

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/058336

発行日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(43) 国際公開日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 B O 6 3
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 6 3
A 6 1 K 31/498 (2006.01)	A 6 1 K 31/498	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2007-545328 (P2007-545328)	(71) 出願人	000004569
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/323063		日本たばこ産業株式会社
(22) 国際出願日	平成18年11月14日(2006.11.14)		東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(81) 指定国	AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW	(71) 出願人	504145364
			国立大学法人群馬大学
			群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
		(74) 代理人	100100217
			弁理士 大東 輝雄
		(72) 発明者	立元 一彦
			日本国東京都豊島区高田2-18-15-511
		(72) 発明者	内藤 隆之
			日本国神奈川県横浜市金沢区能見台6丁目14-3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 R e c 1 6 8 を介する肥満細胞の脱顆粒反応抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質のスクリーニング方法及び同定方法、並びにそれら物質を含有してなる炎症性疾患の治療剤

(57) 【要約】

本発明は、G蛋白質共役型受容体R e c 1 6 8を介する新たなメカニズムに基づくアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の治療剤の開発のための、脱顆粒調節物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質のスクリーニング方法及び肥満細胞における脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質の同定方法の提供を目的とする。

本発明は、R e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドの存在下に、被験物質の非共存下及び共存下におけるR e c 1 6 8に対する該リガンドのシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、R e c 1 6 8を介するシグナル伝達能抑制物質、肥満細胞における脱顆粒調節物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質のスクリーニング方法及び肥満細胞における脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質の同定方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Rec 168を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてRec 168アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec 168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】

更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるRec 168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を測定し比較することを特徴とする請求の範囲 1 に記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 3】

Rec 168を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてRec 168アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec 168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質の同定方法。

【請求項 4】

更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるRec 168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を測定し比較することを特徴とする請求の範囲 3 に記載の同定方法。

【請求項 5】

20

請求の範囲 3 又は請求の範囲 4 に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジンD₂産生抑制剤。

【請求項 6】

下記から選ばれる少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する請求の範囲 5 に記載の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジンD₂産生抑制剤。

- ・ 1 - (10H-フェナジン-5-イル) - エタノン、
- ・ 2 - アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3 - (ピリジン-2-イルメチル) - 2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

30

【請求項 7】

請求の範囲 3 又は請求の範囲 4 に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

【請求項 8】

下記から選ばれる少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する請求の範囲 7 に記載の肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

- ・ 1 - (10H-フェナジン-5-イル) - エタノン、
- ・ 2 - アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3 - (ピリジン-2-イルメチル) - 2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

40

【請求項 9】

Rec 168アンタゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジンD₂産生抑制剤。

【請求項 10】

Rec 168アンタゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

【請求項 11】

Rec 168蛋白質もしくはその部分ペプチド及びそれらの塩、Rec 168をコードす

50

るポリヌクレオチド、R e c 1 6 8に対する抗体又はR e c 1 6 8リガンドに対する抗体を試薬として含有することを特徴とする肥満細胞が関与する炎症性疾患の診断薬。

【請求項 1 2】

R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、R e c 1 6 8を介する肥満細胞の脱顆粒反応を抑制する物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 3】

更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるR e c 1 6 8を介する肥満細胞の脱顆粒反応を測定し比較することを特徴とする請求の範囲 1 2に記載のスクリーニング方法。 10

【請求項 1 4】

R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、R e c 1 6 8を介する肥満細胞の脱顆粒反応を抑制する物質の同定方法。

【請求項 1 5】

更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるR e c 1 6 8を介する肥満細胞の脱顆粒反応を測定し比較することを特徴とする請求の範囲 1 4に記載の同定方法。 20

【請求項 1 6】

請求の範囲 1 4又は請求の範囲 1 5に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

【請求項 1 7】

下記から選ばれる少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する請求の範囲 1 6に記載の脱顆粒抑制剤。

- ・ 1 - (10H-フェナジン-5-イル) - エタノン、
- ・ 2 - アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3 - (ピリジン-2-イルメチル) - 2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。 30

【請求項 1 8】

請求の範囲 1 4又は請求の範囲 1 5に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

【請求項 1 9】

下記から選ばれる少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する請求の範囲 1 8に記載の肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

- ・ 1 - (10H-フェナジン-5-イル) - エタノン、
- ・ 2 - アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3 - (ピリジン-2-イルメチル) - 2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。 40

【請求項 2 0】

R e c 1 6 8アンタゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、G蛋白質共役型受容体(G-protein coupled receptor:以下GPCRという)R e c 1 6 8蛋白質を介するシグナル伝達能抑制作用を有する物質、より詳しくはR e c 1 6 8を介する肥満細胞の脱顆粒反応抑制物質、またはプ 50

ロスタグランジンD₂ 産生抑制物質のスクリーニング方法に関するものである。さらには、Rec168を介する肥満細胞の脱顆粒反応抑制物質、またはプロスタグランジンD₂ 産生抑制物質の同定方法、同方法によって同定された物質を含有してなる脱顆粒抑制剤、プロスタグランジンD₂ 産生抑制剤又は肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

GPCRは、生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。受容体は生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。GPCRは、7ヶ所の細胞膜貫通部を有し、GTP（グアノシン5'-三リン酸）結合性の制御蛋白質（G蛋白質）を介して、リガンドの情報をエフェクター系に伝える役割を担っている。G蛋白質は、 α 、 β 及び γ の3つのサブユニットからなる3量体で、 α サブユニットの種類によってGs、Gi、Go及びGq等に大別され、各々受容体特異性（共役するG蛋白質受容体）及びエフェクター系（酵素やイオンチャネル）の種類が異なっている。

例えば、グルカゴン様ペプチド1受容体や β 2アドレナリン受容体は、Gsと共役してエフェクター系であるアデニル酸シクラーゼ系を促進させ、サイクリックAMP（cAMP）を増加させる。また、 α 2アドレナリン受容体は、Giと共役してアデニル酸シクラーゼ系を抑制し、cAMPを減少させる。H1ヒスタミン受容体はGqと共役してエフェクター系であるホスホリパーゼC系を促進し、ジアシルグリセロールとイノシトール3リン酸を増加させ、細胞内Ca²⁺を増加させる。エフェクター系の種類は、アデニル酸シクラーゼ系、ホスホリパーゼC系、及びcGMPホスホジエステラーゼ系などが主要なものである。

また、 β 1アドレナリン受容体は、心臓、脂肪組織、大脳皮質などに局在し、Gsによってアデニル酸シクラーゼ系が促進され、心拍増加、心収縮力増加、脂肪分解といった効果をもたらす。

G蛋白質は、 α サブユニットにGDP（グアノシン5'-二リン酸）が結合し、 β サブユニット及び γ サブユニットと会合している。 α 、 β 及び γ が会合した状態は不活性型で、受容体にリガンドが結合すると、 α に結合していたGDPがGTPに置換され、そして α サブユニットにGTPが結合した α -GTPと、 β - γ の結合体とに乖離する。 α -GTP及び β - γ はエフェクター系に作用してシグナルを伝達する。この間に α サブユニットの持つGTPase活性によってGTPが分解されGDPになると、 α -GDPはエフェクター系を離れて β 及び γ と会合し、再び不活性型となる。この反応を繰り返すことにより、情報の増幅、伝達が行なわれる。

GPCRの生体内分布は特定の器官に局在しているものが多いが、G蛋白質は生体内に広く分布している。そして、前述したようにG蛋白質は、GPCRを通じて主に一連の細胞内リン酸化反応の引き金となって、遺伝子レベルでの転写調節から筋収縮まで幅広く細胞及び臓器機能の制御を行なっている。

このように、GPCR/G蛋白質によって制御される情報伝達系は、生体の生理機能の制御に必須のメカニズムであり、換言すれば、該情報伝達系は種々の疾病の発症に広く関与するものである。従って、ある疾患の発症に関与するGPCRが同定されれば、該受容体の生理機能を調節する薬剤（アゴニスト、アンタゴニスト、アゴニスト作用阻害物質など）を開発することにより、該薬剤によりその疾患を治療することが可能となる。

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、そのデータベースの解析から、多数の新規なGPCRの存在が示唆され、またそれらのうちすでに単離されているものもある（例えば、特許文献1、2参照）。ヒトゲノム全体でGPCRは700から800近く存在している可能性が示唆されているが、リガンドが既知の受容体が約250程度であり、残りはリガンドが未知のオーファン受容体である。したがってGPCRが関与している生理現象の大

10

20

30

40

50

部分が未開拓の領域と言える。前述したとおり、GPCRは、生体の生理機能の制御及び種々の疾患の発症に深く関与することから、該受容体の生理機能を明らかにすることは、種々の疾患の発症の原因を解明することにおいて極めて重要である。GPCRの生理機能を明らかにするために重要なことは、該受容体のリガンドを同定することであり、多くの科学者が精力的に研究を行っている。一方、生理機能が明らかにされたGPCRのシグナル伝達能を調節する薬剤を創出するための、いわゆるGPCR創薬には、米国ベンチャー企業、製薬企業を中心に多くのアプローチが試みられている。その手法は、バイオインフォマティクス、構造生物学などによるいわゆる“DRY BIOLOGYからのアプローチ”と従来の分子生物、細胞生物学研究に基づく、蛋白、細胞、個体レベルでのいわゆる“WET BIOLOGYからのアプローチ”に大きく分けられるが、これらの手法は別々のものではなく相互に補完することで創薬ゴールを目指している。いずれにしても重要なことは、リガンド結合部位を同定する等の新規の有用な知見をいち早く獲得することによって、薬剤として有用なアゴニストやアンタゴニストを開発することであり、多くの製薬企業では、受容体の立体構造を予測するアプローチ等も導入して、新薬開発を加速させている。このようにして、GPCRを介した薬物治療は、めざましい成功を遂げてきた。現在、使われている薬剤の50%以上がGPCRを標的にしたものであり、その薬剤の世界中の売り上げは、上位25%以上を占めており、売上高は2兆ドルに達しようとしている（例えば非特許文献1参照）。 10

GPCRの重要性は、薬物開発ばかりでなく、遺伝性疾患の多くと関連していることにもある（例えば非特許文献1参照）。現在のところ、視覚において色盲、夜盲症や網膜性色素変性症といった疾患で、GPCRの変異が検出されている。また、味覚や臭覚に関連するGPCRも多く存在すると言われており、味覚や臭覚異常の解明が急速に進展する可能性がある。GPCRは細胞外の刺激を受け取る受容体であることから、こうした五感に密接に関連していることも、十分に理解することができる。また、ホルモン分泌におけるGPCRの変異がかなり報告されており、生理的役割における重要性が示唆されている。 20

しかし、GPCRのアゴニストとして複数の物質が明らかになっている場合であっても、人工的なスクリーニング系において該受容体を介してシグナルを入れることができるというだけであって、生体内での機能を反映しているか否か明らかでないものも数多く存在しているのが現状である。

本発明に係るRec168は、Mr gファミリーに属するレセプターで、Mr g X2と呼ばれているGPCRのひとつである。Rec168の遺伝子配列については、既に知られている（例えば、特許文献3～5参照）。これらの文献においては、Rec168の内因性リガンドについての情報の開示は全くない。また、Rec168と同じ蛋白質については、三輪らがすでにhTGR-12として、そのアミノ酸配列、遺伝子配列を開示している（特許文献6参照）。しかしその生理的機能、および生理的リガンドについては具体的な開示はない。その他にも同様の情報が開示されているものの、Rec168の生理的機能や、生理的リガンドについて具体的に開示しているものではない。 30

Rec168のリガンド物質に関しては、Janssen PharmaceuticalのBuist Arjanらが、ヒトdorsal root receptor (hDRRs)の一つであるMr g X2 (Rec168)はリンパ節で発現しており、ブタ視床下部から精製したChaperonin10のN末端ペプチド断片(4-21)に対してアゴニスト活性($ED_{50} = 354 \text{ nM}$)を有することを示した（特許文献7参照）。ACADIA Pharmaceuticalのグループは、Mr g X2 (Rec168)のリガンドはSTIAであるとしているが、STIAに関しての詳細は不明である。Nicola Robasらは、睡眠や運動機能を制御するcortistatinがMr g X2 (Rec168)のリガンドであるとの報告をしている（非特許文献2、特許文献8参照）。ブタ組織から新規に同定されたMr g X1を活性化するペプチドのファミリーがMr g X2 (Rec168)にも弱く作用することも報告されている。Mr g X1のホモログは、ラットSNSR1とマウスMr g C11であるとしている。AstrazenecaのLemboraらは、SNSR3&4 (Mr g X1)のリガンドはBAM8-22 40 50

であると報告したグループであるが、ラットSNSRに対する活性において、 γ 2-MSHが最も有望なペプチドであり ($EC_{50} = 37 \pm 10 \text{ nM}$)、さらに、詳細な構造活性相関解析から γ 2-MSHのC末端配列がアゴニストであると報告した ($K_d = 2.7 \pm 0.4 \text{ nM}$, $B_{max} = 350 \pm 100 \text{ fmol/mg}$)。in vivo解析から、SNSR (Mr g X1) の鎮痛における役割を解析している (非特許文献3参照)。また、Substance P、Substance P2-11、Neuropeptide FF等がMr g X2を活性化するとの報告がなされている (特許文献9参照)。さらに、最近になって、proadrenomedullin N-terminal peptidesも、Mr g X2を活性化するペプチドとして報告されている (非特許文献14参照)。

10

なお、Mr g X1はMr g X2 (Rec168) とタンパク質レベルで60-70%の相同性を持つち、同じファミリーに属するが、Mr g X2とは異なるレセプターである。両者の違いは、配列のみならず、リガンドの反応性も異なり、Mr g X1はBAM8-22に反応するが、Mr g X2は反応しない。Mr g X1のリガンド特異性は高いが、Mr g X2もブロードである。更に、両者の発現組織も異なっている。

以上のようにRec168のリガンドとして、Chaperonin10のN末端ペプチド断片(4-21)、cortistatin等が開示されているが、Rec168の生理的機能については未だ明らかではなく、示唆される機能として記載されているのは、それらリガンド物質が一般的に有する機能から推定するもののみである。そのためRec168をターゲットとした医薬品開発は進んでいないのが現状であり、Rec168のアゴニスト、アンタゴニストは未だに医薬品として市場に出てはいない。今後Rec168をターゲットとした医薬品開発を展開していくためには、Rec168の生理的機能および疾患との関わりを明らかにしていくことが必要である。

20

一方、肥満細胞の脱顆粒は、IgEが肥満細胞上の高親和性IgE受容体(FcεRI)に結合して起こる免疫関与のものと、この系を介さない免疫非関与のものに大きく分類され、前者は炎症初期に、後者は慢性炎症像に多いとされている (非特許文献4参照)。免疫関与の脱顆粒については詳細な研究がなされているのに対して、免疫非関与の脱顆粒については、作用メカニズムをはじめほとんど明らかになっていない。

肥満細胞は全身臓器に広く分布し、特に外界と接する皮膚と粘膜内に多く存在している。その細胞の中に多数の顆粒を有しており、細胞表面にはFcεRIを発現し、IgE分子を介して抗原が結合するとFcεRIが活性化され、種々の細胞内情報伝達機構を介して、顆粒にあるヒスタミンを放出する (脱顆粒) と同時にプロスタグランジンやロイコトリエンという物質も生成する。これらの物質は、化学伝達物質と呼ばれ気管支を収縮し、血管の透過性を亢進させ、痰の分泌を高めて喘息の呼吸困難発作を引き起こす。この反応は短時間に起きるため即時型反応と呼ばれている。さらに最近、ヒスタミンやプロスタグランジンなどのケミカルメディエータの遊離に引き続いて、インターロイキン(IL)-3、IL-4、IL-5、IL-6、マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、腫瘍壊死因子(Tumor necrosis factor- α : TNF- α)などのサイトカインが産生放出され、FcεRIの会合刺激が核内まで伝わるということが知られるようになった。

30

40

ヒスタミン等の化学伝達物質や酵素、脂質メディエーターは、平滑筋の収縮、血管の透過性亢進、組織の浮腫などを惹起するが、これに対し数時間の後に放出される各種サイトカインは、皮膚、肺、鼻、目などにおける遅発型アレルギー反応、すなわち蕁麻疹やアトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎などの臨床症状発現に関与することが明らかにされつつある。

これまでに、IgEが関与しない脱顆粒反応が存在し、慢性炎症に関与していることがわかってきた。また、免疫非関与の肥満細胞脱顆粒誘導物質として、MCDペプチド、Substance P、VIP、Somatostatin、compound 48/80などがBasic secretagoguesとして知られている (例えば非特許文献5~9参照)。

50

Substance P、VIP、SomatostatinなどBasic secretagoguesは、これまで知られているレセプターよりもはるかに高濃度（2～3 μ M）で脱顆粒を起こすことが知られていた。そのメカニズムについては、受容体を介さない経路による可能性があるという報告があるが（例えば、非特許文献10～11参照）、詳細は不明である。特異的な受容体に関する報告はない。

肥満細胞のIgEが関与しない脱顆粒反応の疾患へのかかわりについては、炎症に絡んで複数例が報告されている（例えば非特許文献12～13参照）。自己抗体誘発の関節炎モデルにおいて、肥満細胞欠損マウス（W/W^v、c-kit mutant；Sl/Sl^d、c-kit ligand mutant）では発症しないが、正常肥満細胞を移植することにより発症が確認され、関節炎発症にはIgE非関与の肥満細胞の作用が優位に働いていることが証明された。肥満細胞の免疫非関与の脱顆粒は関節炎を始めとした、各種慢性炎症などに直接関与すると考えられている。

このような状況の中、肥満細胞の免疫非関与の脱顆粒のメカニズムを解明することができれば、各種慢性炎症の治療に応用していくことができると考えられており、その解明が切望されていた。

【特許文献1】特開平9-268号公報

【特許文献2】特開平9-51795号公報

【特許文献3】WO01/19983号パンフレット

【特許文献4】WO01/48015号パンフレット

【特許文献5】WO01/16159号パンフレット

【特許文献6】WO02/04641号パンフレット

【特許文献7】WO03/005036号パンフレット

【特許文献8】WO03/073107号パンフレット

【特許文献9】WO03/104818号パンフレット

【非特許文献1】Flower、D. R.、Biochim. Biophys. Acta (1999) 1422、207-234

【非特許文献2】Robas、N. et al.、J. Biol. Chem. (2003) 278、44400-44404.

【非特許文献3】The 3rd joint meeting of the summer Neuropeptide conference (13th annual meeting) & the European Neuropeptide Club (13th annual meeting)、Montauk、NY、June 8-12、2003.

【非特許文献4】Piliponsky、A. M. et al.、Molecular Immunology (2001) 38、1369-1372.

【非特許文献5】Buku、A.、Peptides (1999) 20、415-420

【非特許文献6】Erjavec、F. et al.、Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1981) 317、67-70.

【非特許文献7】Theoharides、T. C. et al.、European Journal of Pharmacology (1981) 69、127-137.

【非特許文献8】Mori、T. et al.、Arzneimittelforschung (1994) 44、1044-6.

【非特許文献9】Odum、L. et al.、Inflamm. Res. (1998) 47、488-492.

【非特許文献10】Aridor、M. et al.、J. Cell Biol. (1990) 111 (3)、909-17.

【非特許文献11】Peptides (2002) 23 (8)、1507-15.

【非特許文献12】Lee、D. M. et al.、Science (2002) 297、1689-92.

【非特許文献13】Mehlhop、P. D. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) 94、1344-1349.

【非特許文献14】Kamohara、M. et al.、Biochemical and Biophysical Research Communications (2005) 330、1146-1152.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的は、G蛋白質共役型受容体Rec168の生理的機能を解明し、その生理的機能を反映したRec168およびそのリガンドに関する応用用途を提供することである。より具体的には、本発明の目的は、G蛋白質共役型受容体Rec168蛋白質を介するシグナル伝達能抑制作用を有する物質、より詳しくはRec168を介する脱顆粒反応抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質のスクリーニング方法を提供することである。本発明の別の目的は、Rec168を介する脱顆粒反応抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質の同定方法、同方法によって同定された物質を含有してなる脱顆粒抑制剤、プロスタグランジンD₂産生抑制剤又は肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意研究を重ねた結果、本発明の完成に至った。すなわち本発明は、以下に示すとおりである。

1. Rec168を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてRec168アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法。

2. 更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるRec168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を測定し比較することを特徴とする上記1に記載のスクリーニング方法。

3. Rec168を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてRec168アゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質の同定方法。

4. 更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下におけるRec168を介する肥満細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を測定し比較することを特徴とする上記3に記載の同定方法。

5. 上記3又は4に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジンD₂産生抑制剤。

6. 下記から選ばれる少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する上記5に記載の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジンD₂産生抑制剤。

・ 1- (10H-フェナジン-5-イル) -エタノン、

・ 2-アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び

・ 3- (ピリジン-2-イルメチル) -2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

7. 上記3又は上記4に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質またはプロスタグランジンD₂産生抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

8. 下記から選ばれる少なくとも1つの化合物を有効成分として含有する上記7に記載の肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

10

20

30

40

50

- ・ 1- (10H-フェナジン-5-イル) -エタノン、
- ・ 2-アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3- (ピリジン-2-イルメチル) -2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

9. Rec 168 アントゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤またはプロスタグランジン D₂ 産生抑制剤。

10. Rec 168 アントゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

11. Rec 168 蛋白質もしくはその部分ペプチド及びそれらの塩、Rec 168 をコードするポリヌクレオチド、Rec 168 に対する抗体又は Rec 168 リガンドに対する抗体を試薬として含有することを特徴とする肥満細胞が関与する炎症性疾患の診断薬。 10

12. Rec 168 を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下において Rec 168 アントゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec 168 を介する肥満細胞の脱顆粒反応を抑制する物質のスクリーニング方法。

13. 更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下における Rec 168 を介する肥満細胞の脱顆粒反応を測定し比較することを特徴とする上記 12 に記載のスクリーニング方法。

14. Rec 168 を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下において Rec 168 アントゴニスト作用を有するリガンドに対するシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、Rec 168 を介する肥満細胞の脱顆粒反応を抑制する物質の同定方法。 20

15. 更に、肥満細胞を用いて該被験物質の非共存下及び共存下における Rec 168 を介する肥満細胞の脱顆粒反応を測定し比較することを特徴とする上記 14 に記載の同定方法。

16. 上記 14 又は 15 に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

17. 下記から選ばれる少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する上記 16 に記載の脱顆粒抑制剤。 30

- ・ 1- (10H-フェナジン-5-イル) -エタノン、
- ・ 2-アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3- (ピリジン-2-イルメチル) -2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

18. 上記 14 又は 15 に記載の方法によって同定された脱顆粒抑制物質を有効成分として含有してなる肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

19. 下記から選ばれる少なくとも 1 つの化合物を有効成分として含有する上記 18 に記載の肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤。

- ・ 1- (10H-フェナジン-5-イル) -エタノン、
- ・ 2-アゼパン-1-イル-7-ベンジル-1、7-ジヒドロプリン-6-オン、及び
- ・ 3- (ピリジン-2-イルメチル) -2-チオキソ-2、3-ジヒドロ-1H-キナゾリン-4-オン。

20. Rec 168 アントゴニスト作用を有する物質を有効成分として含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

上記発明を完成するに至った経緯は次のようなものである。

公開配列データベース GenBank を用いて、GPCR に特徴的な配列を有する Rec 168 を見出した。ヒト精巢 poly (A)⁺ RNA を鋳型として逆転写反応を行い、cDNA を合成した。PCR により目的の遺伝子を増幅し、発現ベクターに組み込み、R 50

ec168一過性発現細胞及び安定形質発現細胞を作製した。

リガンドが同定されていないGPCRのリガンド（即ち、該受容体と相互作用する物質であるアゴニストやアンタゴニストなど）を同定するためには、数万種以上の多数の候補物質を試験によりスクリーニングする必要がある、該スクリーニングを迅速に行うことが可能なアッセイ系が必要である。また、該アッセイは、被験物質と該受容体との相互作用の有無を、該受容体が共役するG蛋白質を介して誘導される2次メッセンジャーの活性化若しくは抑制の増減を定量的に検出する必要があることから、該メッセージの増減を高感度で検出可能なアッセイ方法が必要である。本発明者らは、このような迅速かつ高感度で検出可能なアッセイ方法について、すでに日本において特許権を取得しており（特許第3643288号）、本発明においてもそのアッセイ方法を使用した。

10

作製したRec168発現細胞を用いて、Rec168に対してアゴニスト活性を示す物質のスクリーニングを実施した。その結果、porcine Chaperonin10のN末端20アミノ酸からなるペプチド、porcine 2', 3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase（以後、pCNPと略す）のN末端17アミノ酸からなるペプチド、porcine tropomyosinのN末端12アミノ酸からなるペプチド、PACAP（6-36）、VIP（3-27）、Substance P、Somatostatin、Mast cell degranulating（以後、MCDと略す）ペプチドなどを得た。

上述したように、免疫非関与の肥満細胞脱顆粒誘導物質としては、MCDペプチド、Substance P、VIP、Somatostatin、compound 48/80などがBasic secretagoguesとして知られており、Substance P、VIP、Somatostatinなどは、これまで知られているレセプターよりもはるかに高濃度（2~3 μ M）で脱顆粒を起こすことが知られていたが、Basic secretagoguesによる免疫非関与の肥満細胞の脱顆粒の機構は未だに不明であった。ところが詳細な解析から、本発明者らが独自のスクリーニングにより取得した、Rec168に対してアゴニスト活性を示す物質群の一部と、免疫非関与の肥満細胞の脱顆粒誘導物質として既知であった物質の種類とが一致し、さらに作用濃度もほぼ同じであることが判明した。そこで、免疫非関与の肥満細胞の脱顆粒はRec168を介するのではないかという、これまでに誰も予想だにしなかった仮説を立て、さらに研究を進めた。

20

30

レポータージーンアッセイによるスクリーニングから得られたRec168のアゴニスト物質は、細胞内遊離カルシウムアッセイ系で測定してもほぼ同様の反応性を示した。また、アゴニスト活性を示すものから数種類を選択して、GTP結合活性を検討した結果、検討したアゴニストはすべてGTP結合活性を示したことから、Rec168に結合することによって、G蛋白質を介して細胞内シグナル伝達をすることが強く示唆された。

次に、実際に、得られたアゴニスト活性物質群が肥満細胞上のRec168を介して脱顆粒反応を惹起するか否かを調べた。ヒト臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞を分離し、常法により肥満細胞へと分化させ、牛胎児血清（Fetal Calf Serum: FCS）非存在下で各アゴニスト活性物質を添加したところ、各物質の濃度依存的に脱顆粒反応が惹起された。それに対して、FCS存在下では脱顆粒反応は惹起されなかった。FCS存在下、非存在下での肥満細胞におけるRec168の発現について検討したところ、FCS非存在下では発現しているものの、FCS存在下ではほとんど発現していないことが判明した。以上のことから、Rec168アゴニスト活性物質群は、肥満細胞の脱顆粒反応を引き起こし、その反応はRec168を介して起こっていることが強く示唆された。

40

さらに同様のアゴニスト活性物質群が肥満細胞上のRec168を介してプロスタグランジンD₂（PGD₂）産生を誘導するか否かを調べた。上記と同様に誘導したヒト肥満細胞に対して、Substance P、MBP fragmentおよびECP fragment等のアゴニスト活性物質群は、濃度依存的にPGD₂産生を誘導した。何れの刺激によるPGD₂産生活性もRec168阻害化合物である、10 μ MのJTP-3

50

75854あるいは445755によって阻害されたことから、Rec168の活性化はヒト培養肥満細胞の脱顆粒だけではなく、PGD₂のde novo合成も誘導することが判明した。IgEは高親和性FcRγ epsilonを介してSykを活性化し、肥満細胞の脱顆粒誘導およびPGD₂のde novo合成を誘導することが知られているが、Rec168はFcRγ epsilonとシグナル伝達経路を一部共有していることが推測された。

ここで、ECP (eosinophil cationic protein) は、炎症部位に存在する好酸球の分泌するタンパク質の一つであり、MBP (Major basic protein) と共に肥満細胞の脱顆粒を誘導する物質として古くから知られている。ECPは、炎症の引き金ではなく、炎症後期に作用して、炎症を長引かせるものと考えられている。 10

次にRec168の発現臓器分布解析を行ったところ、本受容体はMr g Xファミリーに属する他の受容体の発現パターンとは異なり、皮膚および脂肪組織での高発現が特徴であった。肥満細胞は表皮に多く存在していることが確認されている。また、脂肪組織における肥満細胞の存在については明らかではないが、脂肪組織に肥満細胞が混在していることは十分考えられる。

Rec168が脱顆粒のシグナルを伝達する受容体であるということは、これまで誰も予想できなかった事であり、またIgEが関与していない免疫非関与の脱顆粒のメカニズムのひとつが、初めて明らかになったという点でも本発明は極めて重要性が高いものである。さらには、脱顆粒のみならず、脱顆粒と同時に起こることが知られているPGD₂産生のシグナルをもRec168が伝達するということが明らかになった点も注目すべきである。これまで発症のメカニズムが不明であったために、有効な治療薬や治療方法が見つかっていなかった多くの慢性炎症をターゲットとして、今後有効な治療薬の開発を進めていくことが可能となった。 20

そこで本発明者らはさらに研究を進め、Rec168を介した肥満細胞からの脱顆粒反応またはPGD₂産生を抑制することができる薬剤のスクリーニング方法を開発し、実際にスクリーニングを行ったところ、有効な複数の化合物を見出すことにも成功した。

【発明の効果】

【0005】

本発明者らは、これまで判明していなかったRec168の生理的機能を見出し、該機能に基づく新たな薬剤のスクリーニング方法及び同定方法を開発し、かかる薬剤となりうる複数の化合物を実際に取得することに成功した。本発明におけるRec168蛋白質を介するシグナル伝達能抑制作用を有する物質のスクリーニング方法又はRec168蛋白質を介するシグナル伝達能抑制作用を有する物質の同定方法によると、単にRec168に結合する物質の結合能を調節するものや、人工的な細胞系においてシグナルを伝達する物質からのシグナル伝達能を調節する物質を得られるのとは異なり、実際にRec168の生理的機能である脱顆粒反応またはPGD₂産生を抑制する物質を取得することが可能となった。これにより、これまでは不可能であった、肥満細胞の免疫非関与の脱顆粒およびPGD₂産生が関与している炎症性疾患等、特にアレルギー性疾患又は自己免疫疾患等の治療剤の開発も可能となった。 30 40

さらに本発明は、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患等の肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤の診断薬をも提供するものである。これは、Rec168が肥満細胞の脱顆粒反応またはPGD₂産生を誘導することを見出したことによって初めて可能となったことである。Rec168蛋白質の細胞表面発現量や遺伝子発現量の増減、発現しているRec168蛋白質の構造的な異常、遺伝子の変異が、過剰な脱顆粒反応またはPGD₂産生を介した慢性炎症の原因となる可能性があり、これらを検査することにより、肥満細胞が関与する炎症性疾患、特にアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の診断をすることも可能となったものである。

さらには、肥満細胞が関与する炎症性疾患、特にアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の原因となるRec168蛋白やRec168遺伝子の異常発現を調節することができる物 50

質のスクリーニングも可能となり、この方法により得られる物質は、Rec168を介した脱顆粒反応またはPGD₂産生を調節することができるものである。これにより新しいタイプの炎症性疾患の治療剤の開発が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0006】

図1は、PC12h/zifレポーターアッセイ(1)におけるChaperonin 10(1-20)、2'、3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase(1-17)、Tropomyosin(1-12)の結果を示す図である。図中、黒丸はChaperonin 10(1-20)を、黒三角は2'、3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase(1-17)(pCNP(1-17))を、黒四角はTropomyosin(1-12)を意味する。AはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。AはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

図2は、PC12h/zifレポーターアッセイ(2)におけるMCD-Peptide、Somatostatin 28、Substance Pの結果を示す図である。図中、黒丸はMCD-Peptide、黒三角はSomatostatin 28、黒四角はSubstance Pを意味する。AはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

図3は、PC12h/zifレポーターアッセイ(3)におけるCompound 48/80の結果を示す図である。図中、黒丸はCompound 48/80を意味する。AはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

図4は、発現ベクターpLHCXI4を示す。

図5は、pLHC-Rec168-I4を示す。

図6は、Substance P濃度依存的な膜画分へのGTP-Eu結合(GTP結合量の増加)を示す図である。図中、黒丸はRec168安定発現293細胞から調製した膜画分、白丸は293(親株)から調製した膜画分での結果を示す。

図7は、Chaperonin 10(1-20)濃度依存的な膜画分へのGTP-Eu結合(GTP結合量の増加)を示す図である。図中、黒丸はRec168安定発現293細胞から調製した膜画分、白丸は293(親株)から調製した膜画分での結果を示す。

図8は、pCNP(1-17)濃度依存的な膜画分へのGTP-Eu結合(GTP結合量の増加)を示す図である。図中、黒丸はRec168安定発現293細胞から調製した膜画分、白丸は293(親株)から調製した膜画分での結果を示す。

図9は、MCD peptide(Mast Cell Degranulating Peptide)濃度依存的な膜画分へのGTP-Eu結合(GTP結合量の増加)を示す図である。図中、黒丸はRec168安定発現293細胞から調製した膜画分、白丸は293(親株)から調製した膜画分での結果を示す。

図10は、リガンドによるヒト培養肥満細胞の脱顆粒反応(リガンド物質の濃度依存的な脱顆粒反応)を示す図である。陽性対象としてはA23187を用いた。脱顆粒を異なる3 donor由来の培養肥満細胞を用いた3回の実験のMean±S.E.Mで示した。

図11は、ヒト培養肥満細胞の脱顆粒反応(EC_{2.5})とRec168発現細胞を用いたCa Assayでの活性(EC₅₀)の相関を示す図である。

図12は、Donor 4由来ヒト培養肥満細胞での、Substance P(図12A)、Compound 48/80(図12B)及びA-23187(図12C)刺激による脱顆粒に及ぼす培養時FCSの影響を示す図である。

図13は、Donor 6由来ヒト培養肥満細胞での、Substance P及びCompound 48/80刺激による脱顆粒に及ぼす培養時FCSの影響を示す図である。AはSubstance P刺激、BはCompound 48/80刺激による脱顆粒に対する培養時添加血清の影響を示す。

図14は、Rec168の組織別mRNA発現量の比較を示す図である。

10

20

30

40

50

図15は、Rec168阻害化合物（化合物1（15-b）、化合物2（15-a）、化合物3（15-c））の肥満細胞脱顆粒に対する阻害活性に関する図である。図中、白四角はSubstance P（1 μ M）、黒四角は[D-Pro²、D-Trp^{7、9、10}]-Substance P（1-11）（1 μ M）、白丸はPACAP（6-27）（1 μ M）、黒丸はA23187（0.3 μ M）を意味する。

図16は、ECP及びMBPのfragment mapである。ECP fragment mapは（A-1）乃至（A-3）の3に分割して示した。MBP fragment mapは（B-1）乃至（B-3）は3に分割して示した。

図17は、断片化ECPのヒト培養肥満細胞に対する脱顆粒誘導活性（A）及びRec168安定発現293細胞に対するCa応答活性（B）を示す図である。

10

図18は、断片化MBPのヒト培養肥満細胞に対する脱顆粒誘導活性（A）及びRec168安定発現293細胞に対するCa応答活性（B）を示す図である。

図19は、MBP、ECP fragment及びSubstance P刺激によるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導に対するRec168阻害化合物（化合物1（A）、化合物2（B）及び化合物3（C））の作用を示す図である。

図20は、Substance P（A）及びCompound 48/80（B）刺激によるヒト肥満細胞の脱顆粒誘導に対するRec168阻害化合物及びCromolynの作用を示す図である。図中、黒丸は化合物1、白丸は化合物3、黒四角はCromolynを示す。

図21は、IgE架橋によるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導（A）とRec168阻害化合物及びCromolynの作用（B）を示す図である。図（B）中、黒丸は化合物1、白丸は化合物3、黒四角はCromolynを意味する。

20

図22は、Substance P（A）、MBP fragment（B）及びECP fragment（C）刺激によるヒト培養肥満細胞のPGD2産生とRec168阻害化合物の作用を示す図である。

図23は、抗Rec168抗体（抗Mr gX2 peptide抗体）、抗ヒトTryptase抗体及び抗ヒトChymase抗体を用いたヒト培養肥満細胞の免疫染色を示す図である。図中のバーは20 μ mを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

30

以下、本発明で用いる語句の意味及び本発明の具体的態様を明らかにすることにより本発明をさらに詳細に説明する。

G蛋白質共役型受容体

本発明における「G蛋白質共役型受容体」は、細胞膜上に存在する受容体であって、GTP（グアノシン5'-三リン酸）結合性の制御蛋白質（G蛋白質）を介して、該受容体と相互作用するリガンドの情報をエフェクター系に伝える機能を有する蛋白質を意味する。これまでに同定されているほとんどのG蛋白質共役型受容体は細胞膜を7回貫通する構造を有している。

Rec168を発現している細胞

本発明において「Rec168を発現している細胞」とは、細胞表面にRec168蛋白質を発現している細胞であれば、特に限定されるものではない。

40

例えば、Rec168を発現している細胞としては、既存の細胞株にRec168遺伝子を導入し、細胞表面に強制発現させた細胞株を用いることもできる。この場合には、比較対象のRec168を発現していない細胞としては、その親株を用いることができる。ここで用いる既存の細胞株は、特に限定されるものではないが、発現ベクターを含み、発現ベクターの複製又は発現を維持することが可能な細胞であればよい。例えばE. coliのような原核細胞、またはイースト、昆虫、両生類のような真核細胞、またはCHO、HeLa、293のような哺乳動物細胞などとすることができる。Rec168を効率良く発現させることができる細胞としては、中でも293細胞が好ましい。

このとき、Rec168強制発現細胞としては、Rec168を一過性に発現させたも

50

のをを用いても、安定的に発現させたものを用いてもよい。尚、R e c 1 6 8 強制発現細胞の作成は、当業者に公知の方法で行うことができる。

また、R e c 1 6 8 を発現している細胞としては、生体由来であって、n a t i v e に R e c 1 6 8 を発現している細胞を用いることもできる。R e c 1 6 8 を発現している細胞であれば特に限定されるものではないが、中でも肥満細胞が好ましい。

ここで本発明における肥満細胞としては、生体から分離した初代培養細胞であっても、肥満細胞としての特徴を保持する既存の細胞株であってもよい。中でも結合組織型肥満細胞が好ましい。例えば、初代培養細胞としては、ヒト臍帯血由来の C D 3 4 陽性造血幹細胞より、常法に従って誘導して得られる肥満細胞を用いることができる。また既存の細胞株としては、特に限定されるものではないが、例えば P 8 1 5、R B L - 2 H 3 細胞などが挙げられる。 10

物質

本発明の方法により同定またはスクリーニングされる「物質」とは、自然界に存在する天然の物質（蛋白質、抗体、ペプチド、天然化合物など）あるいは人工的に調製される任意の物質（化学合成化合物）を意味する。

具体的には、例えば、化学的に合成された任意の「化合物」を挙げることができる。該化合物の種類及び分子量などについては特に限定されないが、分子量について言えば、医薬品として用いられる可能性のある化合物の分子量は、分子量約 5 0 乃至約 3 0 0 0 以下であり、さらに一般的には分子量約 1 0 0 乃至約 2 0 0 0 であり、さらに一般的には分子量約 1 0 0 乃至約 1 0 0 0 である。 20

該物質が、蛋白質、抗体またはペプチドである場合には、生体組織や細胞から単離されるもの、及び遺伝子組換えや化学的合成により調製されるものも包含する。さらにまた、それらの化学修飾体も包含する。

ペプチドとしては、例えば、約 3 乃至約 5 0 0 個のアミノ酸、好ましくは約 3 乃至約 3 0 0 個のアミノ酸、さらに好ましくは約 3 乃至約 2 0 0 個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。

タンパク質、ペプチド、ポリペプチド

本発明で用いられる R e c 1 6 8 は、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。R e c 1 6 8 は複数の文献（例えば W O 0 1 1 6 1 5 9、W O 0 1 1 9 9 8 3、W O 0 1 7 2 8 3 8 等）に記載されている公知のタンパク質である。 30

R e c 1 6 8 は、例えば、ヒトやその他の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞〔例えば、網膜細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、白血球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞（例、乳癌細胞株（G I - 1 0 1）、結腸癌細胞株（C X - 1、G I - 1 1 2）、肺癌細胞株（L X - 1、G I - 1 1 7）、卵巣癌細胞株（G I - 1 0 2）、前立腺癌細胞株など）など〕、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、M E L、M 1、C T L L - 2、H T - 2、W E H I - 3、H L - 6 0、J O S K - 1、K 5 6 2、M L - 1、M O L T - 3、M O L T - 4、M O L T - 1 0、C C R F - C E M、T A L L - 1、J u r k a t、C C R T - H S B - 2、K E - 3 7、S K W - 3、H U T - 7 8、H U T - 1 0 2、H 9、U 9 3 7、T H P - 1、H E L、 40 50

J K-1、CMK、K O-812、MEG-01など)に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、比較するアミノ酸配列に対して、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。本明細書における R e c 168 としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性、レセプター結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

R e c 168 としては、(1)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(4)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

本明細書における R e c 168 は、ペプチド表記の慣例に従って、左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。R e c 168 は、C末端がカルボキシル基($-COOH$)、カルボキシレート($-COO^-$)、アミド($-CONH_2$)またはエステル($-COOR$)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-6} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラールキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

R e c 168 がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明でいう R e c 168 に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、R e c 168 には、上記タンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

Rec 168の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒトRec 168などが挙げられる。Rec 168またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプタータンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載するRec 168またはRec 168をコードするDNAを含む形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

10

Rec 168の部分ペプチド（以下、単に「部分ペプチド」と略記する場合がある）としては、上記したRec 168の部分アミノ酸配列を有するペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、Rec 168の分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、Rec 168と実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するRec 168の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

20

部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したRec 168の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

また、部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

30

さらに、部分ペプチドには、上記したRec 168と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

Rec 168またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

40

Rec 168の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいはRec 168を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、Rec 168を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa)～e)に記載された方法が挙げられる。

50

- a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers、New York (1966年)
- b) Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide)、Academic Press、New York (1965年)
- c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) (1975年)
- d) 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977年)
- e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ポリヌクレオチド

本発明は、配列番号：1で示されるアミノ酸配列をコードする核酸、及び配列番号：1で示されるアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドも提供する。

本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖型両方のDNA、およびそのRNA相補体も含む。DNAには、例えば、天然由来のDNA、組換えDNA、化学合成したDNA、PCRによって増幅されたDNA、およびそれらの組み合わせが含まれる。本発明のポリヌクレオチドとしてはDNAが好ましい。なお、周知の通り、コドンには縮重があり、1つのアミノ酸をコードする塩基配列が複数存在するアミノ酸もあるが、上記アミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、いずれの塩基配列を有するものも本願発明の範囲に含まれる。なお、下記の実施例1において実際にクローニングされたcDNAの塩基配列が配列番号：2に示されている。よって、本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは配列番号：2の塩基配列を有する。

本発明のポリヌクレオチドは、例えば以下の方法により調製することが可能である。Rec168に特徴的な塩基配列をクエリーとして塩基配列の検索を行い、ヒトゲノムよりRec168を見出す。見出したゲノム配列は又はその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや核酸増幅反応等の遺伝子工学の基本的手法を用いて、cDNAライブラリーなどから本発明ポリヌクレオチド (例えば本発明DNA) を調製することができる。

ここで、核酸増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) [Saiki R. K. et al.、Science、230、1350-1354 (1985)]、ライゲース連鎖反応 (LCR) [Wu D. Y. et al.、Genomics、4、560-569 (1989); Barringer K. J. et al.、Gene、89、117-122 (1990); Barany F.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88、189-193 (1991)]、及び転写に基づく増幅 [Kwoh D. Y. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86、1173-1177 (1989)] 等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応 (SDA) [Walker G. T. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89、392-396 (1992); Walker G. T. et al.、Nuc. Acids Res.、20、1691-1696 (1992)]、自己保持配列複製 (3SR) [Guatelli J. C.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、1874-1878 (1990)]、及びQ β レプリカーゼシステム [リザイルディら、BioTechnology、6、1197-1202 (1988)] 等の恒温反応を含む。また、欧州特許第0525882号に記載されている標的核酸と変異配列の競合増幅による核酸配列に基づく増幅 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification: NASABA) 反応等も利用可

能である。好ましくはPCR法である。

実施例1に示すように、配列番号：3及び配列番号：4のプライマーを使用した場合、PCR産物として1.0kbpのDNA断片が得られるので、これを例えばアガロースゲル電気泳動等の分子量によりDNA断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って単離して本発明の核酸を得ることができる。

上記のようなハイブリダイゼーション、核酸増幅反応等を使用してクローニングされる相同な核酸は、配列表の配列番号：1に記載の塩基配列に対して少なくとも20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、さらにより好ましくは70%以上、最も好ましくは90%以上の同一性を有する。

同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら、Nucleic Acids Res.、12、387（1984）に記載され、そしてウイスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ（UWCGC）より入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには：（1）ヌクレオチドに関する単一（unary）比較マトリックス（同一に対し1および非同に対して0の値を含む）、並びにSchwartz及びDayhoff監修、Atlas of Protein Sequence and Structure、pp. 353-358、National Biomedical Research Foundation（1979）に記載されるような、Gribskov及びBurgess、Nucleic Acids Res.、14、6745（1986）の加重比較マトリックス；（2）各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ；及び（3）末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた、使用可能である。

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15~100ヌクレオチド、好ましくは15~35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。このようなポリヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：2）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

本明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、中程度又は高程度なストリンジェントな条件においてハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジェントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Sambrook、J.ら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual（3rd edition）、Cold Spring Harbor Laboratory、7.42-7.45（2001）に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し

、 $5\times\text{SSC}$ 、 0.5% SDS、 1.0mM EDTA (pH 8.0) の前洗浄溶液、約 $40-50^{\circ}\text{C}$ での、約 50% ホルムアミド、 $2\times\text{SSC}-6\times\text{SSC}$ (又は約 42°C での約 50% ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液) のハイブリダイゼーション条件、および約 60°C 、 $0.5\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS の洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジェントな条件もまた、例えば DNA の長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジェントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及びおよそ 68°C 、 $0.2\times\text{SSC}$ 、 0.1%

SDS の洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度および洗浄溶液塩濃度は、プローブ 10 の長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

また、このポリヌクレオチドには、Rec 168 をコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド (アンチセンス DNA/RNA; 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンス RNA、および該 RNA をコードする DNA) やリボザイム (本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA) が含まれる。

アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写 20 抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ (A) 付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、 30 標的遺伝子の発現を抑制する (平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」、日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347、1993)。

本発明で用いられるアンチセンスポリヌクレオチドは、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の $5'$ 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。しかし、コード領域もしくは $3'$ 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは $3'$ 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を 40 有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写された RNA は、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15 ヌクレオチド以上、好ましくは 100 ヌクレオチド、さらに好ましくは 500 ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、 3000 ヌクレオチド以内、好ましくは 2000 ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、Rec 168 をコードするポリヌクレオチド (例えば、配列番号: 2) の配列情報を基にホスホロチオネート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosph 50

orothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするポリヌクレオチドを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子、(1990)蛋白質核酸酵素、35:2191）。 10

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている（M. Koizumiら、(1988)FEBS Lett. 228:225）。リボザイムの基質結合部を標的的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である（M. Koizumiら、(1988)FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子、(1990)蛋白質核酸酵素、35:2191、M. Koizumiら、(1989)Nucleic Acids Res. 17:7059） 20

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される（J. M. Buzayan Nature 323:349、1986）。このリボザイムも、標的的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている（Y. KikuchiおよびN. Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋、(1992)化学と生物30:112）。

Rec168をコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなど 30 を利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

抗体

本発明は、Rec168に結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

Rec168またはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、Rec168に結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、Rec168に免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりもRec168に対して実質的に高い親和性を有する 40 ことを意味する。

本発明における抗体としては、Rec168を検出可能であり、かつRec168の機能に影響を与える活性を有しているものが挙げられる。ここで、Rec168の機能とは、リガンド物質の結合機能、リガンド物質が結合することによって細胞の脱顆粒反応を誘導する機能を意味する。従って、本発明における薬剤としての抗体は、Rec168とリガンド物質との結合を一部もしくは全部阻害するもの、Rec168を介して起こる細胞の脱顆粒反応の一部もしくは全部を抑制するもの、または亢進するものが含まれる。

Rec168に対する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。Rec168またはその断片あるいはそれらのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し 50

血清を得る。これを、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、Rec168をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエロマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、Rec168に結合し、かつRec168の機能に影響を与える抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することで、調製することが可能である。 10

本発明における炎症性疾患診断薬、炎症性疾患診断用キットに含まれるRec168の検出に用いる抗体としては、検出可能な抗体であれば特に制限はなく、上記と同様、該抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。

剤、薬剤

本発明の「剤」または「薬剤」、「医薬組成物」とは、前記で定義される本発明の「化合物」、「ペプチド」、「ポリヌクレオチド」または「抗体」のいずれかと、薬学的に許容され得る担体とからなる医薬組成物である。

これら「剤」または「薬剤」、「医薬組成物」における「化合物」とは、天然又は合成の化合物を意味する。し、同様に「ペプチド」とは、アミノ酸が複数ペプチド結合した化合物を意味し、オリゴ・ペプチドであってもポリペプチドであってもよい。「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドが30個程度以上重合したポリマーを意味する。「抗体」とは、所謂免疫グロブリン（Ig）を意味する。 20

本発明のこれら医薬組成物は、後述する炎症疾患、特に肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤として有効である。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロア剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。 30

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記ポリペプチドや抗体など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき10 μ gから1000mg（あるいは10 μ gから500mg）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1 μ g抗体/ml担体～10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、1 μ g～100mgの割合で、好ましくは50 μ g～50mgの割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。 40

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。 50

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の「剤」または「薬剤」乃至「医薬組成物」は、肥満細胞の脱顆粒反応が関与している疾患、例えば、炎症性疾患等の治療及び予防に適用が可能である。特にアレルギー性疾患、自己免疫疾患等の慢性炎症に有効である。

なお、アレルギー性疾患について更に詳述すれば以下のとおりである。

アレルギー炎症は、周知のとおり、抗原の生体内への侵入、マクロファージによる貪食と抗原提示、T_hの抗原認識とIL-4産、B細胞の刺激とIgE抗体産生、FcεRI 10との結合と脱顆粒反応への進展の過程を経て発症する。

また、これらアレルギー炎症は病的には、下記のとおりである。

- (1) IgE産生を亢進するアトピー性皮膚炎。
- (2) IgEを介さない非特異的な刺激による活性化 (Substance P、compound 48/80)。
- (3) 肥満細胞遊離のケミカルメディエーターによる多彩な炎症像や細胞遊走活性による炎症細胞の集積。
- (4) 好酸球が遊離物質による組織障害。
- (5) 局所浸潤のT細胞からのサイトカインによる炎症細胞機能修飾 (T_h2細胞からのIL-3、IL-5、GM-CSFなどによる好酸球遊走と活性化)。
- (6) T細胞および肥満細胞からのサイトカインによる血管内皮細胞と好酸球などの炎症細胞表面への接着分子誘導。

これら炎症は、生体組織に何らかの有害な起炎物質が作用した時に生体が示す局所反応であり、生体防御の一過程である。血管透過性をあげ、局所に白血球を浸出させ、血漿などの防御因子を局所に漏出させ、血液凝固の促進、血管内閉塞、局所の酸素濃度を低下させることによって病原体の増殖抑制と毒素の拡散を防止する。

そして、これら炎症反応に伴って以下のような現象が監察される。

- (1) 組織傷害；
これは、病原生物、物理刺激（火傷）や化学的刺激（酸腐食）、異物、あるいは抗原抗体反応によって起こる。
- (2) 微小血管での変化；
微小血管は一時的に収縮した後に拡張し、その結果、細静脈で血管内皮細胞間のtight junctionの間隙が広がり血漿が浸潤し、その後炎症細胞が血管外へと遊走する。ヒスタミンやプロスタグランディン類が内皮細胞や炎症細胞に作用する。
- (3) 修復；
マクロファージが貪食することにより起炎物質を除去し、線維芽細胞の増殖と血管新生により肉芽組織が形成される。傷害された実質細胞が再生することがある。

- (4) 慢性化；
修復時に起炎物質が除去されない時は慢性化が起きる。
これら炎症は、起炎物質の作用時に生体が示す反応であり、これには抗原抗体反応を伴う。Rec168の反応は免疫非関与であることから、アレルギー炎症の「IgEを介さない非特異的な刺激による活性化 (Substance P、compound 48/80)」の部分と炎症の「火傷による細胞傷害や異物混入（例えば、蜂毒や細菌感染など）」の複合型である。

特に肥満細胞と関わりが強いとされる疾患としては下記のごとき疾患を例示することができる。

- (1) 胃炎、胃潰瘍；
肥満細胞の優位な増加が認められ、肥満細胞脱顆粒の電顕所見が認められる。
- (2) 肝硬変；
胆管周囲に存在する肥満細胞集が増加し、肝の線維増生・肝内微小血行調節や血管新生 50

に關与する。

(3) 慢性胆道系疾患(肝内結石症、原発性硬化性胆管炎) :

肝内大型胆管や隔壁胆管の胆壁の線維性肥厚や胆管周囲の線維化が認められる。胆管周囲肥満細胞が増加し、この肥満細胞には線維化に關与する b F G F、その他 T N F - α 、I L - 1、T G F - β などのサイトカインの産生が認められる。

(4) 潰瘍性大腸炎 :

活動期の潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜では正常の肥満細胞がほとんどなく、脱顆粒後の形態を示す。

(5) 慢性炎症性血管病 :

肥満細胞の増加と脱顆粒、肥満細胞のキマーゼの過剰発現のために起こるとされるアンジオテンシン I I が過剰産生される。 10

(6) 動脈硬化 :

ヒト冠状動脈効果病変において肥満細胞を認め、活性化肥満細胞が動脈硬化血管内皮プラークに多く存在する。

(7) 心臓アナフィラキシー :

ヒトの心臓、とくに血管周囲や筋鞘の近傍、動脈硬化巣内に肥満細胞が存在する。I 型アレルギーで肥満細胞が活性化する。

(8) 肺線維症 :

膠原線維の沈着部位に一致して肥満細胞が増加する。b F G F 陽性肥満細胞の存在が確認される。 20

(9) 気管支喘息 :

肥満細胞が増加し、脱顆粒像の様相を呈する。

(10) 腎炎(尿細管間質腎炎、糸球体腎炎) :

尿細管質、腎間質の血管周囲あるいは糸球体周囲の結合組織内に肥満細胞が増加する。I L - 4 陽性肥満細胞の存在が確認される。

(11) 間質性膀胱炎 :

肥満細胞が増加する。S u b s t a n c e P などのニューロペプチドの尿中での増加が認められる。

(12) アトピー性皮膚炎 :

肥満細胞の増加、T N F - α や I L - 4 の産生が認められる。C 線維神経終末から分泌される S u b s t a n c e P で新たな肥満細胞の活性化と脱顆粒が惹起される。 30

(13) ケロイド :

真皮に於ける膠原線維成分の増加、肥満細胞の増加と脱顆粒像が認められる。膜安定化剤トラニラスト治療と予防への効果あり。

(14) 血管増殖性疾患(カポジ肉腫、悪性血管内皮細胞種) :

肥満細胞の増加と b F G F 陽性肥満細胞の存在が確認される。

(15) 慢性関節リュウマチ :

滑膜に肥満細胞増加と脱顆粒像が認められる。肥満細胞欠如マウスによる肥満細胞関与が証明された。

(16) アレルギー性鼻炎 :

肥満細胞が増加する。 40

(17) アレルギー性結膜炎 :

肥満細胞が増生する。

(18) 胃がん :

胃がん周辺に肥満細胞が浸潤、肥満細胞多いと予後悪し。腫瘍血管新生に關与する。

(19) 大腸がん、乳がん、皮膚の基底細胞がん、軟部組織腫瘍、メラノーマなどの悪性腫瘍 :

間質に肥満細胞の集積が認められる。

(20) 非小細胞肺癌 :

肥満細胞のガン間質への集積、血管新生に關与の可能性、肥満細胞に於ける V E G F の 50

発現が認められる。

即ち、肥満細胞が関与する疾患としては、上記のとおり、胃炎、胃潰瘍：肝硬変：慢性胆道系疾患（肝内結石症、原発性硬化性胆管炎）：潰瘍性大腸炎：慢性炎症性血管病：動脈硬化：心臓アナフィラキシー：肺線維症：気管支喘息：腎炎（尿細管間質腎炎、糸球体腎炎）：間質性膀胱炎：アトピー性皮膚炎：ケロイド：血管増殖性疾患（カポジ肉腫、悪性血管内皮細胞種）：慢性関節リュウマチ：アレルギー性鼻炎：アレルギー性結膜炎：胃がん：大腸がん、乳がん、皮膚の基底細胞がん、軟部組織腫瘍、メラノーマなどの悪性腫瘍：非小細胞肺癌：その他蕁麻疹、全身性エリトマトーデス、多発性硬化症、膠原病、悪性腫瘍、Bリンパ腫、B細胞白血病、等を挙げることができる。

また、本発明の「剤」または「薬剤」の種々疾患症状の治療効果については、常法に従って、既知の疾患モデル動物に投与することにより試験、検討することができる。

Rec168アゴニスト作用を有するリガンドのシグナル伝達能

本発明において、「Rec168アゴニスト作用を有するリガンド」とは、Rec168を介して細胞内にシグナルを伝達できる物質のことであって、シグナルの種類、物質の種類等は特に限定されるものではない。またここで言う「シグナル伝達能」は、Rec168アゴニスト作用を有するリガンド物質が、Rec168を介して細胞内に伝達することができるシグナルの程度により表されるものであるが、上記と同様にシグナルの種類、リガンド物質の種類等に特に限定はない。

例えば、上記シグナル伝達能を測定する工程としては、以下のようなレポーター遺伝子を用いたアッセイ（レポータージーンアッセイ）（国際特許出願公開WO92/02639号、及び特表平6-502527など）を用いることができる。ここで、レポータージーンアッセイとは、細胞に、被験物質を接触させ、該化合物の作用に依存して発現されるレポーター蛋白質の量を、該蛋白質が発する蛍光の量を測定することにより間接的に測定することにより、該被験物質のG蛋白質共役型受容体との相互作用の有無を分析する方法である。また、該レポータージーンアッセイは、マニュアル作業でも可能であるが、機械（ロボット）を用いて自動で行う所謂ハイスループットスクリーニング（High Throughput Screening）（組織培養工学、Vol. 23、No. 13、p. 521-524；米国特許第5、670、113号）を用いることにより迅速、簡便に行うことができる。

例えば、レポータージーンアッセイを用いて、被験物質のRec168を介するシグナル伝達能を測定する工程、またはRec168アゴニスト作用を有するリガンドを選定する工程としては、以下のようなものが考えられる。

Rec168のリガンドを同定するために物質をスクリーニングする方法における工程であって、下記（a）乃至（c）の工程を含むことを特徴とするもの：

（a）少なくとも下記（1）及び（2）の外來性遺伝子：

（1）Rec168をコードする遺伝子；及び

（2）Rec168を介する刺激により発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域に発現可能に連結されたレポーター遺伝子；

を有するPC12由来細胞の定数からなる試料の複数を準備し、該試料の各々に異なる物質を接触させる工程；

（b）工程（a）で該物質に接触させた各々の試料について、該試料中の各細胞において発現した該レポーター遺伝子が生ずる検出可能なシグナルを、いずれの物質にも接触させていない該試料の各細胞において発現した該レポーター遺伝子が生ずる検出可能なシグナルの各々を定量的に決定する工程；及び、

（c）工程（b）で決定した該各々のシグナルの量を比較する工程。

本工程において、Rec168を介した刺激により発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域としては、最初期遺伝子（immediate-early gene）のプロモーター領域が挙げられる。本発明で用いられる最初期遺伝子のプロモーターとしては、例えば、c-fosプロモーター領域やzif268プロモーター領域（Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、Vol. 86、p. 377-381、1989；「

EGR-1」、「NGF1-A」、「Krox24」、「Tis8」または「cef5」とも称される。)が挙げられる。特に好ましい態様としては、zif268 (EGR-1) プロモーター領域が挙げられる。また、本発明で使用するプロモーターとしては、前記プロモーターの任意の動物種の対応物も包含される。

ここで「プロモーター領域」とは、プロモーター活性を発現するために必要な最小の塩基配列を含む任意の領域を意味する。例えば、該遺伝子の転写部位に対して上流約500bp乃至約2kbpの領域の一部または全部を用いることが可能である。さらに本発明における標記プロモーター領域としては、ミニマルプロモーターの上流に転写因子結合配列であるSRE (serum response element) 及び/またはCRE (cAMP response element) を有するプロモーター領域が挙げられる。 10

本工程における「レポーター遺伝子」は、検出可能な蛍光を発するレポーター蛋白質をコードする遺伝子を意味する。具体的には、例えば、蛍若しくはウミシイタケなどに由来するルシフェラーゼ、またはクラゲ由来のGFP (Green Fluorescence Protein) などを挙げることができる。さらには、例えば、 β ガラクトシダーゼをコードする遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、及び β ラクタマーゼをコードする遺伝子を挙げることができる。

本工程における「PC12由来細胞」とは、ラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞株 (ATCC CRL-1721; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 73, p. 2424-2426, 1976; Science, Vol. 229, p. 393-395, 1985; EMBO J., Vol. 2, p. 643-648, 1983) または該PC12細胞株からサブクロニングされた任意の細胞株を意味する。好ましくは、該サブクロニングされた細胞であって、且つ下記の性質を有するものである。 20

即ち、該細胞に、(1) Rec168をコードする遺伝子、並びに(2)「G蛋白質を介する刺激により発現が誘導される遺伝子のプロモーター領域に発現可能に連結されたレポーター遺伝子」を外来的に導入して得た組換え細胞に、Rec168のリガンドを接触させた場合に、発現が誘導される該レポーター遺伝子産物の量が、宿主細胞として該PC12細胞株を用いて検出されるレポーターの量よりも高い値が得られる細胞である。

該サブクロニングされた細胞としては、例えば、PC12h細胞株 (Brain Research, Vol. 222, p. 225-233, 1981) 並びに該PC12h細胞株からサブクロニングされた種々細胞を好ましい態様として例示することができる。 30

さらに、上記シグナル伝達能を測定する工程としては、細胞内遊離カルシウム量を測定する方法が用いられることもある。細胞表面に発現したRec168と、これに結合する化合物を含むと予想される被験物質とを接触せしめ、常法に従って細胞内遊離カルシウムを測定し、Rec168を介して細胞内にシグナルを伝達する活性を有する化合物を選択することができる。

この工程においては、Rec168発現細胞及びRec168非発現細胞のそれぞれに対して被験物質を添加し、細胞内遊離カルシウム濃度の変化を測定する。両者の結果を比較し、Rec168を強制発現させた細胞株のみで細胞内遊離カルシウム濃度の変化が大きい物質をRec168を介するシグナル伝達能の高い物質とし、Rec168のリガンドの候補として選定することができる。 40

細胞内遊離カルシウム濃度の測定は当業者に公知の方法で行うことができる。例えば、96穴や384穴などのマルチウエルプレートに細胞を播種し、細胞内カルシウムの蛍光検出試薬 (Fura-2など) をロードし、リガンド候補物質で刺激を行い、細胞内カルシウム測定用蛍光分光器で測定することができる。

さらに、上記シグナル伝達能を測定する工程としては、例えばGTP結合試験を用いることもできる。この試験においては、フィルタープレートに添加したRec168発現細胞及び非発現細胞の細胞膜画分に被験物質を反応させ、膜画分に結合したGTP量を測定 50

し比較することにより、被験物質がG蛋白質共役型受容体であるR e c 1 6 8を介して特異的なシグナルを伝達するか否かを解析することができる。G T P結合活性の測定は当業者に公知の方法で行うことができ、特に限定されないが、例えば、パーキンエルマー社のD E L F I A G T P - b i n d i n g k i t A D 0 1 6 7等のキットを用いると簡便に測定することができる。

本発明における、「R e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンド」の好ましい例としては、例えば、M C D - P、[D - P r o²、D - T r p^{7、9、10}] - S u b s t a n c e P (1-11)、[D - P r o⁴、D - T r p^{7、9、10}] - S u b s t a n c e P (1-11)、[D - T r p^{7、9、10}] - S u b s t a n c e P (1-11)、S o m a t o s t a t i n 28、C h a p e r o n i n 10 (1-20)、P l a t e l e t F a c t o r - 4、p C N P (1-17)、S u b s t a n c e P、I n d o l i c i d i n、A n g i o p e p t i n、P A C A P (6-27)、S o m a t o s t a t i n、C o r t i s t a t i n 14、M B P、M B P (99-110)、E C P、E C P (29-45)等を挙げることができる。

R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質

本発明は、R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドのシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法を提供する。また、本発明は、R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドのシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程を含むことを特徴とする、R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質の同定方法をも提供する。

R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質の同定方法とは、被験物質がR e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質であるか否かを同定することを意味する。したがって、かかる「R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質の同定方法」は、概念上、「R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法」を包含する。

本発明者らは、R e c 1 6 8が肥満細胞の脱顆粒及びプロスタグランジンD₂産生を誘導する蛋白質であることを見出した。すなわち、R e c 1 6 8アゴニスト活性を有するリガンド物質がR e c 1 6 8に結合することにより、細胞内シグナル伝達過程を経て、脱顆粒反応及びプロスタグランジンD₂産生が誘導される。

本発明において「R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質」とは、R e c 1 6 8アゴニスト活性を有するリガンド物質がR e c 1 6 8に結合することにより引き起こされる細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制することができる物質のことであり、このような作用を有する物質であれば、特に限定されるものではない。このような作用を有する物質は、言い換えれば、「R e c 1 6 8アンタゴニスト作用を有する物質」である。

R e c 1 6 8が肥満細胞の脱顆粒またはプロスタグランジンD₂産生を誘導する蛋白質であるため、R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドのシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程により選択された同シグナル伝達能を抑制する物質であれば、R e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質であると考えられる。従って、本発明においてR e c 1 6 8を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法または同定方法としては、R e c 1 6 8を発現している細胞を用いて、被験物質の共存下及び非共存下においてR e c 1 6 8アゴニスト作用を有するリガンドのシグナル伝達能を測定する工程、並びに両測定値を比較する工程のみが含まれているものであってもよい。

さらには、上記工程に以下の工程を組み合わせた方法も好ましい。また、R e c 1 6 8

を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質のスクリーニング方法または同定方法としては、以下に示す工程のみでもよい。

例えば、Rec168と、Rec168アゴニスト活性を有するリガンド物質との結合を抑制する物質は、Rec168を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジンD₂産生を抑制する物質であると考えられる。このような物質のスクリーニング方法または同定方法としては、被験物質存在下、非存在下での、リガンド物質のRec168への結合性を比較する方法が可能である。尚、リガンド物質の結合性の検出、比較は、次のように行うことができる。

ここで、本発明におけるスクリーニングまたは同定に用いられるRec168は組換えポリペプチドであっても、天然由来のポリペプチドであってもよい。また部分ペプチドであってよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被験物質としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製ポリペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被験物質を接触させる本発明のポリペプチドは、例えば、精製したポリペプチドとして、可溶型ポリペプチドとして、担体に結合させた形態として、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被験物質に接触させることができる。

被験物質存在下、非存在下での、リガンド物質のRec168への結合性を検出、比較する方法としては、リガンド物質がポリペプチドである場合には、以下のように当業者に公知の多くの方法により行うことができる。

例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。Rec168をコードする遺伝子を、pSV2neo、pcDNA1、pCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしてはSV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol. 3, Academic Press, London, p. 83-141 (1982)), EF-1 α promoter (Kim Gene 91, p. 217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p. 193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p. 684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p. 466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p. 3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p. 385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987)), リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987)), DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985)), リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位（エピトープ）をRec 168のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合ポリペプチドとしてRec 168を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学13、85-90（1995））。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質（GFP）などとの融合ポリペプチドを発現することができるベクターが市販されている。

融合ポリペプチドにすることによりRec 168の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合ポリペプチドを調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン（His-tag）、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖蛋白質（VSV-GP）、T7 gene10蛋白質（T7-tag）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質（HSV-tag）、E-tag（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、Rec 168に結合するポリペプチドのスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる（実験医学 13、85-90（1995））。10

免疫沈降においては、これらの抗体を、被験物質の存在下及び非存在下において、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体はRec 168、それと結合能を有するポリペプチド、および抗体からなる。被験物質が、Rec 168とリガンド物質との結合を抑制する活性を有するものである場合には、これら免疫複合体中のリガンド物質の量がコントロールと比較して減少することとなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のポリペプチドに対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のポリペプチドに対する抗体は、例えば、Rec 168をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたポリペプチドを精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成したRec 168の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。20

免疫複合体は、例えば、抗体がマウスIgG抗体であれば、Protein A SepharoseやProtein G Sepharoseを用いて沈降させることができる。また、Rec 168を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合ポリペプチドとして調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、Rec 168の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。30

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献（Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp. 511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

また、Rec 168に結合するリガンド物質であるポリペプチドの量を測定する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法（Skolnik, E. Y. et al.、Cell (1991) 65、83-90）が考えられる。すなわち、Rec 168と結合するリガンドポリペプチドを発現している細胞、組織、臓器（例えば、精巣）よりファージベクター（ λ gt11、ZAPなど）を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたポリペプチドを固定し、被験物質の存在下、及び非存在下において、精製して標識した本発明のポリペプチドと上記フィルターとを反応させ、Rec 168と結合したポリペプチドを発現するブランクを標識により検出すればよい。被験物質がRec 168とリガンド物質との結合を阻害する活性を有するものである場合には、カウントが低く検出されることとなる。Rec 168を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、Rec 168又はRec 168に融合したポリペプチド（例えばGSTなど）に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げら 50

れる。

被験物質存在下、非存在下での、リガンド物質の R e c 1 6 8 への結合性を検出、比較する方法としては、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行う方法も考えられる。例えば、R e c 1 6 8 をアフィニティークラムの担体に固定し、被験物質存在下、非存在下で R e c 1 6 8 アゴニスト活性を有するリガンド物質を結合させた後、カラムを洗浄し、R e c 1 6 8 に結合したリガンド物質量を比較することができる。

被験物質存在下、非存在下での、リガンド物質の R e c 1 6 8 への結合性を検出、比較する方法としては、ペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、R e c 1 6 8 に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法 (W r i g h t o n N C ; F a r r e l l F X ; C h a n g R ; K a s h y a p A K ; B a r b o n e F P ; M u l c a h y L S ; J o h n s o n D L ; B a r r e t t R W ; J o l l i f f e L K ; D o w e r W J . , S m a l l p e p t i d e s a s p o t e n t m i m e t i c s o f t h e p r o t e i n h o r m o n e e r y t h r o p o i e t i n , S c i e n c e (U N I T E D S T A T E S) J u l 2 6 1 9 9 6 , 2 7 3 p 4 5 8 - 6 4 , V e r d i n e G L . , T h e c o m b i n a t o r i a l c h e m i s t r y o f n a t u r e . N a t u r e (E N G L A N D) N o v 7 1 9 9 6 , 3 8 4 p 1 1 - 1 3 , H o g a n J C J r . , D i r e c t e d c o m b i n a t o r i a l c h e m i s t r y . N a t u r e (E N G L A N D) N o v 7 1 9 9 6 , 3 8 4 p 1 7 - 9) が当業者に公知である。

本発明において、結合した物質を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、R e c 1 6 8 と被験物質との間の相互作用を微量のポリペプチドを用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である (例えば B I A c o r e , P h a r m a c i a 製)。したがって、B I A c o r e 等のバイオセンサーを用いることにより本発明のポリペプチドと被験物質との結合を評価することが可能である。

また、R e c 1 6 8 を介する脱顆粒反応またはプロスタグランジン D₂ 産生を抑制する物質のスクリーニング方法または同定方法としては、直接的に、細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジン D₂ 産生を測定し、比較する方法も可能である。

尚、R e c 1 6 8 発現細胞に被験物質を接触せしめ、R e c 1 6 8 を介した細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジン D₂ 産生を誘導することができる物質は「R e c 1 6 8 アゴニスト作用を有するリガンド」のひとつであると言える。

例えば、R e c 1 6 8 を発現した肥満細胞と発現していない肥満細胞に対して被験物質を添加することによって、R e c 1 6 8 を発現した肥満細胞においては脱顆粒またはプロスタグランジン D₂ 産生を誘導するが、発現していない細胞においては誘導しないような物質を選定する方法が考えられる。肥満細胞は、造血幹細胞より常法に従って分化誘導させることができ、培養条件によって R e c 1 6 8 発現細胞、非発現細胞を誘導することが可能である。

ここで、肥満細胞としては、血液、組織から直接分離したものを用いることもできる。R e c 1 6 8 発現細胞、非発現細胞は、R e c 1 6 8 に対する抗体を用いたソーティングにより分離することも可能である。また、肥満細胞としては、培養細胞株を用いることもできる。

R e c 1 6 8 を介する細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジン D₂ 産生を抑制する物質のスクリーニング方法としては、被験物質存在下、非存在下での、R e c 1 6 8 を介したリガンド物質による細胞の脱顆粒反応またはプロスタグランジン D₂ 産生の程度を比較する工程が含まれていれば特に限定されるものではない。

R e c 1 6 8 の発現を制御する物質のスクリーニング方法

さらに、本発明は、細胞における R e c 1 6 8 蛋白質、又は R e c 1 6 8 をコードするポリヌクレオチドの発現を制御する物質のスクリーニング方法をも提供することができる

。本発明のひとつの態様としては、細胞に対して披検物質を作用させる前後における細胞表面上の R e c 1 6 8 蛋白質発現、又は R e c 1 6 8 遺伝子発現の程度を比較することにより行うことができる。

細胞における R e c 1 6 8 の発現の変化を検出する方法としては、当業者に公知の方法で行うことができる。このような方法としては、例えば、ノーザンブロッティング法や R T - P C R 法などを例示することができるがこれらに制限されない。ノーザンブロッティング法においては、検査対象となる細胞の R N A を精製し、アガロースゲル中にて電気泳動し、メンブレンにブロットしたものに、本発明の遺伝子を放射能などで標識したプローブをハイブリダイズさせ、特異的に出現するバンドの有無、濃淡で本発明のポリヌクレオチドの発現を測定する。また、R T - P C R 法では、検査対象となる細胞の R N A を精製し、逆転写酵素により c D N A とし、これを鋳型として、R e c 1 6 8 に特徴的な配列をプライマーとして、本発明の遺伝子の転写産物由来の c D N A を P C R により増幅する。これにより増幅された c D N A の量は鋳型となった c D N A の量、ひいては R e c 1 6 8 の転写産物の量に比例すると考えられるので、この P C R により増幅された D N A 断片の量を電気泳動法などを用いて測定することで、R e c 1 6 8 の発現量を測定できる。

また他の方法としては、例えば、本発明の抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、R e c 1 6 8 または該ポリペプチドを含む細胞を免疫学的に検出することができる。該検出方法は、R e c 1 6 8 をコードする遺伝子（ゲノム D N A 等）の変異または発現異常が原因となり得る疾患の診断にも利用することができる。また、R e c 1 6 8 の定量方法としては、免疫学的に検出する方法として、マイクロタイタープレートを用いる E L I S A 法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等があげられる。また、液相中で R e c 1 6 8 と反応する抗体のうちエピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A 法、放射性ヨード等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

また他の方法として、R e c 1 6 8 の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結された D N A を含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験物質とを接触させ、R e c 1 6 8 の発現を制御する化合物を選択することにより行うこともできる。レポーター遺伝子としては、その発現が検出可能なものであれば特に制限されず、例えば、当業者において一般的に使用される C A T 遺伝子、l a c Z 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子（G U S）および G F P 遺伝子等を挙げることができる。また、上記レポーター遺伝子には、R e c 1 6 8 をコードする D N A もまた含まれる。

レポーター遺伝子の発現レベルは、使用するレポーター遺伝子の種類に応じて、当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、レポーター遺伝子が C A T 遺伝子である場合には、該遺伝子産物によるクロラムフェニコールのアセチル化を検出することによって、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。レポーター遺伝子が l a c Z 遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による色素化合物の発色を検出することにより、また、ルシフェラーゼ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による蛍光化合物の蛍光を検出することにより、また、 β -グルクロニダーゼ遺伝子（G U S）である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による G l u c u r o n （I C N 社）の発光や 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - グルクロニド（X - G l u c）の発色を検出することにより、さらに、G F P 遺伝子である場合には、G F P タンパク質による蛍光を検出することにより、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。

また、R e c 1 6 8 をレポーターとする場合、該遺伝子の発現レベルの測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、該遺伝子の m R N A を定法に従って抽出し、この m R N A を鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法、または R T - P C R 法を実施することによって該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。さらに、D N A アレイ技術を用いて、該遺伝子の発現レベルを測定することも可能である。

また、該遺伝子からコードされる R e c 1 6 8 を含む画分を定法に従って回収し、該ポリヌクレオチドの発現を S D S - P A G E 等の電気泳動法で検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うこともできる。また、R e c 1 6 8 に対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法などを実施し、該ポリペプチドの発現を検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うことも可能である。

本発明のスクリーニング方法または同定方法により得られる物質は、R e c 1 6 8 蛋白質若しくは R e c 1 6 8 をコードするポリヌクレオチドの発現を制御するための、又は R e c 1 6 8 蛋白質の活性（例えば、R e c 1 6 8 蛋白質を介するシグナル伝達能）を調節（例えば、抑制）するための薬剤の候補となり、R e c 1 6 8 の発現異常や機能異常などに起因する疾患や R e c 1 6 8 の活性を制御することにより治療可能な疾患の治療への応用が考えられる。治療や予防の対象となる疾患としては、例えば、炎症性疾患、特にアレルギー性疾患、自己免疫疾患等の慢性炎症が考えられる。本発明のスクリーニング方法または同定方法により得られる物質の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明の範囲に含まれる。

炎症性疾患

炎症性疾患とは、特に肥満細胞が関与する炎症性疾患とは、特に肥満細胞が関与するアレルギー性疾患、自己免疫疾患等の慢性炎症を意味し、それらアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の具体的な例としては、前記の通り、胃炎、胃潰瘍；肝硬変；慢性胆道系疾患（肝内結石症、原発性硬化性胆管炎）；潰瘍性大腸炎；慢性炎症性血管病；動脈硬化；心臓アナフィラキシー；肺線維症；気管支喘息；腎炎（尿細管間質腎炎、糸球体腎炎）；間質性膀胱炎；アトピー性皮膚炎；ケロイド；血管増殖性疾患（カポジ肉腫、悪性血管内皮細胞種）；慢性関節リウマチ；アレルギー性鼻炎；アレルギー性結膜炎；胃がん；大腸がん、乳がん、皮膚の基底細胞がん、軟部組織腫瘍、メラノーマなどの悪性腫瘍；非小細胞肺がん；その他蕁麻疹、全身性エリトマトーデス、多発性硬化症、膠原病、悪性腫瘍、Bリンパ腫、B細胞白血病、等を挙げることができる。

診断薬

本発明は、R e c 1 6 8 をコードする遺伝子の発現の異常または R e c 1 6 8 の活性の異常に関連した疾患の診断薬を提供する。R e c 1 6 8 は肥満細胞の脱顆粒を誘導する機能を有するため、その発現や機能の異常は、慢性炎症等種々の疾患の原因となり得る。従って、R e c 1 6 8 の不適当な活性または発現、リガンド分子の体内発現量を指標とすることにより、このような疾患の診断を行うことも可能である。

本発明において「診断薬」とは、疾患の症状を呈している被験者の治療戦略を立てるための診断薬のみならず、被験者が疾患にかかりやすいか否かを判断するために使用する予防のための診断薬も含まれる。

本発明の診断薬の一つの態様は、被験者における R e c 1 6 8 のリガンド物質の体内発現量を測定するために用いる R e c 1 6 8 蛋白質またはその部分ペプチドを含有する診断薬である。R e c 1 6 8 蛋白質またはその部分ペプチドをあらかじめコーティングしたプレートに被験者から調製した血液試料を添加し、標識したリガンド物質に対する抗体を用いて、血液試料中のリガンド物質の量を定量することができる。

本発明の診断薬の一つの態様は、被験者における R e c 1 6 8 をコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出できるものである。

一つとしては、被験者における R e c 1 6 8 をコードする遺伝子またはその発現制御領域の塩基配列を直接決定することによって検査を行うための診断薬であり、例えば R e c 1 6 8 をコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む D N A にハイブリダイズするプローブ又はプライマーを含むものである。被験者における R e c 1 6 8 をコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出することができれば、その使用方法是特に限定されない。例えば、まず、被験者から D N A 試料を調製する。D N A 試料は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液等から抽出した染色体 D N A あるいは R N A を基に調製することができる。染色体 D N A から本方法の D N A 試料を調製するには、例えば染色体 D N A を適当な制限酵素で切断し、ベクターにクローニングして、ゲノムライブラリーを作

製すればよい。RNAからDNA試料を調製するには、例えば、逆転写酵素を用いて、RNAからcDNAライブラリーを作製すればよい。次いで、Rec168をコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、Rec168をコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプローブを用いて、ゲノムライブラリーやcDNAライブラリーのスクリーニングをすることにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノムDNAライブラリー、cDNAライブラリー、あるいはRNAを鋳型としたPCRによって単離することもできる。次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。選択したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。次いで、決定したDNAの塩基配列を、
10 対照と比較する。「対照」とは、正常な（野生型の）Rec168をコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAの塩基配列を言う。このような比較の結果、被験者のDNAの塩基配列が対照と異なっていた場合には、被験者は、疾患に罹患しているまたは発症の危険があると判定される。

本発明の診断薬の一つの態様は、被験者におけるRec168蛋白の発現量または活性を測定するために用いるRec168あるいはその部分ペプチドに対する抗体、又はRec168のリガンド物質を含有する診断薬である。被験者から調製した血液試料中から肥満細胞を分離し、Rec168あるいはその部分ペプチドに対する抗体、又はリガンド物質を反応させ、肥満細胞上のRec168分子の発現量、リガンド結合能をフローサイトメーターにて測定することができる。発現量やリガンド結合能が増大している場合には、
20 発症の危険があると判定される。

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

【実施例1】

【0008】

Rec168 (MRGX2) のクローニング

ヒト精巢poly(A)⁺ RNAを鋳型として逆転写反応を行い、cDNAを合成した。反応にはHigh Fidelity RNA PCR Kit (TaKaRa) に添付される試薬を使用した。反応系は、ヒト精巢poly(A)⁺ RNA (1 μg/μL) 0.01 μL、2×Bca 1st buffer 2 μL MgSO₄ (25mM) 0.8 μL、dNTP Mixture (10mM) 0.2 μL、RNase Inhibitor (40 units/μL) 0.1 μL、Bca PLUS RTase (42 U/μL) 0.2 μL、Random Hexamer (50 μM) 0.2 μLを滅菌水でメスアップし4 μLとした。これを65℃1分、30℃1分、30-65℃15分、65℃30分、98℃5分、5℃5分反応させた。
30

1次PCRはPyrobest DNA Polymerase (TaKaRa) に添付される試薬を使用した。上記で合成したcDNAを含む逆転写反応液4 μLに、dNTP Mixture (2.5mM each) 0.4 μL、10×Pyrobest buffer 2 μL、Pyrobest DNA Polymerase (5 units/μL) 0.1 μLに、それぞれ配列番号：3及び4に示した配列を有するプライマー168__PCR__F1 (5 μM) 4 μL及び168__PCR__R1 (5 μM) 4 μLを添加し、滅菌水でメスアップし20 μLとした。これを、94℃30秒、(94℃30秒、72-56℃ (1サイクルごとに1℃下げる) 30秒、72℃2分) ×17サイクル、(94℃30秒、55℃30秒、72℃2分) ×13サイクル、72℃3分反応させた。
40

2次PCRはPyrobest DNA Polymerase (TaKaRa) に添付される試薬を使用した。1次PCR反応液の100倍希釈液1 μLに、dNTP Mixture (2.5mM each) 0.8 μL、10×Pyrobest buffer II 1 μL、Pyrobest DNA Polymerase (5 units/μL) 0.05 μLに、それぞれ配列番号：5及び6に示した配列を有するプライマー168__PCR__F2 (5 μM) 2 μLと168__PCR__R2 (5 μM) 2 μLを添加し
50

、滅菌水でメスアップし10 μ Lとした。これを、94℃30秒、(94℃30秒、72℃56℃(1サイクルごとに1℃下げる)30秒、72℃2分)×17サイクル、(94℃30秒、55℃30秒、72℃2分)×13サイクル、72℃3分反応させた。

2次PCR産物は、1%アガロースゲルを用いて電気泳動法にて分離し、アガロースゲルの破片からDNAを抽出した。T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa) を使用して、末端のリン酸化を行い、これをTaKaRa Ligation Kit Ver. 2 (TaKaRa) を使用して、マルチクロニングサイトを制限酵素HpaIで消化し、脱リン酸化処理したベクターpENTR1A (インビトロジェン株式会社) と反応させた。この反応液を大腸菌DH5 α 株へ導入・形質転換し、カナマイシンを含むLB寒天培地で選択した。得られた大腸菌コロニーから、遺伝子が挿入されたクローンを選別し、プラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAを鋳型とし、Rec168 (MRGX2) のプライマー6種類を用いて塩基配列解析を行なった。プライマーは、168__PCR__F2 (配列番号: 5)、168__PCR__R2 (配列番号: 6)、168__SEQ__F1 (配列番号: 7)、168__SEQ__F2 (配列番号: 8)、168__SEQ__R1 (配列番号: 9)、168__SEQ__R2 (配列番号: 10) を使用した。DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (アマシャム バイオサイエンス株式会社) を用いたダイターミネーター法で反応させ、シーケンサーMegaBace1000 (アマシャム バイオサイエンス株式会社) を使用して解析した。目的の配列が挿入されたプラスミドDNAを「pENTR-Rec168」と名付けた。

10

20

【実施例2】

【0009】

発現ベクターの構築

pENTR1A (エントリーベクター) にクローニングされたpENTR-Rec168をGateway Systemテクノロジー (インビトロジェン株式会社) によって、目的の発現ベクター (デスティネーションベクター) へ挿入配列部分を相同組換え技術によって入れ換えた。

attL×attR組換え反応を仲介する酵素Gateway LR Clonase Enzyme Mix (インビトロジェン株式会社11791-019) を使用した。試薬は酵素に添付されている。今回は発現ベクターには、pME18Sをデスティネーション化したpME18S. rfaを使用した。エントリーベクター100ngとデスティネーションベクター100ngをTE bufferで6 μ Lにメスアップし、5×LR Clonase Reaction Buffer 2 μ Lと混合した。LR Clonase Enzyme Mix 2 μ Lを添加し、室温(25℃)で1時間インキュベーションした。反応停止するためにProteinase K Solution (2 μ g/ μ L) 1 μ L添加し37℃で10分間インキュベーションした。反応終了後、氷上に冷した。この反応液2.5 μ Lで氷上解凍したコンピテントセルJM109 (TOYO B) をtransformationし、アンピシリンを含むLB寒天培地で選択した。得られた大腸菌コロニーから、遺伝子が挿入されたクローンを選別し、プラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAを鋳型とし、遺伝子特異的なプライマーを用いて塩基配列解析を行った。BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いたダイターミネーター法で反応させ、シーケンサーABI3100 (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を使用して解析した。目的の配列が挿入されたプラスミドDNAを「pME-Rec168」と名付けた。

30

40

【実施例3】

【0010】

Rec168一過性発現PC12h細胞におけるレポーター活性の変化96ウェル法

10%ウマ血清 (Invitrogen 26050-088) と5%ウシ胎児血清 (JRH12103-78P) および0.5%ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigm 50

a P0906) 含有D-MEM (High-glucose) (日研生物 CM4402) 培地にてコラーゲン type I コートフラスコ (イワキ硝子 4143-010) で培養したラット腎臓由来 PC12h 細胞を、 2.25 cm^2 フラスコ (1×10^7 個細胞) から PBS (-) (日研生物 CM6201) でリンスした後、トリプシン/EDTA 溶液 (Invitrogen 5300-054) を用いて剥がした後、0.5% ウマ血清 (Invitrogen 26050-088) と 0.25% ウシ胎児血清 (JRH 12103-78P) および 0.5% ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma P0906) 含有 D-MEM (High-glucose) フェノールレッドフリー (日研生物 CM4410) 培地にて 1.5×10^5 個細胞/mL に調製した。この細胞懸濁液 1 mL あたり、ホタルルシフェラーゼ-zif レポータープラスミド DNA (pGL2-zif) を 100 ng、Gal4-protein プラスミド DNA (pME-neo-G16) を 50 ng、レセプタープラスミド DNA (pME-MRGX2) 1 μg を、D-MEM (High-glucose) フェノールレッドフリー (日研生物 CM4410) 培地 60 μL に溶解し、トランスフェクション試薬 SuperFect (QIAGEN 301307) を 2 μL と混合した。これと上記細胞懸濁液を混合したものを、コラーゲン type I コート 96 ウェルプレート (イワキ硝子 4860-010) に 100 μL ずつ分注し、CO₂ インキュベーターで 37℃ にて 48 時間培養した。

培養上清 50 μL を除去したのち、終濃度の 2 倍濃溶液に D-MEM (High-glucose) フェノールレッドフリー (日研生物 CM4410) 培地を用いて調製した被験物質を 50 μL 添加し、CO₂ インキュベーターで 37℃ にて 6 時間培養した。培養上清をすべて除去し、Luciferase Cell Culture Lysis Reagent (Promega E1531) を 25 μL /ウェル添加し、細胞を溶解した。

細胞溶解液 10 μL を 96 ウェル白プレート (Costar 3912) 分注し、ルミノメーター LB96V (ベルトールド) にてルシフェラーゼ基質フラッシュタイプ (Promega E4550) を 50 μL 添加し、ルシフェラーゼ活性 (単位; RLU) を測定した。ルシフェラーゼ活性値を Y 軸に、被験物質の濃度を X 軸にプロットした濃度依存曲線を作成し、EC₅₀ 値を導き出した。

3.8.4 ウェル法

96 ウェル法と同様にトランスフェクションした細胞懸濁液を、PEI (Polyethyleneimine) コーティングした 384 ウェル白プレート (Falcon 3988) に 40 μL ずつ分注し、CO₂ インキュベーターで 37℃ にて 48 時間培養した。PEI コーティングは、PEI (Sigma P3143) を滅菌水で 1000 倍希釈し、これを 25 μL /ウェル添加し 1 時間以上放置後、70 μL 滅菌水で 2 回洗浄した。

培養上清 50 μL を除去したのち、終濃度の 5 倍濃溶液に D-MEM (High-glucose) (日研生物 CM4402) 培地を用いて調製した被験物質を 10 μL 添加し、CO₂ インキュベーターで 37℃ にて 6 時間培養した。反応終了後、Steady Glo Luciferase Assay Reagent (Promega E2550) を 25 μL /ウェル添加し、1450 MICROBETA (Wallac) にてルシフェラーゼ活性 (単位; CCPS) を測定した。ルシフェラーゼ活性値を Y 軸に、被験物質の濃度を X 軸にプロットした濃度依存曲線を作成し、EC₅₀ 値を導き出した。

被検物質としては、Mast Cell Degranulating Peptide (MCD-P) (American Peptide 41-9-30)、Somatostatin 28 (American Peptide 68-1-50)、Atrial Natriuretic Peptide (1-28)、rat (American Peptide 14-5-41)、Bradykinin (American Peptide 18-1-10)、Neurotensin (American Peptide 60-1-12)、Magainin 2 (American Peptide 72-2-26)、Granuliberin R (American Peptide 87-0-72)、Substance P (ペプチド研究所 4014-v)

、Histatin 5 (ペプチド研究所 4270-s)、Platelet Factor-4 (ペプチド研究所 4305-v)、 α -Defensin-1 (HNp-1) (ペプチド研究所 4271-s)、Compound 48/80 (Sigma C2313)、Poly-L-lysine (Sigma P9404)、Chaperonin GroES (宝酒造 7331)、chaperonin 10 (1-20) (合成品)、2'、3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (1-17) (pCNP (1-17)) (合成品)、substance P antagonist (合成品)、histamine releasing peptide (合成品)、human HRP-1 (合成品)、human HRP-2 (合成品)、[d-Pro⁴、d-Trp⁷、⁹、¹⁰] substance P (4-10 11) (Bachem H4695)、eosinophil peroxidase peptide (合成品)、ABCA-SSN (合成品)、autoantigen SS-N (合成品)、[d-Pro²] substance P antagonist (合成品)、[d-Pro⁴] substance P antagonist (合成品)、cathelicidin (LL-37) (合成品)、catestatin (合成品)、Indolicidin (American Peptide 72-2-28)、Angiopepsin (American Peptide 68-1-45)、PACAP (6-27) (合成品)、VIP (1-28) (合成品)、Somatostatin (American Peptide 68-1-10)、BAM (8-22) (合成品)、cortistatin 14 (ペプチド研究所 4329-v)、Tropomyosin (1-12) (合成品)を用いた。陽性コントロールとして、10 μ M Forskolin (RBI F105) および 100 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (和光純薬 545-00216) を使用した。

使用した被検物質のペプチド配列は下記表1のとおりである。

【表 1】

表 1 被検物質のペプチド配列

[D-Pro ⁴ , D-Trp ^{7,9,10}] substance P (4-11)	dPro-Gln-Gln-dTrp-Phe-dTrp-dTrp-Met-NH ₂
[D-Pro ⁵] substance P antagonist	Arg-dPro-Lys-Pro-Gln-Gln-dTrp-Phe-dTrp-dTrp-Met-NH ₂
[D-Pro ⁷] substance P antagonist	Arg-Pro-Lys-dPro-Gln-Gln-dTrp-Phe-dTrp-dTrp-Met-NH ₂
ABCA-SSN	Leu-Lys-Pro-Leu-Ile-Leu-Gly-Lys-Leu-Phe-Ala-Pro-Phe-Thr-Arg-Lys-OH (配列番号: 11)
Angiopepsin	DNal-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂
Armal Natriuretic Peptide (1-28), rat	Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (配列番号: 12)
autoantigen SS-N	Leu-Lys-Pro-Leu-Ile-Leu-Gly-Lys-Leu-Phe-Ala-Pro-Asp-Thr-Pro-Phe-OH (配列番号: 13)
BAM(8-22)	Val-Gly-Arg-Pro-Glu-Tyr-Tyr-Met-Asp-Tyr-Gln-Lys-Arg-Tyr-Gly (配列番号: 14)
Bradykinin	Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (配列番号: 15)
catestatin	Arg-Ser-Met-Arg-Leu-Ser-Phe-Arg-Ala-Arg-Gly-Tyr-Gly-Phe-Arg-OH (配列番号: 16)
cathelicidin(LL-37)	Leu-Lys-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Gln-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser-OH (配列番号: 17)
chaperonin 10 (1-20)	ac-Ala-Gly-Gln-Ala-Phe-Arg-Lys-Phe-Leu-Pro-Leu-Phe-Asp-Arg-Val-Leu-Val-Glu-Arg-Ser-OH (配列番号: 18)
Compound 48/80	C11H15NOGnonomer ₂
cortistatin 14	Pro-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys-Lys (Disulfide bonds between Cys2-Cys13) (配列番号: 19)
eosinophil peroxidase peptide	Phe-Leu-Pro-Leu-Val-Leu-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Arg-Arg-OH (配列番号: 20)
Granuliberin R	Phe-Gly-Phe-Leu-Pro-Ile-Tyr-Arg-Arg-Pro-Ala-Ser-NH ₂ (配列番号: 21)
histamine releasing peptide	Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Pro-Tyr-Phe-OH (配列番号: 22)
Histatin 5	Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr (配列番号: 23)
human HRP-1	Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro-Tyr-Pro-OH (配列番号: 24)
human HRP-2	Val-Arg-Tyr-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Pro-Thr-Leu-OH (配列番号: 25)
Indolicidin	Ile-Leu-Pro-Tyr-Lys-Tyr-Pro-Tyr-Tyr-Pro-Tyr-Arg-Arg-NH ₂ (配列番号: 26)
Magainin 2	Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Glu-Ile-Met-Asn-Ser (配列番号: 27)
MCD-P	Ile-Lys-Cys-Asn-Cys-Lys-Arg-His-Val-Ile-Lys-Pro-His-Ile-Cys-Arg-Lys-Ile-Cys-Gly-Lys-Asn-NH ₂ (Disulfide bonds between Cys3-Cys16) (配列番号: 28)
Neurotensin	Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu (配列番号: 29)
PACAP(1-27)	His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Arg-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH ₂ (配列番号: 30)
PACAP(6-27)	Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Ser-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH ₂ (配列番号: 31)
pCNP(1-17)	ac-Asn-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Lys-Ser-Gln-Thr-Phe-Leu-Pro-Lys-Ile-Phe-Phe-OH (配列番号: 32)
Platelet Factor-4	Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (配列番号: 33)
Somatostatin	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Tyr-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys (Disulfide bonds between Cys3-Cys14) (配列番号: 34)
Somatostatin 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Tyr-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys (Disulfide bonds between Cys17-Cys28) (配列番号: 35)
[D-Trp ^{7,9,10}] substance P antagonist (1-11)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-dTrp-Phe-dTrp-dTrp-Met-NH ₂
Substance P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ (配列番号: 36)
Substance P (4-11)	Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ (配列番号: 37)
Tropomyosin(1-12)	ac-Met-Asp-Ala-Ile-Lys-Lys-Lys-Met-Gln-Met-Leu-Lys-Leu-Asp-Lys-OH (配列番号: 38)
VIP(1-28)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH ₂ (配列番号: 39)

10

20

30

40

した。その結果、MCD-P、cortistatin14、Compound 48/80、somatostatin28、Platelet Factor4、[D-Pro²] substance P antagonist、[D-Pro⁴] Substance P antagonist、substance P antagonist、Substance P、pCNP(1-17)、Indolicidin、Angiopsin、PACAP(6-27) histamine releasing peptide、human HRP-1では、Rec168を導入したPC12h細胞でルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。今回試した被検物質で全く応答しなかったものは、[D-Pro⁴、D-Trp^{7、9、10}] Substance P(4-11)、Granuliberin R、Histatin5、 α -Defensin-1、Poly-L-lysine、Chaperonin GroESであった。

結果を図1～3及び表2に示した。

図1に示すとおり、全てにおいてRec168を導入したPC12h細胞でルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。なお、ここでAはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

図2に示すとおり、全てにおいてRec168を導入したPC12h細胞でルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。なお、ここでAはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

図3に示すとおり、Rec168を導入したPC12h細胞でルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。なお、ここでAはRec168発現細胞、BはMockでの結果を示す。

【表 2】

表 2 PC12h/zif レポーターアッセイでの EC₅₀ 値

被験物質	EC ₅₀
MCD-P	50 nM
[D-Pro ² 、D-Trp ^{7、9、10}]-Substance P (1-11)	>100 nM
[D-Pro ⁴ 、D-Trp ^{7、9、10}]-Substance P (1-11)	300 nM
[D-Trp ^{7、9、10}]-Substance P (1-11)	300 nM
Somatostatin28	>500 nM
chaperonin10(1-20)	1 μM
Platelet Factor-4	2 μM
pCNP(1-17)	3 μM
SubstanceP	3 μM
ABCA-SSN	>5 μM
Magainin 2	>10 μM
histamine releasing peptide	>30 μM
human HRP-1	>30 μM
catestatin	>30 μM
Neurotensin	>30 μM
autoantigen SS-N	>30 μM
Bradykinin	>30 μM
cathelcidin(LL-37)	>30 μM
substance P(4-11)	>30 μM
human HRP-2	>30 μM
eosinophil peroxidase peptide	>30 μM
Atrial Natriuretic Peptide (1-28)、 rat	-
Granuliberin R	-
α-Defensin-1 (HNP-1)	-
Histatin 5	-
Chaperonin GroES	-
Poly-L-Lysine	-
Compound 48/80	0.3 μg/ml
Indolicidin	0.1 μM
Angiopeptin	1 μM
PACAP(6-27)	1 μM
VIP(1-28)*	ND
Somatostatin	1 μM
BAM(8-22)	-
cortistatin14	3 μM
Tropomyosin(1-12)	10 μM

*VIP(1-28)は、MOCK においても活性を示すため、EC50 は算出できない。

【実施例 4】

【0011】

安定形質発現細胞の作製

発現ベクター構築

Rec168 cDNAを、発現ベクターpLHCXI4 (図4参照) にサブクローニングし、pLHC-Rec168-I4 (図5参照) を構築した。このpLHC-Rec168-I4で形質転換したE. coli DH5 α を培養後、EndoFree Plasmid Mega Kit (キアゲン社) を用いてpLHC-Rec168-I4のDNAを調製した。

293細胞のtransfection

293細胞(ATCC CRL-1573)を10%牛胎仔血清を添加したD-MEM培地(日研生物医学研究所 CM4402)でファルコン6ウェルプレートに 7.5×10^5 個播種し、5% CO₂ インキュベーターで37℃一晩培養した。上記発現プラスミドpLHC-Rec168-I4 DNA 2.5 μ gを、LipofectAMINE 2000 Reagent (インビトロジェン社) 8 μ Lで添付取扱説明書の記述に従いトランスフェクションし、6時間後に培地を交換した。さらに、2日間培養した後、選択培地[200 μ g/mLのハイグロマイシン B (Invitrogen 10687-010)と10%牛胎仔血清を添加したD-MEM培地(日研生物医学研究所 CM4402)]に交換した。3~4日ごとに選択培地を交換しながら4週間培養を行い、ハイグロマイシン耐性細胞を得た。

MACSによるCD4陽性細胞の選択

上記で得たハイグロマイシン耐性細胞から、CD4陽性細胞をMACS select 4 transfected cell selection kit (Miltenyi Biotec社)で回収した。上記で得たハイグロマイシン耐性細胞を選択培地[200 μ g/mLのハイグロマイシン B (Invitrogen 10687-010)と10%牛胎仔血清を添加したD-MEM培地(日研生物医学研究所 CM4402)]で75 cm² フラスコに播種し、 1×10^7 個になるまで培養した。培地を廃棄し、D-PBS(日研生物医学研究所 CM6201)を10mLで細胞を洗浄した。5mM EDTAを添加したD-PBSを5mL加え、室温で10分置いて細胞を剥離させた。210 $\times$ gで3分間遠心して細胞を回収し、720 μ LのPBE(D-PBS/5mM EDTA/0.5% BSA)に懸濁した。80 μ LのMACS select 4 MicroBeads (Miltenyi Biotec社)を添加し、4℃で15分間結合させた後、PBEを1.2mL加えて希釈した。添付取扱説明書の記述に従いPBE 3mLで洗浄したLSカラム(Miltenyi Biotec社)にMACS select 4 MicroBeadsを結合させた細胞懸濁液を添加して結合させた。カラムを3mLのPBEで4回洗浄後、MACS separator磁石からはずし、5mLのPBEでCD4陽性細胞を回収した。回収したCD4陽性細胞を210 $\times$ gで3分間遠心した後、選択培地で75 cm² フラスコに播種した。3~4日ごとに選択培地を交換しながら10日間培養を行い、CD4陽性ハイグロマイシン耐性細胞を得た。得られたCD4陽性ハイグロマイシン耐性細胞をRec168安定発現293細胞とした。

【実施例5】

【0012】

細胞内遊離カルシウム測定

Rec168安定発現293細胞における細胞内遊離Ca²⁺濃度の変化

10%ウシ胎児血清(JRH 12103-78P)および0.5%ペニシリン/ストレプトマイシン(Sigma P0906)含有D-MEM(High-glucose)(日研生物 CM4402)培地にて培養したRec168安定発現293細胞、および293細胞(親株)を、PBS(-)(日研生物 CM6201)でリンスした後、フラスコを叩いて細胞を剥がした。Ca²⁺アッセイバッファー(20mM HEPES(ナカライ17514-15); (pH7.4; 1M KOH(ナカライ 286-16)で調製)、115mM NaCl(Sigma S5150)、5.4mM KCl(ナカライ 285-14)、0.8mM MgCl₂(ナカライ 209-09)、1.8mM CaCl₂(ナカライ 067-29)、13.8mM Glucose(ナカライ 168-06)、0.2% BSA(Sigma A8806)、2.5mM Prob

enicid (Sigma P8761) で1回洗浄した後、Fura 2ローディングバッファー (2 μ M Fura 2-AM (同仁化学 343-05401)、0.02% Pluronic F127 (Molecular Probe P6866) を含む上記 Ca^{2+} アッセイバッファー) 10 mL に懸濁し、室温で1時間インキュベーションした。 Ca^{2+} アッセイバッファーで2回洗浄し、 1×10^6 個細胞/mL に調製した。384 ウェルプレート (Nunc. 142761) に40 μ L ずつ播き、40000 個細胞/ウェルとした。

細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の測定はFDSS3000 (浜松ホトニクス) を用いて経時的に測定した。具体的には、細胞を撒いた384ウェルプレートの蛍光強度を1.5秒毎に3.5分間測定した。終濃度の5倍濃溶液に Ca^{2+} アッセイバッファーを用いて調製したリガンドは、測定開始30秒後に10 μ L 添加し、20秒間攪拌させた。 10

測定値は、2種類の励起波長340 nm (Ca^{2+} 結合型)、380 nm (Ca^{2+} 非結合型) に対して得られる蛍光波長500 nmの蛍光強度のRatio値 [340 nm励起 (Ca^{2+} 結合) $\div$ 380 nm励起 (Ca^{2+} 非結合型)] で表される。このRatio値をY軸に、時間をX軸にしてプロットし、各種リガンドに対する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。また、各種被験物質のさまざまな濃度刺激におけるRatio値の最大値をY軸に、被験物質の濃度をX軸にプロットした濃度依存曲線を作成し、 EC_{50} 値を導き出した。アッセイを4回実施し、それぞれの EC_{50} 値をカリキュレーションソフト「XLfit」を使用して算出し、その平均値を求めた。

被験物質として、Angiopeptin (American Peptide 68-1-45)、Bradykinin (American Peptide 18-1-10)、Granuliberin R (American Peptide 87-0-72)、Indolicidin (American Peptide 72-2-28)、Magainin 2 (American Peptide 72-2-26)、PACAP (6-27) (American Peptide 34-0-45)、Somatostatin 28 (American Peptide 68-1-50)、VIP (1-28) (American Peptide 48-1-10)、Compound 48/80 (Sigma C2313)、Atrial Natriuretic Peptide (1-28)、human (ペプチド研4135-v)、cortistatin 14 (ペプチド研4329-v)、Histatin 5 (ペプチド研4270-s)、MCD-P (ペプチド研4258-v)、Neurotensin (ペプチド研4029-v)、Platelet Factor-4 (ペプチド研4305-v)、Somatostatin (ペプチド研4023-v)、Substance P (ペプチド研4014-v)、及び下記合成方法 (A) によって得られた [D-Pro², D-Trp^{7,9,10}] - Substance P (1-11)、[D-Pro⁴, D-Trp^{7,9,10}] - Substance P (1-11)、BAM (8-22)、Catestatin、cathelicidin (LL-37)、chaperonin 10 (1-20)、eosinophil peroxidase peptide、histamine releasing peptide、human HRP-1、human HRP-2、PACAP (6-38)、pCNP (1-17)、[D-Trp^{7,9,10}] - Substance P (1-11)、Tropomyosin (1-12)、の31種類を使用した。陽性コントロールとして、Ionomycin (BIOMOL CA201) を使用した。 30

合成方法 (A)

上記ペプチドは、自動ペプチド合成機 (Model 431A、アプライド バイオシステム社製) を用いて合成した。ペプチドの合成及び保護は、メーカーのマニュアルに従って行なった。得られたペプチド製剤に含まれる不純物は、高速液体クロマトグラフ (ウォーターズ社製) を用いて、逆相C18カラム (5 μ m、2 x 250 mm、YMC-Pac ODS-A、YMC) に吸着させ、0.1% トリフルオロ酢酸 (溶液A) 及びアセトニトリル (溶液B) のグラディエントにて分離した。得られた合成ペプチド製剤の構造及 50

び純度は、レーザーイオン化質量分析計 (KOMPACTMALDI III、島津製作所製) による分子量測定によって確認した。

結果

Rec 168 安定発現 293 細胞に対し、31 種類のリガンドを刺激した。その結果、Tropomyosin (1-12)、Platelet Factor-4、Cortistatin 14、Angiopeptin、HRP-2、Magainin 2、MCD-P、PACAP (6-27)、VIP (1-28)、Indolicidin、Somatostatin 28、PACAP (6-38)、Somatostatin、[D-Trp^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11) [D-Pro²、D-Trp^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11)、Substance¹⁰ P、pCNP (1-17)、[D-Pro⁴、D-Trp^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11)、eosinophil peroxidase peptide、Histatin 5、Compound 48/80、BAM (8-22)、chaperonin 10 (1-20)、catestatin、histamine releasing peptide、human HRP-1、Neurotensin で細胞内遊離 Ca 濃度の上昇が認められた。結果を表 3 に示した。単位は μ M である。ただし Compound 48/80 は μ g/mL で表示した。

【表 3】

表 3 Ca アッセイでの EC₅₀

Ligand	EC ₅₀
MCD-P	1.25 ± 0.7
PACAP(6-27)	1.64 ± 0.55
cortistatin14	1.68 ± 0.81
VIP(1-28)	2.63 ± 2.8
Indolicidin	2.94 ± 0.91
Angiopeptin	4.39 ± 2.25
Somatostatin28	4.44 ± 0.82
PACAP(6-38)	4.88 ± 2.44
Somatostatin	5.7 ± 2.1
[D-Pro ² , D-Trp ^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11)	6.04 ± 4.15
[D-Pro ⁴ , D-Trp ^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11)	6.8 ± 3.47
SubstanceP	8.02 ± 4.48
Platelet Factor-4	8.96 ± 2.6
pCNP(1-17)	9.58 ± 4.2
[D-Trp ^{7, 9, 10}]-Substance P (1-11)	9.91 ± 5.36
Granuliberin R	24.31 ± 2.22
chaperonin10(1-20)	25.47 ± 12.12
Magainin 2	28.06 ± 5.85
catestatin	28.3 ± 13.19
Tropomyosin(1-12)	33.01 ± 18.31
eosinophil peroxidase peptide	40.02 ± 2.78
cathelicidin(LL-37)	65.26 ± 12.35
Histatin 5	81.16
BAM(8-22)	>100
histamine releasing peptide	>100
human HRP-1	>100
human HRP-2	>100
Neurotensin	>100
Atrial Natriuretic Peptide (1-28)、human	inactive
Bradykinin	inactive
Compound 48/80	3.75 ± 1.54

【実施例 6】

【0013】

GTP 結合試験

Rec168 安定発現 293 細胞の膜画分調製

Rec168 安定発現 293 細胞は、細胞培養用フラスコ（培養面積 175 cm²）中に 50 mL の培地（10% ウシ胎仔血清、50 units/mL ペニシリン、0.05 mg/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; high glucose)（日研生物医学研究所製）中、37℃ 5% CO₂ で培養した。継代後 2 日以上経過し約 80% コンフルエントにな

10

20

30

40

った細胞を、冷却したD-PBS (Phosphate buffered saline、pH7.4; Ca^{2+} 不含、 Mg^{2+} 不含) (日研生物医学研究所製) で洗浄した。回収した細胞は冷却した溶解緩衝液 (15mM Tris-HCl (pH7.6)、2mM MgCl_2 、0.3mM EDTA、1mM EGTA、pH7.4~7.5) に懸濁し、ガラスホモジナイザーで破碎した。この細胞破碎液を遠心分離 (50,000×g、30分、4℃) し、得られた沈殿物に溶解緩衝液を添加した。更にこれを遠心分離 (50,000×g、30分、4℃) し、得られた沈殿を保存液 (75mM Tris-HCl (pH7.6)、12.5mM MgCl_2 、0.3mM EDTA、1mM EGTA、250mM Sucrose、pH7.5) に懸濁して、Rec168安定発現293細胞の膜画分を得た。

10

Rec168安定発現293細胞とGTPとの結合試験

GTP結合実験はDELTA GTP-binding kit AD0167 (PerkinElmer社製) を用いて実施した。96穴フィルタープレート (AcroWell Filter Plate) に1穴あたり反応緩衝液 (0.03μM GDP、1mM MgCl_2 、10mM NaCl、300μg/mL Saponin、終濃度で表記) を添加した。これに50mM HEPES bufferで適当な濃度に希釈した被験物質を1穴あたり20μL加えた。更に上記で調製した膜画分を1穴あたり3.858μgとなるように50mM HEPES bufferで20μLに調製して加えた。これを室温で30分間プレートシェーカーを用い静かにインキュベーションした後、ユーロピウム標識したGTP (GTP-Eu、100nM) を1穴あたり10μL添加し、反応を開始した。室温で45分間プレートシェーカーを用い静かにインキュベーションした後、フィルタープレートを濾過する (Multiscreen Vacuum Manifold、Millipore社製) 事で反応を停止した。濾過後更に冷却した洗浄液300μLで2回洗浄した後、フィルター上の膜画分に結合したGTP-Eu量を時間分解能蛍光測定装置で測定した。

20

GDPとGTPの交換反応はG蛋白質共役型受容体の非存在下でも起こるので、検体添加時の結合活性は、測定値 (Stimulated signal) と、検体の非存在時の測定値 (基底シグナル (Basal signal)) を比較し、百分率で算出 [% over basal = (Stimulated signal / Basal signal × 100) - 100] した。

30

また、非特異的結合量は1穴あたり5μM (終濃度) のGTP-γ-S存在下で測定した。対照として、Rec168を導入していない293細胞 (親株) から上記と同様に調製した膜画分を用い、同一条件下でGTP結合活性を観察した。被験物質としては、MCD Peptide (ペプチド研究所製)、Substance P (アメリカン・ペプチド社製)、ヒトAtrial Natriuretic Peptide (1-28) (ペプチド研究所製)、Chaperonin10 (1-20)、pCNP (1-17)、Bovine Adrenal Medulla (8-22) の6種類を使用した。

結果

その結果を図6~9に示した。

図6から明らかとなおり、Substance Pの濃度依存的にGTP結合量の増加が見られた。

図7から明らかとなおり、Chaperonin10 (1-20) の濃度依存的にGTP結合量の増加が見られた。

図8から明らかとなおり、pCNP (1-17) の濃度依存的にGTP結合量の増加が見られた。

図9から明らかとなおり、MCD peptideの濃度依存的にGTP結合量の増加が見られた。

この結果よりRec168安定発現293細胞膜画分を用いた場合に、Mast Cell Degranulating Peptide、Substance P、Chaperonin10 (1-20)、pCNP (1-17) を添加することによって濃度依

50

存的にGTP-Euの結合量が増加した。これらの中でMCD peptideが最も低濃度(30 nM以上)でGTP結合が認められ、次いでSubstance P、pCNP(1-17)は300 nM以上でGTP結合を確認した。Chaperonin 10(1-20)は1 μ M以上でGTP結合活性を確認した。一方、293細胞(親株)から調製した膜画分では、被験物質依存的なGTP結合が認められなかった。

【実施例7】

【0014】

ヒト培養肥満細胞脱顆粒試験

臍帯血の入手

京都専売病院よりインフォームドコンセントによる同意を得て、ヘパリン採血した臍帯血を6例入手した。6例の入手日は、2004年2月23日、2月26日、3月2日、4月12日、4月21日および5月17日であり、それぞれDonor 1、2、3、4、5および6とした。

造血幹細胞の分離

ヘパリン採血した臍帯血10-60 mLを等量のBuffer(0.5% bovine serum albumin (BSA)、2mM ethylenediamine tetra acetic acid/Phosphate Buffered Saline(-))にて希釈後、Ficoll-Paque(Amersham Pharmacia Biotech)に重層(Ficoll-Paque:Blood(1:2))し、400 $\times$ g(1350 rpm)、4 $^{\circ}$ Cにて30分間遠心分離をすることで単核球画分を取得した。Bufferで3回洗浄(1500 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分)後、細胞数を計数し、 1×10^8 cellsに対して0.1 mLのReagent A1(Fc blocking、CD34 Progenitor Cell Isolation Kit、Miltenyi Biotec、467-01)を加えた。攪拌後、0.1 mLのReagent A2(CD34 antibody-hapten)を加え(final volume 0.5 mL/ 1×10^8 cell)、さらに攪拌後9 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベーションした。Bufferで3回洗浄(1500 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分)後、Buffer(0.4 mL)に再懸濁し、0.1 mLのReagent B(anti hapten antibody-microbeads)を加えて攪拌(final volume 0.5 mL/ 1×10^8 cell)後、9 $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベーションした。再びBufferにて2回洗浄(1500 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分)した後、Buffer(0.5 mL)に再懸濁し、MACS(Magnetic Cell Sorting system:Miltenyi Biotec、第一化学薬品)にセットしたCSカラム(Miltenyi Biotec)を通し、30 mLのBufferで洗浄してCD34 $^{-}$ cellを除去した。カラムをMACSからはずして30 mLのBufferにて結合したCD34 $^{+}$ cellを溶出し、それらを造血幹細胞集団とした。

造血幹細胞長期培養によるヒト肥満細胞への分化

分離したCD34 $^{+}$ cellをrecombinant human(rh) stem cell factor(SCF、1 μ g/mL、Pepro tech)、rh interleukin(IL)-6(0.5 μ g/mL、Pepro tech)、rh IL-3(10 ng/mL、Pepro tech)、Insulin-Transferin(1%、Gibco)、2-mercaptoethanol(2-ME、 5×10^{-5} M、Gibco)、BSA(0.1%、Sigma)を含むIscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM、Gibco)培地に 1×10^6 cells/mLの濃度で再懸濁し、0.1 mL/wellにて24 well culture plateに播種した。そこへ0.9% methylcellulose入りIMDM(Metho cult、SFBIT、StemCell technology)を0.9 mL添加し培養を開始した。1週間後、0.9% methylcelluloseを除く上記培地を100 μ L/wellにて添加し、その後1週間に1回の間隔で、さらにIL-3を除いた培地を100 μ L/wellにて添加した。増殖の程度を見

ながら細胞を希釈し、およそ 10^5 cells/mL/well レベルを維持しながら、約 8 週間以上培養することでヒト培養肥満細胞へと分化させた。

培養途中における fetal calf serum (FCS) の影響の検討

Donor 4 および Donor 6 由来の細胞を用いた。それぞれ培養開始から 57 および 27 日目の細胞を 10% FCS の存在下、非存在下に分けてそれ以降、92 および 57 日目まで培養した。

脱顆粒試験

以下の脱顆粒試験は全て 1% Insulin-Transferrin、 5×10^{-5} M 2-ME、0.1% BSA 含有 IMDM 培地を用いて行った。得られたヒト培養肥満細胞を培地にて洗浄後、 6×10^3 cells/ $180 \mu\text{L}$ /well で 96 well U 10 bottom culture plate に播種した。Compound 48/80 および各種ペプチドを 0.1– $10 \mu\text{M}$ となるように $20 \mu\text{L}$ 加え、 37°C で 30 分間刺激した。対照として DMSO に溶解した A-23187 (Sigma) を、0.1– $10 \mu\text{M}$ (DMSO 終濃度 0.1%) となるように $20 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 30 分間刺激した。刺激後、遠心分離 (2000 rpm 、 4°C 、5 分) を行い、上清を $50 \mu\text{L}$ /well 回収し、 β -hexosaminidase の活性を測定した。培養上清 $50 \mu\text{L}$ に対して β -hexosaminidase の基質である p-nitrophenyl, N-acetyl, β , D-glucosaminide (1 mM、0.1% Triton X-100 含有) を等量加え、 37°C で 2 時間反応させた後、Carbonate buffer (0.1 M、pH 10) を $100 \mu\text{L}$ 加えて反応を停止した。吸光度は波長 4 20 05 nm にて Plate Reader (Molecular Devices) を用いて測定した。各サンプルにおける脱顆粒率は、無処置の細胞を水で破碎させたときの値 (細胞内顆粒最大遊離量; maximum release) を 100% として算出した。

Compound 48/80 および 15 種のペプチドによるヒト培養肥満細胞 (Donor 3, 4, 5) の脱顆粒反応を、A-23187 による反応と比較検討した。レポーターアッセイ、Ca アッセイで Rec168 に反応した、Compound 48/80 および Chaperonin 10 (1–20)、pCNP (1–17)、Tropomyosin (1–12)、Mast cell degranulating peptide、Cortistatin 14、Substance P、Somatostatin、Angiopeptin、Indolicidin、[D-Trp^{7, 9, 1 30}]-Substance P (1–11)、Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) (6–27)、Vasoactive intestinal peptide (VIP) の 12 種のペプチドは、いずれも 0.1– $10 \mu\text{M}$ で濃度依存的な脱顆粒反応を惹起し、また、それらの $10 \mu\text{M}$ での最大反応は細胞内顆粒最大遊離量の 33–44% であり、A-23187 の $10 \mu\text{M}$ での 29–30% に匹敵するものであった (図 10 参照)。これらが細胞内顆粒最大遊離量の 25% を誘発する濃度 (EC₂₅) は 0.2–3.7 μM であった (表 4 参照)。Rec168 発現細胞での reporter gene assay および Ca^{2+} influx assay における EC₅₀ 値と、培養ヒト肥満細胞での脱顆粒反応における EC₂₅ 値の相関図を図 11 に示す。

【表 4】

表 4 MrgX リガンドによるヒト培養マスト細胞の脱顆粒反応
(EC₂₅)と Rec168 発現細胞における Reporter Assay および Ca²⁺
Influx Assay での活性 (EC₅₀)

Ligand	(μM)		
	CBMC (n=3)	MrgX2	
	Degranulation-EC25	Reporter-EC50	Ca-EC50
Chaperonin 10 (1-20)	1.3	1	10
pCNP	0.6	3	6
Tropomyosin	3.5	10	20
Compound 48/80	3.7	0.3	3
MCD peptide	0.3	0.05	0.5
Cortistatin 14	0.2	3	0.7
Substance P	0.3	3	4
Somatostatin	0.4	1	4
Angiopeptine	0.7	1	2
Indolicidin	0.2	0.1	2
SP antagonist	0.2	0.3	4
VIP	0.3	8	1
PACAP (6-27)	0.2	1	0.8
Histamin releasing peptide	>10	>30	100
ANP (1-28)	>10	—	—
BAM (8-22)	>10	—	—

10

20

肥満細胞の培養時に FCS の共存下では性質が変わり、脱顆粒を誘発するペプチドに反 30
 応しなくなるという報告 (Moon TC、Lee E、Baek SH、Murakami M、Kudo I、Kim NS、Lee JM、Min HK、Kambe N、Chang HW. Degranulation and cytokine expression in human cord blood-derived mast cells cultured in serum-free medium with recombinant human stem cell factor. Mol Cells. 16:154-160 (2003).) に基づき、今回得られたヒト臍帯 40
 血由来肥満細胞を FCS 存在下あるいは非存在下に培養し、Substance P、Compound 48/80 および A-23187 による脱顆粒反応を比較した。その結果、臍帯血採取の 57 日目から 92 日目まで FCS 存在下に培養した Donor 4 の肥 40
 満細胞では、Substance P および Compound 48/80 による脱顆粒反応は 10 μM まで全く認められなかった。FCS 非存在下での細胞は、10 μM で約 20-25% の脱顆粒反応を示した (図 12 参照)。一方、A-23187 は FCS の存在、非存在に関わらず 10 μM で約 45-55% の脱顆粒反応を示した。さらに、Donor 6 で同様の検討を行った結果、A-23187 を用いた検討は行っていないが、Donor 4 と同様に Substance P および Compound 48/80 による脱顆粒反応は FCS 存在下で培養した細胞では認められなかった (図 13 参照)。

【実施例 8】

【0015】

Rec168 の mRNA 発現解析

50

Rec168の発現組織分布の解析は、リアルタイムモニタリングによる定量的PCR法(TaqMan法)によって行った。TaqMan法はPCR増幅された特異的PCR鎖をTaqManプローブと呼ばれる蛍光プローブの蛍光強度によってリアルタイムに7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems社)によって検出、定量する原理に基付いている。Rec168を特異的に認識するTaqManプローブおよびプライマーは、Assays-on-Demand (登録商標) Gene Expression Products (Assay ID: Hs00365019 s1)を用いた。

TaqMan PCR反応における鋳型は、dorsal root ganglion由来total RNAと41種類のヒト組織由来poly (A)⁺ RNA (CLONT ECH社)より合成したcDNAを鋳型として使用した。cDNAの合成は、total RNA 6.5 μgまたはpoly (A)⁺ RNA 1 μgから、逆転写酵素としてSuperScript II、プライマーとしてランダムヘキサマーを用い、添付の使用説明書に従い、42℃で行った。反応液組成は、鋳型cDNAとしてはtotal RNAから合成したcDNAはRNA量換算で30 ng、poly (A)⁺ RNAから合成したcDNAはRNA量換算で4 ngを使用し、2×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社) 5 μL、Assays-on-Demand (登録商標) Gene Expression Products 0.5 μL、TaqMan GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems社) 0.5 μLを加え、総液量を10 μLとした。Rec168発現量と同時にGAPDH発現量を測定してnormalizeすることにより、Rec168組織分布を比較した。スタンダードDNAとして、pME-Rec168を2.3×10¹–2.4×10⁸コピー/4 μLに調製して使用した。PCR反応は95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回行い、反応終了と同時にPCRの定量的自動解析を行った。結果を図14に示した。

図14から明らかとなっており、皮膚及び脂肪組織においてRec168の高い発現が見られた。

【実施例9】

【0016】

臍帯血由来ヒト培養肥満細胞における発現解析

Rec168および関連受容体の臍帯血由来ヒト培養肥満細胞における発現解析は、リアルタイムモニタリングによる定量的PCR法(TaqMan法)によって行った。Rec168および関連受容体を特異的に認識するTaqManプローブおよびプライマーは、Assays-on-Demand (登録商標) Gene Expression Products (表5参照)を用いた。

【表5】

表5 Rec168 および関連受容体を特異的に認識する

TaqMan プローブおよびプライマー

Receptor	Assays On Demand ID
Rec168	Hs00365019_s1
Rec183	Hs00600918_s1
NK1R	Hs00185530_m1
NK2R	Hs00169052_m1
NK3R	Hs00357277_m1
SSTR1	Hs00265617_s1
SSTR2	Hs00265624_s1
SSTR3	Hs00265633_s1
SSTR4	Hs00265639_s1
SSTR5	Hs00265647_s1
PACAPR	Hs00153869_m1
VIPR1	Hs00270351_m1
VIPR2	Hs00173643_m1
C3AR1	Hs00269693_s1
C5R1 (CD88)	Hs00704891_s1
Fc ϵ γ	Hs00175408_m1

10

20

30

TaqMan PCR反応における反応組成は、臍帯血由来ヒト培養肥満細胞由来 total RNA (Donor 4、Donor 5) および血清添加または血清非添加培養にて分化誘導を行った臍帯血由来ヒト培養肥満細胞由来 total RNA (FCS⁺、FCS⁻) より逆転写酵素として SuperScript II、プライマーとしてランダムヘキサマーを用い、添付の使用説明書に従って 42℃ で合成した cDNA を total RNA 換算で 5 ng 鋳型として使用し、2×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、Assays-on-Demand (登録商標) Gene Expression Products 0.5 μ L、TaqMan GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems 社) 0.5 μ L を加え、総液量 10 μ L とした。Rec168 発現量または関連受容体発現量と同時に GAPDH 発現量を測定して normalize することにより、Rec168 および関連受容体の臍帯血由来ヒト培養肥満細胞における発現を比較した。スタンダード DNA として、各遺伝子 cDNA 断片を保持するベクターを $2.3 \times 10^1 - 8.9 \times 10^6$ コピー / 4 μ L に調製して使用した。PCR 反応は 95℃・10 分の後、95℃・15 秒、60℃・1 分のサイクルを 40 回行い、反応終了と同時に PCR の定量的自動解析を行った。結果 (コピー数 / 5 ng total RNA) を表 6 に示した。

40

50

【表 6】

表 6 PCR の定量的自動解析

Receptor	Donor4	Donor5	FCS (+)	FCS (-)
<MRGX>				
Rec168	20317	25414	32	17565
Rec183	1	7	0	0
<NKR>				
NK1R	0	0	0	0
NK2R	0	0	0	0
NK3R	0	0	0	0
<SSTR>				
SSTR1	0	0	0	0
SSTR2	720	1149	58	1790
SSTR3	0	0	0	0
SSTR4	0	0	0	0
SSTR5	0	0	0	0
<PACAPR>				
PACAPR1	0	0	0	0
PACAPR2	19	5	16	7
PACAPR3	1	9	83	0
<Complement Receptor>				
C3AR1	17154	19254	14103	17299
C5R1	17860	27713	4803	10026
<IgE Receptor>				
Fc ϵ γ	2781	6428	2095	2152

【実施例 10】

【0017】

Rec168 阻害剤のスクリーニング

Rec168 安定発現 293 細胞における Substance P による細胞内遊離 Ca 濃度上昇の抑制を指標として、Rec168 阻害剤のスクリーニングを行った。200 μ g/mL のハイグロマイシン B (Invitrogen 10687-010) と 10% 牛胎児血清を添加した D-MEM 培地 (日研生物医学研究所 CM4402) で培養した Rec168 安定発現 293 細胞を、2 μ M Fura-2/AM (同仁化学研究所) を含む Ca²⁺ アッセイバッファー (20mM HEPES (ナカライ 17514-15)、115mM NaCl (Sigma S5150)、5.4mM KCl (ナカライ 285-14)、0.8mM MgCl₂ (ナカライ 209-09)、1.8m

M CaCl_2 (ナカライ 067-29)、13.8mM Glucose (ナカライ 168-06)、0.2%BSA (Sigma A8806)、2.5mM Probenicid (Sigma P8761)、KOHでpH7.4に調整)に懸濁して37℃1時間インキュベーションした。 Ca^{2+} アッセイバッファーで2回洗浄後、 Ca^{2+} アッセイバッファーに 1×10^6 cells/mLとなるように懸濁した。細胞懸濁液を384ウェル黒色プレートに20 μL /well分注し、 Ca^{2+} アッセイバッファーで100 μM に希釈した被験物質を4 μL 添加した。5分経過後、FDSS3000 (浜松ホトニクス株式会社)で25 μM Substance P (株式会社 ペプチド研究所)を16 μL 添加し、励起光波長340nmと380nmでの蛍光強度変化を測定した。測定した蛍光強度から、蛍光強度比(励起光波長340nmの蛍光強度/励起光波長380nmの蛍光強度; Ratio値)を算出し、さらにSubstance P添加後のRatio値の最大値からSubstance P添加前のRatio値を差し引いたRatio値の変化量(Δ Ratio値)を計算した。被験物質による細胞内 Ca^{2+} 遊離の抑制率は、以下の数式で求めた。

数式中A、Bはそれぞれ以下の意味を表す。

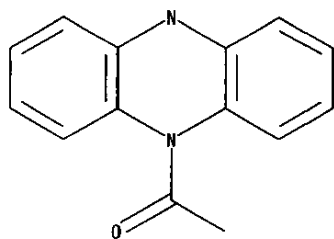
A:被験物質およびSubstance P添加時の Δ Ratio値

B:被験物質およびSubstance Pの両方が非添加時の Δ Ratio値

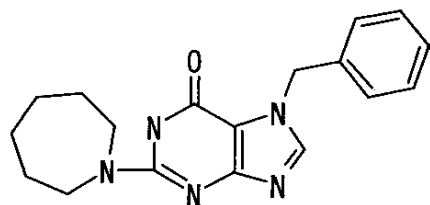
C:Substance Pのみ添加時の Δ Ratio値

阻害率 [%] = $[1 - (A - B) / (C - B)] \times 100$

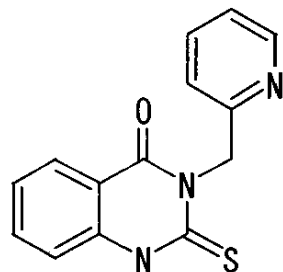
Rec168阻害活性化合物として以下の3化合物を得た。



化合物 1



化合物 2



化合物 3

【実施例 11】

【0018】

Rec168阻害化合物によるRec168安定発現293細胞における細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシン B (Invitrogen 10687-01 50

0)と10%牛胎児血清を添加したD-MEM培地(日研生物医学研究所 CM4402)で培養したRec168安定発現293細胞を、2 μ M Fura-2/AM(同仁化学研究所)を含むCa²⁺アッセイバッファー(20mM HEPES(ナカライ 17514-15)、115mM NaCl(Sigma S5150)、5.4mM KCl(ナカライ 285-14)、0.8mM MgCl₂(ナカライ 209-09)、1.8mM CaCl₂(ナカライ 067-29)、13.8mM Glucose(ナカライ 168-06)、0.2%BSA(Sigma A8806)、2.5mM Probenicid(Sigma P8761)、KOHでpH7.4に調整)に懸濁して37℃1時間インキュベーションした。Ca²⁺アッセイバッファーで2回洗浄後、Ca²⁺アッセイバッファーに1 $\times$ 10⁶ cells/mLとなるように懸濁した。細胞懸濁液を384ウェル黒色プレートに20 μ L/well分注し、Ca²⁺アッセイバッファーで30 μ M~100 μ Mに希釈した被験物質を4 μ L添加した。5分経過後、FDSS3000(浜松ホトニクス株式会社)で刺激剤として25 μ M Substance P(株式会社 ペプチド研究所)、2.5 μ M PACAP(6-27)(合成品)、7.5 μ M [D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P(1-11)(合成品)、及び7.5 μ M Ionomycin(BIOMOL CA-201)を16 μ L添加し、励起光波長340nmと380nmでの蛍光強度変化を測定した。測定した蛍光強度から、蛍光強度比(励起光波長340nmの蛍光強度/励起光波長380nmの蛍光強度;Ratio値)を算出し、さらに刺激剤添加後のRatio値の最大値から刺激剤添加前のRatio値を差し引いたRatio値の変化量(Δ Ratio値)を計算した。

Substance P、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P(1-11)及びPACAP(6-27)刺激によるRec168安定発現293細胞における細胞内遊離Ca²⁺濃度上昇を化合物1、化合物2及び化合物3は何れも濃度依存的に阻害した。Substance P刺激に対する化合物1、化合物2及び化合物3の阻害率(IC₅₀値)はそれぞれ4.5、4.0及び5.6 μ M、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P(1-11)刺激に対するIC₅₀値はそれぞれ3.2、3.8及び5.9 μ M、PACAP(6-27)刺激に対するIC₅₀値はそれぞれ3.7、4.2及び5.8 μ Mであった。一方、何れの化合物もIonomycin刺激に対するRec168安定発現293細胞における細胞内遊離Ca²⁺濃度上昇を阻害しなかった(図15参照)。

【実施例12】

【0019】

Rec168阻害化合物の肥満細胞脱顆粒に対する阻害活性の検討

材料は以下のものを使用した。リコンビナントヒトSCF(PeproTech社、cat. 300-07)、リコンビナントヒトIL-6(PeproTech社、200-06)、リコンビナントヒトIL-3(PeproTech社、200-03)、55mM 2-ME(GIBCO社、21985-023)、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM,GIBCO社、12440-053)、Insulin-Transferrin(GIBCO社、41400-045)、35%BSA(SIGMA社、A-7409)、Methocult SF^{B1T}(StemCell technology社、04236)、PBS(-)(日科研社、CM6201)、Substance P(ペプチド研社、4013-v)、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P(1-11)(合成品)、PACAP(6-27)(合成品)、A23187(SIGMA社、C-7522)、p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine(pN-GlcNAc,SIGMA社、N9376)、DMSO(SIGMA社、D-2660)

1 μ g/mLリコンビナントヒトSCF、100ng/mLリコンビナントヒトIL-3及び500ng/mLリコンビナントヒトIL-6、0.1%BSA、1%Insulin-Transferrin、IMDM培地1mLに臍帯血由来CD34陽性細胞(1

$\times 10^5$ cells) を懸濁し、MethoCult SF^BIT を10倍量添加し、CO₂ インキュベーターにて培養を開始した。1週間に1回の間隔で100 ng/mLリコンビナントヒトSCF、50 ng/mLリコンビナントヒトIL-6、1 ng/mLリコンビナントヒトIL-3入りの基本培地を用いて 1×10^5 cells/mL程度になるように細胞を希釈し、細胞の増殖が観察されなくなった場合は同培地にて半量交換を行った。8週間以上培養を維持することによりヒト培養肥満細胞を得た。

得られたヒト培養肥満細胞を回収し、0.1% BSA、1% Insulin-Transferrin、IMDM培地にて2回洗浄後、約 2×10^4 cells/wellとなるように96穴U字底の培養プレートに160 μ Lずつ播種した。3、10、30及び100 μ Mの化合物1、化合物2及び化合物3 (1% DMSO、0.1% BSA、1% Insulin-Transferrin、IMDM培地溶液) を20 μ Lずつ細胞に添加し、10 μ M Substance P、10 μ M [D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P (1-11)、10 μ M PACAP (6-27) 及び3 μ M A23187を20 μ Lずつ添加して混和後、CO₂ インキュベーターを用いて37℃にて30分間インキュベートした。遠心後 (4℃、3,000 rpm、5分間)、上清を50 μ Lずつ回収した。脱顆粒量の測定は培養上清中に遊離した顆粒中に含まれる β -Hexosaminidase活性を指標にして行った。培養上清50 μ Lに等量の4 mM pN-GlcNAc (0.1M citrate buffer、pH4.5) を添加し、37℃にて2時間インキュベートした。0.1M carbonate buffer (pH10) を等量添加して反応を停止し、波長405 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。各刺激による脱顆粒率は細胞を水にて破碎した β -Hexosaminidase活性を100%として算出した。また、化合物による脱顆粒阻害活性は0.1% DMSO存在下におけるSubstance P、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P (1-11)、PACAP (6-27) 及びA23187刺激後の脱顆粒率を100%として算出した。

Substance P、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P (1-11) 及びPACAP (6-27) 刺激によるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導化合物1、化合物2及び化合物3は何れも濃度依存的に阻害した (表7 参照)。Substance P刺激に対する化合物1、化合物2及び化合物3の阻害率 (IC₅₀ 値) はそれぞれ1.5、0.6及び1.0 μ M、[D-Pro⁴、D-Trp^{7,9,10}]-Substance P (1-11) 刺激に対するIC₅₀ 値はそれぞれ3.0、1.4及び4.4 μ M、PACAP (6-27) 刺激に対するIC₅₀ 値はそれぞれ1.2、0.4及び1.0 μ Mであった。一方、何れの化合物もA23187刺激に対する肥満細胞の脱顆粒誘導を阻害しなかった。

【表7】

表7 Rec168 阻害化合物によるヒト肥満細胞脱顆粒の抑制

Actibators (1 μ M)	IC ₅₀ value of compound(μ M)		
	化合物1	化合物2	化合物3
Substance P	1.5	0.6	1.0
[D-Pro ⁴ ,D-Trp ^{7,8,9}]-Substance P(1-11)	3.0	1.4	4.4
PACAP(6-27)	1.2	0.4	1.0

【実施例 13】

【0020】

ECPおよびMBP断片のヒト培養肥満細胞に対する脱顆粒作用

材料は以下のものを使用した。

Cord Blood CD34⁺ (CAMBREX、2C-101A)、Cord Blood MNC (STEMCYTE、CAI 001)、Rec168発現HEK293細胞。rhSCF (PeproTech、300-07)、rhIL-6 (PeproTech、200-06)、rhIL-3 (PeproTech、200-03)、55mM 2-ME (GIBCO、21985-023)、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM、GIBCO、12440-053)、Insulin-Transferrin (GIBCO、41400-045)、35%BSA (SIGMA、A-7409)、Methocult SF^{B1T} (StemCell technology、04236)、酢酸 (JUNSEI、31010-0330)、PBS⁻ (日科研、CM6201)、A23187 (SIGMA、C-7522)、p-Nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosamine (pN-GlcNAc、SIGMA、N9376)、DMSO (SIGMA、D-2660)、化合物1、化合物2、化合物3 (Rec168分子阻害剤)、 α -MEM (GIBCO、41061-029)、FBS (JRH、12103-78P)、Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec、130-046-702)、Fura-2AM (DoJINDO、343-05401)、10% Pluronic F127 (Molecular Probe、P-6866)、Ca assay用buffer (20mM HEPES、115mM NaCl、5.3mM KCl、0.8mM MgCl₂、1.8mM CaCl₂、13.8mM Glucose、0.2%BSA、pH7.4)、Substance P (ペプチド研、4013-v) および下記合成法によって得られたMBP fragment

(Gly-Gly-Trp-Trp-Arg-Arg-Ala-His-Cys-Leu-Arg-Arg-OH)、

ECP fragment

(Ala-Ile-Asn-Trp-Arg-Trp-Arg-Cys-Lys-Asn-Gln-Asn-Thr-Phe-Leu-Arg-OH)

上記ペプチドは、自動ペプチド合成機 (Model 431A、アプライドバイオシステム社製) を用いて合成した。ペプチドの合成及び保護は、メーカーのマニュアルに従って行なった。得られたペプチド製剤に含まれる不純物は、高速液体クロマトグラフ (ウォーターズ社製) を用いて、逆相C18カラム (5 μ m、2x250mm、YMC-Pack ODS-A、YMC) に吸着させ、0.1%トリフルオロ酢酸 (溶液A) 及びアセトニトリル (溶液B) のグラディエントにて分離した。得られた合成ペプチド製剤の構造及び純度は、レーザーイオン化質量分析計 (KOMPACT MALDI III、島津製作所製) による分子量測定によって確認した。

培地の調製及びヒト肥満細胞の培養は以下のとおり行った。

IMDM 100mLに35% BSA 286 μ LおよびInsulin-Transferrin 1mLを添加し、2-MEを100 μ L添加し、ヒト培養用の基本培地とした。rhSCF 10 μ gに10mM酢酸水溶液20 μ L添加して溶解し、軽く遠心後、1mLの基本培地を添加した (10 μ g/mL rhSCF)。rhIL-6 20 μ gに10mM酢酸水溶液40 μ L添加して溶解し、軽く遠心後、1mLの基本培地を添加した (20 μ g/mL rhIL-6)。rhIL-3 10 μ gに蒸留水40 μ L添加して溶解し、軽く遠心後、1mLの基本培地を添加した (10 μ g/mL rhIL-3)。

Cord Blood CD34⁺ 細胞 (1x10⁵ cells) に1 μ g/mL rhSCF、0.5 μ g/mL rhIL-6、0.01 μ g/mL rhIL-3入りの

基本培地を500 μ L添加して24穴培養プレート (Falcon、3047) に100 μ Lずつ播種した。Methocult SF^B I T を0.9 mLずつ添加し、CO₂ インキュベーターにて培養を開始した。1週間に1回の間隔で100 ng/mL rhSCF、50 ng/mL rhIL-6、1 ng/mL rhIL-3入りの基本培地を用いて1 $\times$ 10⁵ cells/mL程度になるように細胞を希釈し、細胞の増殖が観察されなくなった場合は同培地にて半量交換を行った。8週間以上培養を維持することによりヒト培養肥満細胞を得た。

Cord Blood MNCよりCD34陽性細胞の調製は以下のように行った。PBS⁻ 100 mLに500 mM EDTA 400 μ L、35% BSA 1428 μ Lを添加し (Cell wash buffer)、凍結保存してあるCord Blood MNC (1.61 $\times$ 10⁷ cells/mL) を解凍し、Cell wash bufferにて洗浄後、Cell wash buffer 0.3 mLにて再懸濁した。100 μ LのFcR Blocking Reagentを添加し、100 μ L CD34 MicroBeadsを添加し、9℃にて30分間インキュベートした。Cell wash bufferにて洗浄し、30 μ m Cell strainerを通過した細胞をMiniMACS Separation unitにアプライし、CD34陽性細胞を回収した。 10

脱顆粒の測定法は以下のとおりである。

得られたヒト培養肥満細胞を回収し、基本培地にて洗浄後、約1.5 $\times$ 10⁴ cells/wellとなるように96穴U字底の培養プレートに播種し、各濃度のSubstance P、MBP fragment、ECP fragmentまたはA23187を1/10量添加し、CO₂ インキュベーターを用いて37℃にて30分間インキュベートした (final volume 200 μ L/well)。遠心後 (4℃、3,000 rpm、5分間)、上清を50 μ Lずつ回収した。脱顆粒量の測定は培養上清中に遊離した顆粒中に含まれる β -Hexosaminidase活性を指標にして行った。培養上清50 μ Lに等量の4 mM pN-GlcNAc (0.1 M citrate buffer pH4.5) を添加し、37℃にて2時間インキュベートした。0.1 M carbonate buffer (pH10) を等量添加して反応を停止し、波長405 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。各刺激による脱顆粒率は細胞を水にて破碎した β -Hexosaminidase活性を100%として算出した。化合物1、2及び3はRec168リガンド添加10分前に1/10量添加して評価した。 20 30

また、Ca assayは以下のとおり行った。

各細胞をPBS⁻にて洗浄後、Ca assay用bufferに溶解した2 μ M Fura-2 AM溶液に置換し、室温にて1時間インキュベートした。Ca assay用bufferにて2回洗浄後、1 $\times$ 10⁶ cells/mLになるようにCa assay用bufferにて再懸濁し、384穴黒プレート (NUNC、242764) に40 μ Lずつ添加した。最終濃度の10倍濃い各刺激リガンドを各細胞に10 μ Lずつ添加した。測定はFDSS (浜松ホトニクス) を用いて測定し、Ca応答の評価は340 nm/380 nm比を用い、リガンド刺激後の最高340 nm/380 nm比からリガンド刺激前の340 nm/380 nm比の差をリガンド活性値とした。 40

上記実験から以下のことが明らかになった。

Rec168とMBPが肥満細胞の同一部位を認識しているとの報告とRec168リガンド類が8~30のアミノ酸残基ペプチドであることより、ECP及びMBPのTrypsin切断部位を推定して (図16)、8-25アミノ酸残基に断片化したECP及びMBPを合成した。ECP及びMBPの各fragment (10 μ M) をヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導活性を指標にして探索したところ、ECPの29番目から45番目の領域、またMBPの99番目から110番目の領域を含むペプチドfragmentが活性を有することが判明した (図17、18)。さらに、脱顆粒誘導活性を示したECP及びMBPのfragment (30 μ M) はRec168安定発現293細胞に対するCa応答活性を示し、ヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導活性とRec168安定発現293 50

細胞に対するCa応答活性は相関していた(図17、18)。また、MBPの9～25番目アミノ酸残基ペプチド(Fr. No. 23)はヒト培養肥満細胞に対する脱顆粒誘導性を示したが、同領域が重複するMBP fragment (Fr. No. 22、24)には活性が認められなかったため、アゴニスト作用はMBPの9～25番目領域にはないと判断した。そこで、ECP及びMBP断片の内、最も活性の強かった各fragmentを以後の実験に用いた。

MBP fragment、ECP fragment及びSubstance Pによるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導に対してRec168阻害化合物は濃度依存的に抑制し(図19)、化合物1のMBP fragment、ECP fragment及びSubstance P刺激に対するIC₅₀値はそれぞれ1.02 μM、0.33 μM及び1.72 μM、化合物2のMBP fragment、ECP fragment及びSubstance P刺激に対するIC₅₀値はそれぞれ2.19 μM、0.52 μM及び1.86 μM、化合物3のMBP fragment、ECP fragment及びSubstance P刺激に対するIC₅₀値はそれぞれ2.54 μM、0.42 μM及び2.25 μMであった(表8)。

【表8】

表8 MBP、ECP fragment 及び Substance P 刺激によるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導に対する Rec168 阻害化合物の IC₅₀ 値

IC ₅₀ value	Stimulation		
	MBP (10 μM)	ECP (3 μM)	SP (1 μM)
化合物 1	1.02 μM	0.33 μM	1.72 μM
化合物 2	2.19 μM	0.52 μM	1.86 μM
化合物 3	2.54 μM	0.42 μM	2.25 μM

SP : Substance P

Rec168のアゴニストの一つであるSubstance PとMBPが肥満細胞の同一分子により認識されて肥満細胞が活性化するとの報告から、Rec168がMBPをアゴニストとする可能性が考えられた。また、疾患部位にはMBPやECPと同様にTrypsinaseの存在が確認されていることから、ECP及びMBPのTrypsinase切断部位を推定して、8～25アミノ酸残基に断片化したECP及びMBPを合成した。ECPの29番目から45番目の領域、またMBPの99番目から110番目の領域を含むペプチドfragmentがヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導活性を有することが判明した。さらに、同fragment (30 μM)は、ヒト培養肥満細胞活性化のみならずRec168安定発現293細胞に対するCa応答活性も示した(図16、17)。また、これらのfragmentが誘導する肥満細胞の活性化はRec168阻害化合物によって抑制されることから、MBP fragment及びECP fragment刺激がRec168受容体を介していることが判明した。

Rec168を活性化するMBP及びECP fragmentを用いてヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導を検討したところ、MBP fragmentとECP fragmentは何れもヒト培養肥満細胞に対して濃度依存的に、また、Giprotein依存的に脱顆粒を誘導した。これらのfragmentが、全長タンパク質と同様の活性を有するかどうかについては、fragment活性がPatellaの報告した活性と同程度であることや、また、Piliponskyらの報告したように、Rec168介在のヒト肥満細胞脱顆粒誘導がGisensitiveであることから、MBP fragment及びECP fragmentでも各全長タンパク質と同様の肥満細胞脱顆粒誘導活性を有するものと考えられた。さらに、Rec168阻害化合物によってMBP f

r a g m e n t 及び E C P f r a g m e n t 刺激の肥満細胞脱顆粒誘導が抑制されたことにより、M B P f r a g m e n t 及び E C P f r a g m e n t 刺激が R e c 1 6 8 受容体を介していることが判明した。

今回の検討により、神経因性の肥満細胞の活性化と E o s i n o p h i l による肥満細胞活性化に R e c 1 6 8 が関与する可能性が強く示唆された。アトピー性皮膚炎のモデルマウス (N C / N a マウス) にストレス付加すると、アトピー性皮膚炎様の症状を示す。さらに、ストレスによりアトピー性皮膚炎様症状を示した N C / N a マウスの血中 S u b s t a n c e P 量は上昇し、肥満細胞及び E o s i n o p h i l の増加、掻痒行為を引き起こすと報告されている。そこで、慢性炎症時における R e c 1 6 8 の役割については、
10 ストレス等により惹起される神経過敏状態によって神経ペプチドが分泌され、それにより R e c 1 6 8 を介して肥満細胞を活性化したサイトカイン類やエイコサノイドが E o s i n o p h i l を増殖・活性化し、増殖・活性化された E o s i n o p h i l より分泌される E C P などにより再び R e c 1 6 8 を介して肥満細胞を活性化する重要な役割であろうと推測した。このように、R e c 1 6 8 は慢性炎症時における悪循環の中心的な役割を果たしている可能性が高く、R e c 1 6 8 阻害剤は慢性炎症時の有効な治療薬となる可能性があると考えられた。

【実施例 14】

【0021】

R e c 1 6 8 阻害化合物および C r o m o l y n のヒト培養肥満細胞脱顆粒に対する作用
使用した試薬及び材料は以下のとおりである

C o r d B l o o d C D 3 4 ⁺ (C A M B R E X、2 C - 1 0 1 A)、C o r d B l o o d M N C (S T E M C Y T E、C A I 0 0 1)、r h S C F (P e p r o T e c h、3 0 0 - 0 7)、r h I L - 6 (P e p r o T e c h、2 0 0 - 0 6)、r h I L - 3 (P e p r o T e c h、2 0 0 - 0 3)、5 5 m M 2 - M E (G I B C O、2 1 9 8 5 - 0 2 3)、I s c o v e ' s M o d i f i e d D u l b e c c o ' s M e d i u m (I M D M、G I B C O、1 2 4 4 0 - 0 5 3)、I n s u l i n - T r a n s f e r r i n (G I B C O、4 1 4 0 0 - 0 4 5)、3 5 % B S A (S I G M A、A - 7 4 0 9)、M e t h o c u l t S F ^{B 1 T} (S t e m C e l l t e c h n o l o g y、0 4 2 3 6)、酢酸 (J U N S E I、3 1 0 1 0 - 0 3 3 0)、P B S ⁻ (日科研、C M 6 2 0 1)、p - N i t r o p h e n y l - N - a c e t y l - b - D - g l u c o s a m i n e (p N - G l c N A c、S I G M A、N 9 3 7 6)、D M S O (S I G M A、D - 2 6 6 0)、化合物 1、化合物 3 (R e c 1 6 8 分子阻害剤)、 α -M E M (G I B C O、4 1 0 6 1 - 0 2 9)、F B S (J R H、1 2 1 0 3 - 7 8 P)、S u b s t a n c e P (ペプチド研、4 0 1 3 - v)、C o m p o u n d 4 8 / 8 0 (S i g m a C 2 3 1 3)。
30

培地の調製、ヒト肥満細胞の培養は上記実施例 13 と同様に行なった。また、脱顆粒の測定は、S u b s t a n c e P、M B P f r a g m e n t、E C P f r a g m e n t または A 2 3 1 8 7 に代えて S u b s t a n c e P または C o m p o u n d 4 8 / 8 0 を使用した点以外は実施例 13 の「E C P および M B P 断片のヒト培養肥満細胞に対する脱顆粒作用」の測定法と同様の方法によって行なった。
40

上記実験から以下のことが明らかになった。

肥満細胞脱顆粒抑制化合物である C r o m o l y n と R e c 1 6 8 阻害化合物のヒト培養肥満細胞の脱顆粒に対する阻害作用を比較検討した。化合物 1 および 3 の R e c 1 6 8 阻害化合物も S u b s t a n c e P 刺激によるヒト培養肥満細胞の脱顆粒誘導に対して濃度依存的に阻害したが、C r o m o l y n は殆ど阻害しなかった (図 20 (A) 参照)。しかし、C o m p o u n d 4 8 / 8 0 刺激による脱顆粒誘導に対して、C r o m o l y n は濃度依存的に阻害し、10 mM で完全に阻害した (図 20 (B) 参照)。また、R e c 1 6 8 阻害化合物は C o m p o u n d 4 8 / 8 0 刺激の脱顆粒誘導に対して濃度依存的に阻害するが、何れの化合物も 10 μ M では 50 % 程度の阻害率であった (図 20 (B) 参照)。さらに、I g E 架橋によるヒト肥満細胞の脱顆粒誘導に対しては R e c 1 6
50

8 阻害化合物及び *romolyn* の何れも阻害作用を示さなかった (図 21 (B) 参照)

。

神経性のペプチドである *Substance P* や炎症に関わる MBP や ECP 由来の塩基性ペプチドが *Rec 168* アゴニスト活性を示すため、炎症の複雑なネットワークにおける肥満細胞の活性化に *Rec 168* が寄与する可能性がある。そこで、広域なアレルギー治療薬として知られている肥満細胞安定化薬 *Cromolyn* とヒト培養肥満細胞について活性化抑制効果を比較したところ、*Rec 168* 阻害化合物は *in vitro* において *Substance P* 刺激による肥満細胞の脱顆粒反応を抑制したが、*Cromolyn* は抑制しなかった (図 20)。また、*Rec 168* 阻害化合物は *Compound 48/80* 刺激による脱顆粒反応を $10 \mu\text{M}$ で 50% 程度阻害したが、*Cromolyn* は 10mM の高濃度で完全に抑制した (図 20 (B))。10
Cromolyn は *Rec 168* 安定発現 293 細胞の Ca^{2+} 応答を抑制しないことより、*Rec 168* を介した *Compound 48/80* 刺激のヒト培養肥満細胞の脱顆粒反応抑制ではなく、*Rec 168* 以外の *Compound 48/80* 作用点を介した脱顆粒反応の抑制であると考えられた。従って、*Rec 168* 阻害化合物は生体内アゴニストに対して *Cromolyn* より高い阻害効果を示すこと、また、分子ターゲットとしてレセプターを特定できる観点からも *Rec 168* 阻害化合物の方が *Cromolyn* よりも有用であると考えられた。

【実施例 15】

【0022】

ヒト肥満細胞における PGD_2 産生の検討

20

試薬及び材料は以下のものを使用した。

Cord Blood CD34⁺ (CAMBREX、2C-101A)、*Cord Blood MNC* (STEMCYTE、CAI 001)、*rhSCF* (PeproTech、300-07)、*rhIL-6* (PeproTech、200-06)、*rhIL-3* (PeproTech、200-03)、55mM 2-ME (GIBCO、21985-023)、*Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM、GIBCO、12440-053)、*Insulin-Transferrin* (GIBCO、41400-045)、35% BSA (SIGMA、A-7409)、*Methocult SF^{B1T}* (StemCell technology、04236)、酢酸 (JUNSEI、31010-0330)、PBS- (日科研、C 30
M6201)、DMSO (SIGMA、D-2660)、化合物 1、化合物 3 (*Rec 168* 分子阻害剤)、 α -MEM (GIBCO、41061-029)、FBS (JRH、12103-78P)、*Carnoy's solution* (60% エタノール、30% クロロホルム、10% 氷酢酸) *Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec、130-046-702)、*Prostaglandin D₂-MOX EIA kit* (Cayman、512011)。

培地の調製及びヒト肥満細胞の培養は、実施例 13 と同様に行なった。

PGD_2 産生及び測定は以下のとおり行なった。

ヒト培養肥満細胞を回収し、基本培地にて洗浄後、約 1.0×10^5 cells/well となるように 96 穴 U 字底の培養プレートに播種し、各濃度の *Substance P*、MBP fragment、ECP fragment を 1/10 量添加し、 CO_2 インキュベーターを用いて 37°C にて 30 分間インキュベートした (final volume $200 \mu\text{L}/\text{well}$)。遠心後 (4°C 、3,000 rpm、5 分間)、上清を $50 \mu\text{L}$ ずつ回収した。回収した培養上清に含まれる PGD_2 量を *Prostaglandin D₂-MOX EIA kit* にて測定した。測定法は Kit の操作手順書に従った。阻害化合物は *Rec 168* リガンド添加 10 分前に 1/10 量添加して評価した

。

これら実験の結果、以下のことが明らかになった。

肥満細胞が活性化されると炎症性 Mediator であるエイコサノイドが合成 (de 50

nov o合成)・分泌されることが知られている。また、Substance P、MBP及びECPによってエイコサノイドであるProstaglandin D₂ (PGD₂) が産生されることが報告されている。そこで、Rec168の活性化によるヒト培養肥満細胞のPGD₂ 産生への関与を検討した。Substance P (0.3 μM、1 μM) 及びMBP fragment、ECP fragment (3 μM、10 μM) はヒト培養肥満細胞に対して添加濃度に応じてPGD₂ 産生を誘導した(図22)。Substance P刺激によるPGD₂ 産生誘導活性が最も強かった。何れの刺激によるPGD₂ 産生活性もRec168阻害化合物である、10 μMの化合物1あるいは化合物3によって阻害された(図22)。

Substance P、MBP fragmentおよびECP fragment¹⁰ はヒト培養肥満細胞において濃度依存的にPGD₂ 産生を誘導した。何れの刺激によるPGD₂ 産生活性もRec168阻害化合物である、10 μMの化合物1あるいは化合物3によって阻害された(図22)ことから、Rec168の活性化はヒト培養肥満細胞の脱顆粒だけではなく、PGD₂ のde novo合成も誘導することが判明した。IgEは高親和性FcRγ epsilonを介してSykを活性化し、肥満細胞の脱顆粒誘導およびPGD₂ のde novo合成を誘導することが知られているが、Rec168はFcRγ epsilonとシグナル伝達経路を一部共有していることが推測された。

【実施例16】

【0023】

ヒト肥満細胞の抗Rec168 peptide抗体、抗Tryptase抗体及び抗Ch²⁰
ymase抗体による染色

試薬及び材料は以下のものを使用した。

Cord Blood CD34⁺ (CAMBREX、2C-101A)、Cord Blood MNC (STEMCYTE、CAI 001)。rhSCF (PeproTech、300-07)、rhIL-6 (PeproTech、200-06)、rhIL-3 (PeproTech、200-03)、55mM 2-ME (GIBCO、21985-023)、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM、GIBCO、12440-053)、Insulin-Transferrin (GIBCO、41400-045)、35% BSA (SIGMA、A-7409)、酢酸 (JUNSEI、31010-0330)、Methocult SF^{B I}³⁰
^T (StemCell technology、04236)、PBS⁻ (日科研、CM6201)、α-MEM (GIBCO、41061-029)、FBS (JRH、12103-78P)、Carnoy's solution (60%エタノール、30%クロロホルム、10%氷酢酸)、ウサギ抗Rec168 peptide抗体 (abcam社)、抗ヒトTryptase抗体 (CHEMICON、MAB1222)、抗ヒトChymase抗体 (CHEMICON、MAB1254)、N-universal negative control mouse (DakoCytomation、N1698)、LSAB+ System-AP (DakoCytomation、K0678)、Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (DakoCytomation、S1964)、Direct CD34 P⁴⁰
rogenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec、130-046-702)。

培地の調製及びヒト肥満細胞の培養は実施例13と同様にして行った。

免疫染色は下記のとおり行った。

各細胞が1.5 × 10⁵ cells/mLになるように調製し、サイトスピン2を用いて細胞懸濁液(100~150 μL)をスライドガラスに塗抹した。塗抹標本を十分に乾燥後、Carnoy's solutionに1分間固定し、蒸留水にて洗浄した。抗Tryptase抗体及び抗Chymase抗体を0.1% BSA、TBS bufferにて1 μg/mLに調製。塗抹標本を1 μg/mLのウサギ抗Rec168 peptide抗体、マウスTryptase抗体、抗Chymase抗体及びコントロール抗体⁵⁰

(に浸し、室温にて1時間静置した。TBS bufferにて洗浄後(10分間隔にてTBS bufferを交換)、LSAB+ System-AP kitのBiotin化抗マウスIg抗体に浸し、室温にて30分間静置した。再びTBS bufferにて洗浄後(10分間隔にてTBS bufferを交換)、LSAB+ System-AP kitのStreptavidin-APに浸し、室温にて15分間静置した。塗沫標本をTBS bufferにて洗浄後(10分間隔にてTBS bufferを交換)、LSAB+ System-AP kitのFuchsin+ Chromogen基質に浸し、室温にて10分間静置した。蒸留水にて洗浄後(10分間隔にて蒸留水を交換)、余分な水分を切り、Ultramount Aqueous Permanent Mounting Mediumの1、2滴を滴下し、スライドガラスを水平な台にて静置し、風乾した。 10

上記実験から下記のことになった。

ヒト培養肥満細胞のcell typeを検討するため、抗MrgX2-peptide抗体、抗ヒトTryptase抗体及び抗ヒトChymase抗体による免疫染色を行った。コントロール抗体と比較して、何れの抗体によってもヒト培養肥満細胞は強く染色された(図23)。本条件で培養したヒト培養肥満細胞はRec168陽性細胞であり、また、Tryptase及びChymase陽性細胞であった。

ヒト肥満細胞は大別して2つのcell typeに分類することができる。すなわち、Tryptase陽性細胞であるMC_T細胞とTryptase及びChymase陽性細胞であるMC_{Tc}細胞である。MC_T細胞は粘膜型肥満細胞と呼ばれ、主に消化管粘膜に多く、一方、MC_{Tc}細胞は結合組織型と呼ばれ、皮下組織に多い。Substance Pやcompound 48/80に反応する肥満細胞は後者のタイプである。今回、Rec168陽性の肥満細胞はTryptase及びChymase陽性細胞であったことから、結合組織型肥満細胞であることが判明した。長期罹患関節リウマチ患者の滑膜にはMC_{Tc}細胞が優位に存在すること、間質性膀胱炎患者の疾患部位ではMC_{Tc}細胞および好酸球の増加が認められること、MC_{Tc}細胞の産生するTNFが細菌感染時にT細胞をリンパ節に誘導し腫張させるなどの報告があり、結合組織型肥満細胞の炎症と免疫応答との関わりから、ストレスによるアトピー性皮膚炎に留まらず、これら疾患とRec168のつながりについても検討を加える必要がある。 20

【産業上の利用可能性】

30

【0024】

以上のように、本発明のG蛋白質共役型受容体Rec168を介する新たなメカニズムに基づく、脱顆粒調節物質のスクリーニング方法及び肥満細胞における脱顆粒抑制物質の同定方法は、新たなアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の治療剤の開発方法として有用であり、特に肥満細胞が関与するアレルギー性疾患又は自己免疫疾患の治療剤の開発方法として適している。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> GPCR Rec168

<130> JF0198PC

<150> JP2005-330339

<151> 2005-11-15

10

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn
 1 5 10 15

Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile
 20 25 30

Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn
 35 40 45

30

Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe
 50 55 60

Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser
 85 90 95

40

Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala
 100 105 110

Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys
 115 120 125

Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His
 130 135 140

Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu
 145 150 155 160

Ser Ile Leu Glu Gly Lys Phe Cys Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp
 165 170 175

Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile
 180 185 190

10

Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg
 195 200 205

Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr
 210 215 220

Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly
 225 230 235 240

20

Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu
 245 250 255

Phe Cys His Ile His Pro Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Asn Ser
 260 265 270

Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln
 275 280 285

30

Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu
 290 295 300

Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly
 305 310 315 320

Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser Leu Val
 325 330

40

<210> 2
 <211> 1009
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2

aggttttctg agcatggatc caaccacccc ggcttgggga acagaaagta caacagtga 60
 tggaaatgac caagcccttc ttctgctttg tggcaaggag acctgatcc cggctcttct 120
 gatccttttc attgccttgg tcgggctggt aggaaacggg tttgtgctct ggctcctggg 180
 ctccgcatg cgcaggaacg ctttctctgt ctacgtctc agcctggccg gggccgactt 240
 cctcttctc tgettecaga ttataaattg cctggtgtac ctcagtaact tttctgttc 300 10
 catctccatc aatttccta gttcttcac cactgtgatg acctgtgctt acctgcagg 360
 cctgagcatg ctgagcaccg tcagcaccga gcgctgcctg tccgtcctgt ggcccatctg 420
 gtatcgtgc cgcgccccca gacacctgtc agcggtcgtg tgtgtcctgc tctgggcctt 480
 gtcctactg ctgagcatct tggaaggga gttctgtggc ttcttattta gtgatggtga 540
 ctctggttgg tgcagacat ttgatttcat cactgcagcg tggctgattt ttttattcat 600 20
 ggttctctgt gggctcagtc tggccttget ggtcaggatc ctctgtgget ccaggggtct 660
 gccactgacc aggctgtacc tgaccatct gctcacagtg ctggtgttcc tctctgcgg 720
 cctgcccttt ggcattcagt ggttcctaatt attatggatc tggaaggatt ctgatgtctt 780
 attttgcatt attcatccag tttcagttgt cctgtcatct cttaacagca gtgccaaccc 840
 catcatttac ttcttcgtgg gctcttttag gaagcagtgg cggctgcagc agccgatcct 900 30
 caagctgget ctccagaggg ctctgcagga cattgctgag gtggatcaca gtgaaggatg 960
 ctccgctcag ggcaccccg agatgtcgag aagcagtctg gtgtagaga 1009

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial 40

<220>

<223> Oligonucleotide sequence of PCR primer

<400> 3

tcttgttttt gtttcaggg g 21

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide sequence of PCR primer

<400> 4
catatatctg atggaagtag ag 22 10

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide sequence of PCR primer 20

<400> 5
agggttttctg agcatggatc caac 24

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220> 30
<223> Oligonucleotide sequence of PCR primer

<400> 6
tctctacacc agactgcttc tcg 23

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial 40

<220>
<223> Oligonucleotide of sequence primer

<400> 7
accttgcagg cctgagcatg c 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220> 10
<223> Oligonucleotide of sequence primer

<400> 8
gaccctgga gccacagagg a 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial 20

<220>
<223> Oligonucleotide of sequence primer

<400> 9
ctggtgttcc tcctctgcgg c 21

<210> 10
<211> 21 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotide of sequence primer

<400> 10
atggagatgg aacagaagaa g 21

40

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Leu Lys Pro Leu Ile Leu Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Phe Thr Arg Lys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Rat

<400> 12

10

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly

1 5 10 15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20 25

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

20

Leu Lys Pro Leu Ile Leu Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asp Thr Pro Phe

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 14

30

Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp Met Asp Tyr Gln Lys Arg Tyr Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 15

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens 10

<400> 16

Arg Ser Met Arg Leu Ser Phe Arg Ala Arg Gly Tyr Gly Phe Arg

1 5 10 15

<210> 17

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens 20

<400> 17

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Gln Lys Ile Gly Lys Glu Phe Lys Arg

1 5 10 15

Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Pro Arg Thr Glu Ser

20 25 30 35

30

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLTATION 40

<400> 18

Ala Gly Gln Ala Phe Arg Lys Phe Leu Pro Leu Phe Asp Arg Val Leu

1 5 10 15

Val Glu Arg Ser
20

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> Rat

<220>
<221> DISULFID
<222> (2)..(13)
<223>

10

<400> 19

Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys
1 5 10

20

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Phe Leu Pro Leu Val Leu Gly Lys Ala Arg Ala Arg Arg
1 5 10

30

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Frog Rana Rugosa

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> AMIDATION

40

<400> 21

Phe Gly Phe Leu Pro Ile Tyr Arg Arg Pro Ala Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22 10

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Pro Tyr Phe
1 5 10

<210> 23
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23 20

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
1 5 10 15

Lys His His Ser His Arg Gly Tyr
20

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Pro
1 5

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 25

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
1 5 10 15

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Bovine 10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> AMIDATION

<400> 26

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10 20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 27

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe
1 5 10 15 30

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser
20

<210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> Bee 40

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> AMIDATION

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(15)

<223>

<400> 28

Ile Lys Cys Asn Cys Lys Arg His Val Ile Lys Pro His Ile Cys Arg
1 5 10 15

10

Lys Ile Cys Gly Lys Asn
20

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID

<400> 29

Glu Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

30

<210> 30

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> AMIDATION

40

<400> 30

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 31
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220> 10
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> AMIDATION

<400> 31

Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys
1 5 10 15

20

Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Swine

<220> 30
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

<400> 32

Asn Arg Gly Phe Ser Arg Lys Ser Gln Thr Phe Leu Pro Lys Ile Phe Phe
1 5 10 15

40

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser
1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens 10

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(14)

<223>

<400> 34

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
1 5 10 20

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DISULFID

<222> (17)..(28) 30

<223>

<400> 35

Ser Ala Asn Ser Asn Pro Ala Met Ala Pro Arg Glu Arg Lys Ala Gly
1 5 10 15

Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
20 25

40

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> AMIDATION

<400> 36

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5 10

10

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> AMIDATION

20

<400> 37

Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Swine

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLTATION

40

<400> 38

Met Asp Ala Ile Lys Lys Lys Met Gln Met Leu Lys Leu Asp Lys
1 5 10 15

<210> 39
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> AMIDATION

10

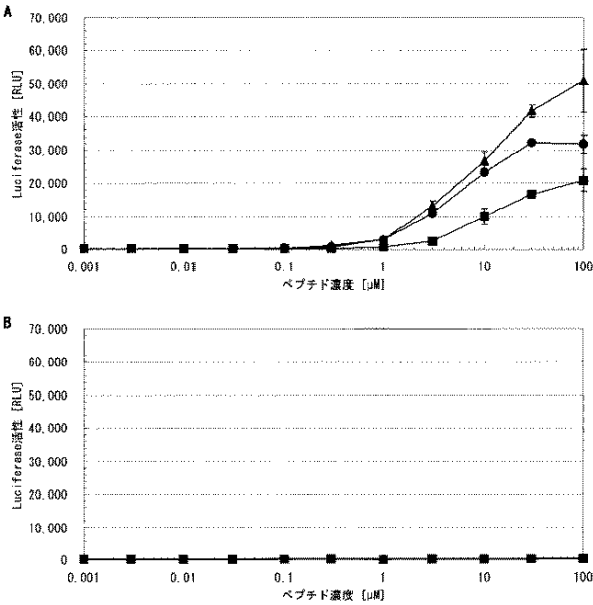
<400> 39

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

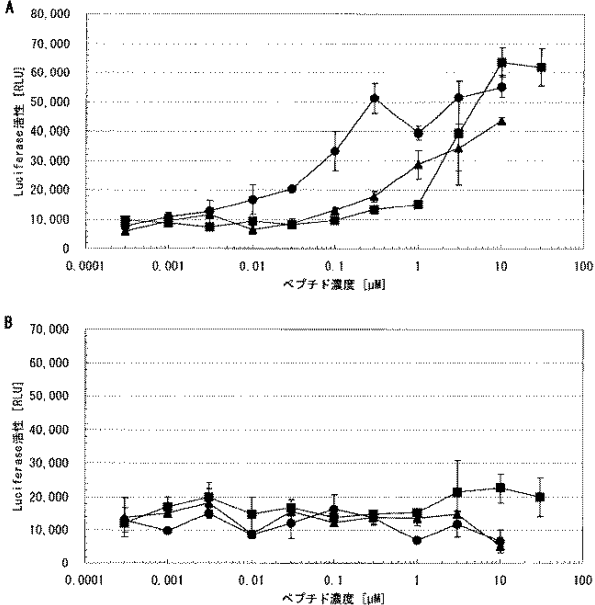
【図 1】

図 1



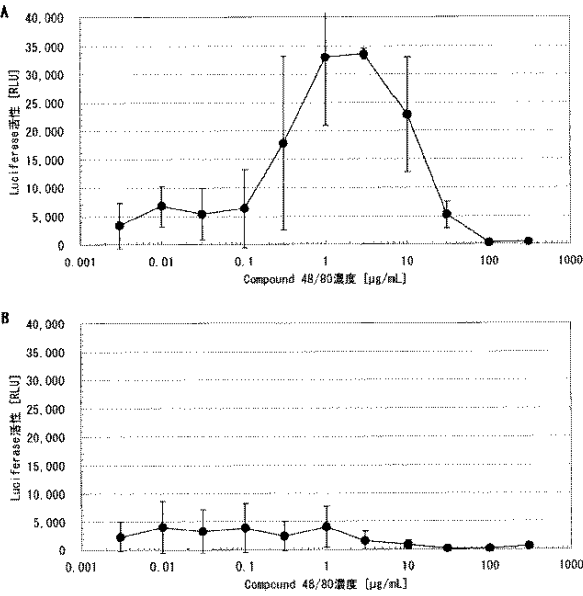
【図 2】

図 2



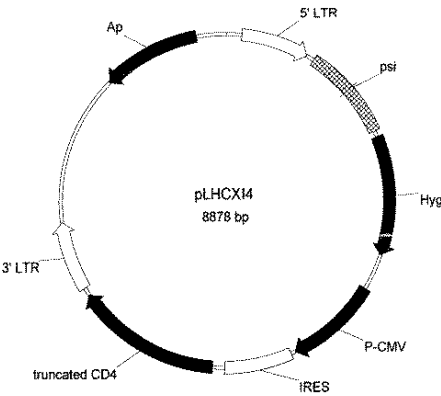
【図 3】

図 3



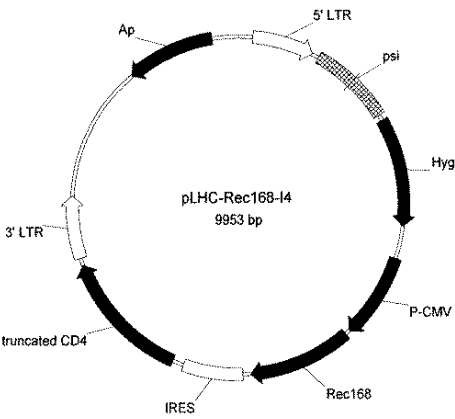
【図 4】

図 4



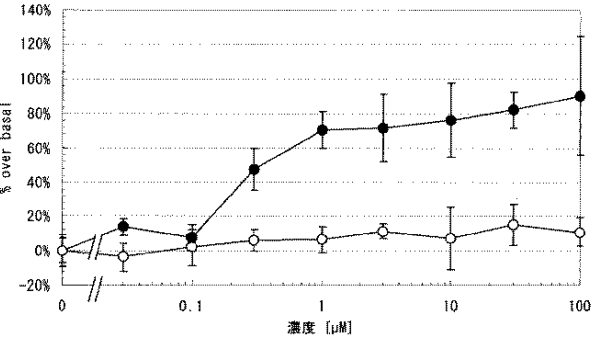
【図 5】

図 5



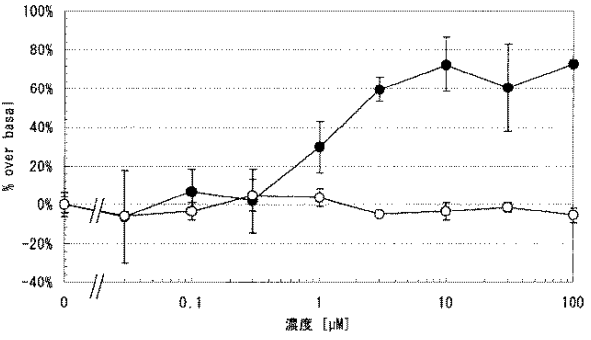
【図 6】

図 6



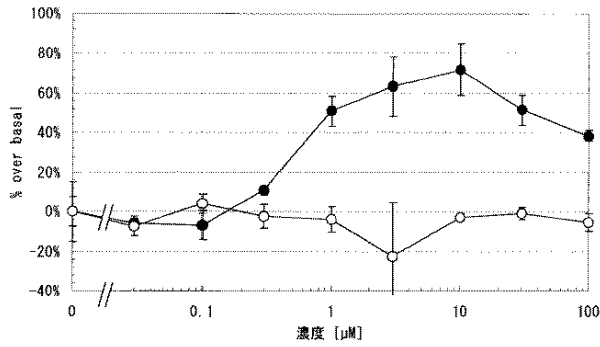
【図 7】

図 7



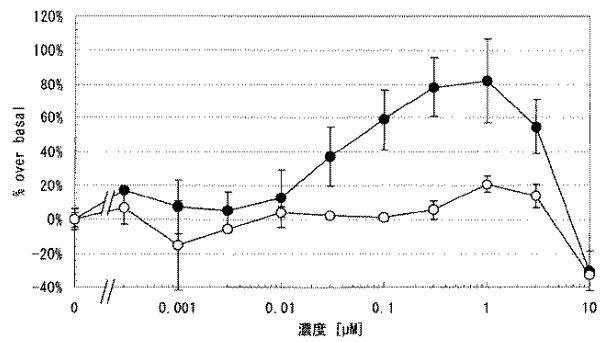
【図 8】

図 8



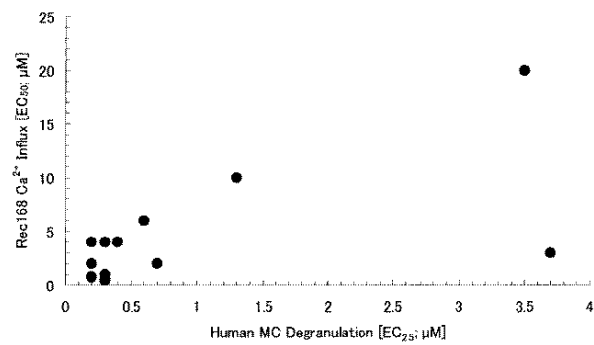
【図 9】

図 9



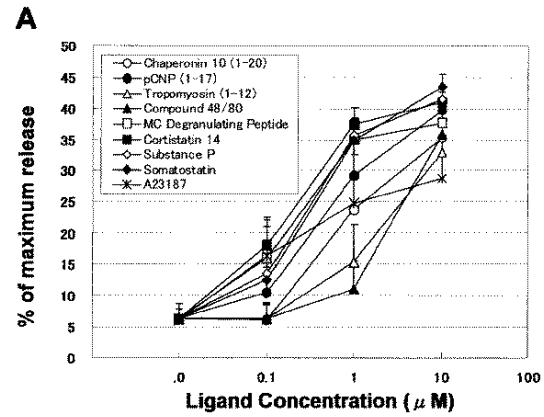
【図 11】

図 11

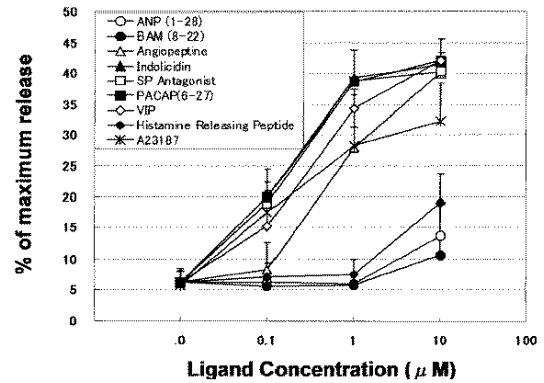


【図 10】

図 10

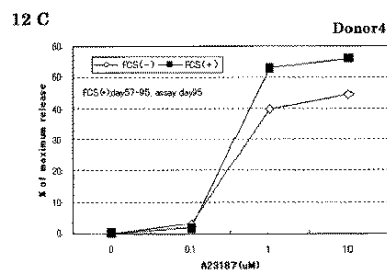
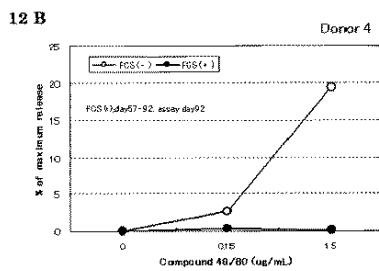
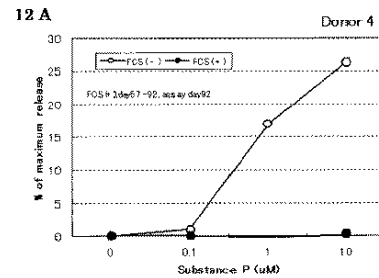


B



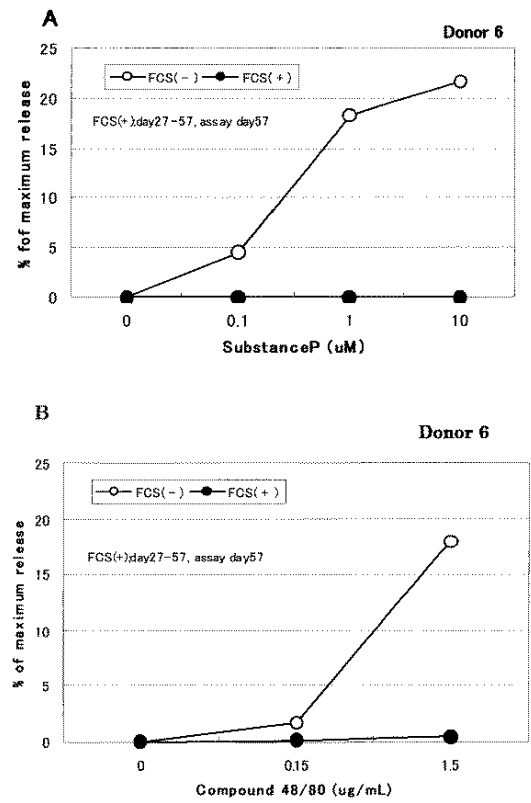
【図 12】

図 12



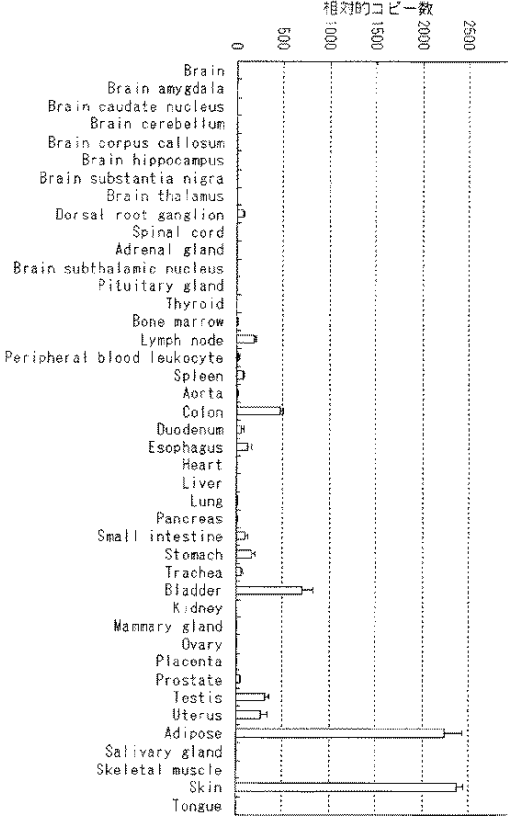
【図 1 3】

図 1 3



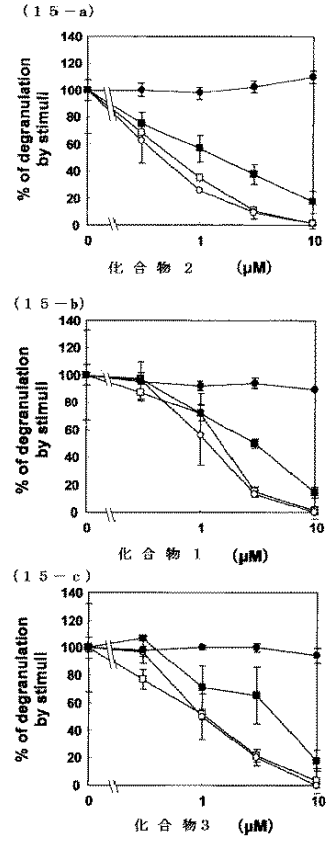
【図 1 4】

図 1 4

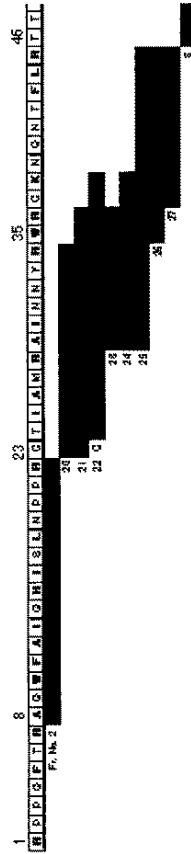


【図 1 5】

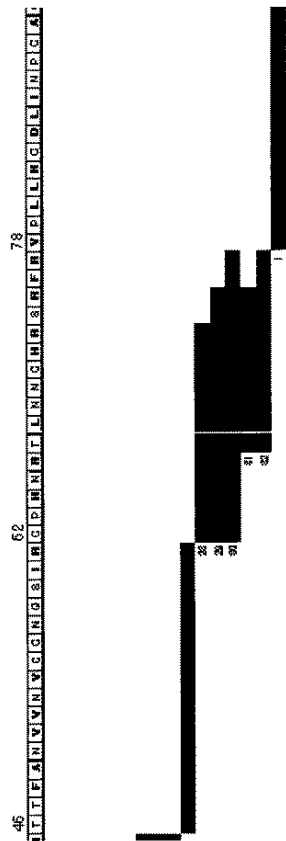
図 1 5



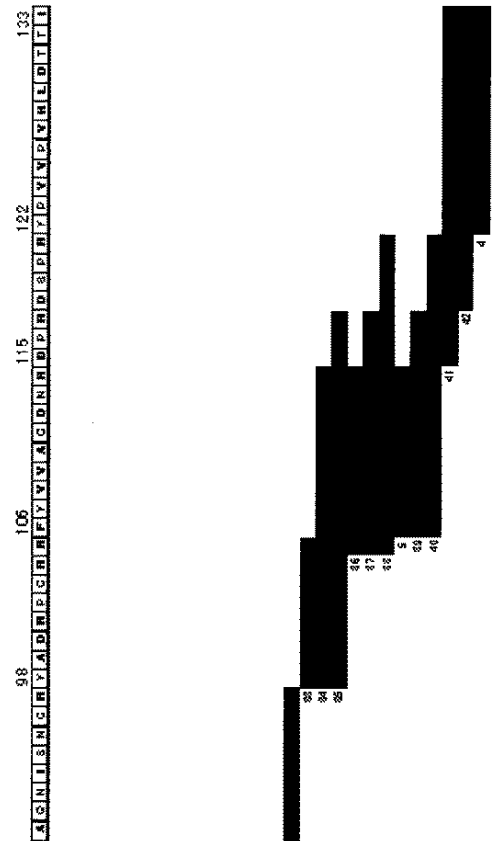
【図 1 6 (A-1)】



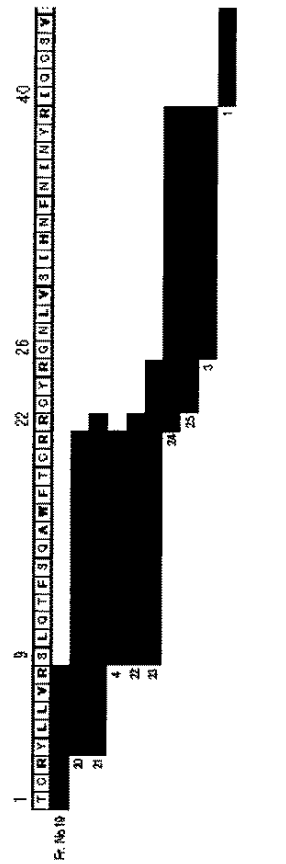
【☒ 1 6 (A-2)】



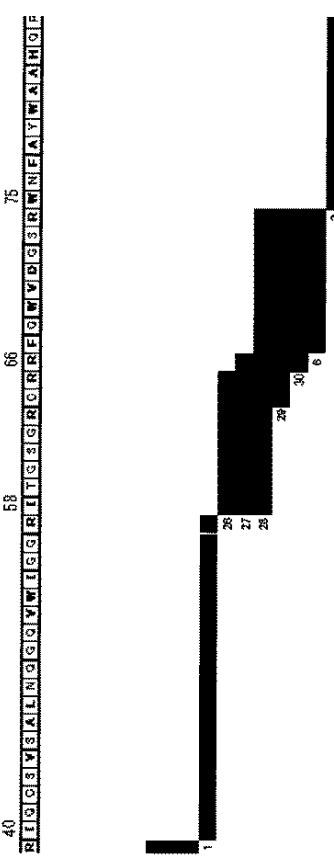
【☒ 1 6 (A-3)】



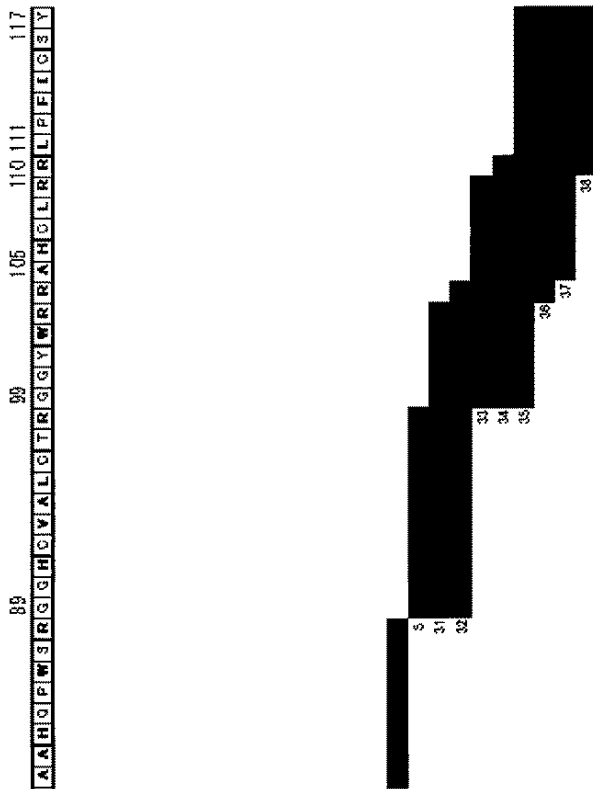
【☒ 1 6 (B-1)】



【☒ 1 6 (B-2)】

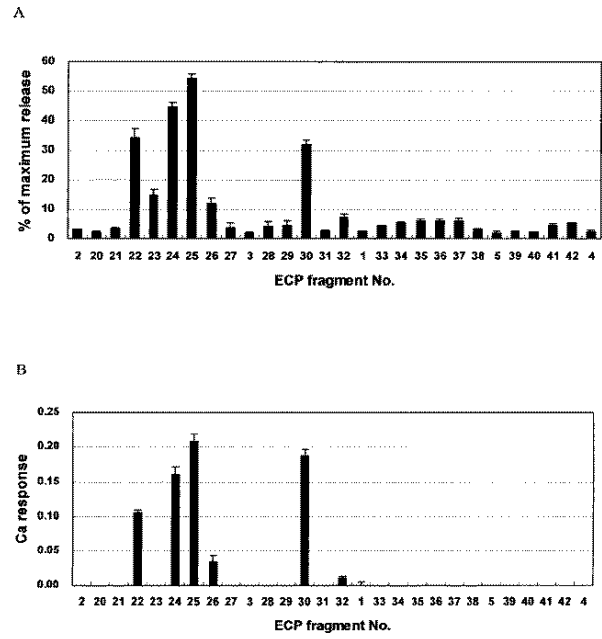


【図 16 (B-3)】



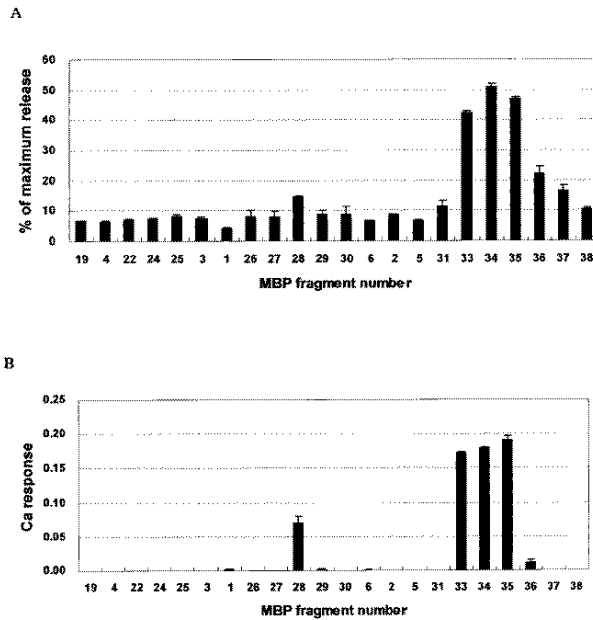
【図 17】

図 17

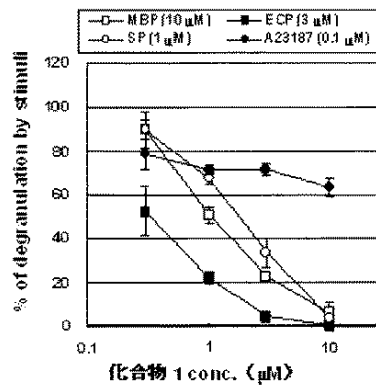


【図 18】

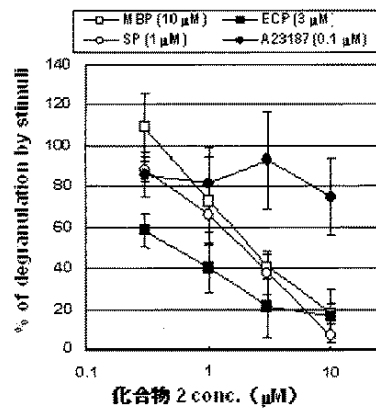
図 18



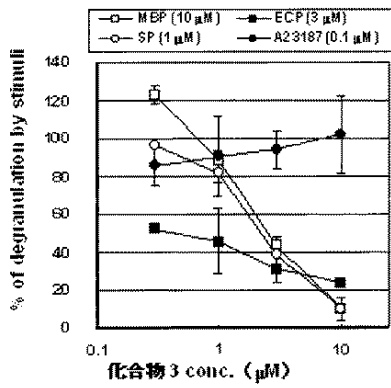
【図 19 (A)】



【図 19 (B)】



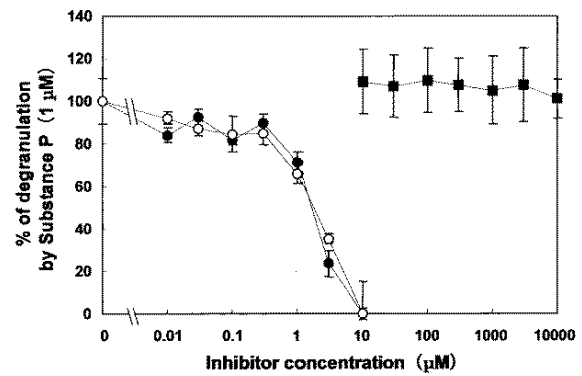
【図 19 (C)】



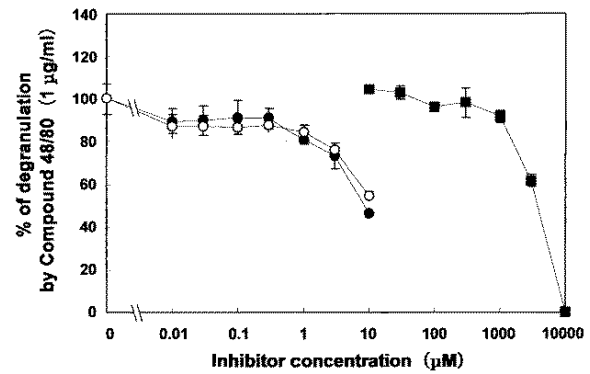
【図 20】

図 20

(A)



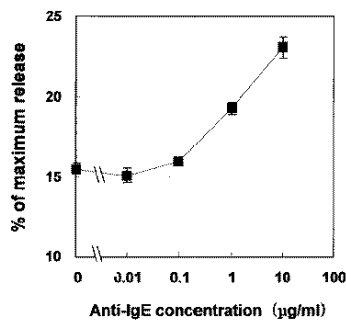
(B)



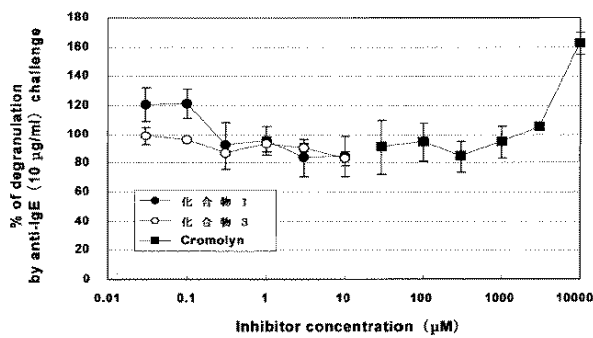
【図 21】

図 21

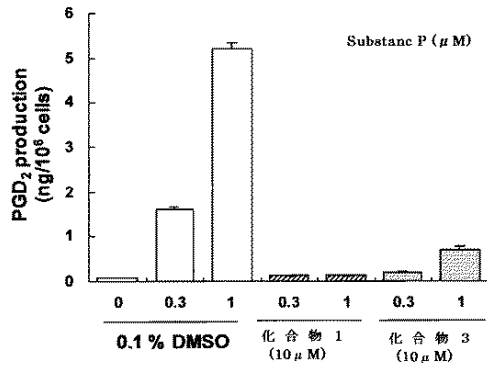
(A)



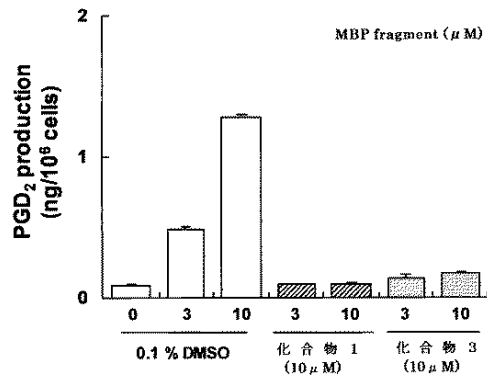
(B)



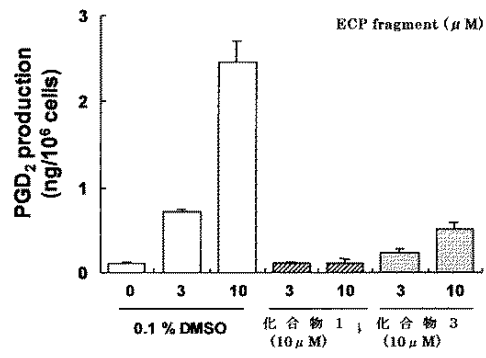
【図 22 (A)】



【図 22 (B)】



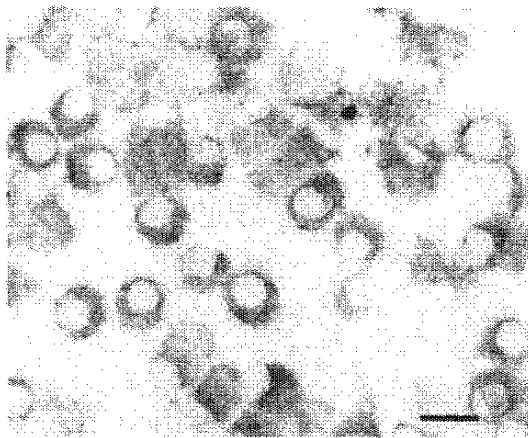
【図 2-2 (C)】



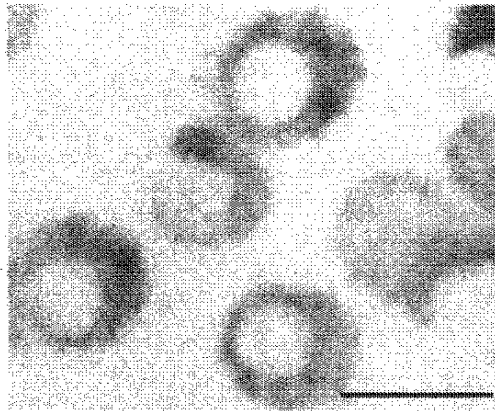
【図 2 3】

図 2 3

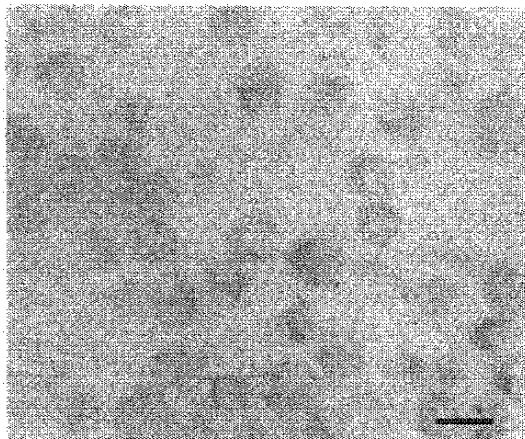
(A) 抗Rec168抗体



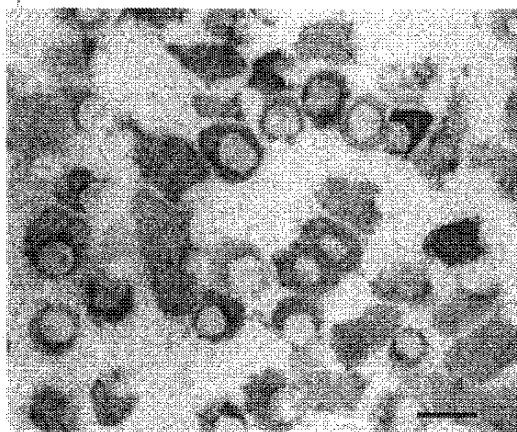
(B) 抗Rec168抗体 (拡大)



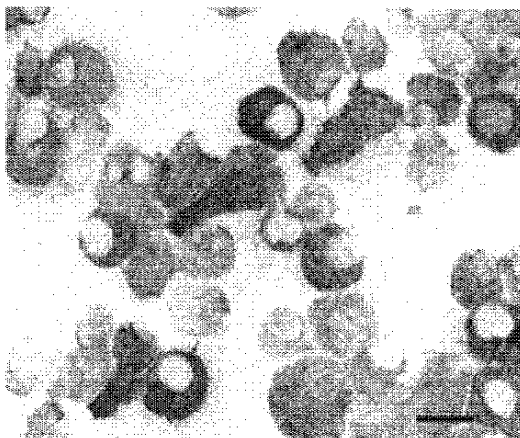
(C) ウサギコントロール抗体



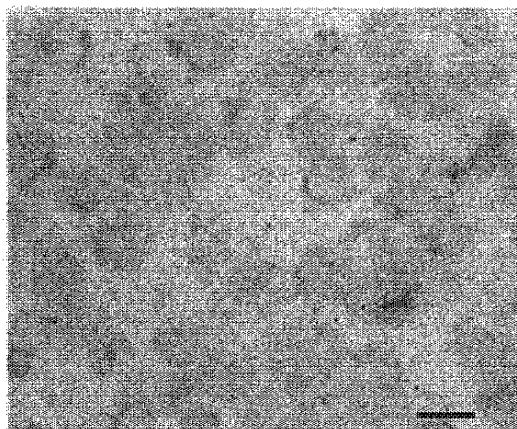
(D) 抗Tryptase抗体



(E) 抗Chymase抗体



(F) コントロールマウス抗体



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/323063
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/02(2006.01)i, A61K31/498(2006.01)i, A61K31/517(2006.01)i, A61K31/55(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, 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, A61K31/498, A61K31/517, A61K31/55, A61K45/00, A61P29/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07D241/46, C07D403/04, C07D473/32 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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus(JDream2), REGISTRY (STN), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/028667 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., et al.),	1-5, 7, 9-16, 18, 20
Y	31 March, 2005 (31.03.05), (Family: none).	1-5, 7, 9-16, 18, 20
Y	WO 2003/073107 A2 (Pfizer Pharmaceuticals Inc.), 04 September, 2003 (04.09.03), & EP 1340979 A2 & US 2003/0171293 A1 & JP 2004-033211 A & AU 2003/206014 A1	1-5, 7, 9-16, 18, 20
P, X	Tatemoto Kazuhiko et al., "Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors", Biochem.Biophys. Res.Comm., Nov. 2006, Vol.349, pp.1322-1328.	1-20
☒ 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 06 February, 2007 (06.02.07)		Date of mailing of the international search report 13 February, 2007 (13.02.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/323063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	Natsuyo AKUSAWA et al., 'Hito G-Tanpakushitsu Kyoeki Juyotai MrgX2 no Ligand Tansaku', Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 25 November, 2005 (25.11.05), No.28, page 658	1-20
P, A	Sugo Tsukasa et al., "Identification of a lysophosphatidylserinereceptor on mast cells," Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Vol.341, pp.1078-1087.	1-20
P, A	Burstein S. Ethan et al., "Characterization of the Mas-relatedgene family: structural and functional conservation of human andrhesus MrgX receptors, "British Journal of Pharmacology, 2006, Vol.147, pp.73-82.	1-20
A	Nothacker Hans-Peter et al., "Proadrenomedullin N-terminalpeptide and cortistatin activation of MrgX2 receptor is basedon a common structural motif, "European Journal of Pharmacology, Sep. 2005, Vol.519, pp.191-193.	1-20
A	Yang Su et al., "Adaptive evolution of MRGX2, a human sensoryneuron specific gene involved in nociception, " Gene, Jun. 2005, Vol.352, pp.30-35.	1-20
A	Kamohara Masazumi et al., "Identification of MrgX2 as a humanG-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminalpeptides, " Biochem. Biophys. Res. Commun., May 2005, Vol.330, pp.1146-1152.	1-20
A	Zhang Lin et al., "Cloning and expression of MRG receptors inmacaque, mouse and human, " Molecular Brain Research, Feb. 2005, Vol.133, pp.187-197.	1-20
A	Robas Nicola et al., "MrgX2 is a high potency cortistatinreceptor expressed in Dorsal Root Ganglion," J. Biol. Chem., 2003, Vol.278, No.45, pp.44400-44404.	1-20
A	Hiroyuki HIRAI et al., 'Dai 2 no Prostaglandin D2 Juyotai, CRTH2', Igaku no Ayumi, 2004 Nen, Vol.210, No.3, pages 213 to 214	1-20
A	Niyonsaba Francois et al., 'Sakkin Peptide no Himan Saibo ni Oyobosu Eikyo', Ensho-Saisei, 2001 Nen, Vol.21, No.2, pages 109 to 115	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/323063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tetsu YAMAZAKI et al., 'Mast Saibo no Datsu Karyu to Bishokan Keisei', Clinical Immunology, 2005 Nen, 10 Gatsu, Vol.44, No.4, pp.382-388.	1-20
A	Vines M. Charlotte et al., "Mechanisms of G protein-coupled receptor-mediated degranulation, "FEMS Microbiol. Letters, 2004, Vol.236, pp.1-6.	1-20
A	Nguyen MyTrang et al., "Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E2-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production, " Journal of Immunology, 2002, Vol.169, pp.4586-4593.	1-20
A	Piliponsky M. Adrian et al., "Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation, "Molecular Immunology, 2001, Vol.38, pp.1369-1372.	1-20
A	Buku Angeliki, "Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation, "Peptides, 1999, Vol.20, pp.415-420.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/323063

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))*C07D241/46(2006.01)n, C07D403/04(2006.01)n, C07D473/32(2006.01)n*

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/323063

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1st Group of inventions: a method for screening or identification of a substance capable of inhibiting the degranulation reaction or prostaglandin D₂ production in a mast cell through Rec168 (claims 1-4, 12-15);

2nd Groups of inventions: an inhibitor of the degranulation or prostaglandin D₂ production in a mast cell (claims 5-6, 9, 16-17, 20);

3rd Groups of inventions: a therapeutic agent for an inflammatory disease associated with a mast cell (claims 7-8, 10, 18-19); and

4th Group of inventions: a diagnostic agent for an inflammatory disease associated with a mast cell, the agent comprising an Rec168 protein, a nucleic (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/323063

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

acid encoding the Rec168 protein, or an antibody directed against Rec168
as a reagent (claim 11).

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 3 0 6 3	
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, A61K31/498(2006.01)i, A61K31/517(2006.01)i, A61K31/55(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07D241/46(2006.01)n, C07D403/04(2006.01)n, C07D473/32(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, A61K31/498, A61K31/517, A61K31/55, A61K45/00, A61P29/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07D241/46, C07D403/04, C07D473/32			
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), REGISTRY (STN), CA (STN)			
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 請求の範囲の番号	
X Y	WO 2005/028667 A1 (協和醗酵工業株式会社ほか) 2005.03.31 (ファミリーなし).	1-5, 7, 9-16, 18, 20 1-5, 7, 9-16, 18, 20	
Y	WO 2003/073107 A2 (ファイザー製薬株式会社) 2003.09.04 & EP 1340979 A2 & US 2003/0171293 A1 & JP 2004-033211 A & AU 2003/206014 A1.	1-5, 7, 9-16, 18, 20	
☒ 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 06.02.2007		国際調査報告の発送日 13.02.2007	
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100-8915 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) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 3 0 6 3

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 請求の範囲の番号
PX	Tatemoto Kazuhiko et al., "Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors," Biochem. Biophys. Res. Commun., Nov. 2006, Vol. 349, pp. 1322-1328.	1-20
PY	阿久沢夏世ほか, 「ヒトGタンパク質共役受容体 MrgX2 のリガンド探索」, 日本分子生物学会年会講演要旨集, 2005年11月25日, 第28回, p. 658.	1-20
PA	Sugo Tsukasa et al., "Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells," Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Vol. 341, pp. 1078-1087.	1-20
PA	Burstein S. Ethan et al., "Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors," British Journal of Pharmacology, 2006, Vol. 147, pp. 73-82.	1-20
A	Nothacker Hans-Peter et al., "Proadrenomedullin N-terminal peptide and cortistatin activation of MrgX2 receptor is based on a common structural motif," European Journal of Pharmacology, Sep. 2005, Vol. 519, pp. 191-193.	1-20
A	Yang Su et al., "Adaptive evolution of MRGX2, a human sensory neuron specific gene involved in nociception," Gene, Jun. 2005, Vol. 352, pp. 30-35.	1-20
A	Kamohara Masazumi et al., "Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides," Biochem. Biophys. Res. Commun., May 2005, Vol. 330, pp. 1146-1152.	1-20
A	Zhang Lin et al., "Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse and human," Molecular Brain Research, Feb. 2005, Vol. 133, pp. 187-197.	1-20
A	Robas Nicola et al., "MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in Dorsal Root Ganglion," J. Biol. Chem., 2003, Vol. 278, No. 45, pp. 44400-44404.	1-20
A	平井博之ほか, 「第2のプロスタグランジン D2 受容体, CRTH2」, 医学のあゆみ, 2004年, 第210巻, 第3号, pp. 213-214.	1-20

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2005年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 3 0 6 3

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 請求の範囲の番号
A	Niyonsaba Francois ほか, 「殺菌ペプチドの肥満細胞に及ぼす影響」, 炎症・再生, 2001年, 第21巻, 第2号, pp.109-115.	1-20
A	山崎哲ほか, 「マスト細胞の脱顆粒と微小間形成」, 臨床免疫, 2005年10月, 第44巻, 第4号, pp.382-388.	1-20
A	Vines M. Charlotte et al., "Mechanisms of G protein-coupled receptor-mediated degranulation," FEMS Microbiol. Letters, 2004, Vol.236, pp.1-6.	1-20
A	Nguyen MyTrang et al., "Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E2-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production," Journal of Immunology, 2002, Vol.169, pp.4586-4593.	1-20
A	Piliponsky M. Adrian et al., "Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation," Molecular Immunology, 2001, Vol.38, pp.1369-1372.	1-20
A	Buku Angeliki, "Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation," Peptides, 1999, Vol.20, pp.415-420.	1-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 3 0 6 3

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

発明1：Rec168を介して肥満細胞の脱顆粒反応又はプロスタグランジンD2産生を抑制する物質をスクリーニング又は同定する方法（請求の範囲1-4, 12-15）。

発明2：肥満細胞の脱顆粒抑制剤又はプロスタグランジンD2産生抑制剤（請求の範囲5-6, 9, 16-17, 20）。

発明3：肥満細胞が関与する炎症性疾患の治療剤（請求の範囲7-8, 10, 18-19）。

発明4：Rec168をコードする蛋白質又は核酸、Rec168に対する抗体を試薬とする肥満細胞が関与する炎症性疾患の診断薬（請求の範囲11）。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2005年4月）

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/522 (2006.01)	A 6 1 K 31/522	
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 D 241/46 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 0 7 D 473/18 (2006.01)	C 0 7 D 241/46	
C 0 7 D 401/06 (2006.01)	C 0 7 D 473/18	
	C 0 7 D 401/06	

(72)発明者 野崎 有子

日本国神奈川県横浜市福浦一丁目13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬探索研究所内

(72)発明者 古野 雅弘

日本国大阪府高槻市紫町1番1号 日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所内

(72)発明者 戸村 恵子

日本国大阪府高槻市紫町1番1号 日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所内

F ターム (参考) 2G045 CB01 DA13 DA36 FB03

4B024 AA11 BA63 CA04 CA09 CA12 DA02 DA03 EA04 GA13 GA14

4B063 QA18 QQ08 QQ13 QQ89 QR50 QR77 QR80 QX01 QX02

4C063 AA01 BB03 CC31 DD12 EE01

4C086 AA01 AA02 BC46 BC51 CB07 MA01 MA04 NA14 ZB11 ZB21

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項 (実用新案法第48条の13第2項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

本发明基于G蛋白偶联受体Rec168介导的新机制, 提供了脱颗粒调节剂或前列腺素D2产生抑制剂, 用于开发变应性疾病或自身免疫疾病的治疗剂。一个目的是提供一种筛选方法和一种用于鉴定肥大细胞中脱颗粒抑制剂或前列腺素D2产生抑制剂的方法。本发明在具有Rec168激动作用的配体的存在下, 测定在被测物质不存在和共存下该配体对Rec168的信号转导能力的步骤, 以及比较两个测定值的步骤, 特征, 通过Rec168的信号转导能力抑制剂, 肥大细胞或前列腺素D2产生抑制剂中的脱颗粒调节剂和肥大细胞或前列腺素D2中的脱颗粒抑制剂 这是用于识别生产抑制剂的方法。

[illegible]