗体 (1:1000)、マウスモノクローナル抗  $\beta$ -アクチン抗体 (1:10000, Sigma) をそれぞれ 4℃、一晩インキュベートした。PVDF 膜を 3 回すすぎ、室温で 1 時間、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) が接合した抗ウサギまたはマウス IgG (1:10000, Sigma) をインキュベートし、化学発光増強 (ECL) 検出システム (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を行った。

40

【0081】

GPR40 タンパクは脳や脾臓にごく少量しか含まれていないので、内部標準タンパクの  $\beta$ -アクチンと比較するために、GPR40 は SDS-PAGE の各レーンに 150  $\mu$ g のタンパクをアプライし、 $\beta$ -アクチンは各レーンに 30  $\mu$ g のタンパクをアプライし、それぞれ別個に電気泳動を行った。

【0082】

#### (6) 画像化と数値解析

染色切片は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510; Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を用いて調

50

べた。Alexa Fluor 488は緑のチャンネルに整え、Alexa Fluor 546は赤のチャンネルに整えた。分析するために、全ての陽性細胞をz軸に沿って調べ、他のマーカーと完全に共存している時は、その陽性細胞数をカウントした。GPR40陽性細胞は、少なくとも3つの異なるサル脳と6つの異なる部位の切片を用いて評価した。共ラベルした細胞密度は、同じ基準でLSM 510ソフトウェアを使って計測した。データは少なくとも3頭の異なる実験動物から取得し、データは $\pm$ S.E.Mで表示した。SGZ (Subgranular zone: 海馬歯状回顆粒細胞下層) は歯状回の最内側に沿って50  $\mu$ mまでと定義した。

#### 【0083】

ウエスタンブロッティングのバンドの強度は、NIH Image Analysis Software Version 1.62 (NIH, Bethesda, MD) を使って測定した。データは $\pm$ S.E.Mで表示した。SPSS 11.5 による一方向性ANOVA法に従い統計解析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

10

#### 【0084】

### 2. 結果

#### (1) 虚血状態におけるSGZニッシェでのGPR40の発現

発明者らは、すでに成体サルにおいて、海馬のSGZでGPR40の発現を確認している。本研究では、虚血をおこしていない条件下のSGZにおいて、GPR40陽性 (GPR40<sup>+</sup>) 細胞の表現型を決定し、血管内皮細胞のマーカーであるCD31、アストロサイトのマーカーであるS100、成熟した神経細胞マーカーであるNeuN、神経幹細胞のマーカーであるネスチンやムサシ1などの特異性のあるマーカーを使って、二重染色を行った。二重染色により、SGZでネスチン陽性細胞がGPR40免疫活性部位に発現し (図1A)、いくつかのCD31陽性血管内皮細胞が微小血管壁でGPR40を発現していることがわかった (図1B)。興味深いことに、SGZでS100陽性アストロサイトはGPR40を発現したが、SGZから離れた場所のアストロサイトはGPR40を発現しなかった (図1C)。一方では、顆粒細胞層 (GCL) でNeuN陽性顆粒細胞は、以前の報告通りGPR40と共ラベルし (MA et al., 2007, 前掲)、多くのGPR40陽性/NeuN陰性細胞がSGZで観察された (図1D)。

20

#### 【0085】

#### (2) 虚血後のSGZニッシェにおけるGPR40の発現

虚血後のSGZでのGPR40の発現を評価するために、正常コントロールと虚血後の海馬でのGPR40の発現を比較した。虚血4日後のネスチン (図2A) またはCD31 (図2B) とのGPR40陽性細胞の共ラベルの密度は、コントロールと比べて有意に増加した。しかしながら、虚血15日後までNeuN/GPR40二重陽性細胞は検出されなかった。

30

#### 【0086】

図1Cに示したとおり、ほんのわずかなアストロサイトがSGZでのGPR40陽性を示した。アストロサイトは神経細胞の重要なサポーターとして知られている。よって、SGZのアストロサイトでのGPR40の発現の比較を、虚血後と虚血前とで行った (図2C, D)。虚血4日後とコントロールを比較したところ、S100/GPR40共ラベルの密度は5倍に増加し (図2C3)、S100/GPR40共ラベルの数は2.5倍に増加した。別のアストロサイトマーカーであるGFAPを使用した場合にも、同じ結果が確認された (図2D)。

#### 【0087】

#### (3) 虚血後のGPR40のアップレギュレーションとニューロン新生

コントロールと虚血後のサンプルを用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、GPR40の発現に大きな変化が見られた。GPR40のタンパクレベルは2週目まで徐々に増加し、虚血後15日目で最大の発現が見られた (図3A, B)。内部標準物質である $\beta$ -actinのバンドと比較してGPR40バンドの濃度定量化を行い、統計学的に有意に増加していることを明らかにし得た (図3B)。

40

#### 【0088】

重要なことは、SVZでのGPR40陽性/NeuN陰性細胞の数が虚血後に増加していることである。GPR40陽性/NeuN陰性細胞をコントロール (図3C1)、虚血後9日目 (図3C2)、虚血後15日目 (図3C3) のサンプルと比較した結果、有意な差が明らかに見られた (図3C4)。

#### 【0089】

50

GPR40がSGZの新生ニューロンに発現しているかどうか同定するために、虚血負荷をかけていないサンプルに対して、GPR40とPSA-NCAM、III-ツブリンまたはダブルコルチンなど幼若ニューロンのマーカーを二重免疫蛍光法で用いた。興味深いことに、3つのマーカー全てがそれぞれGPR40と共ラベルされた(図4A、B、C)。

【0090】

虚血後のSGZで新しく産生された細胞の増加は、GPR40と直接的あるいは間接的に関連している可能性が予測された。そこで、これを明らかにするため、PSA-NCAM/GPR40の共ラベルをコントロール(図4D1)として、虚血後9日後(図4D2)、虚血後15日後(図4D3)と比較した。これは虚血後に新しく産生されたニューロンがピークとなる時期をみるためである(Tonchev et al., 2003, 前掲)。その結果、虚血後のPSA-NCAM/GPR40陽性細胞の数は、コントロールと比べて虚血後9日目では約1.5倍、虚血後15日目では約2倍増加し(図4D4)、虚血後のSGZで新しく産生された細胞の増加は、GPR40の発現と関連していることが確認された。

10

【0091】

### 3. 考察

興味深いことに、ウエスタンブロッティングと免疫組織化学では虚血負荷後2週目でGPR40の発現量が増加することを示し、虚血成体脳でのニューロン新生がピークとなるタイムポイントと一致していた。これらのデータから、GPR40は虚血後のニューロン新生と密接に関連している可能性が示された。

【0092】

本研究では、GPR40タンパクがSGZで血管内皮細胞とアストロサイトに存在することを確認した。SGZにおける血管内皮細胞は、神経幹細胞や後の組織修復に関わる血管新生のニッシュ形成のために重要であることが知られている。血管内皮細胞は、神経細胞の分化や神経前駆細胞の自己再生の促進のために、周囲の前駆細胞にシグナルファクターを分泌する。

20

【0093】

GPR40のリガンドは、アラキドン酸やDHAなどのPUFAであることが示されている。そして、発明者らはアラキドン酸やDHAなどのPUFAの経口投与により高次脳機能の低下が改善されることを報告している。

【0094】

血中を循環するDHAは血液脳関門を通過して取り込まれ、脳内のDHAの適切なレベルが維持されるが、アストロサイトもDHAを合成できる。アストロサイトは神経ニッシュに不可欠な構成成分で、神経細胞の機能を助けることが知られており、アストロサイトは、神経幹細胞の増殖および分化促進の両面で、成体脳のニューロン新生を調節している。

30

【0095】

発明者らは虚血後に成人のニューロン新生が有意に亢進する理由について、SGZニッシュでGPR40受容体のアップレギュレーションや自己調節がアストロサイト上で作用するためと推定する。

【0096】

コントロールと虚血後SGZの両方において、GPR40はPSA-NCAMまたはダブルコルチン陽性の新生ニューロンと神経幹細胞であるネスチン陽性細胞に発現していた。GPR40とPSA-NCAMまたはダブルコルチンの二重染色は、成人サルのコントロールと虚血海馬においてGPR40が神経発生早い段階で関与していることを示した。この結果から、SGZの新生アストロサイトと血管内皮細胞が発現するGPR40の虚血後の増加は、局在しているDHA濃度の増強を助け、また細胞外シグナル分子として作用するのではないかと考えられた。

40

【0097】

一方、新生神経ニューロンや神経前駆細胞でのGPR40の免疫染色活性は、SGZニッシュのDHA増加と一致して増大した。SGZでのDHAのシグナル増加は、GPR40受容体の発現増加を介して、新生ニューロンの産生や分化を誘発している可能性がある。従って、DHAとGPR40の両方が、成体海馬でのニューロン新生を助けるニッシュ成分として重要であると考えられ

50

た。

【0098】

実施例2：GPR40強制発現細胞に対する多価不飽和脂肪酸の効果

1. 方法

(1) GPR40遺伝子導入PC12細胞の作製

発現ベクターとしてはpCruzHA (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)を用いた。プラスミドは NotI で消化し、ラットGPR40 cDNA の NotI site に張り付けた。LipofectAMINE reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、ラット GPR40 in pCruzHA をPC12細胞に発現させた。GPR40-containing vectorによる遺伝子導入はPCRで確認した。発現ベクターとGPR40の遺伝子配列を参考に、T7 promoter sense primer (5' -TTAATAC GACTCACTATAGGG-3' : 配列番号2) とGPR40 antisense primer (5' -GAGCCATTCACGGGTATG TT-3' : 配列番号3)をデザインした。PCRは、94 30秒, 50 30秒, 72 2分の条件下で34回繰り返した。

10

【0099】

(2) アラキドン酸添加に対する細胞内カルシウム濃度の変化

GPR40遺伝子導入PC12細胞にEDTAの存在下および非存在下でアラキドン酸 (Arachidonic acid : AA) 10 μMを添加し、細胞内カルシウムイオン濃度の経時的变化をEDTAの存在下と非存在下で測定した。

【0100】

2. 結果

図5に示すように、培養液に、カルシウムイオンをキレートするEDTAを入れておいてもカルシウムイオンの上昇が生じている。したがって、カルシウムイオンの上昇は細胞外からの流入ではなく、細胞内の動員であることが示唆された。以上より、GPR40の遺伝子をラット由来のPC12細胞に導入すると、細胞はアラキドン酸に対して興奮することが確認された。

20

【0101】

参考例1：器質的脳障害に対する多価不飽和脂肪酸の効果

1. 方法

器質的脳疾患 (脳卒中や脳挫傷) の後遺症としてRBANS神経心理テストの評価点が40点以下 (正常者の平均点は50点) の記憶障害がみられる患者50例に、一日量で240mgのアラキドン酸とドコサヘキサエン酸を90日間服用させ、服用前後における高次脳機能をアーバンス神経心理テストにより評価した。

30

【0102】

2. 結果

図6に示されるように、服用前に比べて、服用後には、記憶力 (即時記憶力と遅延記憶力) が有意 ( $P < 0.001$ ) に改善することが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0103】

本発明によれば、GPR40を介したニューロン新生を標的とした新たな脳機能改善薬の探索および開発が可能になる。

40

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1】図1は、虚血負荷をかけていない状態下でのSVZにおけるGPR40陽性 (GPR40+) の細胞表現型を示す。(A) ネスチン (赤) とGPR40 (緑) の二重染色は、GPR40の免疫染色活性がネスチン陽性前駆細胞にあることを示した。(B) CD31 (赤) とGPR40 (緑) の二重染色では、GPR40の免疫染色活性が微小血管壁であるCD31陽性血管内皮細胞に少数、存在することが明らかになった。(C) S100 (赤) とGPR40 (緑) の二重染色では、GPR40の免疫活性がSGZのアストロサイトにいくつか局在していた (矢印)。着目すべき点として、SGZから離れているアストロサイトは、GPR40と免疫活性を示さなかった (矢頭)。(D) NeuN (赤) とGPR40 (緑) の二重染色は、NeuN陽性細胞にGPR40の免疫活性が存在する

50

ことを示した。注意すべき点として、SGZに少しのGPR40陽性/NeuN陰性の細胞も存在した。

【図2-1】図2-1は、虚血後のSGZニッチェにおけるGPR40発現量の変化を示す。(A)SGZでのコントロール(A1)と虚血後4日目(day4)(A2)のネスチン(赤)とGPR40(緑)の二重染色は、ネスチン/GPR40二つとも陽性の割合密度が虚血後のSGZで増加していることを明らかにした(A3)。(B)SGZでのコントロール(B1)と虚血後4日目(day4)(B2)のCD31(赤)とGPR40(緑)の二重染色は、GPR40陽性血管内皮細胞の分布密度が虚血後のSGZで増加していた(B3)。

【図2-2】図2-2は、虚血後のSGZニッチェにおけるGPR40発現量の変化を示す。(C)SGZでのコントロール(C1)と虚血後4日目(day4)(C2)のS-100とGPR40(緑)の二重染色では、虚血後のSGZでGPR40陽性アストロサイトの割合密度が増加していた(C3)。S100/GPR40二つともラベルされた細胞の絶対数を定量解析すると、虚血後4日間で有意に増加していた。(D)SGZでのコントロール(D1)と虚血後4日目(day4)(D2)のGFAP(赤)とGPR40(緑)の二重染色は、同じ結果であった。

【図3】図3は、虚血後のSGZにおけるGPR40発現量の増加を示す。(A)ウエスタンブロッティングは、虚血後1~2週目にGPR40の発現量増加が起きていることを示した。(B)濃度定量化は、虚血後4日と7日の組み合わせを除いて、各グループ間で有意な差が示した。(C)コントロール(C1)と虚血後9日目(C2)と虚血後15日目(C3)でのNeuN(赤)とGPR40(緑)の二重染色は、虚血後のSGZでGPR40陽性/NeuN陰性細胞が有意に増加していた(C4)。

【図4】図4は、GPR40の発現量と成体脳におけるニューロン新生を示す。(A-C)GPR40とPSA-NCAM(赤)、βIIIツブリン(赤)、ダブルコルチン(DCX)(赤)の二重染色は、コントロールサル(SGZ)において、PSA-NCAM(A)、βIIIツブリン(B)、ダブルコルチン(DCX)(C)陽性細胞とGPR40は免疫活性があることを示した(矢印)。(D)コントロール(D1)と虚血後9日目(D2)と虚血後15日目(D3)でのPSA-NCAM(赤)とGPR40(緑)の二重染色は、PSA-NCAM/GPR40の両方がラベルされた細胞が虚血後4日目(day4)のSGZで有意に増加していることが示された。

【図5】図5は、GPR40を強制発現させたPC12細胞におけるカルシウムイオン濃度の変化をみたものである。縦軸はカルシウムイオンの上昇(すなわち、細胞の興奮度)を、横軸は時間経過(秒)を示す(AA:アラキドン酸、Ca:カルシウムイオン)。 $[10\mu\text{M AA}]$ はアラキドン酸を投与したタイムポイントを示す

【図6】図6は、器質的脳疾患(脳卒中、脳挫傷)の後遺症として記憶障害がある患者にアラキドン酸とドコサヘキサエン酸を服用したときのアーバンス神経心理テストの評価点を示す。縦軸は、高次脳機能を検査したアーバンス神経心理テストの評価点(IMEM:即時記憶力(覚え込む力)、VISION:図形&空間能力、LANG:言語能力、ATT:注意&集中力、DELMEM:遅延記憶力(思い出す力)、ALL:総合点)

【配列表フリーテキスト】

【0105】

配列番号1:合成ペプチド

配列番号2:プライマー

配列番号3:プライマー

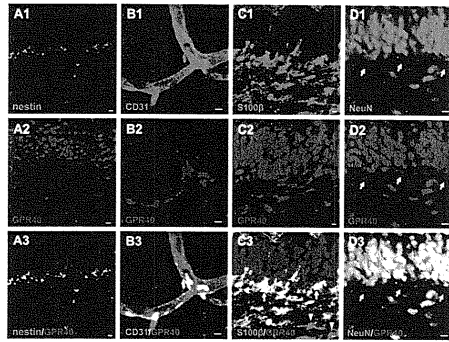
10

20

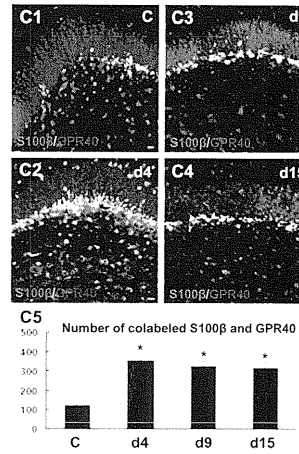
30

40

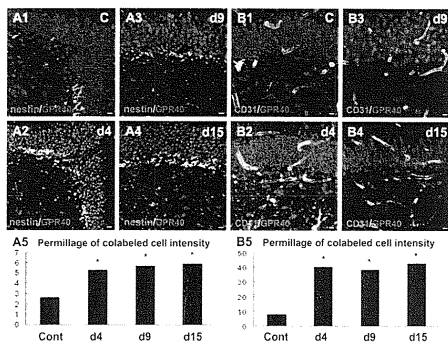
【 図 1 】



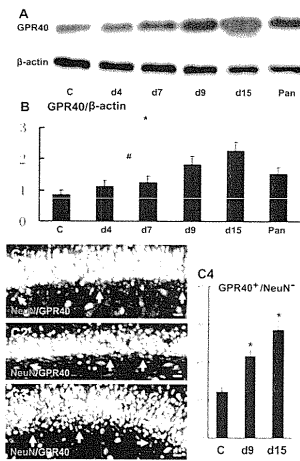
【 図 2 - 2 】



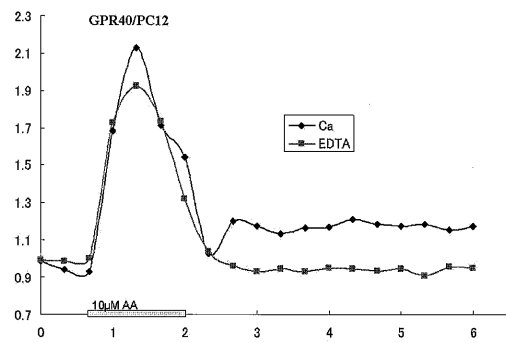
【 図 2 - 1 】



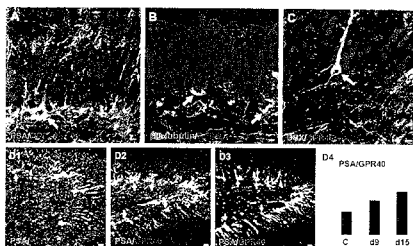
【 図 3 】



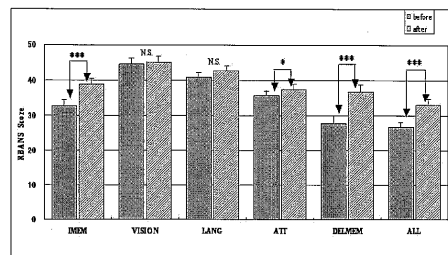
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【配列表】

2009145116000001.app

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA12 DA03 EA04 FA02 GA11 HA11  
4B063 QA01 QA07 QQ08 QQ13 QQ53 QR08 QR42 QR55 QS25 QS36  
QX02 QX04

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用GPR40评价脑功能改善药物的方法  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2009145116A</a>   | 公开(公告)日 | 2009-07-02 |
| 申请号            | JP2007320976  | 申请日     | 2007-12-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人金沢大学  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 国立大学法人金沢大学  |         |            |
| [标]发明人         | 山嶋哲盛  |         |            |
| 发明人            | 山嶋 哲盛   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/50 C12Q1/02 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/50.Z C12Q1/02.ZNA C12N15/00.A G01N33/15.Z G01N33/53.D  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DB07 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX04 |         |            |
| 代理人(译)         | 松任谷裕子   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新方法，通过GPR 40阐明神经元新生命的机制，以改善大脑功能的抑郁或阻塞。解决方案：使用GPR 40的表达，通过待检物质或激活水平的变化作为指标，评价作为脑功能改善药物的待检物质的作用。Z

