

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年9月7日 (07.09.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/100071 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	<i>C07K 14/47</i> (2006.01)
<i>A61K 38/00</i> (2006.01)	<i>C12N 1/15</i> (2006.01)
<i>A61K 45/00</i> (2006.01)	<i>C12N 1/19</i> (2006.01)
<i>A61P 1/10</i> (2006.01)	<i>C12N 1/21</i> (2006.01)
<i>A61P 1/14</i> (2006.01)	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
<i>A61P 43/00</i> (2006.01)	<i>C12N 15/09</i> (2006.01)
<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)	<i>G01N 33/566</i> (2006.01)

ば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 金谷章生 (KANATANI, Akio) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/053989

(22) 国際出願日:

2007年2月23日 (23.02.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-048438 2006年2月24日 (24.02.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1028667 東京都千代田区九段北一丁目13番12号北の丸スクエア Tokyo (JP).

(74) 共通の代表者: 萬有製薬株式会社 (BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.); 〒1028667 東京都千代田区九段北一丁目13番12号北の丸スクエア Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木順 (SUZUKI, Jun) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 守屋隆一 (MORIYA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 廣瀬博康 (HIROSE, Hiroyasu) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP). 菅野哲也 (KANNO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つく

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NPY Y4 AGONIST AS THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASE ACCOMPANIED BY INTESTINAL TRACT DYS-FUNCTION

(54) 発明の名称: 腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤としてのNPY Y4アゴニスト

(57) Abstract: Disclosed is an agent capable of ameliorating the intestinal tract dysfunction through a novel action mechanism. Also disclosed is a method for the evaluation of a compound, including the screening of the agent. A disease accompanied by intestinal tract dysfunction can be ameliorated or treated by using an NPY Y4 agonist as a therapeutic agent. A compound capable of ameliorating or treating a disease accompanied by intestinal tract dysfunction can be evaluated or screened by evaluating a compound targeting to an NPY Y4 receptor.

(57) 要約: 本発明は、新規な作用メカニズムにより腸管の機能異常の改善を可能とする薬剤を提供することを目的とする。また、当該薬剤のスクリーニングをはじめとする化合物の評価方法を提供することを目的とする。腸管の機能異常を伴う疾患に治療剤としてNPYY4アゴニストを使用することにより、当該疾患の改善、治療が可能となる。また、NPYY4受容体を標的とした化合物の評価を行うことにより、腸管の機能異常を伴う疾患の改善、治療を可能とする化合物の評価、スクリーニングが可能となる。

WO 2007/100071 A1

# 明 細 書

腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤としての NPY Y4 アゴニスト

## 5 技 術 分 野

本発明は、NPY Y4 アゴニストを標的とする、腸管の機能異常を伴う疾患の診断又は治療に有効な化合物の評価方法に関する。また、本発明は、腸管の機能異常を伴う疾患の診断又は治療を目的とした NPY Y4 アゴニストの新規用途に関する。

## 10 背 景 技 術

NPY (neuropeptide Y) は36アミノ酸からなるペプチドであり、1982年、立元らにより豚脳より単離された（非特許文献1）。NPYは中枢神経系及び末梢神経系に広く分布し、神経系における最も多量に存在するペプチドの一つとして、生体において多様な機能を司っている。

- 15 すなわち、NPYは中枢において食欲促進物質として働くとともに、各種ホルモンの分泌又は神経系の作用を介して脂肪蓄積を顕著に促進する。例えば、NPYの脳室内連続投与はこれらの作用に基づき、肥満及びインスリン抵抗性を誘発することが知られている。また、NPYは、うつ病、不安、精神分裂、痛み、痴呆及び概日リズムの調節などの中枢作用を持つことが知られている。さらに、NPYは、末梢において、交感
- 20 神経終末にノルエピネフリンと共存し、交感神経系の緊張性と関係している。NPYの末梢投与は血管収縮を引き起こし、またノルエピネフリンを初めとする他の血管収縮物質の作用を増強することが知られている。

- NPYは、その類縁体であるペプチドYY (Peptide-YY：以下、PYYと称する) 及び
- 25 パンクレアティック・ポリペプチド (Pancreatic Polypeptide：以下、PPと称する) と一部共通の受容体を介して、多種多様な薬理作用を有する。これらNPYによる薬理作用はNPY Y1からY5といった、少なくとも5種類の受容体の単独あるいは相互作用を介して惹起されることが知られている（非特許文献2）。

一方、NPY Y4受容体に関して、既にヒトNPY Y4受容体遺伝子が単離されている（

非特許文献3、4及び特許文献1：Accession No. U35232（配列番号1及び2）。ヒトNPY Y4受容体は、ヒトゲノムライブラリーをNPY Y1受容体cDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより単離されたものであり、7回膜貫通型構造を有し、Y1受容体とはアミノ酸レベルで42%の相同性を有することが明らかにされている。

5 。

また、NPYの他、PPにも親和性を持ち、NPY Y1受容体やY2受容体と同じく、細胞内カルシウム濃度を上昇させ、cAMP産生に対して抑制的な効果を示すことが明らかにされている。また、NPY Y4受容体は主に前立腺、結腸、膵臓及び小腸に発現していることが知られている。

NPY Y4受容体のノックアウトマウスでは体重及び白色脂肪組織の総量が減少し、

10 血漿中のPP量が増加することが報告されている（非特許文献5）。

（特許文献1）W095/17906号公報

（非特許文献1）Nature、296巻、659頁、1982年

（非特許文献2）Trends in Neuroscience、20巻、294頁、1997年

（非特許文献3）The Journal of Biological Chemistry、270巻、26762頁、199

15 5年

（非特許文献4）The Journal of Biological Chemistry、270巻、29123頁、199

5年

（非特許文献5）Genes and Development、16巻、1077頁、2002年

## 20 発明の開示

しかしながら、NPY Y4受容体と腸管運動との関係については知見がないのが現状であった。また、腸管の機能異常（例えば、便秘）を改善する薬剤として、より副作用が少なく、新たなメカニズムの薬剤が望まれているのが現状であった。

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、新規な作用

25 メカニズムにより腸管の機能異常の改善を可能とする薬剤を提供することを目的とする。また、当該薬剤のスクリーニングをはじめとする化合物の評価方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、NPY Y4アゴニストが腸管に作用し、かかる作用によって腸管の機能異常を改善することを見出し、本

発明を完成した。

すなわち、本発明の化合物の評価方法は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該 NPY Y4 に対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。かかる評価方法により、NPY Y4 受容体に作用して腸管の機能異常を治療・改善する化合物の評価やスクリーニングが可能となる。

また、本発明の化合物の評価方法は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。かかる評価方法により、NPY Y4 受容体に作用して NPY Y4 受容体を介した細胞内情報伝達の制御を行う機能を有し、腸管の機能異常を治療・改善する化合物の評価やスクリーニングが可能となる。

さらに、本発明の化合物の評価方法は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該 NPY Y4 又は NPY Y4 を介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程と、被検化合物を接触させていない場合と比較して、当該 NPY Y4 又は該細胞内情報伝達物質の発現レベルを増加又は減少させた被検化合物を選択する工程と、を含むことを特徴とする。かかる評価方法により、NPY Y4 受容体に作用して NPY Y4 受容体を介した細胞内情報伝達の制御を行う機能を有し、腸管の機能異常を治療・改善する化合物の評価やスクリーニングが可能となる。

また、本発明の評価方法は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、被検化合物を、NPY Y4 に接触させる工程と、当該接触による NPY Y4 の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。かかる評価方法により、NPY Y4 タンパク質と相互作用することにより NPY Y4 の機能を制御する機能を有し、腸管の機能異常を治療・改善する化合物の評価やスクリー

ニングが可能となる。

また、本発明の化合物の評価方法は、NPY Y4 遺伝子改変非ヒト哺乳動物又は該哺乳動物に由来する組織若しくは細胞を用いることを特徴とする。当該動物を用いて被検化合物を評価することにより、NPY Y4 特異的に結合する化合物について in vivo  
5 における機能や挙動を観察することが可能となり、よりの確な化合物の評価は可能となる。

また、上述した5つの態様の化合物の評価方法においては、前記化合物が NPY Y4 アゴニストであることが好ましい。

さらに、本発明の腸管の機能異常によって生じる疾患の治療剤は、有効成分として NPY Y4 アゴニストを含むことを特徴とする。ここで、前記 NPY Y4 アゴニストが  
10 パンクレアティック・ポリペプチドであることが好ましい。

また、本発明の腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤のスクリーニング用キットは、NPY Y4 又はその部分ペプチドを含むことを特徴とする。当該キットを使用することにより、腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤のスクリーニングや評価を簡便且つ迅速  
15 に行うことが可能となる。

さらに、本発明の腸管の機能異常に伴う疾患の治療剤のスクリーニング用キットは、NPY Y4 と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその部分ペプチドを発現する細胞を含むことを特徴とする。当該キットを使用することにより、化合物のスクリーニングや評価に用いる細胞の調製をすることなしに、  
20 腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤のスクリーニングや評価を簡便且つ迅速に行うことが可能となる。

すなわち、本発明によれば、新規な作用メカニズムによる腸管の機能異常（例えば、便秘）の改善を可能とする薬剤を提供することが可能となる。また、このような薬剤のスクリーニングをはじめとする、腸管の機能異常の改善作用を有する化合物  
25 の評価方法や当該評価を簡便且つ迅速に行うことができるキットを提供することが可能となる。また、本発明の化合物の評価方法によれば、小腸に対する作用は小さく、大腸（特に回腸）に対して選択性が高い治療剤を得ることが可能となる。従って、著明な便秘改善効果を示すばかりでなく、他の臓器・器官に対する副作用の少ない治療剤を得ることが可能となる。

## 図面の簡単な説明

図1は、in vivoにおけるPPの投与量と排糞量との関係を経時的に示す図である。

図2は、in vivoにおけるPPの投与量と、投与後4時間の排糞量の総量との関係  
5 を示す図である。

図3は、回腸(ileum)、近位結腸(proximal colon)又は遠位結腸(distal colon)におけるPPの投与量と腸の張力との関係を示す図である。

図4は、回腸、近位結腸又は遠位結腸におけるPPの投与と腸の振幅数との関係を示す図である。

10 図5は、便秘モデルマウスにPP(1mg/kg)を投与した際の投与後4時間における排糞量を示す図である。

図6は、NPY Y4受容体欠損マウスにPPを投与した際の投与後2時間における排糞量を示す図である。

15 図7は、NPY Y4受容体欠損マウス及び野生型マウスより摘出した回腸、近位結腸又は遠位結腸におけるPPの投与の際の腸の張力の相違を示した図である。

## 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

20 本発明にかかる「NPY Y4」受容体とは、上述したように、NPYの受容体として機能する7回膜貫通構造の分子をいう。また、由来となる生物種は特に限定されず、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ又はウサギが挙げられる。中でも、本発明のNPY Y4アゴニストの投与対象や、化合物の評価における評価対象がヒトであることから、ヒトNPY Y4であることが好ましい。

25 また、本発明に係るNPY Y4遺伝子には、NPY Y4遺伝子と同等の生理機能を有し、NPY受容体としての機能するタンパク質をコードするものであれば1又は2以上の塩基の置換、欠失、付加又は挿入がある遺伝子も含まれる。ここで、当該遺伝子としては、かかるタンパク質をコードする遺伝子であればその配列は特に制限されないが、相同性が50%以上であることが好ましく、70%以上であることがより好ましく、80%以上であることがさらに好ましく、90%以上(例えば、91、92

、93、94、95、96、97、98、99%以上)であることが特に好ましい。

また、本発明に係るNPY Y4遺伝子には、NPY Y4遺伝子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸も含まれる。ここで、「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」とは、二つの核酸断片が、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールドスプリングハーバー(1989)、9.47-9.62及び11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。より具体的には、例えば、約45°Cにて6.0×SSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50°Cにて2.0×SSCで洗浄する条件が挙げられる。ストリンジエンシー選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジエンシーとしての約2.0×SSC、50°Cから、高ストリンジエンシーとしての約0.2×SSC、50°Cまで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジエンシー条件の室温、約22°Cから、高ストリンジエンシー条件の約65°Cまで上昇させることができる。

また、本発明に係る腸管の機能異常によって生じる疾患としては特に制限はなく、例えば、便秘、急性虫垂炎、便秘型の過敏性腸症候群、虚血性大腸炎を挙げることができる。また、かかる便秘の具体例としては、一過性の単純性便秘、症候群性便秘、けいれん性便秘、弛緩性便秘、直腸性便秘及び薬剤性便秘を挙げることができる。

#### 20 (1) 化合物の評価

NPY Y4遺伝子又はタンパク質を用いて、NPY Y4に作用する化合物の評価をすることができる。NPY Y4に対する作用を検出する方法として、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出する方法、被検化合物の接触によって変化した遺伝子の発現量を検出する方法、及び、当該接触によって生じたNPY Y4を介した細胞内情報伝達の活性を検出する方法が挙げられる。以下、順に説明する。

まず、被検化合物の当該受容体に対する特異的結合を検出することにより、被検化合物を評価する方法について説明する。

本発明の化合物の評価方法の第一の態様は、NPY Y4遺伝子を導入し、NPY Y4を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該NP

Y Y4に対する当該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

また、NPY Y4遺伝子を発現する細胞は、当業者が公知の方法で調製すればよく、具体的な方法としては特に制限はないが、例えば以下の方法によることができる。

- 5 すなわち、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングし、クローニングされた核酸を有するベクターを宿主細胞に導入することにより調製する。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、pCMV-Tag、pcDNA3.1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNA1、pMC1neo、pXT1、pSG5
- 10 、pEF1/V5-HisB、pCR2.1、pET11、 $\lambda$ gt11又はpCR3.1が挙げられる。

- 次に、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸が導入された発現ベクターを宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるものであれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、具体的には、例えば、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C12
- 15 71、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されないが、具体的には、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法又は遺伝子銃が挙げられる。

- 被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、天然化合物、有機化合物、無機
- 20 化合物、タンパク質、ペプチド等の単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物若しくは動物細胞抽出物等を挙げることができる。上記被検化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることがで
- 25 ける。また、上記被検化合物に代えて、これらの被検化合物を複数種混合した混合物を使用してもよい。

また、本発明において「接触」は、NPY Y4の状態に応じて行う。例えば、NPY Y4が細胞表面に発現した状態又は細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液又は細胞抽出液に被検化合物を添加することにより接触させることが



できる。被検化合物がタンパク質の場合には、例えば、当該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、NPY Y4が発現している細胞へ導入する、又は当該ベクターをNPY Y4が発現している細胞抽出液に添加することにより接触させることができる。また、例えば、酵母又は動物細胞等を用いたツーハイブリッド法を用いることも可能である。

5 具体的には、被検化合物とNPY Y4との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、NPY Y4を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（好ましくはpH 6~8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッ  
10 ファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01~10ml  
15 の当該溶液に、一定量（例えば、5000~500000cpm）の標識した被検化合物を添加し、同時に $10^{-10}$ ~ $10^{-4}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃~50℃、好ましくは4℃~37℃で20分~24時間、好ましくは30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファー  
20 で洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター又はγ-カウンターで計測する。

第一の態様では、次いで、NPY Y4と被検化合物の結合を検出する。検出方法としては、特に制限はない。細胞表面に発現した受容体と被検化合物との結合は、例えば、上述したような、結合した化合物に付された標識による検出（例えば、結合量  
25 を放射活性や蛍光強度による検出）のほか、細胞表面上の受容体へ被検化合物が結合することによって生じた細胞内へのシグナル伝達（例えば、Gタンパク質の活性化、cAMP、または $Ca^{2+}$ の濃度変化（FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader) 等が使用できる）、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化、受容体のインターナリゼーション）を指標に検出することができる。

具体的には、NPY Y4を介する細胞内へのシグナル伝達（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cAMP 5 産生抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸（IP）産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP $\gamma$ S 結合活性、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP 依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、微小管結合蛋白質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）の活性化などを促進する活性または抑制する活性 10 など）を、公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、NPY Y4を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。

10 スクリーニングを行うにあたっては予め新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、被検化合物を添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って 15 定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、イノシトール3リン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、当該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの 20 活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

第一の態様では、次いで、NPY Y4と結合する被検化合物を選択する。選択された化合物には、NPY Y4の活性を促進又は抑制する化合物若しくは、NPY Y4の発現を増 20 加又は減少させる化合物が含まれ、それらの化合物は腸管のぜん動等の運動を促進又は抑制する作用を有する。これらの化合物からNPY Y4に対するアゴニストとして働くものを選択すれば、当該化合物は腸管の異常に伴う疾患の予防又は治療に有効な薬剤として利用することができる。

また、本発明の化合物の評価方法の第二の態様は、NPY Y4遺伝子を導入し、NPY 25 Y4を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、当該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする。

第二の態様においては、まず、NPY Y4を発現する細胞に被検化合物を接触させる

NPY Y4を発現する細胞は以下のようにして調製することができる。すなわち、NPY Y4遺伝子を導入し、NPY Y4タンパク質を発現する細胞の調製は、当業者に公知の方法で行うことができるが、例えば、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングし、クローニングされた核酸を有するベクターを宿主細胞に導入することにより調製する。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、pCMV-Tag、pcDNA3.1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNA1、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2.1、pET11、 $\lambda$ gt11又はpCR3.1が挙げられる。

次に、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸が導入された発現ベクターを宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるものであれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、例えば、SW480、DLD-1、CCD-18Co、CCD-841CoN、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法又はリポフェクション法が挙げられる。

また、第二の態様において用いる被検化合物は第一の態様において使用したものと同様のものを用いることができる。

次に、このようにして調製したNPY Y4を発現する細胞に被検化合物を接触させる。接触させる方法としては特に制限はなく、例えば、NPY Y4が細胞内（細胞膜上を含む）に発現した状態又は細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液または当該細胞抽出液に被検試料を添加することにより行うことができる。被検試料がタンパク質の場合には、例えば、当該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、NPY Y4が発現している細胞へ導入する、または当該ベクターをNPY Y4が発現している細胞抽出液に添加することで行うことも可能である。

次に、NPY Y4と被検化合物との接触によって生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する。具体的には、例えば、フォスホリパーゼC (PLC)、イノシトール

ル三リン酸 (IP3) のようにNPY Y4を介した細胞内情報伝達を司る分子の活性を測定する。

IP3の場合、NPY Y4アゴニストにより細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。この現象を利用し、標識したイノシトールの存在下、被検化合物をNPY Y4受容体を発現した細胞に接触させた場合と、接触させていない場合とのイノシトール三リン酸の濃度を測定し、濃度が上昇した場合には、当該被検化合物にはNPY Y4アゴニストとしての活性があると判断することができる。ここで、イノシトール三リン酸の濃度の測定は公知の方法により行うことができる。より具体的には、例えば、NPY Y4を発現した細胞を96穴プレートに播き、1日間培養する。その後、myo-[<sup>3</sup>H]inositolを添加した培地で1日間培養した後、標識されたイノシトールを含まない培地で細胞を洗浄する。これに被検化合物を添加した後、10%過塩素酸を加え、反応を止める。1.5M 水酸化カリウム及び60mM HEPES溶液で中和し、0.5mlのAG1x8樹脂 (Bio-Rad) を詰めたカラムに通し、5mM 四ホウ酸ナトリウム及び60mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1M ギ酸アンモニウム及び0.1M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定することにより、IP3の濃度を測定・算出することができる。

また、被検化合物とNPY Y4の結合活性を指標にして活性の測定とすることもできる。このような方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、NPY Y4が固定されたメンブレンに対する被検化合物の親和性を測定することによって結合活性を測定する方法が挙げられる。ここで用いられる被検化合物は、検出が容易なように放射性同位体等で標識されていてもよい。また、前記結合活性の検出方法として、放射性同位体で標識したリガンドと競合してNPY Y4へ結合する化合物を検出する方法も挙げられ、かかる方法を用いた場合には、被検化合物の標識は不要である。

以上のように、本発明の化合物の評価方法により化合物を検出した結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性 (対照) より低い値を示した場合には、当該被検化合物は、本発明に係るNPY Y4とリガンドとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、前記受容体に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物 (アゴニスト) 及び当該活性を有しない化合物 (アンタゴニスト) 等が含まれる。アゴニストは

、前記受容体に対するリガンド及びそのアナログと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、前記受容体に対するリガンド及びそのアナログが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明に係るNPY Y4を介したシグナル伝達の進行を制御する機能を有し、このようなシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

また、本発明の化合物の評価方法の第三の態様は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、NPY Y4遺伝子を導入し、NPY Y4を発現する細胞を調製する工程と、当該細胞に被検化合物を接触させる工程と、当該NPY Y4又はNPY Y4を介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程と、被検化合物を接触させていない場合と比較して、当該NPY Y4又は該細胞内情報伝達物質の発現レベルを増加又は減少させた被検化合物を選択する工程と、を含むことを特徴とする。

第三の態様では、まず、NPY Y4を発現する細胞に被検化合物を接触させる。

NPY Y4を発現する細胞は以下のようにして調製することができる。すなわち、NPY Y4遺伝子を導入し、NPY Y4タンパク質を発現する細胞の調製は、当業者に公知の方法で行うことができるが、例えば、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸を好適なプロモーター及び転写調節エレメントを含む発現ベクターにクローニングし、クローニングされた核酸を有するベクターを宿主細胞に導入することにより調製する。ここで、前記ベクターとしては、発現ベクターとして利用可能なものであれば特に限定されないが、例えば、pCMV-Tag、pcDNA3.1、pBlueBacHis2、pCI-neo、pcDNA1、pMC1neo、pXT1、pSG5、pEF1/V5-HisB、pCR2.1、pET11、 $\lambda$ gt11又はpCR3.1が挙げられる。

次に、NPY Y4遺伝子又はその一部からなる核酸が導入された発現ベクターを宿主細胞に導入する。かかる宿主細胞としては、遺伝子の発現に通常使用されるものであれば特に限定されず、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物のいずれであってもよく、例えば、SW480、DLD-1、CCD-18Co、CCD-841CoN、COS1、COS7、CHO、NIH/3T3、293、Raji、CV11、C1271、MRC-5、CPAE、HeLa、293T又はSf9が挙げられる。また、発現ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、公知の方法であれば特に限

定されないが、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法又はリポフェクション法が挙げられる。

また、第三の態様において用いる被検化合物は第一の態様において使用したものと同様のものを用いることができる。

- 5 本発明において「接触」は、以下のように行うことができる。細胞内に発現した状態又は細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液又は細胞抽出液に被検化合物を添加することにより接触させることができる。被検化合物がタンパク質の場合には、例えば、当該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、NPY Y4が発現している細胞へ導入する、又は当該ベクターをNPY Y4が発現している
- 10 細胞抽出液に添加することにより接触させることができる。また、例えば、酵母又は動物細胞等を用いたツーハイブリッド法を用いることも可能である。

- 第三の態様では、次いで、NPY Y4の発現レベルを測定する。ここで、本発明における「発現レベル」とは、NPY Y4を介した情報伝達経路上に存在するタンパク質をコードする遺伝子の転写産物の絶対量又は相対量をいう。この場合、当該遺伝子にはDNA又はmRNAのいずれもが含まれる。また、発現の検出対象がタンパク質の場合、その「発現レベル」とは、NPY Y4を介した情報伝達経路上に存在するタンパク質の絶対量又は相対量をいう。また、シグナル伝達上の分子の活性を指標にする場合、活性測定方法は特に制限されず、測定の対象となる分子の種類によって好適な方法を選択すればよい。
- 15

- 20 NPY Y4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、NPY Y4遺伝子のmRNAを定法に従って抽出し、このmRNAを鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法又はRT-PCR法を実施することによってNPY Y4遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。さらに、DNAアレイ技術を用いて、NPY Y4遺伝子の発現レベルを測定することも可能である。

- 25 また、NPY Y4遺伝子にコードされるNPY Y4を含む画分を定法に従って回収し、NPY Y4の発現をSDS-PAGE等の電気泳動法により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、NPY Y4に対する抗体を用いてウエスタンブロットティング法を実施し、NPY Y4の発現を検出することにより、遺伝子の翻訳レベルでの測定を行うことも可能である。ここで、NPY Y4の検出に用いる抗体としては

、検出可能な抗体であれば、特に制限はないが、モノクローナル抗体であってもよくポリクローナル抗体であってもよい。当該抗体は、当業者に公知の方法により調製することができる。具体的には、例えば、ポリクローナル抗体であれば、以下の

5 ようにして調製することができる。すなわち、NPY Y4又はNPY Y4とGSTとの融合タンパク質として大腸菌等の微生物において発現させたリコンビナントタンパク質又はその部分ペプチドをウサギ等に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロ

10 テインAカラム、プロテインGカラム、イオン交換クロマトグラフィー、NPY Y4をカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製できる。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、NPY Y4又はその部分ペプチドをマウ

15 ス等の小動物に対して免疫し、同マウスより脾臓を取り出し、これをすりつぶして細胞を分離し、当該細胞とマウスミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の試薬を用いて融合させ、これにより得られた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、NPY Y4に結合す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

20 ローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインAカラム、プロテインGカラム、イオン交換クロマトグラフィー、NPY Y4をカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製できる。

第三の態様では、次いで、被検化合物を接触させていない場合と比較して、当該NPY Y4の発現レベルを減少又は増加させた被検化合物を選択する。選択された化合物

20 には、NPY Y4の発現を減少又は増加させる化合物が含まれ、発現を減少させる化合物はNPY Y4アンタゴニストとして、発現を増強する化合物はNPY Y4アゴニストとして作用する。これらの化合物からNPY Y4に対するアゴニストとして働くものを選択すれば、当該化合物は腸管の機能異常を伴う疾患の予防又は治療に有効な薬剤として使用することができる。

25 また、本発明の化合物の評価方法の第四の態様は、腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、被検化合物を、NPY Y4に接触させる工程と、当該接触によるNPY Y4の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする。

NPY Y4の精製は公知の方法により行うことができる。また、NPY Y4を発現してい

る細胞としては、内在性のNPY Y4を発現している細胞又は外来性のNPY Y4を発現している細胞を挙げるができる。内在性のNPY Y4を発現している細胞としては、培養細胞等を挙げることができるが、これに限定されるものではない。当該培養細胞としては、特に制限はなく、例えば、市販のものを用いることができる。また、

5 内在性のNPY Y4を発現している細胞が由来する生物種としては特に制限はなく、ヒト、マウス、ラット、サル、モルモット、フェレット等を挙げるができる。また、前記外来性のNPY Y4を発現している細胞は、例えば、NPY Y4をコードするDNAを含むベクターを細胞に導入することで作製できる。ベクターの細胞への導入は、一般的な方法、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション、リポフェ

10 タミン法、マイクロインジェクション法によって実施することができる。

また、NPY Y4が発現している細胞抽出液は、例えば、試験管内転写翻訳系に含まれる細胞抽出液に、NPY Y4をコードするDNAを含むベクターを添加したものを挙げることができる。このような試験管内転写翻訳系としては、特に制限はなく、市販の試験管内転写翻訳キット等を使用することができる。

15 また、第四の態様において用いる被検化合物は第一の態様において使用したものと同様のものを用いることができる。

第四の態様において、接触の方法としては特に制限はなく、具体的には、例えば、緩衝液（リン酸緩衝液等）等の溶液中で混合することにより接触させる方法や、NPY Y4タンパク質をメンブレン上に固定し、メンブレン上で被検化合物と接触させる

20 方法が挙げられる。

次に、接触によって生じたNPY Y4の活性の変化を検出する。

タンパク質の活性測定方法としては、使用するタンパク質の性質により適宜設定すればよく、具体的には、例えば、NPY Y4に対するリガンドの結合活性を指標にする方法が挙げられる。

25 前記のリガンドの結合活性を指標にする方法としては特に制限はないが、具体的には、例えば、NPY Y4が固定されたメンブレンに対する被検化合物の親和性を測定することによって結合活性を測定する方法が挙げられる。ここで用いられる被検化合物は、検出が容易なように放射性同位体等で標識されていてもよい。また、前記結合活性の検出方法として、放射性同位体で標識したリガンドと競合してNPY Y4へ



結合する化合物を検出する方法も挙げられ、かかる方法を用いた場合には、被検化合物の標識は不要である。

以上のように、本発明の化合物の評価方法により化合物を検出した結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性（対照）より低い値を示した場合には、当該被検化合物は、本発明に係るNPY Y4とリガンドとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、前記受容体に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物（アゴニスト）及び当該活性を有しない化合物（アンタゴニスト）等が含まれる。アゴニストは、前記受容体に対するリガンド及びそのアナログと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、前記受容体に対するリガンド及びそのアナログが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明に係るNPY Y4を介したシグナル伝達の進行を制御する機能を融資、このようなシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。なかでも、NPY Y4に対するアゴニストとして働くものを選択すれば、当該化合物は腸管の機能異常を伴う疾患の予防又は治療に有効な薬剤として使用することができる。

本発明の化合物の評価方法の第五の態様は、NPY Y4 遺伝子改変非ヒト哺乳動物又は該哺乳動物に由来する組織若しくは細胞を用いることを特徴とする。

当該評価方法において用いられる遺伝子改変非ヒト哺乳動物としては、そのNPY Y4の抑制方法について特に制限はなく、公知の方法に従って作製することができるが、例えば、以下のようにして遺伝子改変マウスを作製することができる。まず、マウスからNPY Y4 遺伝子のエクソン部分を含むDNAを単離し、遺伝子工学的手法によりNPY Y4 遺伝子配列の一部又は全部を削除、若しくは他遺伝子を挿入又は置換する。一般に、NPY Y4 遺伝子配列の一部又は全部に適当なマーカー遺伝子を挿入し、ターゲティングベクターを構築する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子やハイグロマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子； $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（cat）、ルシフェラーゼ遺伝子又はGFP（Green Fluorescent Protein）遺伝子のようなレポーター遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、

抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには、ターゲティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくことも可能である。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、レポーター遺伝子を  
5 挿入してエクソンの機能を破壊する場合、当該レポーター遺伝子は、NPY Y4 のプロモーターの制御下で発現するように挿入することが好ましい。また、ターゲティングベクターの調製に用いるベクターとしては、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUB110、pTB5、pSH19、pSH15、pK0 を挙げるることができる。

10 こうして得られたターゲティングベクターをエレクトロポレーション法等によりマウス等の ES 細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。具体的には、ターゲティングベクターを非ヒト哺乳動物 ES 細胞又は非ヒト動物卵細胞に公知の方法（エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、パーティクルガン法等）によって導入し、ターゲ  
15 ティングベクターに含まれる不活性化された NPY Y4 遺伝子配列を相同組換えにより、非ヒト動物 ES 細胞又は非ヒト動物卵細胞の染色体上の NPY Y4 遺伝子と入れ替えることにより選抜することができる。

NPY Y4 遺伝子がノックアウトされた細胞は、NPY Y4 遺伝子上又はその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析又はターゲティングベク  
20 ター上の DNA 配列と NPY Y4 遺伝子近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。

非ヒト動物 ES 細胞を用いた場合は、相同組換えにより、NPY Y4 遺伝子が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を胚形成の初期の適当な時期、例えば、  
8 細胞期の非ヒト動物胚または胚盤胞に注入し、又は NPY Y4 遺伝子が不活性化された ES 細胞塊を 2 個の 8 細胞期胚ではさみ込むことにより作製したキメラ胚を偽妊  
25 娠させた非ヒト動物の子宮に移植する。

作出された動物は正常な NPY Y4 遺伝子座を有する細胞と人為的に変異した NPY Y4 遺伝子座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。当該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した NPY Y4 遺伝子座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加

えた MGAT2 遺伝子座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、NPY Y4 ヘテロ発現不全個体であり、NPY Y4 ヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から NPY Y4 ホモ発現不全個体を得ることができる。

- 5 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法で遺伝子溶液を注入することによりターゲティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト動物を比較することにより、相同組換えにより NPY Y4 遺伝子座に変異のあるものを選択することにより得られる。
- 10 このようにして作製した NPY Y4 遺伝子欠損非ヒト哺乳動物は、生体内の NPY Y4 受容体を欠損している。従って、NPY Y4 アゴニストやアンタゴニストを投与した際でも当該アゴニスト又はアンタゴニストによる生理機能を発揮することはない。本発明者らは、NPY Y4 アゴニストをマウスに投与すると排糞量が増加し、腸管の張力が上昇することを見出しているが、NPY Y4 遺伝子欠損マウスではこの現象は見られない。
- 15 すなわち、上述の化合物の評価方法の第一から第四の態様によって評価・スクリーニングされた化合物を NPY Y4 欠損非ヒト哺乳動物に投与したり、当該動物の組織を用いて化合物の評価を行うことにより、当該化合物が NPY Y4 特異的に結合し、作用していることを確認することが可能となる。

- 20 具体的には、NPY Y4 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを準備し、それぞれに被検化合物を投与する。投与方法は特に限定されないが、経口投与や皮下投与による方法を挙げることができる。投与後、糞を採取し、その重量を測定することにより、被検化合物投与による排糞量を測定する。野生型マウスにおいて NPY Y4 遺伝子欠損マウスと比較して排糞量が有意に多い場合には、当該被検化合物は NPY Y4 特異的に作用する化合物であり、NPY Y4 アゴニスト活性を有すると判断することができる。

- 25 また、NPY Y4 遺伝子欠損マウス及び野生型マウスから摘出した腸管を用いて被検化合物の作用を検討することができる。例えば、マウスから取り出した腸管を適当な長さに切り、Krebs-Henseleit 液中で所望の静止張力で懸垂する。懸垂した腸管に被検化合物を適用し、張力の変化を測定することにより、NPY Y4 特異的に作用する化合物を選択することができる。ここで、摘出する腸管の部位（例えば、回腸、結

腸等)を変えて試験に供することにより、部位特異的に機能する化合物を選択することができる。

また、本発明の化合物の評価方法により、NPY Y4への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進又は阻害する物質のスクリーニングを行うことができる。すなわち、上述した方法によって複数の被検化合物を評価することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する化合物を選択することができる。かかる選択の結果、被検化合物非存在下においてリガンド及びそのアナログを作用させた場合の細胞内シグナル伝達の変化と比較して、その変化が抑制されれば、当該被検化合物は、NPY Y4への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検化合物が細胞内シグナル伝達を増強させれば、当該化合物は、NPY Y4への被検化合物結合後の細胞内シグナル伝達を促進する化合物であると判定される。このようなスクリーニング方法によって選択された化合物は、腸管の機能異常を伴う疾患の治療又は症状の緩和に有効であり、中でも、NPY Y4アゴニストとして機能する化合物は、腸管の機能異常を伴う疾患の治療又は症状の緩和に有効である。また、本発明の化合物の評価方法によれば、小腸に対する作用は小さく、大腸(特に回腸)に対して選択性が高い治療剤を得ることが可能となる。従って、著明な便秘改善効果を示すばかりでなく、他の臓器・器官に対する副作用の少ない治療剤を得ることが可能となる。

## (2) NPY Y4アゴニスト及び当該アゴニストを有効成分として含む治療剤

本発明における「NPY Y4アゴニスト」とは、NPY Y4受容体を介して細胞内シグナル伝達を引き起こす物質をいい、NPY Y4作動剤ともいう。また、本発明にかかるNPY Y4アゴニストは、NPY Y4受容体に親和性を示し、アゴニストとして機能する分子であればその分子種は特に制限されない。このような分子としては、例えば、低分子化合物、タンパク質、ペプチドを挙げることができる。前記低分子化合物としてもその種類は特に制限されず、具体的には、例えば、天然化合物、有機化合物又は無機化合物が挙げられる。また、前記ペプチドとしてもその種類は特に制限されず、具体的には、例えば、NPYの類縁体であるPPが挙げられる。

ここで、PP(ヒトPP:配列番号3、ウシPP:配列番号4、ラットPP:配列番号5、マウスPP:配列番号6)は、NPYとアミノ酸で約50%の相同性を有するペプチドで



錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、当該アゴニストがDNAによりコードされうるものであれば、当該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

NPY Y4アゴニストの投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与

方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。

5 本発明によれば、小腸に対する作用は小さく、大腸（特に回腸）に対して選択性が高い治療剤が提供される。従って、著明な便秘改善効果を示すばかりでなく、他の臓器・器官に対する副作用の少ない治療剤が提供される。

（3）腸管の機能異常によって生じる疾患の治療剤のスクリーニング用キット

10 本発明のスクリーニング用キットは、NPY Y4と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその部分ペプチドを少なくとも含むことを特徴とする。当該タンパク質又は部分ペプチドは標識されていてもよい。

前記部分ペプチドは、NPY Y4の部分配列を有し、且つ、NPY Y4と同様のGPCR活性を有していればそのアミノ酸数及びNPY Y4上の部位は限定されない。

また、NPY Y4又はその部分ペプチドのほか、反应用緩衝液、反応の停止液、洗浄用緩衝液、反応や洗浄に用いる容器等をさらに含んでもよい。

15 本発明のスクリーニング用キットを用いた被検化合物の評価の方法は以下のとおりである。すなわち、反応容器に反應用緩衝液を加えた後、キットに含まれるNPY Y4又はその部分配列を有するペプチド及び被検化合物を添加し、被検化合物とNPY Y4との結合反応を進行させる。ここで、被検化合物に代えてコントロール（ネガティブコントロール及び／又はポジティブコントロール）化合物を添加した試料を準備しておくことが望ましい。反応は所望の反応停止液によって停止すればよい。反応停止後、NPY Y4と結合した標識された被検化合物を検出することにより、被検化合物のNPY Y4結合活性を測定することができる。

25 また、本発明のスクリーニング用キットの別の態様は、NPY Y4と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその部分ペプチドを発現する細胞を少なくとも含むことを特徴とする。ここで、NPY Y4と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質とは、1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失、付加又は挿入はあるが、NPY Y4と同様のGPCR活性を有しているタンパク質を指す。例えば、活性に影響を与えない遺伝子多型を有するタンパク質を挙げることができる。また、前記部分ペプチドは、NPY Y4の部分配列を有し、且つ、NPY Y4と同様のキナーゼ活

性を有していればそのアミノ酸数及びNPY Y4上の部位は限定されない。

当該スクリーニング用キットにおいては、NPY Y4、NPY Y4と実質的に同一なタンパク質又はその部分ペプチドのほか、反应用緩衝液、洗浄用緩衝液、コントロールとして利用可能なリガンド、反応や洗浄に用いる容器等をさらに含んでもよい。

5

本発明のスクリーニング用キットを用いた被検化合物の評価の方法は以下のとおりである。すなわち、細胞培養容器にキットに含まれる細胞を播種した後、被検化合物を添加し、反応を進行させる。ここで、被検化合物に代えてコントロール（ネガティブコントロール及び／又はポジティブコントロール）化合物を添加した試料を準備しておくことが望ましい。反応は所望の反応停止液によって停止してもよし、氷上等で反応溶液の温度を下げることにより停止させてもよい。反応停止後、細胞上のNPY Y4に結合した標識された被検化合物を検出したり、NPY Y4を介した細胞内シグナル伝達を検出することにより、被検化合物のNPY Y4アゴニスト又はアンタゴニスト活性を測定することができる。

10

#### 15 (実施例)

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

##### 実施例 1

(NPY Y4アゴニストであるmPPの消化管運動に対する効果)

20 神経ペプチドYの受容体サブタイプのひとつであるNPY Y4受容体に対して、腸管ペプチドであるPPが高い親和性を示すことが知られている。また、Y4受容体は下部消化管に存在することが知られているため、マウスにmouse PP (mPP) を投与し、マウスの下部消化管運動に与える影響を検討した。すなわち、mPP投与によって排糞量がどのような変化をするかを観察し、排糞量の増加が下部消化管の運動亢進を反映しているものとして、消化管運動の変化を考察した。

25

雄性のマウス (C57BL/6J、15週齢) にmPP (0.001、0.01、0.1又は1 mg/kg) を皮下投与し、vehicle群には生理食塩水のみを皮下投与 (5 mL/kg) した。生理食塩水又はmPPの皮下投与と同時に絶食を行い、投与1、2及び4時間後に糞を採取し重量を測定した。分散分析およびDunnett's testを用い群間の有意差を解析した。



図1及び2に示すとおり、mPPは用量依存的な排便増加作用を示した。mPPの投与4時間後における累積排糞量は、vehicle群に比して0.1 mg/kg以上の用量で有意であり、vehicle群、mPP 0.1 mg/kg群及びmPP 1 mg/kg群において、各々211±18 mg/4h、325±22 mg/4h (P<0.05)及び408±36 mg/4h (P<0.01)であった。なお、図中、\*はP<0.01を、\*はP<0.05 (vehicle群との比較)を表す。

mPPの皮下投与によりマウスの排便量の増加が示されたことから、mPPの下部消化管運動促進作用が示された。したがって、mPPは便秘症および便秘型の過敏性腸症候群 (IBS: irritable bowel syndrome) などの下部消化管運動機能障害を改善する新規かつ有効な治療薬として有用と考えられた。

## 10 実施例2

(マウス摘出結腸の自発性収縮に対するNPY Y4アゴニストの効果)

実施例1において、マウスにNPY Y4アゴニストであるmPPを1 mg/kg適用することで排糞量の増加が誘発された。そこでmPPの作用点を確認するためにmPPの作用が摘出臓器レベルでも見られるか検討した。

15 C57BL/6マウス (8-20週齢) の回腸、近位結腸及び遠位結腸を摘出した。標本はそれぞれ1cmの長さに切り、95% O<sub>2</sub>~5% CO<sub>2</sub>で酸素化した5 mLのKrebs-Henseleit液 (組成を表1に示す) 中に0.3 gの静止張力で縦走筋方向に懸垂し、bath内温度は37度とした。張力はisometric transducer (TB-651, Nihon Kohden製) で測定し、Power Lab (ADInstrument製) に毎秒20ポイント記録した。

20 1時間平衡化したのち0.01 μM、0.1 μM及び1 μMのmPPを適用して20分間計測した。mPPは0.01 mM、0.1 mM及び1 mMのDMSO溶液になるように調製して、5 mLのorgan bath中に5 μL適用した。mPPの作用は適用前20分の平均張力に対する適用後20分の平均張力の比で示した。統計計算はPaired t-Testで行った。

(表1)

	mM
NaCl	115.0
KCl	4.7
CaCl <sub>2</sub>	2.5
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
glucose	5.6

NaHCO <sub>3</sub>	25.0
--------------------	------

図3に示すとおり、マウス近位結腸及び遠位結腸においてmPPは用量依存的に張力を上昇させ、その最大作用は適用前のそれぞれ131%及び152%であった。一方、回腸においては有意な張力の上昇を示さなかった。また、図4に示すとおり、近位結腸及び遠位結腸において、mPP適用により張力の上昇だけでなく自動運動の振幅の増大が見られた。なお、図中、\*はP<0.05を、\*\*はP<0.01 (pre値との比較)を表す。

以上より、マウス近位結腸及び遠位結腸においてmPPは張力の上昇及び自動運動の振幅の増大が見られた。結腸は排便に重要な役割を持ち、結腸の運動の亢進は下痢を惹起するとされている。今回の結果はin vivoにおけるmPPによる排便亢進といった結果と一致する。摘出組織でもmPPの作用が見られたことよりその作用点は末梢神経または平滑筋であることが考えられた。

### 実施例3

(Clonidine誘発便秘モデルマウスに対するNPY Y4アゴニストの効果)

マウスにおいてmPPの腹腔内あるいは皮下投与が排便量を増加させたことから、NPY Y4アゴニストの排便亢進作用がClonidine誘発の便秘モデルにおいて改善作用を示すか否かを検討した。

雄性のマウス (C57BL/6J、18週齢) にClonidine (0.1 mg/kg) を腹腔内投与し、vehicle群には生理食塩水のみを腹腔内投与した。Clonidine投与1時間後にsaline (対照群)あるいはmPP (1 mg/kg) を皮下投与した。なお、vehicle群においても生理食塩水の皮下投与を行なった。生理食塩水又はClonidineの腹腔内投与と同時に絶食を行い、その投与1、2、3及び4時間後に糞を採取し重量を測定した。分散分析及びTukey's testにより群間の有意差を解析した。

図5に示すとおり、Control群では、vehicle群に比して投与4時間後において有意な排便量の減少が観察された(図中、\*\*\*はP < 0.001を示す)。これに対し、Clonidine投与4時間後(mPP投与3時間後)においてmPP 1 mg/kg投与群では、vehicle群に比して排便量の有意な低下は観察されなかった。

すなわち、マウスClonidine誘発便秘モデルにおいてmPPの後処置は改善作用を示したことから、mPPの抗便秘作用が示された。従って、mPPは便秘症及び便秘型過敏

性腸症候群 (IBS) 等の下部消化管運動機能障害を改善する新規かつ有効な治療薬として有用と考えられた。

#### 実施例 4

(NPY Y4受容体欠損マウスにおけるmPPの消化管運動に対する効果)

- 5 PPの作用するNPY受容体サブタイプは不明であることから、PPによる下部消化管運動促進効果にNPY Y4受容体が関与するかどうかを明らかにするために、NPY Y4受容体欠損マウス (Deltagen Inc. 製) におけるPPの下部消化管運動に与える影響を検討した。

- 10 以下の試験は野生型 (wild type) マウス及びNPY Y4受容体欠損マウス (雄性、23-29週齢、n=10~16) を用いて行った。mPP (1 mg/kg) 又は生理食塩水を皮下投与 (5 mL/kg) し、投与と同時に絶食を行った。投与1及び2時間後に糞を採取し重量を測定した。糞重量は2時間の累積量を解析に用い、Student's t-testにより群間の有意差を解析した。

- 15 図6に示すとおり、mPPは野生型マウスにおいて排便増加作用を示した (vehicle群 $322 \pm 41$  mg/2時間、mPP群 $668 \pm 64$  mg/2時間、 $P < 0.01$ )。一方、NPY Y4受容体欠損マウスではmPPによる排便増加作用は認められなかった (vehicle群 $358 \pm 31$  mg/2時間、mPP群 $403 \pm 43$  mg/2時間)。なお、図中、##は $P < 0.01$  (vehicle群との比較) を表す。

- 20 以上より、mPPの皮下投与による排便量の増加は野生型マウスのみで認められ、NPY Y4受容体欠損マウスでは認められなかった。このことはNPY Y4受容体の活性化は下部消化管運動を亢進させる事を示している。したがって、NPY Y4受容体アゴニストは便秘症及び便秘型の過敏性腸症候群などの下部消化管運動機能障害を改善する新規かつ有効な治療薬として有用と考えられた。

#### 実施例 5

- 25 (NPY Y4受容体欠損マウス摘出結腸の自発性収縮に対するNPY Y4アゴニストの効果)

C57BL/6マウス近位結腸及び遠位結腸においてNPY Y4アゴニストであるmPPは張力を上昇させた。そこでmPPの作用がNPY Y4受容体を介するか否かを確認するためにNPY Y4受容体欠損マウスを用いて検討した。

NPY Y4受容体欠損マウス及び野生型マウス (32-37週齢) の回腸、近位結腸及び遠位結腸を摘出した。標本はそれぞれ1cmの長さに切り、95% O<sub>2</sub>~5% CO<sub>2</sub>で酸素化した5 mLのKrebs-Henseleit液中に0.3 gの静止張力で縦走筋方向に懸垂し、bath内温度は37度とした。張力はisometric transducer (TB-651, Nihon Kohden製) で測定し、Power Lab (ADInstrument) に毎秒20ポイント記録した。

1時間平衡化したのち1  $\mu$  MのmPPを適用して20分間計測した。mPPは1 mMのDMSO溶液になるように調製して、5 mLのorgan bath中に5  $\mu$  L適用した。mPPの作用は適用前20分の平均張力に対する適用後20分の平均張力の比で示した。また、統計計算はStudent's t-TestまたはPaired t-Testで行った。

- 10 図7に示すとおり、近位結腸及び遠位結腸において1  $\mu$  M mPP適用後の張力の変化は野生型マウスとNPY Y4受容体欠損マウスの間で有意な差が見られた。また野生型マウスで見られた張力の上昇はNPY Y4受容体欠損マウスでは見られなかった。一方、回腸においては両者に差は見られなかった。なお、図中、#はP<0.05を、##はP<0.01を表す (pre値との比較)。なお、図中、\*はP<0.05を、\*\*はP<0.01を表す (NPY Y4受容体欠損マウスと野生型マウスとの比較)。

以上より、野生型マウス近位結腸及び遠位結腸においてみられたmPPによる張力の上昇は、NPY Y4受容体欠損マウスでは見られなかったことよりマウス近位結腸及び遠位結腸におけるmPPによる張力上昇はNPY Y4受容体を介することが確認された。

## 20 産業上の利用可能性

以上説明したよう、本発明のNPY Y4アゴニスト及び化合物の評価方法によれば、新規な作用メカニズムによる腸管の機能異常の改善を可能とする薬剤を提供することが可能となる。また、このような薬剤のスクリーニングをはじめとする、腸管の機能異常の改善作用を有する化合物の評価方法を提供することが可能となる。

## 請求の範囲

1. 腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、
  - 5 NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、  
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、  
該 NPY Y4 に対する該被検化合物の特異的結合を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
2. 腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、
  - 10 NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、  
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、  
該接触により生じた細胞内情報伝達物質の活性を測定する工程と、  
該活性と被検化合物を接触させない場合の該細胞内情報伝達物質の活性とを比較する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
3. 腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、
  - 20 NPY Y4 遺伝子を導入し、NPY Y4 を発現する細胞を調製する工程と、  
該細胞に被検化合物を接触させる工程と、  
該 NPY Y4 又は NPY Y4 を介した細胞内情報伝達物質の発現レベルを測定する工程と、  
被検化合物を接触させていない場合と比較して、該 NPY Y4 又は該細胞内情報伝達物質の発現レベルを増加又は減少させた被検化合物を選択する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。
4. 腸管の機能異常によって生じる疾患の診断又は治療に用いる化合物の評価方法であって、
  - 25 被検化合物を、NPY Y4 に接触させる工程と、  
該接触による NPY Y4 の活性の変化を検出する工程と、を含むことを特徴とする化合物の評価方法。

化合物の評価方法。

5. NPY Y4 遺伝子欠損非ヒト哺乳動物又は該哺乳動物に由来する組織若しくは細胞を用いることを特徴とする、腸管の機能異常を伴う疾患の予防又は治療に有効な化合物の評価方法。

5 6. 前記化合物が NPY Y4 アゴニストである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物の評価方法。

7. 前記腸管の機能異常によって生じる疾患が便秘である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の化合物の評価方法。

10 8. 有効成分として NPY Y4 アゴニストを含む、腸管の機能異常によって生じる疾患の治療剤。

9. 前記 NPY Y4 アゴニストがパンクレアティック・ポリペプチドである、請求項 8 に記載の治療剤。

10 10. NPY Y4 又はその部分ペプチドを含む、腸管の機能異常を伴う疾患の治療剤のスクリーニング用キット。

15 11. NPY Y4 と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその部分ペプチドを発現する細胞を含む、腸管の機能異常に伴う疾患の治療剤のスクリーニング用キット。

図 1

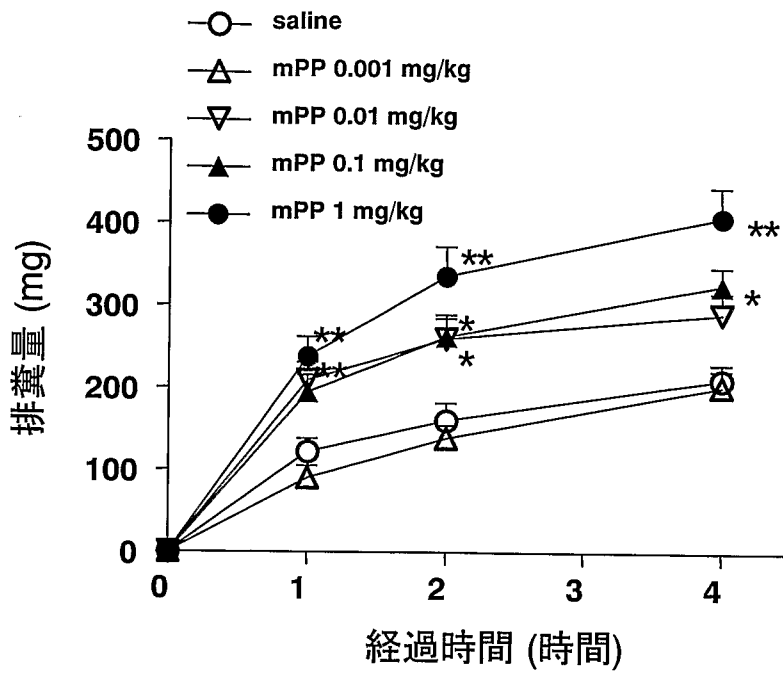


図 2

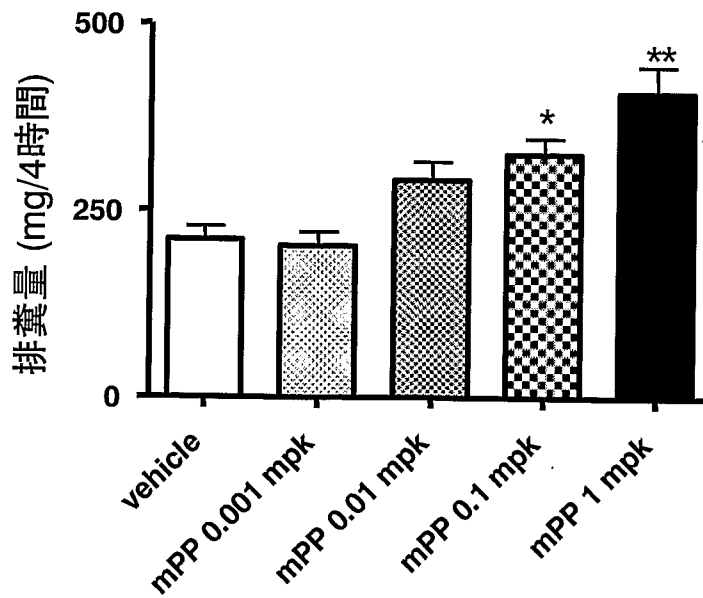


図 3

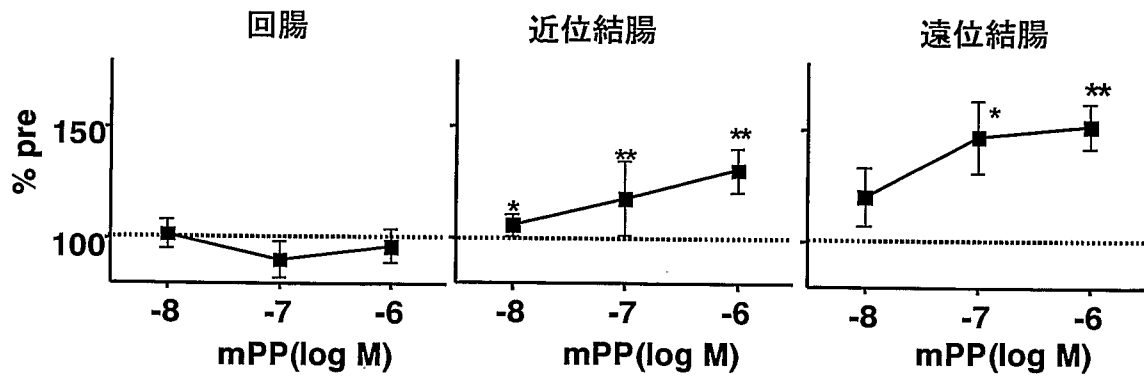


図 4

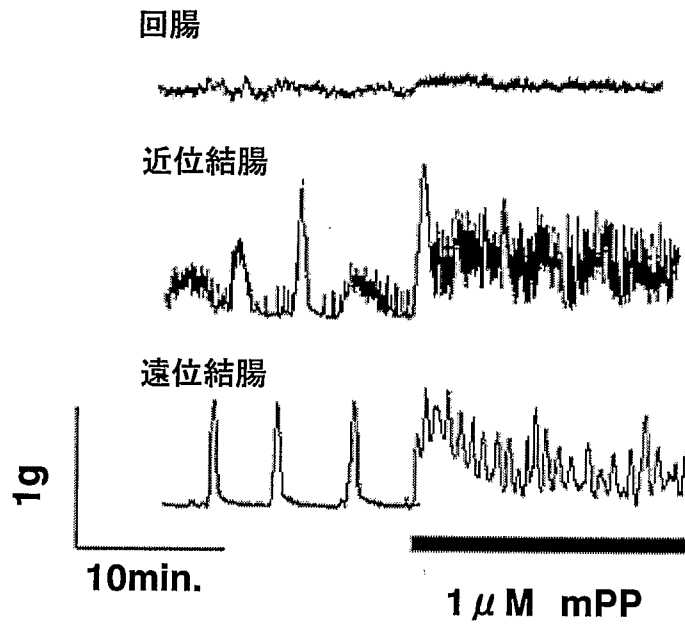




図 5

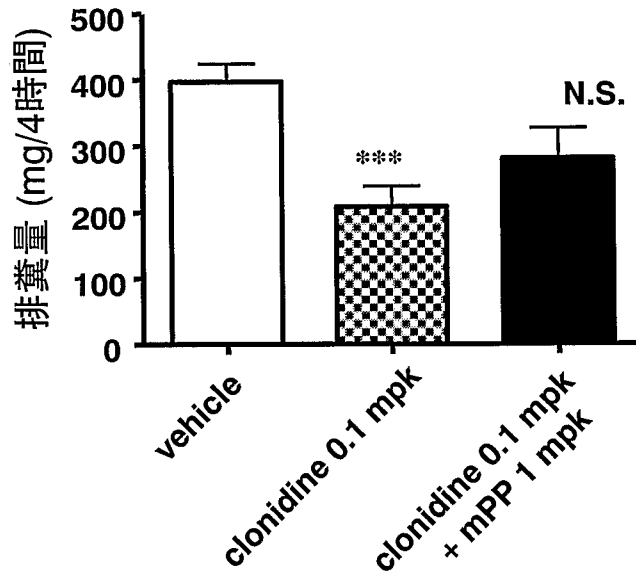


図 6

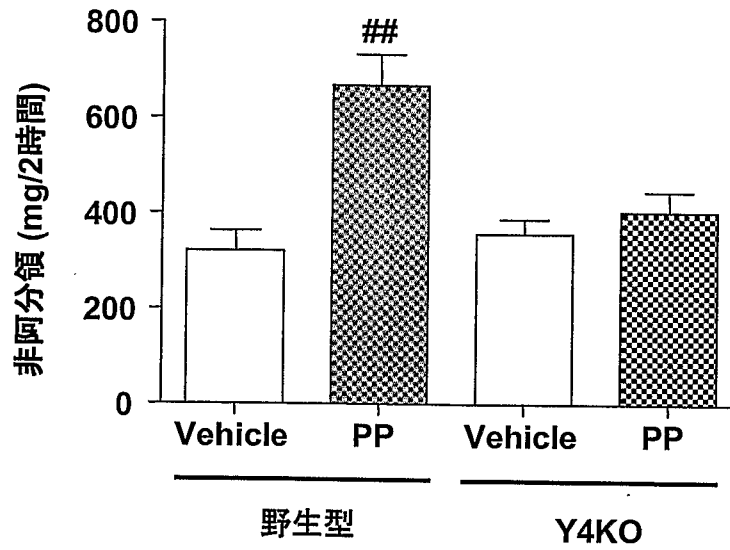
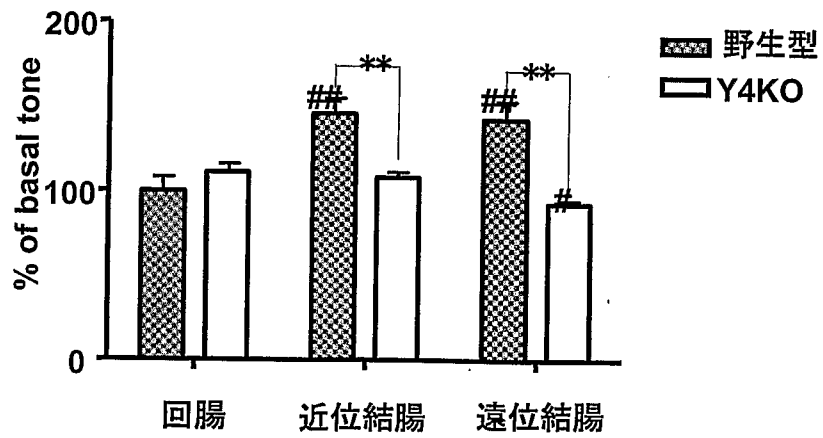


図 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/10(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n, C12N1/15(2006.01)n, C12N1/19(2006.01)n, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/68, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/10, A61P1/14, A61P43/00, C12Q1/02, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, G01N33/566		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2005/089786 A2 (7TM PHARMA A/S), 29 September, 2005 (29.09.05), & WO 2005/089786 A3 & EP 1729792 A3 & EP 1729792 A2 & GB 2427551 A & CA 2560174 A1 & AU 2005/224028 A1	8, 9 1-11
Y	PHENG, L.H. et al., Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide Y Y2 and Y4 receptors in the rat colon., Eur. J. Pharmacol., 1999, vol.374, p.85-91	1-11
Y	MctIGUE, D.M. et al., Pancreatic polypeptide in dorsal vagal complex stimulates gastric acid secretion and motility in rats., Am. J. Physiol., 1993, Vol.265, No.6, p.G1169-G1176	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 28 May, 2007 (28.05.07)		Date of mailing of the international search report 12 June, 2007 (12.06.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053989

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Toru FUJIKAWA et al., "Mouse Kabu Chokan ni Oite pancreatic polypeptide wa Y4 Juyotai o Kaishite Undosei Koshin o Jakki suru", Journal of Smooth Muscle Research, 28 April, 2006 (28.04.06), Vol.10, No.1, page J-34, column 16	8,9
A	BARD, J.A. et al., Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY., J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.45, p.26762-26765	1-11
A	LUNDELL, I. et al., Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY., J. Biol. Chem., 1995, vol.270, No.49, p.29123-29128	1-11
A	BLOMQVIST, A.G. et al., Y-receptor subtypes - how many more?, Trends Neurosci., 1997, vol.20, p.294-298	1-11
A	SAINSBURY A. et al., Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice., Genes & Development, 2002, vol.16, p.1077-1088	1-11
A	WO 95/017906 A1 (SYNAPTIC PHARMA CORP.), 06 July, 1995 (06.07.95), & EP 0746332 A1 & EP 0746332 B1 & US 6913892 B1 & US 5516653 A1 & ES 2097717 T1 & AU 702438 B2 & JP 09-511127 A	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/053989

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

*C12N1/21(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n,*  
*G01N33/566(2006.01)n*

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053989

Claim 8 relates to a therapeutic agent for a disease caused by the intestinal tract dysfunction, which comprises a compound that is defined by a desired property "an NPY Y4 agonist". The description discloses various specific examples of the "NPY Y4 agonist" recited in claim 8. However, those which are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5 are only limited to a pancreatic polypeptide, and it is unclear what types of compounds can also act as the agonist, in addition to the pancreatic polypeptide.

With respect to the property "NPY Y4 agonist", even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into the consideration, the scope of the compound having the property cannot be specified. Thus, claim 8 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6, too.

Such being the case, a search was only made on the part which are supported by and disclosed in the description, namely the above-mentioned compound.

Regarding claim 9, a complete search was made.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
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 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, A61K38/00, A61K45/00, A61P1/10, A61P1/14, A61P43/00, C12Q1/02, C07K14/47, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, G01N33/566			
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			
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) MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream2)			
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	WO 2005/089786 A2 (7TM PHARMA A/S) 2005.09.29	8,9	
Y	& WO 2005/089786 A3 & EP 1729792 A3 & EP 1729792 A2 & GB 2427551 A & CA 2560174 A1 & AU 2005/224028 A1	1-11	
Y	PHENG, L.H. et al., Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide Y Y2 and Y4 receptors in the rat colon., Eur. J. Pharmacol., 1999, vol. 374, p. 85-91	1-11	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 28.05.2007	国際調査報告の発送日 12.06.2007		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	3962

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット  紙形式  
 電子形式
- c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれていたもの  
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：



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
Y	McTIGUE, D.M. et al., Pancreatic polypeptide in dorsal vagal complex stimulates gastric acid secretion and motility in rats., Am. J. Physiol., 1993, Vol.265, No.6, p.G1169-G1176	1-11
P, X	藤川 徹 他、マウス下部腸管において pancreatic polypeptide は Y4 受容体を介して運動性亢進を惹起する、日本平滑筋学会雑誌、2006.04.28、第10巻、第1号、J-34 頁、16 欄	8, 9
A	BARD, J.A. et al., Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY., J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.45, p.26762-26765	1-11
A	LUNDELL, I. et al., Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY., J. Biol. Chem., 1995, vol.270, No.49, p.29123-29128	1-11
A	BLOMQUIST, A.G. et al., Y-receptor subtypes - how many more?, Trends Neurosci., 1997, vol.20, p.294-298	1-11
A	SAINSBURY A. et al., Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice., Genes & Development, 2002, vol.16, p.1077-1088	1-11
A	WO 95/017906 A1 (SYNAPTIC PHARMA CORP) 1995.07.06 & EP 0746332 A1 & EP 0746332 B1 & US 6913892 B1 & US 5516653 A1 & ES 2097717 T1 & AU 702438 B2 & JP 09-511127 A	1-11

## 発明の属する分野の分類

C12Q1/68(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P1/10(2006.01)i,  
A61P1/14(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n,  
C12N1/15(2006.01)n, C12N1/19(2006.01)n, C12N1/21(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n,  
C12N15/09(2006.01)n, G01N33/566(2006.01)n

## 別紙

請求の範囲 8 は、「NPY Y4 アゴニスト」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする腸管の機能異常によって生じる疾患の治療剤に関するものである。そして、請求の範囲 8 の「アゴニスト」について、明細書中に種々例示はされているものの、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5 条の意味において開示されているのは、パンクレアティック・ポリペプチドのみであり、他にどのようなものがアゴニストとして実際に機能するかは不明である。

また、「NPY Y4 アゴニスト」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲 8 は、PCT 6 条の意味における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち上記化合物についてのみ行った。

また、請求の範囲 9 については完全な調査を行った。