

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4360915号
(P4360915)

(45) 発行日 平成21年11月11日(2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月21日(2009.8.21)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 18 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2003-558044 (P2003-558044)
 (86) (22) 出願日 平成15年1月6日(2003.1.6)
 (65) 公表番号 特表2005-533483 (P2005-533483A)
 (43) 公表日 平成17年11月10日(2005.11.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/000042
 (87) 国際公開番号 W02003/057730
 (87) 国際公開日 平成15年7月17日(2003.7.17)
 審査請求日 平成17年10月26日(2005.10.26)
 (31) 優先権主張番号 60/346,396
 (32) 優先日 平成14年1月7日(2002.1.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502156641
 ユーロスクリーン・ソシエテ・アノニム
 Euroscreen S. A.
 ベルギー国、ペー-1070 ブリュッセル、
 ルート・ドゥ・レニック 802
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100129160
 弁理士 古館 久丹子
 (72) 発明者 ル プー, エマニュエル
 ベルギー国、ペー-1180 ブリュッセル、
 95 アヴニュー ドゥ ラウヌ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質共役受容体GPR43のリガンドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

GPR43に結合する物質を同定する方法であって：

(a) 短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補結合物質の存在または不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；および

(b) GPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、候補結合物質存在下の結合が、候補結合物質不存在下の結合と比較して減少すれば、該候補結合物質がGPR43に結合する物質として同定される工程；

を含む方法。

【請求項2】

GPR43のシグナル伝達活性を増大させる物質を同定する方法であって：

(a) GPR43ポリペプチドを候補物質と接触させる工程；

(b) 候補物質存在下でGPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；および

(c) 候補物質存在下で測定されるシグナル伝達活性を、GPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸を接触させる反応で測定されるシグナル伝達活性と比較する工程であって、候補物質存在下で測定される活性量が、短鎖脂肪酸によって誘導される量の少なくとも10%であれば、該候補物質がGPR43のシグナル伝達活性を増大させる物質として同定される工程；

を含む方法。

【請求項 3】

G P R 4 3 のシグナル伝達活性を減少させる物質を同定する方法であって：

(a) 該物質の存在または不存在下で G P R 4 3 ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；

(b) G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；および

(c) 該物質不存在下で G P R 4 3 および短鎖脂肪酸を含有する反応において測定される活性量を、該物質存在下で G P R 4 3 および短鎖脂肪酸を含有する反応において測定される活性量と比較する工程であって、該物質存在下のシグナル伝達活性が、該物質不存在下のシグナル伝達活性と比較して減少すれば、該物質が G P R 4 3 の拮抗薬であることが示される工程；

を含む方法。

【請求項 4】

短鎖脂肪酸が検出可能に標識されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

短鎖脂肪酸が、放射性同位体、フルオロフォア、蛍光消光剤、酵素、およびアフィニティータグからなる群から選択される部分で検出可能に標識されている、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

接触が G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞内またはその表面で行われる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

接触が G P R 4 3 ポリペプチドを含有するウイルス誘導性出芽膜内またはその表面で行われる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

接触が合成リポソーム内またはその表面で行われる、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

接触が G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞由来の膜画分を用いて行われる、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

物質が、ペプチド、ポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片、脂質、炭水化物、核酸、および有機小分子からなる群から選択される、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

測定が、標識置換、表面プラスモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー転移、蛍光消光、および蛍光偏光からなる群から選択される方法を用いて行われる、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程がセカンドメッセンジャーのレベル変化を検出することを含む、請求項 2、3 および 6 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

シグナル伝達活性を測定する工程が、グアニンヌクレオチド結合または交換、アデニル酸シクラーゼ活性、c A M P、プロテインキナーゼ C 活性、ホスファチジルイノシトール分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、細胞内カルシウム、アラキノイド酸、M A P キナーゼ活性、チロシンキナーゼ活性、またはレポーター遺伝子発現の測定を含む、請求項 2、3 および 6 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

シグナル伝達活性の測定がエクオリンに基づくアッセイの使用を含む、請求項 13 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

短鎖脂肪酸またはその塩が線状である、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

短鎖脂肪酸またはその塩が分岐状である、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

短鎖脂肪酸またはその塩の 1 つまたはそれ以上の非カルボニル炭素が非炭素含有置換基で置換されている、請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

短鎖脂肪酸塩が、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オーファン G タンパク質共役受容体に対する天然リガンドおよびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は細胞内シグナル伝達を担うタンパク質である。GPCR は通常、7 種の膜貫通ドメインを有する。リガンドが GPCR の細胞外部分または断片と結合すると、細胞内にシグナルが伝達され、細胞の生物学的または生理学的性質または動態に変化が生じる。G タンパク質およびエフェクター (G タンパク質によって調節される細胞内酵素およびチャネル) と共役する GPCR は、細胞内セカンドメッセンジャーの状態を細胞外入力と関連させるモジュール式シグナル伝達系の構成要素である。

20

【0003】

GPCR 遺伝子および遺伝子産物は種々の生理的プロセスを調節可能であり、疾患の潜在的な原因物質である。GPCR は中枢神経系および末梢生理学的プロセスの両者に対して非常に重要であると考えられる。

【0004】

GPCR タンパク質スーパーファミリーは 5 つのファミリーに分けられる：ファミリー I, ロドプシンおよびベータ 2 - アドレナリン作動性受容体によって分類され、現在 200 を超える固有のメンバーを含む；ファミリー II, 副甲状腺ホルモン / カルシトニン / セクレチン受容体ファミリー；ファミリー III, 代謝調節型グルタミン酸受容体ファミリー；ファミリー IV, CAMP 受容体ファミリー、細胞性粘菌 (*D. discoideum*) の走化性および成育に重要；およびファミリー V, STE 2 のような真菌の接合フェロモン受容体。

30

【0005】

G タンパク質とは、グアニンヌクレオチドと結合した、およびサブユニットから構成されるヘテロ三量体タンパク質のファミリーを表わす。これらのタンパク質は通常はシグナル伝達用の細胞表面受容体 (7 つの膜貫通ドメインを含有する受容体) と連結されている。実際、GPCR にリガンドが結合すると、コンフォメーション変化が G タンパク質に伝達され、このことがサブユニットが結合 GDP 分子を GTP 分子と交換させ、サブユニットから解離させる。

40

【0006】

、およびサブユニットの GTP 結合型は典型的にエフェクター調節部分として機能し、セカンドメッセンジャー、例えば cAMP (例えばアデニルシクラーゼの活性化により)、ジアシルグリセロールまたはイノシトールリン酸の生成につながる。

【0007】

ヒトでは、20 を超える種々の型のサブユニットが既知である。これらのサブユニットは小プールのおよびサブユニットと結合する。哺乳類の G タンパク質の例には、

50

G i、G o、G q、G sおよびG tが含まれる。Gタンパク質は、Lodish et al. Molecular Cell Biology (1995) Scientific American Books Inc., New York, N. Y. (非特許文献1)およびDownes and Gautam (1999) The G-Protein Subunit Gene Families. Genomics 62:544-552. (非特許文献2)に詳細に記載されている。これら両文献の開示内容は引用により本明細書中に包含される。

【0008】

既知の特徴付けされていないGPCRは現在、薬物作用および開発に関する主要な標的となっている。潜在的な予防および治療特性を有し得る新規作用薬および拮抗薬についてのスクリーニングに使用可能な新規Gタンパク質共役受容体を同定する取り組みが継続中である。

10

【0009】

嗅覚受容体ファミリーを除いて、300以上のGPCRが今日までにクローニングされている。構造的には、すべての臨床的に重要な薬物の約50-60%が種々のGPCRの機能を調節することによって作用する(Cudermann et al.(1995)J.Mol.Med.,73:51-63.(非特許文献3))。

【0010】

GPCR43はロドプシン様受容体ファミリーのメンバーであり、1997年にクローニングされた。これは別のオーファンGPCRであるGPCR41と38%相同性を示し、マウスPAR1受容体の膜貫通ドメインと27%相同性を示す。GPCR43をコードする遺伝子はヒト染色体19q31に位置する(Sawzdargo et al.(1997) Biochem Biophys Res Commun. 239(2): 543-7.(非特許文献4))。GPCR43はマウスサイトカイン依存性Tヘルパー細胞株および骨髄由来の初代肥満細胞中でIL-9により誘導される遺伝子として記載されている。さらに、GPCR43のmRNA転写はIL-9過剰発現トランスジェニックマウスの肺、腸および胃で刺激される。GPCR43のmRNAはまた、脾細胞においてマイトジェン、例えばコンカナバリンAによって誘導され、この誘導はアミノステロイド化合物によって阻害される(W099/15656(特許文献1)を参照のこと)。GPCR43ポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は米国特許第5,910,430号(特許文献2)、米国特許第6,180,365B1号(特許文献3)、W000/28083(特許文献4)、W098/40483(特許文献5)、W099/15656(特許文献6)およびW000/22129(特許文献7)に開示されている。これらはそれぞれ引用により本明細書中に包含される。

20

30

【0011】

短鎖脂肪酸(SCFA)には、酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩および吉草酸塩が含まれるがこれらに限定されない。SCFAは後腸内の微生物発酵によって相当量が生産される。後腸内容物のほとんどのアニオンがSCFAであり、主に酢酸塩、プロピオン酸塩および酪酸塩である。SCFAは急速に吸収され、末梢血のトータルSCFA濃度は79μMに達する(Cummings J. H. et al (1987) Gut28: 1221-7.(非特許文献5))。種々のSCFAのうち、酢酸塩は主要なアニオンであり、生化学合成により種々の組織内で生産され得る(Bergman E. (1990) Physiol. Rev. 70, 567-590.(非特許文献6))。酢酸塩は濃度59から85μMで血漿内に存在し、エタノール投与後にはこの濃度は20倍まで増大し得る(Lundquist F. (1960) Acta Physiol. Scand.175, 97.(非特許文献7))。ほとんどの血漿酢酸塩は内臓神経床(splanchnic bed)由来であり、これが他の組織で用いられると考えられる。このような組織で、酢酸塩は基本エネルギー消費の約7%を担い得る。酪酸塩は結腸内腔で食物繊維を微生物発酵することによって生産され、酪酸塩はインビトロ実験において大腸癌細胞の増殖に劇的に影響する。種々の歯周および根管の病原体、例えばバクテロイド種は、大量の短鎖脂肪酸(SCFA)を生産可能である。短鎖脂肪酸はまた、胃腸管の成育および分化の生理学的調節因子でもあり、さらに抗菌性物質として作用し得る。SCFA代謝が大腸炎潰瘍、憩室症および結腸直腸癌の進行に関与するいくつかの証拠がある。結腸細胞の細胞増殖、分化およびアポトーシスに対するSCFAの作用にはインビボおよびインビトロで差異があり、これはSCFAの直接の作用に加えて、全身性の作用、例えば神経性および体液性因子もまた非常に重要であることを示す

40

50

。正常な結腸細胞および大腸癌細胞の、増殖およびアポトーシスに対して S C F A が反対に作用することから、結腸疾患の予防および / または治療に関する可能性が示される。

【特許文献 1】 W099/15656

【特許文献 2】 米国特許第 5,910,430 号

【特許文献 3】 米国特許第 6,180,365B1 号

【特許文献 4】 W000/28083

【特許文献 5】 W098/40483

【特許文献 6】 W099/15656

【特許文献 7】 W000/22129

【非特許文献 1】 Lodish et al. Molecular Cell Biology (1995) Scientific American Books Inc., New York, N. Y. 10

【非特許文献 2】 Downes and Gautam(1999)The G-Protein Subunit Gene Families. Genomics 62:544-552.

【非特許文献 3】 Cudermann et al. (1995) J.Mol.Med.,73: 51-63.

【非特許文献 4】 Sawzdargo et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun. 239(2):543-7

【非特許文献 5】 Cummings J.H. et al. (1987) Gut 28:1221-7.

【非特許文献 6】 Bergman E. (1990) Physiol. Rev. 70, 567-590.

【非特許文献 7】 Lundquist F. (1960) Acta Physiol. Scand. 175, 97.

【発明の開示】 20

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 2 】

本発明は、短鎖脂肪酸 (S C F A) がオーファン受容体 G P R 4 3 の天然産のリガンドであることを発見したことに基づくものである。したがって本発明は、 S C F A リガンド / 受容体 (以後配列番号 2 と特定する) ペアに関し、さらに S C F A リガンドとの組み合わせとして、 S C F A を結合するこの受容体の機能的相同体および、この受容体をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1) を含むベクターによって形質転換された細胞に関する。本発明はまた、単離された G P R 4 3 ポリペプチドおよび単離された S C F Aから本質的に構成される組成物、ならびに G P R 4 3 ポリペプチドの活性を調節する物質を同定する方法に関する。この方法は、新規薬物の開発に有用な作用薬、逆作用薬または拮抗薬化合物の同定に有用である。また G P R 4 3 と S C F A の相互作用は G P R 4 3 活性に関連する疾患の診断法の開発に有用である。 30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

本発明は、 G P R 4 3 の機能を調節する物質を同定する方法であって： a) 短鎖脂肪酸と G P R 4 3 ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補調節因子の存在および不存在下で G P R 4 3 ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；および b) G P R 4 3 ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、候補調節因子存在下の結合が、候補調節因子不存在下の結合と比較して減少すれば、この候補調節因子が G P R 4 3 の機能を調節する物質として同定される工程；を含む方法を包含する。 40

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、試料中で、 G P R 4 3 の機能を調節する物質の存在を検出する方法であって： a) 短鎖脂肪酸と G P R 4 3 ポリペプチドの結合を許容する条件下で試料の存在および不存在下で G P R 4 3 ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；および b) G P R 4 3 ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、試料存在下の結合が、試料不存在下の結合と比較して減少すれば、該試料中に G P R 4 3 の機能を調節する物質が存在することが示される工程；を含む方法を包含する。

【 0 0 1 5 】

前記いずれかの方法の一態様では、測定が、標識置換、表面プラスモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー転移、蛍光消光、および蛍光偏光から選択される方法を用いて行われる。 50

【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、G P R 4 3 の機能を調節する物質を同定する方法であって： a) 候補調節因子の存在および不存在下で G P R 4 3 ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；および b) G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程であって、候補調節因子存在下の活性が、候補調節因子不存在下の活性と比較して変化すれば、この候補調節因子が G P R 4 3 の機能を調節する物質として同定される工程；を含む方法を包含する。

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、G P R 4 3 の機能を調節する物質を同定する方法であって： a) G P R 4 3 ポリペプチドを候補調節因子と接触させる工程； b) 候補調節因子存在下で G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；および c) 候補調節因子存在下で測定される活性を、G P R 4 3 ポリペプチドが E C ₅₀ の濃度の短鎖脂肪酸と接触している試料中で測定される活性とを比較する工程であって、候補調節因子存在下で測定される活性量が、E C ₅₀ の濃度で存在する短鎖脂肪酸によって誘導される量の少なくとも 2 0 % であれば、この候補調節因子が G P R 4 3 の機能を調節する物質として同定される工程；を含む方法を包含する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、試料中で、G P R 4 3 の機能を調節する物質の存在を検出する方法であって： a) 試料の存在および不存在下で G P R 4 3 ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程； b) G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；および c) 試料不存在下で G P R 4 3 および短鎖脂肪酸を含有する反応において測定される活性量を、G P R 4 3 、短鎖脂肪酸および試料を含有する反応において測定される活性量と比較する工程であって、試料存在下の活性が、試料不存在下の活性と比較して変化すれば、この試料中に G P R 4 3 の機能を調節する物質が存在することが示される工程；を含む方法を包含する。

20

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、試料中で、G P R 4 3 の機能を調節する物質の存在を検出する方法であって： a) G P R 4 3 ポリペプチドを試料と接触させる工程； b) 試料存在下で G P R 4 3 ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；および c) 試料存在下で測定される活性を、G P R 4 3 ポリペプチドが E C ₅₀ の濃度で存在する短鎖脂肪酸と接触している反応中で測定される活性と比較する工程であって、試料存在下で測定される活性量が、E C ₅₀ の濃度で存在する短鎖脂肪酸によって誘導される量の少なくとも 2 0 % であれば、G P R 4 3 の機能を調節する物質が検出される工程；を含む方法を包含する。

30

【 0 0 2 0 】

前記各方法の一態様では、短鎖脂肪酸は検出可能に標識されている。好ましい態様では、短鎖脂肪酸は、放射性同位体、フルオロフォア、蛍光消光剤、酵素、およびアフィニティータグからなる群から選択される部分で検出可能に標識されている。

【 0 0 2 1 】

前記各方法の一態様では、接触は G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞内またはその表面で行われる。

40

【 0 0 2 2 】

前記各方法の一態様では、接触は合成リポソーム内またはその表面で行われる。

【 0 0 2 3 】

前記各方法の一態様では、接触は G P R 4 3 ポリペプチドを含有するウイルス誘導性出芽膜 (virus-induced budding membranes) 内またはその表面で行われる。

【 0 0 2 4 】

前記各方法の一態様では、接触は G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞由来の膜画分を用いて行われる。

【 0 0 2 5 】

前記各方法の一態様では、測定は、標識置換、表面プラスモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー

50

一転移、蛍光消光、および蛍光偏光からなる群から選択される方法を用いて行われる。

【0026】

前記各方法の一態様では、物質は、天然または合成ペプチドまたはポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片、脂質、炭水化物、核酸、および有機小分子からなる群から選択される。

【0027】

シグナル伝達活性が測定される方法の一態様では、GPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程がセカンドメッセンジャーのレベル変化を検出することを含む。

【0028】

シグナル伝達活性が測定される方法の別の態様では、シグナル伝達活性を測定する工程が、グアニヌクレオチド結合または交換、アデニル酸シクラーゼ活性、cAMP、プロテインキナーゼC活性、ホスファチジルイノシトール分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、細胞内カルシウム、クモ膜酸(arachinoid acid)、MAPキナーゼ活性、チロシンキナーゼ活性、またはレポーター遺伝子発現の測定を含む。

【0029】

一態様では、シグナル伝達活性を測定する工程がエクオリンに基づくアッセイの使用を含む。

【0030】

本発明はさらに、細胞内のGPR43ポリペプチドの活性を調節する方法であって、GPR43ポリペプチドの活性を調節する物質を細胞に供給(derivering)し、これによりGPR43の活性が調節される工程を含む方法を包含する。

【0031】

本発明はさらに、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害を診断する方法であって：a)組織試料をGPR43ポリペプチドに特異的な抗体と接触させる工程；b)組織試料に対する抗体の結合を検出する工程；およびc)工程(b)で検出される結合を標準と比較する工程であって、標準と比較して結合に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害が診断される工程；を含む方法を包含する。

【0032】

本発明はさらに、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害を診断する方法であって：a)組織試料から核酸を単離する工程；b)核酸を鋳型として用いてGPR43ポリヌクレオチドを増幅する工程；およびc)工程(b)で生産される増幅GPR43ポリヌクレオチドの量を標準と比較する工程であって、標準と比較して増幅GPR43ポリヌクレオチドの量に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害が診断される工程；を含む方法を包含する。

【0033】

本発明はまた、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害を診断する方法であって：a)組織試料から核酸を単離する工程；b)核酸を鋳型として用いてGPR43ポリヌクレオチドを増幅する工程；およびc)工程(b)で生産される増幅GPR43ポリヌクレオチドの配列を標準と比較する工程であって、標準と比較して配列に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害が診断される工程；を含む方法を包含する。一態様では、増幅工程はRT/PCRを含む。別の態様では、標準は配列番号1である。別の態様では、配列を比較する工程はミニシーケンシングを含む。別の態様では、量を比較する工程はマイクロアレイを用いて行われる。

【0034】

本発明はさらに、GPR43の調節不全を特徴とする疾患の存在を検出する方法であって：a)PMN細胞の膜に存在するGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；b)GPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程；およびc)工程(b)で検出される結合を標準と比較する工程であって、標準と比較して結合に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患の存在が示される工程；を含む方法を包含する。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明はさらに、GPR43の調節不全を特徴とする疾患の存在を検出する方法であって：a)PMN細胞の膜に存在するGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；b)GPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程；およびc)工程(b)で検出されるシグナル伝達活性を標準と比較する工程であって、標準と比較して結合に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患の存在が示される工程；を含む方法を包含する。

【0036】

本発明はさらに、単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸を含むか、あるいはこれらから本質的に構成される組成物を包含する。単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸はいっしょになって複合体を形成し、この複合体はその相互作用を調節する物質の同定、GPR43ポリペプチドの活性を調節する物質の同定、およびGPR43によって媒介されるか、あるいはGPR43が関与する疾患または障害を患う個体の同定に有用である。したがって、複合体または複合体でない(すなわち結合または未結合の)単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸は本発明のアッセイおよび方法の必須要素または基礎である。単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸「から本質的に構成される」組成物は追加の成分を含むことができるが、このような追加の成分は発明が基礎とする新規相互作用に必須ではないものである。単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸「から本質的に構成される」組成物は、例えば細胞内、組織内、または細胞もしくは組織抽出物内に存在する、GPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸間の天然に存在する複合体から区別され、これらを除外する。本発明の組成物はまた、組換えコンストラクトから発現されるGPR43ポリペプチドと天然短鎖脂肪酸間の複合体から区別され、これを除外する。

【0037】

本発明はさらに、単離されたGPR43ポリペプチドおよび単離された短鎖脂肪酸またはその塩を含むキットを包含する。一態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は線状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は分岐状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩の1つまたはそれ以上の非カルボニル炭素は非炭素含有置換基で置換されている。別の態様では、短鎖脂肪酸塩は、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される。

【0038】

本発明はさらに、GPR43ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドおよび単離された短鎖脂肪酸塩を含むキットを包含する。一態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は線状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は分岐状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩の1つまたはそれ以上の非カルボニル炭素は非炭素含有置換基で置換されている。別の態様では、短鎖脂肪酸塩は、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される。

【0039】

本発明はさらに、GPR43ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞および単離された短鎖脂肪酸またはその塩を含むキットを包含する。一態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は線状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は分岐状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩の1つまたはそれ以上の非カルボニル炭素は非炭素含有置換基で置換されている。別の態様では、短鎖脂肪酸塩は、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される。

【0040】

本発明はさらに、GPR43ポリペプチドを含む細胞膜画分およびパッケージ材料を含むキットを包含する。一態様では、キットは単離された短鎖脂肪酸またはその塩をさらに含む。一態様では、短鎖脂肪酸またはその塩は線状である。別の態様では、短鎖脂肪酸ま

10

20

30

40

50

たはその塩は分岐状である。別の態様では、短鎖脂肪酸またはその塩の1つまたはそれ以上の非カルボニル炭素は非炭素含有置換基で置換されている。別の態様では、短鎖脂肪酸塩は、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される。

【0041】

本発明のキットは、例えばGPR43の活性を調節する物質のスクリーニング、試料中のGPR43を調節する物質の存在の同定、またはGPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害の診断に有用である。本発明のキットはさらに、そのようなキットに必要なパッケージ材料を含むことができる。本発明のキットはさらに、標準を含むことができる。一態様では、標準は、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害を患わない個体由来の試料である。

10

【0042】

本明細書中で用いる用語「GPR43ポリペプチド」とは、以下2つの必須の性質を有するポリペプチドを意味する：1) GPR43ポリペプチドは配列番号：2と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、またはそれ以上、100%同一性まで、および100%同一性を含むアミノ酸同一性を有する；および2) GPR43ポリペプチドは、GPR43リガンド結合活性（本明細書中では、酢酸塩またはプロピオン酸塩結合と少なくとも等価な親和性を有するSCFAリガンドが結合）または本明細書中で定義されるGPR43シグナル伝達活性のいずれか、あるいは両者を含むGPR43活性を有する。

20

【0043】

本明細書中で用いる用語「GPR43活性」とは、本明細書中で定義されるGPR43ポリペプチドに対するSCFA結合またはこのGPR43ポリペプチドによるシグナル伝達を意味する。「GPR43活性」を有するポリペプチドは、ギ酸塩の親和性より少なくとも100倍高い親和性で酢酸塩およびプロピオン酸塩と結合する。

【0044】

相同配列（別の哺乳類種または特定群のヒト集団に存在し得る）の相同性は配列同一性を示し、これは、完全ヒトヌクレオチド配列または配列番号2のアミノ酸配列と高い配列同一性（80%、85%、90%、95%より大きなまたは98%より大きな配列同一性）を示す配列を意味する。機能的相同体は、本明細書中で定義される短鎖脂肪酸リガンドとの結合能またはリガンド結合に応答するシグナルの開始能または伝達能、あるいはその両者を特徴とする。機能的相同体は野生型（wt）GPR43の天然リガンドを以下のような親和性で結合する：プロピオン酸塩 = 酢酸塩 > 酪酸塩 > ギ酸塩、プロピオン酸塩および酢酸塩はギ酸塩より少なくとも100倍高い親和性で結合する。

30

【0045】

本発明の配列の相同配列は、別の動物種（ラット、マウス、ネコ、イヌ、等）または特定ヒト集団群に存在する類似の受容体であって、同一の生化学経路に關与する受容体のアミノ酸配列またはそれをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0046】

このような相同配列は、1つまたはそれ以上のアミノ酸またはヌクレオチドの付加、欠失または置換を含んでいてもよく、これらは本発明の受容体の機能的特徴を実質的に改変しない。すなわち相同体は、wt完全長ヒトGPR43の少なくとも90%の活性を有し、ギ酸塩と比較して少なくとも100倍高い親和性で酢酸塩およびプロピオン酸塩と結合する。

40

【0047】

このような相同配列はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（例えば、SAMBROOK et al. Molecular Cloning, Laboratory Manuel, Cold Spring, Harbor Laboratory press, NewYork.（非特許文献8）に記載される条件）下、完全ヒトGPR43配列とハイブリダイズ可能な400、600、800または1000ヌクレオチド以上のヌクレオチド配列であってよい。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」の例

50

は以下のものである：50%ホルムアミド、5XSSC、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5Xデンハーツ液(Denhardt's solution)、50 μ g/ml超音波処理サーモン精子DNA、0.1%SDSおよび10%デキストラン硫酸中42でハイブリダイズ；および0.2XSSCおよび0.1%SDS中42（またはそれ以上、例えばプローブ配列の完全相補物のTmより2下まで）で洗浄。

【0048】

本明細書中で用いる用語「GPR43シグナル伝達活性」とは、GPR43ポリペプチドによるシグナルの開始または伝達を意味する。GPR43シグナル伝達活性は、1つまたはそれ以上の以下のものを分析し、シグナル伝達経路の検出可能な工程を測定することによってモニターされる：Gタンパク質上のGDPとGTPの交換の刺激；アデニル酸シクラーゼ活性の変化；プロテインキナーゼC調節；ホスファチジルイノシトール分解（セカンドメッセンジャー、ジアシルグリセロール、およびイノシトール三リン酸を生産する）；細胞内カルシウム流動；MAPキナーゼの活性化；チロシンキナーゼの調節；または遺伝子またはレポーター遺伝子活性の調節。本明細書中以下に記載される任意のGPR43活性アッセイに関して、測定可能な活性が、SCFAの実質的不存在下で確立される基準の上または下に10%またはそれ以上変化した場合には、シグナル伝達経路の検出可能な工程が開始または媒介されたとみなされる。測定可能な活性は、例えばcAMPまたはジアシルグリセロールレベルの測定と同様に直接測定することができる。あるいは、測定可能な活性は、例えばレポーター遺伝子アッセイと同様に間接的に測定してもよい。

【0049】

本明細書中で用いる用語「短鎖脂肪酸」および「短鎖脂肪酸カルボン酸」とは、一般式： $C_xH_{(2x+1)}-COO$ で示される分子であって、一般式中のxは0から5である、またはOH、NH₃、PO₄、Oおよびハロゲンを含む非炭素含有置換基がカルボニル鎖上で分岐している関連分子を意味する。本発明のSCFAは線状または分岐状で、飽和または不飽和であってよい。本発明のSCFAは、酢酸塩またはプロピオン酸塩と少なくとも等価、ギ酸塩より少なくとも100倍強い親和性で、本明細書中で定義されているGPR43ポリペプチドと結合する。本発明のSCFAはさらに、GPR43シグナル伝達活性を刺激し得る。SCFAの例には、酢酸塩(acetate)、プロピオン酸塩(propionate)、n-酪酸塩(n-butyrate)、n-ペンタン酸塩(吉草酸塩)(n-pentanoate(valerate))およびギ酸塩(formate)が含まれるが、これらに限定されない。本発明のSCFAの例およびGPR43に対するその相対活性を図12に示す。

【0050】

本明細書中で用いる用語「検出可能な工程」とは、直接的に、例えば、セカンドメッセンジャーの測定、または修飾(例えばリン酸化)タンパク質の検出によってか、あるいは間接的に、例えば、この工程の下流作用のモニタリングによって測定することができる工程を意味する。例えば、アデニル酸シクラーゼの活性化はcAMPの生産をもたらす。アデニル酸シクラーゼの活性は直接的に、例えばcAMP生産をモニターするアッセイによってか、あるいは間接的に、cAMPの実際のレベルを測定することによって測定できる。

【0051】

本発明の組換え細胞は、プラスミド、コスミドまたはウイルスベクター、好ましくはバキュロウイルス、アデノウイルス、またはセムリキ森林熱ウイルスによって形質転換された組換え細胞であるのが好ましく、細胞は細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳類細胞からなる群から選択されるのが好ましい。

【0052】

本発明の好ましい態様では、細胞はCOS-7細胞、CHO細胞、LM(TK-)細胞、NIH-3T3細胞、HEK-293細胞、K-562細胞または1321N1星細胞腫細胞からなる群から選択される。しかし他の形質転換可能なセルラインもまた有用である。ベクターは、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド配列と作動可能に連結され、その発現を可能にする調節因子を含むのが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

本発明の別の側面は、配列の特定活性部分の使用に関する。本明細書中で用いる「活性部分」とは、正常または正常に近い薬理作用（例えば、受容体活性（本明細書中で定義されているもの）、活性化剤または阻害剤に対する応答、またはリガンド結合が、野生型受容体によって示される活性、応答、または結合のレベルの少なくとも90%であること）を示すのに十分な大きさである配列の部分の意味する。「部分」とは、受容体をコードする配列に対して意味するのと同様に、100%より少ない配列（すなわち、99、90、80、70、60、50%等）を意味する。活性部分は、完全ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の部分欠失を含むが、特定リガンド、好ましくは酢酸塩およびプロピオン酸塩の結合およびその相互作用に必要な活性部位（群）およびタンパク質ドメイン（群）を依然保持している受容体であり得る。

10

【 0 0 5 4 】

前記いずれかの方法の別の態様では、接触がGPR43ポリペプチドを含有する合成リポソーム（Mirzabekov et al. (2000) Nature Biotechnology 18, 649-654.またはウイルス誘導性出芽膜の内または表面で行われる。（例えば引用により本明細書中に包含されるWO0102551（Virus-like particles, their Preparation and their Use preferably in Pharmaceutical Screening and Functional Genomics (2001)）を参照のこと）。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で用いる「リガンド」とは、受容体と会合または結合可能な部分の意味する。本発明の方法では、リガンドおよび受容体は、受容体に対するリガンド結合の検出に適切なアッセイ方法（例えば、受容体に対するリガンド結合に反応するセカンドメッセンジャー生産の増大または減少を検出するセカンドメッセンジャーアッセイ、タンパク質-リガンド結合を測定する結合アッセイ、または抗体-抗原相互作用を測定する免疫アッセイ）によって結合の検出が可能であるほど十分に強い結合定数を有する。本発明のリガンドには、受容体と結合する既知の分子（例えば、プロピオン酸塩はGPR43のリガンドである）が含まれ、あるいはリガンドは、任意の、受容体と結合可能なヌクレオチド、抗体、抗原、酵素、ペプチド、ポリペプチドまたは核酸であってよい。リガンドは短鎖カルボン酸であるのが好ましいが、ポリペプチド、ペプチドまたは核酸配列を含むこともできる。本発明の方法では、リガンドおよび受容体は互いに特異的に結合する（例えば、共有結合または水素結合を介して、または例えばタンパク質とリガンド、抗体と抗原またはタン

20

30

【 0 0 5 6 】

本発明の別の側面は、本発明の受容体の候補調節因子をスクリーニング、検出および回収するための方法であって：酢酸塩またはプロピオン酸塩とGPR43の結合を許容する条件下、候補調節因子存在下で、GPR43発現細胞をSCFAと接触させる工程、セカンドメッセンジャーアッセイを行う工程、および候補調節因子の存在および不存在下で得られるセカンドメッセンジャーアッセイの結果を比較する工程を含む方法に関する。

【 0 0 5 7 】

本発明の別の側面は、本発明の受容体候補調節因子のスクリーニング、検出および可能な回収を行うための方法であって：酢酸塩またはプロピオン酸塩とGPR43の結合を許容する条件下、GPR43発現細胞膜をSCFAと接触させる工程、セカンドメッセンジャーアッセイを行う工程、および候補調節因子の存在および不存在下で得られるセカンドメッセンジャーアッセイの結果を比較する工程を含む方法に関する。

40

【 0 0 5 8 】

別の態様では、GPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程は、セカンドメッセンジャーレベルの変化を検出することを含む。

【 0 0 5 9 】

本発明のさらなる側面は、本発明の方法によって同定され、ならびに/あるいは回収される未知の作用薬および/または拮抗薬化合物、ならびにこの（未知の）化合物を含むか、あるいは適当な製薬的担体および必要量のこの（未知の）化合物を含む医薬組成物（ワ

50

クチンを含む)を含む診断キットに関する。

【0060】

本発明の拮抗薬化合物は、本発明の受容体と結合可能で、天然化合物(プロピオン酸塩または酢酸塩または関連する短鎖カルボン酸)の結合を阻害することができる分子または分子群を意味する。

【0061】

本発明は、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害を診断する方法であって：a)組織試料をGPR43ポリペプチドに特異的な抗体およびGPR43リガンドに特異的な抗体と接触させる工程；b)抗体と組織試料の結合を検出する工程；およびc)工程(b)で検出される結合を標準と比較する工程であって、標準と比較して抗体のいずれかまたは両者の結合に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害が診断される工程；を含む方法を包含する。

10

【0062】

本発明はさらに、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害を診断する方法であって：a)組織試料を単離する工程；b)SCFA濃度を測定する工程；およびc)工程(b)で測定されるSCFA量を標準と比較する工程であって、標準と比較してSCFA量に差異があれば、GPR43の調節不全を特徴とする疾患または障害が診断される工程；を含む方法を包含する。

【0063】

本発明のさらなる側面は、本発明のGPR43受容体をコードするポリヌクレオチド配列のホモ接合性無発現変異(ホモ接合性「ノックアウト」)を含む非ヒト哺乳類、またはGPR43ポリペプチドを天然の発現レベルを超えて過剰発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類に関する。本明細書中で用いる「天然の発現レベルを超えて」とは、正常天然状態での内因性受容体の発現レベルと比較して少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、ならびに最も好ましくは100倍またはそれ以上(すなわち150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10,000倍、等)のレベルを意味する。本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳類は、少なくとも1つの組織または細胞タイプで導入遺伝子を発現するが、すべての組織および細胞でGPR43導入遺伝子を発現してもよい。トランスジェニック非ヒト哺乳類は、例えばW098/20112に記載されるように、胚性幹細胞のトランスフェクションに基づく典型的な技術を用いる当業者に周知の方法により、好ましくはCarmeliet et al. (1996) Nature, Vol.380, p.435-439.に記載の方法にしたがって得ることができる。

20

30

【0064】

「遺伝子ターゲティング」とは、ゲノムDNA断片が哺乳類細胞に導入された場合に生じるタイプの相同組換えであり、この断片が内因性相同配列の位置を突き止め、組換える。これは米国特許第5,464,764号および米国特許第5,777,195号に典型的に示され、これらの開示内容はその全体が引用により本明細書中に包含される。本明細書中で用いる用語「トランスジェニック動物」とは、1つまたはそれ以上の、好ましくは本質的にすべての細胞が、人為的介入、例えば当技術分野に既知のトランスジェニック技術によって導入された導入遺伝子を含有する非ヒト動物を意味する。導入遺伝子は、細胞の前駆体への導入によって、慎重な遺伝子操作、例えばマイクロインジェクションによって、または組換えウイルスを用いる感染によって、直接または間接的に細胞に導入することができる。

40

【0065】

本発明のGPR43受容体をコードするポリヌクレオチドを過剰発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類は、受容体の過剰発現を可能にする誘導性プロモーターおよび、場合により、組織および細胞特異的な調節因子を伴ってDNAコンストラクトに組み込まれたポリヌクレオチドを含むのが好ましい。

【0066】

一態様では、本発明のキットは、GPR43ポリペプチドに対する短鎖脂肪酸の結合を測定するための試薬を含む。別の態様では、キットはGPR43ポリペプチドのシグナル

50

伝達活性を測定するための試薬を含む。

【0067】

一態様では、本発明のスクリーニングキットまたは診断キットは、GPR43受容体ポリペプチドまたはGPR43ポリペプチドを含む細胞膜調製物、および1つまたはそれ以上のSCFAを別々の容器内に含む。このようなキットはさらに、本発明のGPR43受容体に対する（例えばプロピオン酸塩の）特異的結合の検出を行うために必要なすべての手段および媒体を含むことができる。結合活性またはシグナル伝達活性は、本明細書中以下に記載される疾患の1つまたはそれ以上の症状をモニタリングする方法と関連させることができる。

【0068】

したがって診断キットはさらに、特定の診断測定、または、例えば、当業者に既知のハイスループットスクリーニング技術、例えばWO 00/02045に記載される技術を用いる結合化合物の測定に必要な要素を含むことができる。このようなキットを用いて、例えば処置のために用いられるGPR43調節物質の用量および有効性をモニターすることができる。ハイスループットスクリーニング診断用量およびモニタリングは種々の固形支持体、例えば当業者によって選択されるマイクロタイタープレートまたはパイオチップを用いて行うことができる。

【0069】

本発明の医薬組成物中、適当な製薬的担体は固形、液状またはガス状担体であり、当業者が、投与の型およびGPR43活性を調節するために投与される化合物の副作用の可能性に応じて選択可能である。本発明の有用な製薬的担体には組織培養培地または他の血清含有培地は含まれない。製薬的担体と特定化合物間の割合は、当業者が、処置対象の患者、投与方法および化合物の副作用の可能性、ならびに処置または予防目的の対象である疾患障害のタイプに応じて選択可能である。

【0070】

医薬組成物は、種々の疾患または障害の処置および/または予防の分野での適用に有益であり、このような疾患または障害は以下からなる群から選択されるのが好ましい：前立腺（ostatic）肥大、偏頭痛、嘔吐、精神病性および神経学的障害、例えば不安、統合失調症、躁鬱病、鬱病、譫妄、痴呆症および深刻な精神遅滞、変性疾患、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病またはパーキンソン病、および運動障害（dyskinasias）、例えばハンチントン病またはギレス・デ・ラ・トゥーレット症候群（Gilles de la Tourett's syndrome）および他の関連疾患、例えば血栓症および他の心血管疾患、自己免疫および炎症性疾患。

【0071】

上記疾患のうち好ましい適用は、機能不全または疾患を予防し、改善し、あるいは治すのに機能を果たすことが可能な7TM受容体を標的とする治療物質に関するものであり、このような機能不全および疾患には以下のものが含まれる：受胎能、胎児発生、感染、例えば細菌、真菌、原虫およびウイルス感染、特にHIV1およびHIV2によって引き起こされる感染、疼痛、癌、摂食障害、過食症、喘息、パーキンソン病、急性心不全、高血圧症、尿閉、骨粗鬆症、狭心症、心筋梗塞、潰瘍、喘息、アレルギー、良性の前立腺肥大症、精神病性および神経学的障害、例えば不安、鬱病、偏頭痛、嘔吐、脳卒中、統合失調症、躁鬱病、譫妄、痴呆症、深刻な精神遅滞および運動障害、例えばハンチントン病またはギレス・デ・ラ・トゥーレット症候群、血栓症、他の心血管疾患、自己免疫および炎症性疾患、ただしこれらに限定されない。

【0072】

本発明はまた、細胞表面受容体GPR43を保持しているPMN細胞を、PMN走化性を調節するのに十分なGPR43シグナル伝達活性の調節因子と接触させることを含む、哺乳類において該PMN走化性を調節する方法を提供する。

【0073】

一態様では、本発明は、患者にGPR43シグナル伝達活性の阻害剤を投与することを

10

20

30

40

50

含む、それを必要としている患者においてPMN走化性を調節する方法を提供する。

【0074】

一態様では、PMN細胞をGPR43シグナル伝達活性の阻害剤と接触させることによって前記PMN走化性を減少させる。

【0075】

一態様では、PMN細胞をGPR43シグナル伝達活性の拮抗薬と接触させることによって前記PMN走化性を減少させる。

【0076】

さらなる態様では、PMN細胞をGPR43シグナル伝達活性の作用薬と接触させることによって前記PMN走化性を増大させる。

10

【0077】

本発明はまた、PMN走化性を調節する物質を同定する方法であって：短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補物質の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびGPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程であって、候補物質存在下のGPR43のシグナル伝達活性が、候補物質不存在下のシグナル伝達活性と比較して増大または減少すれば、該候補物質がPMN走化性を調節する物質として同定される工程；を含む方法を包含する。

【0078】

本発明はまた、PMN走化性関連疾患処置用の物質を同定する方法であって：短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補物質の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびGPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程であって、候補物質存在下のGPR43のシグナル伝達活性が、候補物質不存在下のシグナル伝達活性と比較して増大または減少すれば、該候補物質がPMN走化性関連疾患処置用の物質として同定される工程；を含む方法を提供する。

20

【0079】

本発明はまた、PMN走化性を調節する物質を同定する方法であって：短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補物質の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびGPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、候補物質存在下の結合が、候補物質不存在下の結合と比較して減少すれば、該候補物質がPMN走化性を調節する物質として同定される工程；を含む方法を提供する。

30

【0080】

本発明はまた、試料中で、PMN走化性を調節する物質の存在を検出する方法であって：a) 試料の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびb) GPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を測定する工程であって、試料存在下のGPR43のシグナル伝達活性が、試料不存在下のシグナル伝達活性と比較して増大または減少すれば、候補物質がPMN走化性を調節する物質として同定される工程；を含む方法を提供する。

【0081】

本発明はまた、試料中で、PMN走化性を調節する物質の存在を検出する方法であって：a) 短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で試料の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびb) GPR43ポリペプチドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、試料存在下の結合が、試料不存在下の結合と比較して増大または減少すれば、候補物質がPMN走化性を調節する物質として同定される工程；を含む方法を提供する。

40

【0082】

本発明はさらに、PMN走化性関連疾患処置用の物質を同定する方法であって：短鎖脂肪酸とGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件下で候補物質の存在および不存在下でGPR43ポリペプチドを短鎖脂肪酸と接触させる工程；およびGPR43ポリペプチ

50

ドと短鎖脂肪酸の結合を測定する工程であって、候補物質存在下の結合が、候補物質不存在下の結合と比較して減少すれば、候補物質がPMN走化性関連疾患処置用の物質として同定される工程；を含む方法を提供する。

【0083】

一態様では、GPR43受容体はPMN細胞の細胞膜中に存在する。

【0084】

一態様では、短鎖脂肪酸は検出可能に標識されている。

【0085】

さらなる態様では、短鎖脂肪酸は、放射性同位体、フルオロフォア、蛍光消光剤、酵素、およびアフィニティータグからなる群から選択される部分で検出可能に標識されている。

10

【0086】

本発明はさらに、上記のような方法によって同定されるか、あるいは上記のように試料中で検出されるGPR43活性を調節する物質を包含する。

【0087】

本発明はさらに、上記のような方法によって同定されるか、あるいは上記のように試料中で検出されるPMN走化性を調節する物質を包含する。

【0088】

本発明はさらに、GPR43活性を調節するための前記物質の使用を包含する。

【0089】

本発明はさらに、PMN走化性を調節するための前記物質の使用を包含する。

20

【0090】

本発明はさらに、GPR43関連疾患処置用の医薬品を製造するための前記物質の使用またはGPR43活性調節用のキットを製造するための前記物質の使用を包含する。

【0091】

本発明はさらに、PMN走化性関連疾患処置用の医薬品を製造するための前記物質の使用またはPMN走化性調節用のキットを製造するための前記物質の使用を包含する。

【0092】

本発明はさらに、適当な製薬的担体または希釈剤および必要量の前記物質を含む医薬組成物を包含する。

30

【0093】

本発明はさらに、小胞または、投与対象の患者の免疫応答を調節可能なアジュバントをさらに含む、上記医薬組成物を包含する。

【0094】

本発明はさらに、GPR43関連疾患処置用の医薬品を製造するための、またはGPCR43調節用のキットを製造するための上記医薬組成物の使用を包含する。

【0095】

本発明はさらに、PMN走化性関連疾患処置用の医薬品を製造するための、またはPMN走化性調節用のキットを製造するための上記医薬組成物の使用を包含する。

【0096】

本発明はまた、インビボおよび/またはインビトロのGPR43活性を調節するための短鎖脂肪酸の使用に関する。

40

【0097】

本発明はまた、インビボおよび/またはインビトロのPMN走化性を調節するための短鎖脂肪酸の使用に関する。

【0098】

本発明はまた、GPR43をコードするポリヌクレオチドの部分欠失または全欠失を含む非ヒト哺乳類を確認する際の短鎖脂肪酸の使用に関する。

【0099】

本発明はまた、GPR43をコードするポリヌクレオチドを過剰発現している非ヒト哺乳

50

乳類を確認する際の短鎖脂肪酸の使用に関する。

【0100】

本発明はまた、前記短鎖脂肪酸またはその塩が線状である、上記のような方法、キット、使用を包含する。

【0101】

本発明はまた、前記短鎖脂肪酸またはその塩が分岐状である、上記のような方法、キット、使用を包含する。

【0102】

本発明はさらに、前記短鎖脂肪酸またはその塩の1つまたはそれ以上の非カルボニル炭素が非炭素含有置換基で置換されている、上記のような方法、キット、使用を包含する。

10

【0103】

本発明はまた、前記短鎖脂肪酸塩が、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、吉草酸ナトリウムおよびギ酸ナトリウムからなる群から選択される、上記のような方法、キット、使用を包含する。

【0104】

本明細書中で用いる用語「多形核細胞」または「PMN」とは、直径10 - 14 μm範囲の顆粒球系列の白血球を意味する。本発明の「PMN」は、2つまたはそれ以上の葉またはセグメントを有する、粗集合性の深染色性クロマチンを伴う核を有する（一方、未成熟PMN細胞は、葉を持たない帯状核を有し得る）。本発明の「PMN」はまた、小さくて弱染色性の、または大きくて強染色性の好塩基性顆粒、または大きい（0.5 - 1 μm）好酸性顆粒を含有する顆粒性細胞質を有する。本発明のPMN細胞の形態学は当業者に周知である。

20

【0105】

本明細書中で用いる「PMN走化性」とは、走化性因子に応答する、走化性因子の方向または逆方向へのPMN細胞の定方向運動を意味する。走化性因子には、細菌因子（N-ホルミル化ペプチド、例えばfMLP、これは細菌タンパク質の初期化に特有の因子である）、血漿タンパク質（例えば、C5a、補体活性化の典型的経路または代替経路の活性化産物の1つ、およびロイコトリエン）および細胞（例えば、TGF-ベータおよび他のサイトカイン、リンパ球、肥満細胞、および好塩基球から放出されるポリペプチド、Gc-グロブリン、オプソニン）が含まれるが、これらに限定されない。PMN走化性は、本発明にしたがい、1962年にS. Boydenによって最初に開発された手法によって測定することができる（S. Boyden (1962) The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes, J. Exp. Med. 115: pp.453-466.を参照のこと）。簡単には、この手法では、PMN細胞懸濁液および化学物質を2つの別々の区画に設置する。これらの区画はポリカーボネートフィルターで分離されている。PMNは例えば、哺乳類の末梢血から調製することができる。あらかじめ決められた時間の後、フィルターを取り除き、細胞懸濁液含有区画側フィルター表面の細胞を注意して取り除く。次いでフィルター上の残留細胞を固定し、染色する。ハイパワーの顕微鏡を用いてフィルターを検査し、フィルターの下面（すなわち化学物質含有区画側フィルター面）に現れた細胞の数を手で計測する。正の走化性応答は、細胞がフィルターを通過して化学物質含有区画側へ遊走または「クロール(crawl)」したことによって示される。時間がかかるので、典型的にはフィルター全体が検査されることはない。そのかわり、代表試料領域が検査され、計測される。本発明では、走化性因子が存在しない場合と比較して、走化性因子が区画内に存在する場合に、走化性因子含有区画に接したフィルター表面に少なくとも10%以上のPMN細胞が存在すれば「PMN走化性」が生じたとされる。

30

40

【0106】

本明細書中で用いる「拮抗薬」とは、受容体に対し、作用薬と同一部位で競合的に結合するが、活性型受容体により開始される細胞内応答を活性化しないリガンドである。これにより拮抗薬は、作用薬、例えばプロピオン酸によって誘導される細胞内応答を、作用薬の存在下かつ拮抗薬の不存在下での細胞内応答と比較して、少なくとも10%、好ましく

50

は15 - 20%、より好ましくは25 - 50%、そして最も好ましくは50 - 100%阻害する。

【0107】

本明細書中で用いる「作用薬」とは、細胞内応答を誘導するプロピオン酸濃度と等しいか、あるいはより低い濃度で受容体と結合した場合に、細胞内応答を活性化するリガンドを意味する。本発明の作用薬は、受容体によって媒介される細胞内応答を、作用薬不存在下の細胞内応答と比較して、少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、そして最も好ましくは100倍またはそれ以上(すなわち、150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10,000倍等...)増大させることが可能である。本発明の作用薬は細胞表面受容体の内在化を低下させ、受容体の細胞表面発現を、作用薬不存在下の細胞表面に存在する細胞表面受容体数と比較して、少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、そして最も好ましくは100倍またはそれ以上(すなわち、150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10,000倍等...)増大させることが可能である。本発明の別の態様では、作用薬は細胞表面受容体を安定化し、受容体の細胞表面発現を、作用薬不存在下の細胞表面に存在する細胞表面受容体数と比較して、少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、そして最も好ましくは100倍またはそれ以上(すなわち、200倍、250倍、500倍、1000倍、10,000倍等...)増大させる。

10

【0108】

本明細書中で用いる「逆作用薬」とは、受容体と結合した場合に細胞表面受容体の常時活性を減少させるリガンドを意味する。本発明の逆作用薬は、受容体によって媒介される常時細胞内応答を、逆作用薬不存在下の細胞内応答と比較して、少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、そして最も好ましくは100倍またはそれ以上(すなわち、150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍、10,000倍等...)減少させることができる。

20

【0109】

本発明の「阻害剤」化合物とは、受容体に対する分子または受容体の天然産のリガンドに対する分子であり、酢酸塩またはプロピオン酸塩存在下のリガンドと受容体の結合を、酢酸塩またはプロピオン酸塩存在下で、かつ阻害剤不存在下の結合と比較して、少なくとも10%、好ましくは15 - 25%、より好ましくは25 - 50%、そして最も好ましくは50 - 100%減少させる。本発明の「阻害剤」化合物は、作用薬、例えば酢酸塩またはプロピオン酸塩によって誘導される細胞内応答を、少なくとも10%、好ましくは15 - 25%、より好ましくは25 - 50%、そして最も好ましくは50 - 100%減少させることが可能である。また「阻害剤」とは、本発明の阻害剤化合物をコードするヌクレオチド配列をも意味する。本発明の有用な阻害剤には、GPR43の、少なくともGPR43を介するシグナル伝達に必要なとされる部分(例えばリガンド結合部位)に特異的に結合する抗体、またはGPR43受容体と共役するシグナル伝達経路をブロックするか、あるいは(例えば少なくとも10%)減少させることが可能な化合物が含まれるが、これらに限定されない。このような阻害剤には、致死下の用量の百日咳毒素、N-エチルマレイミド(NEM; Sigma)、ジブチリルcAMP(Boehringer Mannheim, Corp.)、およびH-89(N-[2-((p-プロモシンナミル)アミノ)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド-HCL; Calbiochem)が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0110】

本明細書中で用いる「天然リガンド」とは、酢酸塩またはプロピオン酸塩と少なくとも等価の様式で(すなわちギ酸塩の親和性より大きい受容体に対する親和性で(酢酸塩=プロピオン酸塩>ギ酸塩))、受容体と結合する、天然に発見される、天然に存在するリガンドを意味する。「天然リガンド」は、天然には発見されず、受容体と結合するように操作されている改変リガンドを意味するのではない。改変リガンドはもともと、操作後の結合と程度または種類が異なっていて受容体と結合しなかったものである。このような改変リガンドはもはや天然に存在するのではなく、「非天然」であり、天然に存在する分子に

50

由来する。

【0111】

本明細書中で用いる「調節因子」とは、本発明の受容体の細胞表面発現を増大または減少させる化合物、リガンドと本発明の受容体の結合を増大または減少させる化合物、または作用薬の存在または不存在下で、かつ受容体のリガンド、例えば酢酸塩またはプロピオン酸塩の存在下で本発明の活性型受容体によって開始される細胞内応答を増大または減少させる任意化合物を意味する。調節因子には、本明細書中で定義される、作用薬、拮抗薬、阻害剤または逆作用薬が含まれる。調節因子は、例えばポリペプチド、ペプチド、抗体またはその抗原結合断片、脂質、炭水化物、核酸、および有機小分子であり得る。候補調節因子は天然または合成の化合物であってよく、これには、例えば合成小分子、動物、植物、細菌または真菌細胞の抽出物ならびにそのような細胞由来のならし培地に含まれる化合物が含まれる。

10

【0112】

本明細書中で用いる「増大」および「減少」とは、GPR43受容体に対するリガンド結合および/またはGPR43を介する細胞シグナル伝達の少なくとも10%の変化を意味する。結合またはシグナル伝達における「増大」または「減少」は、候補調節因子の存在下でGPR43をリガンドと接触させることに応答して測定するのが好ましく、この測定では、結合またはシグナル伝達の変化は候補調節因子不存在下の結合またはシグナル伝達と比較される。

【0113】

本明細書中で用いる用語「小分子」とは、3000ダルトンより小さい、好ましくは2000または1500ダルトンより小さい、さらにより好ましくは1000ダルトンより小さい、そして最も好ましくは600ダルトンより小さい分子量を有する化合物を意味する。「有機小分子」は炭素を含む小分子である。

20

【0114】

本明細書中で用いる用語「変化」、「差異」、「増大」または「減少」は、例えば結合またはシグナル伝達活性、またはある物質の量に適用され、結合、シグナル伝達活性、または例えば、mRNA、ポリペプチドまたはリガンドのレベルが、特定のアッセイの標準と比較して少なくとも10%増大または減少することを意味する。

【0115】

本明細書中で用いる用語「調節不全」とは、以下のような試料中のGPR43のシグナル伝達活性を意味する：

30

a) 特定アッセイの測定で、1つまたはそれ以上のGPR43ポリペプチド、リガンドまたはmRNAレベルの量が、本明細書中で定義される標準と比較して10%またはそれ以上増大または減少している試料または；

b) GPR43コード配列中、配列番号1と比較して、少なくとも一組の塩基対変化が検出され、パラグラフa)、c)またはd)で定義されるGPR43リガンド結合またはシグナル伝達活性の変化を生じる試料または；

c) 特定アッセイの測定で、GPR43リガンド結合活性の量が、本明細書中で定義される標準と比較して10%またはそれ以上増大または減少している試料または；

40

d) 特定アッセイの測定で、本明細書中で定義されるセカンドメッセンジャーが、本明細書中で定義される標準と比較して10%またはそれ以上増大または減少している試料。

【0116】

本明細書中で用いる用語「SCFAとGPR43ポリペプチドの結合を許容する条件」とは、SCFA(例えば酢酸塩またはプロピオン酸塩)がGPR43と結合する際の温度、塩濃度、pHおよびタンパク質濃度等の条件を意味する。正確な結合条件は、アッセイが生細胞を用いるのか、または細胞の膜画分のみを用いるのか等のアッセイの性質に応じて変化し得る。しかしGPR43は細胞表面タンパク質であるから、好ましい条件は一般に、生理的塩(90mM)および生理的pH(約7.0から8.0)を含むだろう。結合温度は15 から37 まで変化させることができるが、好ましくは室温から約30 の

50

温度であろう。結合反応中のSCFAの濃度もまた変化させることができるが、好ましくは約1 μM（例えば放射性標識されたトレーサSCFA、例えばプロピオン酸塩を用いる反応中、一般に、SCFA濃度がKdより低い）から10 mM（例えば競合因子としてのプロピオン酸塩）である。

【0117】

本明細書中で用いる用語「試料」とは、GPR43ポリペプチドに対する結合またはGPR43ポリペプチドのシグナル伝達活性を調節する物質または調節因子化合物の存在に関する試験の対象である分子のソースを意味する。試料は、環境試料、動物、植物、酵母または細菌細胞または組織の天然抽出物、臨床試料、合成試料、または組換え細胞または発酵プロセス由来の条件培地であってもよい。用語「組織試料」とは、GPR43ポリペ

10

【0118】

本明細書中で用いる「組織」は、器官内で特定機能を行う細胞の集合体である。本明細書中で用いる用語「組織」とは、特定の生理的領域由来の細胞性物質を意味する。特定組織の細胞はいくつかの異なる細胞タイプを含み得る。この非限定的な例としては、脳組織が挙げられよう。脳組織は、毛細内皮細胞および血球細胞、特定の組織セクションまたは試料中に含まれるすべてのものに加えて、さらにニューロンおよびグリア細胞を含む。また固形組織に加えて、用語「組織」は非固形組織、例えば血液を含むものとする。

20

【0119】

本明細書中で用いる用語「膜画分」とは、GPR43ポリペプチドを含む細胞性脂質膜の調製物を意味する。本明細書中で用いられるように、「膜画分」は細胞性ホモジネートと区別され、非膜結合細胞性成分が少なくとも部分的に（すなわち少なくとも10%、好ましくはそれ以上）除去されている。用語「膜結合」とは、脂質膜に組み込まれているか、あるいは脂質膜に組み込まれている成分と物理的に結合している細胞性成分を意味する。

【0120】

本明細書中で用いる「セカンドメッセンジャーアッセイ」は、以下を測定する工程を含むのが好ましい：グアニンヌクレオチドの結合または交換、アデニル酸シクラーゼ、細胞内cAMP、細胞内イノシトールリン酸、細胞内ジアシルグリセロール濃度、アラキドン酸濃度、MAPキナーゼ（群）またはチロシンキナーゼ（群）、プロテインキナーゼC活性、またはレポーター遺伝子発現またはエクオリンに基づくアッセイ。この測定は当技術分野に既知で、かつ本明細書中で定義される方法にしたがう。

30

【0121】

本明細書中で用いる用語「セカンドメッセンジャー」とは、Gタンパク質共役受容体の活性化によって生産されるか、または濃度の変化が引き起こされ、このGPCR由来のシグナル伝達に関与する分子を意味する。セカンドメッセンジャーの非限定的な例には、cAMP、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アラキドン酸放出、イノシトール三リン酸および細胞内カルシウムが含まれる。用語「セカンドメッセンジャーのレベルの変化」とは、候補調節因子の不存在下で行われるアッセイで検出される量と比較して、特定セカンドメッセンジャーの検出レベルが少なくとも10%増大または減少することを意味する。

40

【0122】

本明細書中で用いる用語「エクオリンに基づくアッセイ」とは、活性化GPCRによって誘導される細胞内カルシウム流動を測定する、GPCR活性についてのアッセイを意味し、このアッセイでは、細胞内で発現されるエクオリンの発光によって細胞内カルシウム流動が測定される。

【0123】

本明細書中で用いる用語「結合」とは、リガンド（例えばプロピオン酸塩のようなSC

50

F Aまたは抗体)と受容体(例えばG P R 4 3)の物理的会合を意味する。本明細書中で用いられるように、結合が1 m Mより小さい、一般に1 m Mから1 0 n Mの範囲のE C₅₀またはK_dで生じる場合、この結合は「特異的」である。例えばE C₅₀またはK_dが1 m M、5 0 0 μ M、1 0 0 μ M、1 0 μ M、9 . 5 μ M、9 μ M、8 . 5 μ M、8 μ M、7 . 5 μ M、7 μ M、6 . 5 μ M、6 μ M、5 . 5 μ M、5 μ M、4 . 5 μ M、4 μ M、3 . 5 μ M、3 μ M、2 . 5 μ M、2 μ M、1 . 5 μ M、1 μ M、7 5 0 n M、5 0 0 n M、2 5 0 n Mまたは1 0 0 n Mまたはそれ以下である場合、結合は特異的である。

【 0 1 2 4 】

本明細書中で用いる用語「E C₅₀」とは、プロピオン酸塩または他のリガンドの結合およびG P R 4 3ポリペプチドの機能的活性を含む特定の活性が、化合物不存在下で同一アッセイを用いて測定可能なG P R 4 3活性に関する最大値の5 0 %である化合物の濃度を意味する。言い換えれば、「E C₅₀」とは、1 0 0 %活性化が、さらに作用薬を添加しても増大しない活性量で設定される場合には、5 0 %活性化を示す化合物の濃度である。例えばプロピオン酸塩アナログの「E C₅₀」は、アッセイで用いられるアナログの独自性に応じて変化し得ることに注意すべきである。例えばプロピオン酸塩アナログはプロピオン酸塩より高いか、より低い、あるいは同一のE C₅₀値を有し得る。したがって、プロピオン酸塩アナログがプロピオン酸塩と異なっている場合には、当業者は従来の方法にしたがってそのアナログに関するE C₅₀を決定することができる。特定のS C F AのE C₅₀は、少なくともG P R 4 3応答が飽和するか、あるいは最大まで増大させるS C F A用量の存在下で、固定量のG P R 4 3ポリペプチドの活性に関するアッセイを実行し、次いで測定されたG P R 4 3活性をS C F A濃度に対してプロットすることによって測定される。

【 0 1 2 5 】

本明細書中で用いる用語「飽和」とは、リガンド濃度をさらに増加してもリガンドの結合またはG P R 4 3特異的シグナル伝達活性が増大しないプロピオン酸塩または他のリガンドの濃度を意味する。

【 0 1 2 6 】

本明細書中で用いる用語「I C₅₀」は、G P R 4 3受容体の最大活性を5 0 %減少させる拮抗薬または逆作用薬の濃度である。

【 0 1 2 7 】

本明細書中で用いる用語「L D 5 0」とは、投与対象の5 0 %を死滅させるのに必要な個々の物質の用量を意味する。

【 0 1 2 8 】

本明細書中で用いる用語「結合の減少」とは、既知または推定のG P R 4 3調節因子を用いる特定のアッセイで検出されるリガンド結合量が、その既知または推定のG P R 4 3調節因子を欠いているアッセイで検出される結合と比較して少なくとも1 0 %減少することを意味する。

【 0 1 2 9 】

本明細書中で用いる用語「供給する(deriviving)」とは、薬物または物質に関して用いられる場合、アッセイ混合物または培養細胞に薬物または物質を添加することを意味する。この用語はまた、動物への薬物または物質の投与を意味する。このような投与は、例えば(例えば滅菌食塩水または水中での適当な担体)注射または吸入、または経口、経皮、直腸内、膈内、または他の一般的薬物投与経路によって行うことができる。

【 0 1 3 0 】

本明細書中で用いる用語「標準」とは、G P R 4 3活性の調節不全を特徴とする疾患または障害を患わない個体から採取される試料を意味する。「標準」は、G P R 4 3 m R N Aまたはポリペプチドレベルおよび性質(すなわち突然変異型対野生型)の比較、ならびにG P R 4 3活性の比較に関する基準として用いられる。「標準」はまた、参照配列、例えば配列番号1または配列番号2を包含する。核酸配列またはそれがコードするポリペプチドがこれらの配列と比較される。

10

20

30

40

50

【0131】

本明細書中で用いる用語「増幅」とは、核酸配列に適用される場合、鋳型の核酸から1つまたはそれ以上のコピーの核酸配列が生産されるプロセスを意味する。好ましい「増幅」方法はPCRまたはRT/PCRである。

【0132】

本明細書中で用いる用語「Gタンパク質共役受容体」または「GPCR」とは、7つのアルファらせん状膜貫通ドメインを有する膜結合ポリペプチドを意味する。機能的GPCRはリガンドまたは作用薬と会合し、さらにGタンパク質と会合して、これを活性化する。GPR43はGPCRである。

【0133】

本明細書中で用いる用語「抗体」は、通常免疫グロブリン分子、ならびに対象ポリペプチドの1つと特異的に反応するその断片である。抗体は従来技術を用いて断片化することができる。当該断片は、完全長抗体に関して本明細書中以下に記載される方法と同様の方法で、その有用性に関してスクリーニング可能である。例えば、抗体をペプシンで処理してF(ab)₂断片を作成することができる。得られたF(ab)₂断片を処理してジスルフィド架橋を還元し、Fab断片を作成できる。本発明の抗体はさらに、二重特異性、単一鎖、およびキメラおよびヒト化分子であって、この抗体の少なくとも1つのCDR領域によって付与される、ポリペプチドに対する親和性を有する分子を含むものとする。好ましい態様では、抗体はさらに、自身に結合している検出可能な標識を含む(例えば標識は放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、または酵素補因子であってよい)。抗体、モノクローナルまたはポリクローナルおよびその超可変部分(FAB、FAB"、等)、ならびに抗体産生ハイブリドーマ細胞は本発明のさらなる側面である。該側面は、好ましくは本明細書中以下に記載されるような、特定の疾患の診断およびモニタリング分野で具体的な産業的適用を見出すものである。

【0134】

本発明の阻害剤には、標識モノクローナルまたはポリクローナル抗体またはその抗体の超可変部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0135】

本明細書中で用いる用語「トランスジェニック動物」とは、1つまたはそれ以上の細胞が人為的介入、例えば当技術分野に周知のトランスジェニック技術によって導入された異種の核酸を含有する、任意の動物、好ましくは非ヒト哺乳類、鳥類、魚類または両生類を意味する。前記核酸は、直接または間接的に、細胞前駆体への導入によって、慎重な遺伝子操作、例えばマイクロインジェクションによって、または組換えウイルスを用いる感染によって細胞内に導入される。用語「遺伝子操作」には、典型的な交雑育種またはインビトロ受精は含まれず、組換えDNA分子の導入を指す。この分子は染色体内に組み込ませることができ、あるいは染色体外複製DNAとすることもできる。本明細書中に記載の典型的なトランスジェニック動物では、導入遺伝子により細胞は1対象ポリペプチドの組換え型、例えば作用薬型または拮抗薬型を発現する。しかし、例えば以下に記載のFLPまたはCREリコンビナーゼ依存性コンストラクトのように、組換え遺伝子がサイレントであるトランスジェニック動物もまた考慮される。さらにまた、「トランスジェニック動物」には、人為的介入、例えば組換え技術およびアンチセンス技術の両者によって、1つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子破壊が生じている組換え動物が含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0136】

本発明は、短鎖脂肪酸がオーファンGタンパク質共役受容体GPR43の天然リガンドであるという発見および薬物スクリーニング方法において受容体に対するこのリガンドの結合を用いる方法に基づくものである。既知のリガンドおよびその受容体GPR43との相互作用はまた、受容体活性の調節不全が関与する症状の診断を提供する。本発明はまた、GPR43および相同配列、その対応するポリヌクレオチドおよび/またはこのポリヌクレオチドを発現する組換え細胞を含むキットであって、この受容体ポリペプチドおよび

10

20

30

40

50

／またはその対応するポリヌクレオチドの作用薬、拮抗薬および逆作用薬化合物を同定するためのキットに関する。このようなキットは、GPR43活性に関連する疾患および障害の診断、予防および／または処置に有用である。

【0137】

本発明はまた、本発明の方法にしたがって同定される、この受容体ポリペプチドおよびその対応するポリヌクレオチドの新規作用薬、拮抗薬および逆作用薬化合物に関する。

【0138】

本明細書中で引用されるすべての参考文献は、引用によりその全開示内容が本明細書中に包含される。

【0139】

配列

本発明は、GPR43をコードするヌクレオチド配列（配列番号1）およびアミノ酸配列（配列番号2）に関する（図1に示す）。本発明はまた、GPR43をコードするヌクレオチド配列およびアミノ酸配列と相同な配列に関する。

【0140】

GPR43組織分布

GPR43は主に好中球で発現され、より低い程度には、単球、マクロファージ、Tリンパ球、ならびに脾臓および骨髄で発現されている。そのmRNAはまた、好酸球および肥満細胞で弱く検出される。その発現は、サイトカインおよびLPS刺激によって高められ、これにより白血球分化および活性化に役割を果たす可能性が示唆される（Senga et al., 2002）。

【0141】

配列相同性の計算

本明細書中に記載の任意の配列に関する配列同一性は、いずれか1つまたはそれ以上の配列を別の配列とシンプルに「肉眼」比較（すなわち厳密に比較）し、この別の配列がこの配列（群）に対して、例えば、少なくとも80%の配列同一性を有するか否かを確かめることによって決定可能である。

【0142】

相対的配列同一性はまた、任意の適当な同一性測定用アルゴリズムを、例えばデフォルトパラメータを用いて使用し、2つまたはそれ以上の配列間の%同一性を算出可能な市販のコンピュータプログラムによって決定することができる。このようなコンピュータプログラムの典型的な例はCLUSTALである。2配列間の同一性および類似性を測定する他のコンピュータプログラム方法には、GCGプログラムパッケージ（Devereux et al(1984) Nucl eicAcids Research 12: 387）およびFASTA（Atschul et al(1990) J Molec Biol 403-410）が含まれるが、これらに限定されない。

【0143】

%相同性は近接する配列にわたって計算することができる。すなわち、1配列が他の配列とアライメントされ、1配列内の各アミノ酸が他の配列内の対応するアミノ酸と1残基ずつ直接比較される。これは「ギャップのない」アライメントと称される。典型的にギャップのないアライメントは比較的少数の残基にわたってのみ行われる。

【0144】

この方法は非常にシンプルで一貫性のある方法であるが、この方法では、例えば別の同一対の配列において、1挿入または欠失があれば、それ以降のアミノ酸残基がアライメントから排除されるため、広範囲のアライメントが行われる場合には%相同性が大きく減少する可能性があることを考慮していない。したがって、ほとんどの配列比較方法は、全体の相同性スコアを不当に不利にすることなく、挿入および欠失の可能性を考慮する最適なアライメントを実行するように設計されている。これは局所相同性を最大にするように、配列アライメントに「ギャップ」を挿入することによって達成される。

【0145】

一方、これらのより複雑な方法では、アライメント中に生じる各ギャップに「ギャップ

10

20

30

40

50

ペナルティ」を割り当て、同数の同一アミノ酸に関して、可能な限り少ないギャップしか含まない配列アライメント - これは2比較配列間のより高い関連性を反映する - が多数のギャップを含むアライメントより高いスコアを達成する。ギャップの存在に対して相対的に高いコストを課し、このギャップ内の以後の各残基に対しては比較的低いペナルティを課する「アフィンギャップコスト (Affinegapcosts)」が典型的に用いられる。これが最も一般的に用いられるギャップスコア系である。高いギャップペナルティは当然、より少ないギャップしか有さない最適化されたアライメントを生じさせる。ほとんどのアライメントプログラムはギャップペナルティの修正を可能にしている。しかし、このようなソフトウェアを配列比較のために用いる場合、デフォルト値を用いるのが好ましい。例えば、GCGWisconsinBestfitパッケージを用いる場合、アミノ酸配列に関するデフォルトギャップペナルティは、ギャップに対して - 12であり、各延長残基に対して - 4である。

10

【 0 1 4 6 】

したがって最大%相同性の計算は、第一に、ギャップペナルティを考慮する最適アライメントの作成を必要とする。このようなアライメントを実行するのに適当なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ (University of Wisconsin, U. S. A.; Devereuxら (1984) *Nucleic Acids Research* 12: 387) である。配列比較を実行可能な他のソフトウェアの例には、BLASTパッケージ (Ausubel et al (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons)、FASTA (Atschul et al (1990) *J. Mol. Biol.*, 403-410) およびGENEWORKS比較ツールパッケージが含まれるが、これらに限定されない。BLASTおよびFASTAはオフラインおよびオンライン検索によって入手可能である (Ausubel et al (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, ページ7 - 58から7 - 60)。

20

【 0 1 4 7 】

最終%相同性は同一性の観点から測定することができるが、アライメントプロセスそのものは典型的に全か無かの対比較に基づくものではない。その代わりに、化学類似性または進化距離に基づく各対ごとの比較にスコアを割り当てる、スケール化された類似性スコアマトリクスが一般に用いられる。このような一般に用いられるマトリクスの例は、BLOSUM62マトリクス (BLASTプログラムパッケージのデフォルトマトリクス) である。GCGWisconsinプログラムは一般に、公開されているデフォルト値または、提供されていれば、カスタムのシンボル比較テーブルを用いる。GCGパッケージについては公開されているデフォルト値、または他のソフトウェアではデフォルトマトリクス、例えばBLOSUM62を使用するのが好ましい。

30

【 0 1 4 8 】

BLASTアルゴリズムはパラメータをデフォルト値に設定して用いるのが有益である。BLASTアルゴリズムはhttp://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlに詳細に記載され、これは引用により本明細書中に包含される。検索パラメータは以下のように定義されており、これらは規定のデフォルトパラメータに設定するのが有益である。

【 0 1 4 9 】

「実質的同一性」とは、BLASTによって評価される場合、少なくとも約7、好ましくは9、そして最も好ましくは10またはそれ以上のEXPECT値と一致する配列と同じである。BLAST検索のEXPECTに関するデフォルトの閾値は通常10である。

40

【 0 1 5 0 】

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) は、プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxによって用いられる発見的検索アルゴリズムである。これらのプログラムはその有意性をKarlinおよびAltschulの統計的方法 (KarlinおよびAltschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-68; KarlinおよびAltschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-7; http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.htmlを参照) を2、3強化して用いる調査結果に帰する。BLASTプログラムは配列類似性検索用に、例えばクエリー配列に対する相同体を同定するように調整されている。配列データ

50

ベースの類似性検索における基本的問題の議論に関しては、Altschulら (1994) Nature Genetics 6: 119-129を参照のこと。

【 0 1 5 1 】

http://www.ncbi.nlm.nih.govで入手可能な5つのBLASTプログラムは以下のタスクを実行する：blastp - アミノ酸クエリー配列をタンパク質配列データベースと比較する；blastn - ヌクレオチドクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較する；blastx - ヌクレオチドクエリー配列（両鎖）の6フレーム概念翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較する；tblastn - タンパク質クエリー配列を、全6リーディングフレーム（両鎖）で動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースと比較する；tblastx - ヌクレオチドクエリー配列の6フレーム翻訳物をヌクレオチド配列データベースの6フレーム翻訳物と比較する。

10

【 0 1 5 2 】

BLASTは以下の検索パラメータを用いる：

HISTOGRAM - 各検索スコアに関するヒストグラムを表示する；デフォルトはイエスである（BLASTマニュアルのパラメータHを参照のこと）。

【 0 1 5 3 】

DESCRIPTIONS - 一致配列について報告される簡単な記述（description）の数を特定数に制限する；デフォルト制限値は100記述（description）である。（マニュアルページのパラメータVを参照のこと）。

【 0 1 5 4 】

EXPECT - データベース配列との一致の報告に関する統計的有意さの閾値；デフォルト値は10であり、KarlinおよびAltschul (1990)の確率論的モデルにしたがえば、10一致はただ偶然にのみ観察されると予想される。一致の統計的有意さがEXPECT閾値より大きい場合、一致は報告されない。EXPECT閾値が低いほど、よりストリンジェントであり、一致が報告される機会がより少なくなる。分数値も許容される。（BLASTマニュアルのパラメータEを参照のこと）。

20

【 0 1 5 5 】

CUTOFF - 高スコア断片対の報告に関するカットオフスコア。デフォルト値はEXPECT値から算出される（上記を参照のこと）。HSPがデータベース配列に関して報告されるのは、その統計的有意さが、CUTOFF値と等しいスコアを有する単一のHSPの有意さと少なくとも等しい高さである場合にのみである。CUTOFF値が高いほど、よりストリンジェントであり、一致が報告される機会がより少なくなる。（BLASTマニュアルのパラメータSを参照のこと）。典型的には、有意さの閾値はEXPECTを用いて比較的感覚的に管理される。

30

【 0 1 5 6 】

ALIGNMENTS - 高スコア断片対（HSP）報告の対象であるデータベース配列を特定数に制限する；デフォルト制限値は50である。この値より多数のデータベース配列が報告に関する統計的有意さの閾値を満たす場合（本明細書中のEXPECTおよびCUTOFFを参照のこと）、高い統計的有意さを示す一致のみが報告される。（BLASTマニュアルのパラメータBを参照のこと）。

【 0 1 5 7 】

MATRIX - BLASTP、BLASTX、TBLASTNおよびTBLASTXに関して代替のスコアリングマトリクスを特定する。デフォルトマトリクスはBLOSUM62である（Henikoff & Henikoff, 1992）。有効な代替の選択には、PAM40、PAM120、PAM250およびIDENTITYが含まれる。BLASTNについては利用可能な代替のスコアリングマトリクスがない；BLASTNリクエストにMATRIXコマンドを特定すると、エラー応答が返される。

40

【 0 1 5 8 】

STRAND - TBLASTN検索をデータベース配列のトップ鎖またはボトム鎖のみに制限する；またはBLASTN、BLASTXまたはTBLASTX検索をクエリー配列のトップ鎖またはボトム鎖のリーディングフレームのみに制限する。

【 0 1 5 9 】

50

FILTER - Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17: 149-163のSEGプログラムによって測定される、組成の複雑さが低いクエリー配列の断片、またはClaverie & States (1993) Computers and Chemistry 17: 191- 201のXNUプログラム、または、BLAST用には、TatusovおよびLipmanのDUSTプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと)によって測定される、短周期の内部反復からなる断片を隠す。フィルタリングは統計的に有意であるが、生物学的に関心のない報告(例えば通常の酸性残基、塩基性残基またはプロリンリッチ領域に対するヒット)をblast出力から排除し、データベース配列との具体的な照合に利用可能な、クエリー配列の生物学的により関心のある領域を残すことができる。

【0160】

フィルタープログラムによって発見される複雑さが低い配列は、ヌクレオチド配列中では、文字「N」を用いて置換され(例えば「NNNNNNNNNNNNNN」)、タンパク質配列中では、文字「X」を用いて置換される(例えば「XXXXXXXXXX」)。

【0161】

フィルタリングはクエリー配列(またはその翻訳産物)に適用されるのみであり、データベース配列には適用されない。デフォルトフィルタリングはBLASTNに関してはDUSTであり、他のプログラムに関してはSEGである。

【0162】

SWISS-PROTで配列に適用された場合、SEG、XNU、または両者によって何も隠されていないのは異常ではなく、つまりフィルタリングは常に効果を生じると予測するべきでない。さらに、配列全体が隠されていることもあり、これはフィルターされていないクエリー配列に対して報告される任意の一致についての統計的有意さが疑われるべきであることを示す。

【0163】

NCBI-gi - 受入(accession)および/または遺伝子座名に加えて、NCBI gi識別子を出力に表示させる。

【0164】

配列比較は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>で提供されているシンプルBLAST検索アルゴリズムを用いて行われるのが最も好ましい。本発明のいくつかの態様では、配列同一性の測定時にギャップペナルティーを用いない。

【0165】

細胞

本発明の有用な細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳類細胞からなる群から選択されるのが好ましい。

【0166】

本発明の有用な細胞は、本発明の受容体をコードする核酸配列が導入可能で、この受容体が、本明細書中で定義される、天然レベルで、あるいは天然レベル以上に発現可能な任意の細胞であり得る。細胞内で発現される本発明の受容体は、本明細書中で定義される、正常の、または正常に近い薬理作用を示すのが好ましい。最も好ましくは、細胞内で発現される本発明の受容体は、図1に示されるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列、または図1に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含む。細胞内で発現される本発明の受容体は、IDPおよびUDPに関する親和性より少なくとも100倍、好ましくは500倍、そして最も好ましくは1000倍高い親和性でプロピオン酸塩と結合するのが好ましい。

【0167】

本発明の好ましい態様では、細胞は、COS-7細胞、CHO細胞、LM (TK-)細胞、NIH-3T3細胞、HEK-293細胞、K-562細胞または1321N1星細胞腫細胞、または他のトランスフェクション可能な細胞株からなる群から選択される。

【0168】

アッセイ

10

20

30

40

50

I. G P R 4 3 の活性を調節する物質の同定に関するアッセイ

G P R 4 3 の活性を調節する物質は、新規に発見された、当該受容体と S C F A、例えば酢酸塩またはプロピオン酸塩の相互作用を利用する多数の方法によって同定することができる。例えば、インビトロ、培養細胞上またはインビボでの G P R 4 3 / プロピオン酸塩結合再構成能は、この結合を分裂させる物質の同定に関する標的を提供する。結合の分裂に基づくアッセイは、物質、例えば有機小分子をそのような分子のライブラリまたはコレクションから同定できる。別法では、このようなアッセイは、天然ソース（起源）由来の試料または抽出物中、例えば、植物、真菌または細菌抽出物中、またはヒト組織試料（例えば腫瘍組織）中でさえ、物質を同定できる。一側面では、抽出物は変異型核酸、ペプチドまたはポリペプチドのライブラリを発現している細胞から作成できる。その後、G P R 4 3 / S C F A 結合の調節因子は、結合アッセイまたは、当該受容体を介する下流のシグナル伝達を測定する機能アッセイを用いてスクリーニングすることができる。

10

【 0 1 6 9 】

G P R 4 3 機能を調節する物質をより直接的に同定するために G P R 4 3 / S C F A 相互作用を使用する別のアプローチでは、候補物質または候補調節因子によって誘導される G P R 4 3 下流シグナル伝達の変化を測定する。これらの機能アッセイは単離された細胞膜画分中または当該受容体を表面に発現している細胞上で行うことができる。

【 0 1 7 0 】

S C F A、例えば酢酸塩およびプロピオン酸塩が G P R 4 3 受容体のリガンドであることが発見されたことにより、受容体活性の作用薬、拮抗薬および逆作用薬を同定するためのスクリーニングアッセイが可能になる。該スクリーニングアッセイは、以下に詳細に説明する、2つの一般的アプローチを有する。この段落では、プロピオン酸塩を典型的な S C F A として用いる。しかし、本明細書中で定義される任意の S C F A が記載されるアッセイで使用可能であることが理解されよう。

20

【 0 1 7 1 】

1) リガンド結合アッセイ

このアッセイでは、G P R 4 3 発現細胞、このような細胞由来の膜抽出物、または G P R 4 3 を含む固定化脂質膜が標識物質および候補化合物に曝露される。インキュベート後、反応混合物は、G P R 4 3 受容体に対する標識物質の特異的結合を測定される。標識物質の結合を妨げるか、あるいはこれを置換する化合物は、G P R 4 3 活性の作用薬、拮抗薬または逆作用薬となり得る。以後の機能分析は陽性化合物に対して行い、この化合物がこれらいずれの部類に属するか決定することができる。

30

【 0 1 7 2 】

2) 機能アッセイ、このアッセイでは G P R 4 3 のシグナル伝達活性が測定される。

a) 作用薬のスクリーニングでは、G P R 4 3 発現細胞またはこの細胞から調製される膜が候補化合物とインキュベートされ、G P R 4 3 のシグナル伝達活性が測定される。受容体活性を調節する化合物によって誘導される活性は、天然リガンド、酢酸塩またはプロピオン酸塩によって誘導される活性と比較される。作用薬または部分作用薬は、1 mM 以下の作用薬または部分作用薬が存在する場合に、プロピオン酸の最大活性の少なくとも 10% に相当する最大の生物学的活性を有するだろう。これらは酢酸塩またはプロピオン酸塩と少なくとも等しい効力を有するのが好ましい。

40

【 0 1 7 3 】

b) 拮抗薬または逆作用薬のスクリーニングでは、G P R 4 3 発現細胞またはこの細胞から単離される膜を、プロピオン酸塩存在下で、候補化合物の存在または不存在下でシグナル伝達活性に関してアッセイする。拮抗薬は、プロピオン酸塩が刺激する受容体活性のレベルを、プロピオン酸存在下の拮抗薬を欠いている反応と比較して少なくとも 10% 減少させるだろう。逆作用薬は、この受容体の構成性活性を、逆作用薬を欠いている反応と比較して少なくとも 10% 減少させるだろう。

【 0 1 7 4 】

c) 逆作用薬のスクリーニングでは、常時 G P R 4 3 活性を発現している細胞またはこ

50

の細胞から単離される膜が、この受容体の活性を候補化合物の存在下で測定する機能アッセイに用いられる。逆作用薬は、この受容体の常時活性を少なくとも10%減少させる化合物である。GPR43の過剰発現により常時の活性化を生じさせることができる。GPR43は強力な常時性プロモーター、例えばCMV早期プロモーターの制御下に配置することによって過剰発現させることができる。また、保存GPCRアミノ酸またはアミノ酸ドメインの特定変異により常時活性を生じさせることも多い。例えば以下を参照のこと：Kjelsberg et al (1992) J. Biol. Chem. 267: 1430; McWhinney et al (2000) J. Biol. Chem. 275: 2087; Ren et al (1993) J. Biol. Chem. 268: 16483; Samama et al (1993) J. Biol. Chem. 268: 4625; Parma et al (1993) Nature 365: 649; Parma et al (1998) J. Pharmacol. Exp. Ther. 286: 85; およびParent et al (1996) J. Biol. Chem. 271: 79 10

【0175】

リガンド結合および置換アッセイ：

上記(1)に記載されるように、細胞上で発現されているGPR43ポリペプチド、または受容体ポリペプチドを含有する単離された膜を、プロピオン酸塩とともに用いて、プロピオン酸塩とGPR43の結合を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。この段落では、プロピオン酸塩を典型的なSCFAとして用いる。しかし、本明細書中で定義される任意のSCFAが記載されるアッセイで使用可能であることが理解されよう。

【0176】

置換実験では、GPR43ポリペプチド発現細胞(通常25,000細胞/アッセイ、または膜抽出物1から100 μ g)は、結合バッファー中、増加濃度の候補調節因子の存在または不存在下で、標識プロピオン酸塩とインキュベートされる。アッセイを有効にし、較正するために、増加濃度の標識されていないプロピオン酸塩を用いるコントロール競合反応を行うことができる。インキュベート後、細胞は何度も洗浄され、結合した標識プロピオン酸塩が特定の標識に応じて適切に(例えばシンチレーション計測、蛍光、等)測定される。候補調節因子の存在下で、結合した標識プロピオン酸塩量の少なくとも10%が減少すれば、候補調節因子によって結合が置換されたことが示される。候補調節因子が、このアッセイまたは本明細書中に記載の他のアッセイで特異的に結合するとみなされるのは、1mM以下の濃度で、標識プロピオン酸塩(飽和以下プロピオン酸塩用量)の50%を置換する場合である。 20 30

【0177】

別法では、結合または結合の置換は、表面プラズモン共鳴(SPR)によりモニターできる。表面プラズモン共鳴アッセイは、固定センサーに近接する質量の変化によって2分子間の結合を測定する定量的方法として用いることができ、この質量の変化は、水相由来プロピオン酸塩とセンサー上の膜内に固定されたGPR43ポリペプチドの結合または結合の喪失によって生じる。この質量の変化は、プロピオン酸塩または候補調節因子の注入または除去後の時間に対する共鳴単位として測定され、Biacore Biosensor (BiacoreAB)を用いて測定される。GPR43は、Salamonらによって示される方法にしたがって、薄膜脂質膜中のセンサーチップ(例えば研究等級CM5チップ; BiacoreAB)に固定することができる(Salamon et al (1996) Biophys J. 71: 283-294; Salamon et al (2001) Biophys. J. 80: 1557-1567; Salamon et al (1999) Trends Biochem. Sci. 24: 213-219、これらはそれぞれ引用により本明細書中に包含される)。Sarrionらは、SPRを用いて、チップ上の脂質層に固定されているGPCRA(1)アデノシン受容体に対するリガンド結合を検出できることを示した(Sarrionら(2000) Mol. Cell. Biol. 20: 5164-5174、これは引用により本明細書中に包含される)。SPRアッセイにおけるGPR43に対するプロピオン酸塩結合の条件は、当業者がSarrionらによって報告されている条件を出発点として用いて微調整可能である。 40

【0178】

SPRは、少なくとも2つの方法で、結合の調節因子に関してアッセイすることができる。第一に、プロピオン酸塩は、固定されたGPR43ポリペプチドにあらかじめ結合さ 50

せておくことができ、次いで、 0.1 nM から $1 \text{ }\mu\text{M}$ の範囲の候補調節因子が注入される。結合プロピオン酸塩の置換は定量可能であり、調節因子結合の検出が可能になる。別法では、膜結合GPR43ポリペプチドは、候補調節因子とプレインキュベート可能であり、これがプロピオン酸塩で惹起される。調節因子にあらかじめ曝露されていないチップ上のGPR43と比較して、調節因子に曝露されたGPR43に対するプロピオン酸塩の結合に差異があれば、調節因子の存在下でのプロピオン酸塩の結合または置換が示されることになる。いずれのアッセイでも、候補調節因子存在下の結合プロピオン酸塩の量が、候補調節因子不存在下の結合プロピオン酸塩の量と比較して10%またはそれ以上減少すれば、該候補調節因子がGPR43およびプロピオン酸塩の相互作用を阻害することが示される。

10

【0179】

GPR43に対するプロピオン酸塩の結合の阻害を検出する別の方法では、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)が用いられる。FRETは、互いに近接している(通常、 $< 100 \text{ \AA}$ の分離)蛍光ドナー(D)および蛍光アクセプター(A)間で、Dの発光スペクトルがAの励起スペクトルと重複する場合に生じる量子力学的現象である。試験対象分子、例えばプロピオン酸およびGPR43ポリペプチドは、ドナーおよびアクセプターフルオロフォアの相補対で標識されている。GPR43:プロピオン酸塩相互作用によって密接に結合した状態で、ドナーフルオロフォアが励起されて発光する蛍光は、プロピオン酸塩およびGPR43ポリペプチドが結合していない場合の励起波長にตอบสนองして発光する蛍光と異なる波長を有し、したがって各波長の発光強度を測定することにより結合分子対未結合分子が定量される。GPR43ポリペプチドを標識するためのドナーフルオロフォアは当技術分野に周知である。特に興味深いのは、Cyan FP(CFP、ドナー(D))およびYellow FP(YFP、アクセプター(A))として既知のA.Victoria GFPの変異体である。例として、GPR43との融合タンパク質としてYFP変異体を作成できる。融合物としてのGFP変異体を発現するベクター(Clontech)およびフルオロフォア標識されたプロピオン酸塩化合物(Molecular Probes)は当技術分野で既知である。標識プロピオン酸塩およびYFP-GPR43タンパク質の混合物に候補調節因子を加えると、例えば、候補調節因子を含まない試料と比較してYFP蛍光が減少し、エネルギー転移の阻害が生じたことが証明されるだろう。GPR43:プロピオン酸相互作用検出のためにFRETを用いるアッセイでは、候補調節因子含有試料中のアクセプター波長での蛍光発光強度が、候補調節因子を含まない試料と比較して10%またはそれ以上減少すれば、この候補調節因子がGPR43:プロピオン酸塩相互作用を阻害することが示される。

20

30

【0180】

FRETのバリエーションでは、蛍光消光を用いて分子の相互作用をモニターする。相互作用ペアの一方の分子をフルオロフォアで標識し、他方は、フルオロフォアと密接付着に至るとその蛍光を消光する分子で標識することができる。励起時の蛍光変化は、フルオロフォア:消光剤ペアで標識された分子の会合の変化を示す。一般に、標識GPR43ポリペプチドの蛍光が増大すれば、消光剤を保持するプロピオン酸塩分子が置換されたことを示す。消光アッセイでは、候補調節因子含有試料中の蛍光発光強度が、候補調節因子を含まない試料と比較して10%またはそれ以上増大すれば、この候補調節因子がGPR43:プロピオン酸塩相互作用を阻害することが示される。

40

【0181】

表面プラスモン共鳴およびFRET法に加えて、蛍光偏光測定が結合の定量に有用である。蛍光標識された分子に関する蛍光偏光値は回転相関時間または反転速度に依存する。複合体、例えば蛍光標識プロピオン酸塩と会合したGPR43によって形成される複合体は、複合体でない標識プロピオン酸塩より高い偏光値を有する。GPR43:プロピオン酸塩相互作用の候補阻害剤を含むことにより、候補阻害剤を含まない混合物と比較して蛍光偏光が減少するのは、該候補阻害剤がGPR43とプロピオン酸塩の相互作用を分裂させるか、あるいは阻害する場合である。蛍光偏光は、受容体:リガンド複合体の形成を乱す小分子の同定に非常に適している。候補調節因子含有試料中の蛍光偏光が、候補調節因

50

子を欠いている試料中の蛍光偏光と比較して10%またはそれ以上減少すれば、この候補調節因子がGPR43：プロピオン酸塩相互作用を阻害することが示される。

【0182】

GPR43：プロピオン酸塩相互作用をモニターするもう1つの代替の方法では、バイオセンサーアッセイが用いられる。ICSバイオセンサーは当技術分野の文献に記載されている(Australian Membrane Biotechnology Research Institute; www.ambri.com.au/; Cornell B, Braach-Maksvytis V, King L, Osman P, Raguse B, Wieczorek LおよびPace R. "A biosensor that uses ion-channel switches" Nature 1997, 387, 580)。この技術では、GPR43およびそのリガンドの会合を、懸濁膜二重層中のグラミシジン(gramacidin)促進性イオンチャネルの閉塞と、すなわちバイオセンサーアドミタンス(インピーダンスと類似)の測定可能な変化と共役させる。このアプローチは6桁の振幅のアドミタンス変化にわたって線形であり、小分子の組み合わせライブラリの大規模なハイスループットスクリーニングに理想的に適している。候補調節因子含有試料中のアドミタンスが、候補調節因子を欠いている試料のアドミタンスと比較して10%またはそれ%以上変化(増大または減少)すれば、該候補調節因子がGPR43およびプロピオン酸塩の相互作用を阻害することが示される。GPR43とプロピオン酸塩の相互作用を試験するアッセイでは、相互作用の調節因子が、プロピオン酸塩と物理的に相互作用しているタンパク質のドメイン(群)と必ずしも直接相互作用することを要しないことに注意することが重要である。また調節因子は、相互作用部位から離れた位置で相互作用し、例えばGPR43ポリペプチドのコンフォメーション変化を生じさせることが可能である。それでもなお、この様式で作用する調節因子(阻害剤または作用薬)は、GPR43の活性を調節する物質として興味深い。

【0183】

本明細書中に記載の任意の結合アッセイが、GPR43の非プロピオン酸塩リガンド(例えば、作用薬、拮抗薬、等)を用いて実行可能であることが理解されよう。これは例えば、本明細書中に記載のように同定される小分子またはプロピオン酸塩アナログ、例えば非限定的に、任意のプロピオン酸塩アナログ、天然産のまたは合成ペプチド、ポリペプチド、抗体またはその抗原結合断片、脂質、炭水化物、および有機小分子である。

【0184】

本明細書中に記載される任意の結合アッセイを用いて、試料、例えば組織試料中の、GPR43受容体分子と結合する物質、またはプロピオン酸塩と該受容体の結合に影響する物質の存在を決定することができる。この場合、GPR43ポリペプチドを、試料の存在または不存在下でプロピオン酸塩または別のリガンドと反応させ、プロピオン酸塩またはリガンドの結合を、使用される結合アッセイに応じて適切に測定する。プロピオン酸塩または他のリガンドの結合が10%またはそれ以上減少すれば、該試料が、受容体ポリペプチドに対するプロピオン酸塩またはリガンドの結合を調節する物質を含有することが示される。

【0185】

受容体活性の機能アッセイ

【0186】

i. GTPアーゼ/GTP結合アッセイ:

GPCR、例えばGPR43に関して、受容体活性の基準は受容体含有細胞膜によるGTPの結合である。引用により本明細書中に包含されるTraynorおよびNahorski (1995) Mol. Pharmacol. 47: 848-854に記載される方法では、標識GTPの結合を検出することによって、膜と共役したGタンパク質が本質的に測定される。GTP結合アッセイでは、この受容体を発現する細胞から単離された膜が、以下を含有するバッファー中でインキュベートされる: 20mMHEPES、pH7.4、100mMNaCl、および10mMMgCl₂、80pM ³⁵S-GTP Sおよび3 μMGDP。このアッセイ混合物は30 で60分間インキュベートされ、その後、未結合の

10

20

30

40

50

標識 G T P が G F / B フィルターでろ過され、除去される。結合した標識 G T P が液体シンチレーション計測によって測定される。プロピオン酸塩誘導性 G P R 4 3 活性の調節をアッセイするために、G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞から調製された膜が、プロピオン酸塩と混合され、G P R 4 3 活性の候補調節因子の存在および不存在下で G T P 結合アッセイが行われる。候補調節因子を含有するこの種のアッセイでのシンチレーション計測によって測定される標識 G T P の結合が、この調節因子を含まないアッセイと比較して 10 % またはそれ以上増大すれば、この候補調節因子が G P R 4 3 活性を阻害することが示される。プロピオン酸塩を用いずに同様の G T P 結合アッセイを行い、作用薬として作用する化合物を同定することができる。この場合、プロピオン酸塩刺激性 G T P 結合は標準として用いられる。化合物が作用薬とみなされるのは、 $1 \mu\text{M}$ またはそれ以下で存在する場合に、プロピオン酸塩によって誘導される G T P 結合レベルの少なくとも 50 % を誘導する場合であり、プロピオン酸塩によって誘導されるレベルと等しいか、あるいはより高いレベルを誘導するのが好ましい。G T P アーゼ活性は、G P R 4 3 ポリペプチド含有膜を $^3\text{P} - \text{G T P}$ とインキュベートすることによって測定される。活性 G T P アーゼはこの標識を無機リン酸塩として放出し、この無機リン酸塩が、 $20 \text{mM H}_3\text{PO}_4$ 中の 5 % 活性炭懸濁液中の遊離の無機リン酸塩の分離、その後のシンチレーション計測によって検出される。コントロールは、G P R 4 3 を発現していない（偽トランスフェクト）細胞から単離された膜を用いるアッセイを含み、候補化合物の非特異的作用の可能性が排除される。

10

【 0 1 8 7 】

20

G P R 4 3 調節性 G T P アーゼ活性に対する候補調節因子の作用をアッセイするためには、膜試料がこの調節因子の存在および不存在下でプロピオン酸塩とインキュベートされた後、G T P アーゼアッセイが行われる。G T P 結合または G T P アーゼ活性のレベルが、調節因子を含まない試料と比較して 10 % またはそれ以上変化（増大または減少）すれば、候補調節因子による G P R 4 3 の調節が示される。

【 0 1 8 8 】

ii . 下流経路活性化アッセイ :

【 0 1 8 9 】

a . カルシウム流動 - エクオリンに基づくアッセイ :

エクオリンアッセイは、G P C R の活性化によって誘導される細胞内カルシウム放出に対するミトコンドリアアポエクオリンの反応性を利用するものである（Stables et al (1997) Anal. Biochem. 252: 115-126; Detheux et al (2000) J. Exp. Med., 1921501-1508; これらは共に引用により本明細書中に包含される）。簡単には、G P R 4 3 発現クローンがトランスフェクトされ、ミトコンドリアアポエクオリンおよび G 1 6 が同時発現される。細胞は $5 \mu\text{M}$ コエレンテラジン H (Coelenterazine H) (Molecular Probes) と室温で 4 時間インキュベートされ、D M E M - F 1 2 培養培地で洗浄され、濃度 0.5×10^6 細胞 / m l で再懸濁される。次いで細胞は試験作用薬分子と混合され、エクオリンによる光放出が照度計で 30 秒間記録される。結果は相対光単位 (Relative Light Units (R L U)) として記載される。コントロールは、G P R 4 3 を発現していない（偽トランスフェクト）細胞から単離された膜を用いるアッセイを含み、候補化合物の非特異的作用の可能性が排除される。

30

40

【 0 1 9 0 】

エクオリン活性または細胞内カルシウムレベルが「変化する」のは、G P R 4 3 ポリペプチドを発現し、かつ候補調節因子で処理された細胞の試料中の光強度が、G P R 4 3 ポリペプチドを発現していない（偽トランスフェクト細胞）が、候補調節因子で処理された細胞の試料と比較して 10 % またはそれ以上増大または減少した場合である。

【 0 1 9 1 】

プロピオン酸塩不存在下で行われる場合は、前記アッセイを用いて、G P R 4 3 活性の作用薬を同定することができる。前記アッセイがプロピオン酸塩の存在下で行われる場合は、これを用いて、拮抗薬についてアッセイすることができる。

50

【 0 1 9 2 】

b . アデニル酸シクラーゼアッセイ :

アデニル酸シクラーゼ活性に関するアッセイは、Kenimer & Nirenberg (1981) Mol. Pharmacol. 20: 585-591に記載され、これは引用により本明細書中に包含される。このアッセイは、引用により本明細書中に包含されるSolomon et al (1974) Anal. Biochem. 58: 541-548) に教示されているアッセイの修飾法である。簡単には、100 μ L 反応物は50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM MgCl₂、20mM クレアチンリン酸 (2ナトリウム塩)、10ユニット (タンパク質71 μ g) のクレアチンホスホキナーゼ、1mM ³²P-ATP (テトラナトリウム塩、2 μ Ci)、0.5mM 環状AMP、G - ³H - 標識環状AMP (約10,000cpm)、0.5mM Ro20-1724、0.25% エタノール、および試験対象のタンパク質ホモジネート (すなわち、候補調節因子の存在または不存在下、プロピオン酸塩で処理されているか、または処理されていない、GPR43ポリペプチドを発現しているか、または発現していない細胞由来のホモジネート) 50-200 μ g を含有する。反応混合物は一般に、37°C で60分間インキュベートされる。インキュベート後、反応混合物は冷6%トリクロロ酢酸0.9mLの添加により除タンパクされる。試験管は1800 x g で20分間遠心分離され、各上澄溶液がDowex AG50W-X4カラムに添加される。カラム由来のcAMP画分は0.1mM イミダゾール-HCl (pH7.5) 4mLを用いて計測バイアル中へ溶出される。アッセイは3回行われるべきである。またコントロール反応は、GPR43ポリペプチドを発現していない細胞由来のタンパク質ホモジネートを用いて行われるべきである。

10

【 0 1 9 3 】

本発明で、アデニル酸シクラーゼ活性が「変化する」のは、GPR43活性の候補調節因子で処理された細胞由来の試料中で、候補調節因子で処理されていない細胞の同様の試料またはGPR43ポリペプチドを発現していない (偽トランスフェクト細胞) が、候補調節因子で処理された細胞の試料と比較して10%またはそれ以上増大または減少した場合である。

20

【 0 1 9 4 】

c . cAMPアッセイ :

細胞内または細胞外cAMPは、当技術分野に広く既知の方法にしたがい、cAMP放射免疫アッセイ (RIA) またはcAMP結合タンパク質を用いて測定される。例えば、引用により本明細書中に包含されるHorton & Baxendale (1995) Methods Mol. Biol. 41: 91-105はcAMPに関するRIAを記載している。

30

【 0 1 9 5 】

cAMP測定用の多数のキットが市販されている。例えば、LJL BiosystemsおよびNEN Life Science Productsにより市販されているHigh Efficiency Fluorescence Polarization-based homogeneous assayがある。コントロール反応は偽トランスフェクト細胞の抽出物を用いて行い、これにより候補調節因子の非特異的作用の可能性が排除される。

【 0 1 9 6 】

cAMPのレベルが「変化する」のは、Horton & Baxendale (1995) 上記のRIAに基づくアッセイを用いて、GPR43ポリペプチドを発現し、GPR43活性の候補調節因子で処理された細胞 (またはそのような細胞の抽出物) 中で検出されるcAMPのレベルが、候補調節因子で処理されていない同様の細胞中のcAMPレベルと比較して少なくとも10%増大または減少した場合である。

40

【 0 1 9 7 】

d . リン脂質分解、DAG生産およびイノシトール三リン酸レベル :

リン脂質の分解を活性化する受容体は、リン脂質分解、およびその結果のセカンドメッセンジャーDAGおよび/またはイノシトール三リン酸 (IP3) 生産をモニターすることによって、GPR43の既知または推定の調節因子の活性を原因とする変化に関してモニターできる。これらそれぞれの検出方法は、Ian M. Bard, Totowa, NJ, Humana Press (1998) 編集のPhospholipid Signalling Protocolsに記載され、これは引用により本明細書中に包含される。また引用により本明細書中に包含されるRudolph et al (1999) J. Biol. Chem.

50

em.274:11824-11831を参照のこと、これはホスファチジルイノシトール分解に関するアッセイを記載している。アッセイは、候補調節因子の存在または不存在下、プロピオン酸塩で処理されたか、または処理されていないGPR43発現細胞または細胞抽出物を用いて行われるべきである。コントロール反応は、偽トランスフェクト細胞またはそれ由来の抽出物を用いて行い、これにより候補調節因子の非特異的作用の可能性が排除される。

【0198】

本発明で、ホスファチジルイノシトール分解、およびジアシルグリセロールおよび/またはイノシトール三リン酸レベルが「変化する」のは、候補調節因子で処理されたGPR43ポリペプチド発現細胞由来の試料中で、候補調節因子で処理されていないGPR43ポリペプチド発現細胞由来の試料中で観察されるレベルと比較して少なくとも10%増大または減少した場合である。

10

【0199】

e. PKC活性化アッセイ :

成長因子受容体チロシンキナーゼはプロテインキナーゼC (PKC) の活性化が関与する経路を介してシグナルを伝達できる。PKCはリン脂質 - およびカルシウム - 活性化プロテインキナーゼのファミリーである。PKC活性化は最終的に、一連の原癌遺伝子転写因子をコードする遺伝子、例えばc-fos、c-myc、およびc-jun、プロテアーゼ、プロテアーゼ阻害剤、例えばI型コラゲナーゼおよびプラスミノゲン活性化剤阻害剤、および接着分子、例えば細胞内接着分子I (ICAM1) の転写を生じさせる。アッセイは、PKCによって誘導される遺伝子産物の増大を検出するように設計されており、これを用いて、PKC活性化、すなわち受容体活性をモニターできる。さらに、PKCを介してシグナル伝達する受容体の活性は、PKC活性化によって活性化される遺伝子の調節配列により駆動されるレポーター遺伝子コンストラクトの使用を介してモニターできる。このタイプのレポーター遺伝子に基づくアッセイは以下により詳細に議論されている。

20

【0200】

PKCのより直接的な測定では、引用により本明細書中に包含されるKikkawa et al (1982) J. Biol. Chem. 257: 13341の方法を用いることができる。このアッセイはPKC基質ペプチドのリン酸化を測定する。当該リン酸化ペプチドは次いでホスホセルロースペーパーとの結合により分離される。このPKCアッセイ系を用いて、精製キナーゼの活性または粗製の細胞抽出物中の活性を測定できる。プロテインキナーゼC試料はアッセイの直前に20mMHEPES/2mMDTT中で希釈することができる。

30

【0201】

前記アッセイの基質はミリストイル化アラニンリッチプロテインキナーゼC基質タンパク質 (MARCKS) から誘導されたペプチドAc-FKKSFKL-NH₂ (配列番号3) である。該ペプチドに対する酵素のK_mは約50 μMである。また、当技術分野に既知の他の塩基性プロテインキナーゼC選択的ペプチドをそれぞれのK_mの少なくとも2 - 3倍の濃度で用いることができる。アッセイに必要なとされる補因子には、カルシウム、マグネシウム、ATP、ホスファチジルセリンおよびジアシルグリセロールが含まれる。使用者の所望により、アッセイを行ってPKC存在量 (活性化用条件) または活性PKC存在量 (非活性化用条件) を測定できる。ほとんどの本発明目的のためには、非活性化用条件が用いられ、活性化可能なPKCの測定ではなく、単離時の試料中で活性なPKCが測定される。非活性化用条件では、EGTAによりカルシウムはアッセイから除去される。

40

【0202】

前記アッセイは以下を含有する混合物中で行われる: 20 mM HEPES、pH 7.4、1-2 mM DTT、5 mM MgCl₂、100 μM ATP、~1 μCi ⁻³²P-ATP、100 μg/ml ペプチド基質 (~100 μM)、140 μM/3.8 μM ホスファチジルセリン/ジアシルグリセロール膜、および100 μMカルシウム (または500 μM MEGTA)。試料48 μlは20mM HEPES、pH7.4、2mM DTT 中で希釈され、最終反応容量80 μlで用いられる。反応は30 で5 - 10分間行われ、その後100mM ATP、100 mM EDTA、pH8.0溶液25 μlの添加により反応が停止される。

【0203】

50

反応の停止後、各反応物の一部 (8 5 μ l) がWhatman P81リン酸セルロースフィルターにスポットされ、次いで 0 . 4 % リン酸 5 0 0 m l 中で 4 回洗浄され (5 - 1 0 分 / 洗浄)、9 5 % エタノール 5 0 0 m l 中で 2 - 5 分間最終洗浄される。シンチレーション計測により結合放射能が測定される。標識 A T P の特異的活性 (cpm / nmol) は、反応物の試料を P81 ペーパーにスポットし、洗浄せずに計測することによって測定される。転移されたリン酸 nmol / 分として定義される P K C 活性のユニットは以下のように算出される :

活性ユニット (nmol / 分) は :

$$= (\text{ペーパー上cpm}) \times (\text{トータル } 1 0 5 \mu \text{ l} / \text{スポットされた } 8 5 \mu \text{ l}) / (\text{アッセイ時間、分}) (\text{A T P の特異的活性 cpm/nmol}) .$$

10

【 0 2 0 4 】

別のアッセイはPanVeraより販売されているプロテインキナーゼ C アッセイキット (Protein Kinase C Assay Kit (Cat.#P2747)) を用いて行うことができる。

【 0 2 0 5 】

アッセイは、候補調節因子の存在または不存在下で、プロピオン酸で処理されたか、あるいは処理されていない G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞由来の抽出物に対して行われる。コントロール反応は偽トランスフェクト細胞またはその抽出物を用いて行われ、候補調節因子の非特異的作用の可能性が排除される。

【 0 2 0 6 】

本発明で、候補調節因子により P K C 活性が「変化する」のは、上記いずれかのアッセイにより測定される P K C のユニットが、候補調節因子で処理された G P R 4 3 発現細胞由来の抽出物中で、候補調節因子で処理されていない細胞由来の同様の試料に対して行われる反応と比較して少なくとも 1 0 % 増大または減少する場合である。

20

【 0 2 0 7 】

f . キナーゼアッセイ :

M A P キナーゼ活性は、市販されているいくつかのキットのいずれかを用いてアッセイすることができる。このようなキットは例えば、New England Biolabsにより販売されている p38MAP キナーゼアッセイキット (Cat#9820) または Perkin-Elmer Life Sciences により販売されている Flash PlateTM MAP キナーゼアッセイである。

【 0 2 0 8 】

30

M A P キナーゼ活性が「変化する」のは、候補調節因子で処理された G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞由来の試料中の活性のレベルが、候補調節因子で処理されていない同様の細胞由来の試料中の M A P キナーゼ活性と比較して 1 0 % またはそれ以上増大または減少する場合である。

【 0 2 0 9 】

既知の合成または天然チロシンキナーゼ基質および標識リン酸を用いるチロシンキナーゼ活性の直接アッセイは、他の型のキナーゼ (例えば、セリン / スレオニンキナーゼ) に関する同様のアッセイのように周知である。キナーゼアッセイは、候補調節因子の存在または不存在下で、プロピオン酸塩で処理されたか、あるいは処理されていない G P R 4 3 ポリペプチド発現細胞由来の精製キナーゼおよび粗製の抽出物の両者を用いて行うことができる。コントロール反応は偽トランスフェクト細胞またはその抽出物を用いて行い、これにより候補調節因子の非特異的作用の可能性が排除される。基質は完全長タンパク質または該基質を代替する合成ペプチドであってよい。Pinna & Ruzzene (1996) Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225 (これは引用により本明細書中に包含される) はキナーゼ活性の検出に有用な多数のリン酸化基質部位をリストしている。多数のキナーゼ基質ペプチドが市販されている。特に有用なものは、「Src関連ペプチド」、RRLIEDAEYAARG (配列番号 4 ; Sigmaより入手可能#A7433) であり、これは多数の受容体および非受容体チロシンキナーゼの基質である。以下に記載のアッセイは、フィルターに対するペプチド基質の結合を必要とするため、このペプチド基質は結合を促す正味の正電荷を有するべきである。一般に、ペプチド基質は少なくとも 2 つの塩基性残基および遊離のアミノ末端を有するべ

40

50

きである。一般に反応は 0.7 - 1.5 mM のペプチド濃度を用いる。

【0210】

アッセイは一般に、以下を含む 25 μ l 容量中で行われる：5x キナーゼバッファ-5 μ l (5 mg/ml BSA、150mM Tris-Cl (pH7.5)、100mM MgCl₂; アッセイ対象のキナーゼに的確に応じて MgCl₂ の代わりに、あるいはそれに加えて、MnCl₂ を用いることができる)、5 μ l の 1.0mM ATP (0.2mM 最終濃度)、³²P-ATP (100-500 cpm/pmol) 3 μ l の 10mM ペプチド基質 (1.2mM 最終濃度)、試験対象のキナーゼを含有する細胞抽出物 (キナーゼアッセイに使用される細胞抽出物はホスファターゼ阻害剤 (例えば 0.1-1mM オルトバナジウム酸ナトリウム) を含有すべきである)、および 25 μ l までの水。反応は 30 秒で行い、細胞抽出物の添加によって開始される。

10

【0211】

キナーゼ反応は 30 秒から約 30 分間行われ、その後、氷冷 10% トリクロロ酢酸 (TCA) 45 μ l が添加される。試料を微量遠心機中で 2 分間回転させ、上清 35 μ l が Whatman P81 リン酸セルロースフィルターサークルへスポットされる。このフィルターは冷 0.5% リン酸 500 ml で 3 回洗浄され、その後、室温で 5 分間、アセトン 200 ml で 1 回洗浄される。フィルターが乾燥され、取り込まれた ³²P がシンチレーション計測によって測定される。キナーゼ反応物中の ATP の (例えば cpm/pmol 単位の) 特異的活性は、反応の小試料 (2 - 5 μ l) を P81 フィルターサークル上へスポットし、洗浄せずに直接計測することによって決定される。次いで、このキナーゼ反応で得られるカウント / 分 (ブランクを除く (minus blank)) が特異的活性で除算されることにより、反応中の転移されたリン酸のモル数が測定される。

20

【0212】

チロシンキナーゼ活性が「変化する」のは、候補調節因子で処理された GPR43 ポリペプチド発現細胞由来試料中のキナーゼ活性のレベルが、候補調節因子で処理されていない同様の細胞由来試料中のキナーゼ活性と比較して 10% またはそれ以上増大または減少する場合である。

【0213】

g. 下流経路活性化に関する転写レポーター :

受容体、例えば GPR43 に対する作用薬の結合によって開始される細胞内シグナルは細胞内イベントのカスケードを開始し、最終的に 1 つまたはそれ以上の遺伝子の転写または翻訳の急速かつ検出可能な変化を生じさせる。したがって受容体の活性は、GPR43 活性化に応答する調節配列によって駆動されるレポーター遺伝子の発現を検出することによってモニターできる。

30

【0214】

本明細書中で用いる「プロモーター」とは、遺伝子発現の受容体媒介性調節に必要な転写調節エレメントを意味し、これには基本的プロモーターだけでなく、受容体によって制御される発現に必要な任意のエンハンサーまたは転写因子結合部位が含まれる。作用薬結合の結果である細胞内シグナルに応答するプロモーターを選択し、該選択プロモーターを、転写、翻訳または最終的活性が容易に検出可能で測定可能なレポーター遺伝子と作動可能に連結することによって、転写に基づくレポーターアッセイは、特定の受容体が活性化されているか否かの迅速な指標を提供する。

40

【0215】

ルシフェラーゼ、CAT、GFP、 β -ラクタマーゼまたは β -ガラクトシダーゼのようなレポーター遺伝子は、当該産物の検出に関するアッセイとともに当技術分野に周知である。

【0216】

受容体活性のモニタリングに特によく適している遺伝子は、「即時早期 (immediate early)」遺伝子であり、これは通常、受容体とエフェクタータンパク質またはリガンドの接触後数分以内に迅速に誘導される。即時早期遺伝子転写の誘導は新たな調節タンパク質の合成を必要としない。リガンド結合に対する迅速な反応性に加えて、レポーターコンス

50

トラクトの作成に有用な好ましい遺伝子の性質には以下が含まれる：静止状態細胞での、低いか、あるいは検出不能な発現；一過性で、かつ新たなタンパク質合成に非依存である誘導；続いて起こる転写遮断が新たなタンパク質合成を必要とすること；およびこれらの遺伝子から転写される mRNA が短期の半減期を有すること。転写調節エレメントが有用であるためにはこれらすべての性質を有するのが好ましいが、必ずしもそうである必要はない。

【 0 2 1 7 】

多数の種々の刺激に応答する遺伝子の例は c-fos 原癌遺伝子である。c-fos 遺伝子は、成長因子、ホルモン、分化に特異的な物質、ストレス、および他の既知細胞表面タンパク質の誘導物質によって、タンパク質合成と無関係な様式で活性化される。c-fos 発現の誘導は非常に迅速で、受容体刺激後数分以内に生じることが多い。この性質により、受容体活性化のレポーターとしての使用に関して c-fos 調節領域は特に魅力的である。

10

【 0 2 1 8 】

c-fos 調節エレメントには以下が含まれる (Verma et al (1987) Cell 51: 513-514 を参照のこと)：転写開始に必要とされる T A T A ボックス；基本転写用の 2 つの上流エレメント、およびエンハンサー、これは二回対称のエレメントであり、T P A、血清、E G F、および P M A による誘導に必要とされる。

【 0 2 1 9 】

c-fos mRNA キャップ部位から上流の - 3 1 7 および - 2 9 8 b p 間に位置する 2 0 b p の c-fos 転写エンハンサーエレメントは、血清飢餓 N I H 3 T 3 細胞内の血清誘導に関して必須である。2 つの上流エレメントの一方は - 6 3 から - 5 7 に位置し、これは c A M P 調節に関する保存配列に類似する。

20

【 0 2 2 0 】

転写因子 C R E B (環状 A M P 応答性エレメント結合タンパク質) は、その名称が示すように、細胞内 c A M P のレベルに応答する。したがって c A M P レベルの調節を介してシグナルを伝達する受容体の活性化は、転写因子の結合を検出するか、あるいは C R E B 結合エレメント (C R E または c A M P 応答エレメント (cAMP response element) と称される) と連結されたレポーター遺伝子の発現を検出することによってモニターできる。C R E の D N A 配列は、TGACGTCA である。C R E B 結合活性に応答するレポーターコンストラクトは米国特許第 5,919,649 号に記載されている。

30

【 0 2 2 1 】

c-fos エレメントおよび C R E B 応答性コンストラクトに加えて、他のプロモーターおよび転写調節エレメントには、血管作用性小腸ペプチド (V I P) 遺伝子プロモーター (c A M P 応答性; Fink et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6662-6666)；ソマトスタチン遺伝子プロモーター (c A M P 応答性; Montminy et al (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6682-6686)；プロエンケファリンプロモーター (c A M P、ニコチン作用薬、およびホルボールエステル応答性; Comb et al (1986) Nature 323: 353-356)；ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子プロモーター (c A M P 応答性; Short et al (1986) J. Biol. Chem. 261: 9721-9726) が含まれる。

【 0 2 2 2 】

G P C R 活性の変化に応答する転写調節エレメントのさらなる例には、A P - 1 転写因子に応答するエレメントおよび N F - B 活性に応答するエレメントが含まれるが、これらに限定されない。共通 A P - 1 結合部位はパリンドローム：TGA(C/G)TCA である (Lee ら (1987) Nature 325: 368-372; Lee et al (1987) Cell 49: 741-752)。前記 A P - 1 部位はまた、腫瘍プロモーター、例えばホルボールエステル 1 2 - O - テトラデカノイルホルボール - アセテート (T P A) による誘導の媒介を担い、したがって T P A 応答エレメントとして T R E と称されることもある。A P - 1 は、成長刺激に対する細胞の早期応答に関与する多数の遺伝子を活性化する。A P - 1 応答性遺伝子の例には、Fos および Jun (これらのタンパク質はそれ自身 A P - 1 活性を構成する) に関する遺伝子、Fos 関連抗原 (Fra) 1 および 2、I B、オルニチンデカルボキシラーゼおよびアネキシン I お

40

50

よび I I が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 2 2 3 】

N F - B 結合エレメントは共通配列 : GGGGACTTTCC (配列番号 5) を有する。多数の遺伝子が N F - B 応答性として同定されており、それらの調節エレメントをレポーター遺伝子に連結して、G P C R 活性をモニターすることができる。N F - B 応答性の遺伝子の小試料には、IL-1 (Hiscott et al (1993) Mol. Cell. Biol. 13: 6231-6240), TNF- (Shakhov et al (1990) J. Exp. Med. 171:35-47)、CCR5 (Liu et al (1998) AIDS Res . Hum. Retroviruses 14: 1509-1519)、P-セレクチン(Pan & Mc Ever (1995) J. Biol. C hem. 270: 23077-23083)、Fas リガンド(Matsui et al (1998) J. Immunol. 161: 3469-3 473)、GM-CSF (Schreck & Baeuerle (1990) Mol. Cell. Biol.10: 1281-1286)および I B (Haskill et al (1991) Cell 65:1281-1289) をコードする遺伝子が含まれる。これらの各参考文献は引用により本明細書中に包含される。N F - B 応答性レポーターをコードするベクターもまた当技術分野に既知であり、あるいは当業者であれば、例えば合成 N F - B エレメントおよび最小プロモーターを用いるか、または N F - B 調節の対象であることが既知の遺伝子の N F - B 応答性配列を用いて容易に作成可能である。さらに N F - B 応答性レポーターコンストラクトは、例えば CLONTECH から市販されている。

10

【 0 2 2 4 】

このようなプロモーターコンストラクトは、該コンストラクトをトランスフェクトされた G P R 4 3 発現細胞をプロピオン酸塩に曝露することによって試験されるべきである。プロピオン酸に応答するレポーター発現が少なくとも 2 倍増大すれば、このレポーターが G P R 4 3 活性の指標であることが示される。

20

【 0 2 2 5 】

転写レポーターコンストラクトを用いて G P R 4 3 活性をアッセイするため、G P R 4 3 ポリペプチドを安定発現する細胞はレポーターコンストラクトで安定にトランスフェクトされる。作用薬に関するスクリーニングでは、細胞は未処理のままか、候補調節因子に曝露されるか、あるいはプロピオン酸塩に曝露され、レポーターの発現が測定される。プロピオン酸塩処理された培養は、既知の作用薬によって誘導される転写レベルの標準となる。候補調節因子の存在下でレポーター発現が少なくとも 5 0 % 増大すれば、この候補は G P R 4 3 活性の調節因子であることが示される。作用薬はプロピオン酸塩単独と少なくとも同等、好ましくは同一量またはそれ以上のレポーター発現を誘導する。またこのアプローチを用いて、逆作用薬に関するスクリーニングを行うことができる。この場合、細胞は、プロピオン酸塩または別の作用薬の不存在下でレポーターの高い基本活性が存在するようなレベルで G P R 4 3 ポリペプチドを発現している。候補調節因子存在下のレポーター活性が、その不存在下と比較して 1 0 % またはそれ以上減少すれば、この化合物は逆作用薬であることが示される。

30

【 0 2 2 6 】

拮抗薬に関するスクリーニングでは、G P R 4 3 を発現し、レポーターコンストラクトを保持している細胞が、候補調節因子の存在および不存在下でプロピオン酸塩 (または別の作用薬) に曝露される。候補調節因子存在下のレポーター発現が、候補調節因子の不存在下と比較して 1 0 % またはそれ以上減少すれば、この候補は G P R 4 3 活性の調節因子であることが示される。

40

【 0 2 2 7 】

転写アッセイに関するコントロールは G P R 4 3 を発現していないが、レポーターコンストラクトを保持している細胞、ならびにプロモーターを欠いているレポーターコンストラクトを含む細胞を含む。G P R 4 3 調節性転写の調節因子として同定される化合物は、これが他の調節配列および他の受容体によって駆動される転写に影響するか否かを測定する分析に付され、その活性の特異性およびスペクトルが決定される。

【 0 2 2 8 】

転写レポーターアッセイ、およびほとんどの細胞に基づくアッセイは、G P R 4 3 活性を調節するタンパク質に関する発現ライブラリのスクリーニングに良く適している。ライ

50

ブラリは、例えば、天然起源、例えば植物、動物、細菌、等由来のcDNAライブラリであってよく、あるいは1つまたはそれ以上のポリペプチドのランダムまたは体系的変異体を発現するライブラリであってよい。またウイルスベクター中のゲノムライブラリを用いて、GPR43のスクリーニングに用いられる種々のライブラリ中の1細胞または組織のmRNA内容物を発現させることができる。

【0229】

h. イノシトールリン酸 (IP) 測定 :

本発明の細胞、例えばCHO-K1細胞は、5% FCS、抗生物質、アンフォテリシン、ピルビン酸ナトリウムおよび400 µg/ml G418を含有するイノシトールを含まないDMEM中、10 µCi/ml [³H]イノシトールで24時間標識される。細胞は以下の組成のクレブスリンガー-Hepes (KRH) バッファー中で2時間インキュベートされる (124mM NaCl、5mM KCl、1.25 mM MgSO₄、1.45 mM CaCl₂、1.25 mM KH₂PO₄、25mM Hepes (pH:7.4) および 8 mM グルコース)。次いでこの細胞は種々のSCFAで30分間惹起される。インキュベートは氷冷3%過塩素酸溶液の添加により停止される。IPは、以前 (Communi, D. et al (1995) Circ. Res., 76, 191-198) に記載されているように、Dowexカラムで抽出分離される。

【0230】

GPR43 アッセイ

本発明は、試料中の本発明の受容体活性を検出するためのアッセイを提供する。例えばGPR43活性は、GPR43を発現している細胞または細胞膜を含む試料中で測定できる。上記のように、この段落ではプロピオン酸塩が例として用いられる。本明細書中で定義されている任意のSCFAがこれらのアッセイで使用可能であることが理解されよう。当該アッセイは、SCFAの存在または不存在下で試料をインキュベートし、上記のようなセカンドメッセンジャーアッセイを実行することによって行われる。SCFAの存在または不存在下で行われたセカンドメッセンジャーアッセイの結果が比較され、GPR43受容体が活性であるか否かが決定される。本明細書中で定義される特定セカンドメッセンジャーの検出レベルが、SCFAの存在下で、SCFAの不存在下で行われたアッセイの検出量と比較して10%またはそれ以上増大すれば、GPR43活性が示される。

【0231】

これらに限定されないが、GTP結合、GTPアーゼ、アデニル酸シクラーゼ、cAMP、リン脂質分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アラキドン酸放出 (以下を参照のこと)、PKC、キナーゼおよび転写レポーターアッセイを含む、受容体活性の任意のアッセイを用いて、試料、例えば組織試料中のGPR43受容体分子の活性に影響する物質の存在が決定できる。この場合、GPR43ポリペプチドは、試料または試料の抽出物の存在および不存在下で活性に関してアッセイされる。試料または抽出物存在下のGPR43活性が、該試料の不存在下と比較して増大すれば、該試料は受容体活性の作用薬を含有することが示される。プロピオン酸塩または別の作用薬および試料の存在下の受容体活性が、プロピオン酸塩が単独で存在する条件下での受容体活性と比較して減少すれば、該試料はGPR43活性の拮抗薬を含有することが示される。所望であれば、その後試料を分画し、さらに試験して、作用薬または拮抗薬を単離または精製することができる。試料が調節因子を含有することを示すために必要とされる測定活性の増大または減少の量は、用いるアッセイのタイプに依存する。一般に、試料の不存在下で行われたアッセイと比較して10%またはそれ以上の変化 (増大または減少) があれば、試料中の調節因子の存在が示される。例外の1つは転写レポーターアッセイであり、このアッセイでは、試料が調節因子を含有することを示すために、シグナルの少なくとも2倍の増大または10%の減少が必要である。作用薬は、プロピオン酸塩単独を用いる場合と比較して少なくとも50%、好ましくは75%または100%またはそれ以上、例えば2倍、5倍、10倍またはそれ以上の受容体活性化を刺激することが好ましい。

【0232】

他の機能アッセイには、例えば微視的生理計測 (microphysiometer) またはバイオセンサーアッセイが含まれる (引用により本明細書中に包含されるHafner (2000) Biosens. B

10

20

30

40

50

ioelectron, 15: 149-158を参照のこと)。またアラキドン酸の細胞内レベルは、Gijon et al (2000) J. Biol.Chem., 275: 20146-20156に記載されるように測定できる。

【0233】

II. GPR43およびプロピオン酸塩の相互作用に基づく診断アッセイ：

GPCRを介するシグナル伝達は多数の疾患および障害の病状に關与する。リンパ球系列、血小板、脾臓、胃、肺ならびに白血病性細胞の細胞内で発現されているGPR43は、免疫プロセス、癌、血栓症および関連障害または疾患において役割を担っている可能性がある。

【0234】

GPCRによって一般に媒介される障害に関するGPR43の発現パターンおよび知識によれば、GPR43が以下の障害に關与し得ることが示される：細胞遊走、癌、腫瘍の進行および腫瘍転移、炎症性および腫瘍性プロセス、創傷および骨治癒および調節性成長機能の機能不全、糖尿病、肥満、摂食障害、過食症、急性心不全、低血圧症、高血圧症、尿閉、骨粗鬆症、狭心症、心筋梗塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、血栓症および他の心血管疾患、自己免疫性および炎症性疾患、過剰平滑筋細胞増殖を特徴とする疾患、動脈瘤、平滑筋細胞の喪失または平滑筋細胞増殖の減少を特徴とする疾患、脳卒中、虚血、潰瘍、アレルギー、良性の前立腺肥大症、偏頭痛、嘔吐、精神病性および神経疾患、例えば不安症、統合失調症、躁鬱病、鬱病、幻覚症状、痴呆および深刻な精神遅滞、変性疾患、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病またはパーキンソン病、および運動障害、例えばハンチントン病、ギレス・デ・ラ・トゥーレット症候群および他の関連疾患、例えば血栓症および他の心血管疾患、自己免疫性および炎症性疾患。

【0235】

GPR43とプロピオン酸塩の相互作用は、GPR43シグナル伝達が關与する疾患、障害またはプロセスの診断またはモニタリングのためのアッセイの基準として用いることができる。GPR43関連疾患または障害に関する診断アッセイはいくつかの諸形式を有し得る。第一に、診断アッセイは、組織試料中のGPR43ポリペプチド、mRNAまたはリガンドの量を測定することができる。GPR43ポリペプチドをコードするmRNAの量を測定するアッセイもこの範疇に収まる。第二に、アッセイは、受容体またはリガンドの性質を評価することができる。例えば個体が突然変異型または変異型のGPR43を発現しているか否かを決定するアッセイが診断に使用可能である。第三に、GPR43ポリペプチドの1つまたはそれ以上の活性を測定するアッセイが診断に使用可能である。

【0236】

A. GPR43ポリペプチドの量を測定するアッセイ

GPR43レベルを測定し、標準と比較して、試料中に異常レベルの受容体またはそのリガンドが存在するか否かを決定することができる。これらの存在はいずれもGPR43シグナル伝達の調節不全の可能性を示すものである。ポリペプチドレベルは、例えば該ポリペプチドに特異的な抗体を用いる免疫組織化学により測定される。GPR43活性を特徴とする疾患または障害を患っていることが疑われる個体から単離された試料を、GPR43ポリペプチドに対する抗体と接触させ、当技術分野に既知のように（例えば二次抗体共役型酵素の活性を測定することにより）抗体結合が測定される。

【0237】

GPR43レベルを測定する別のアプローチは、罹患組織由来の細胞のフローサイトメトリー分析を用いる。GPR43に特異的な抗体を蛍光標識することを含むフローサイトメトリーの方法は、当技術分野に周知である。他のアプローチには、放射性免疫アッセイまたはELISAが含まれる。これらの各方法もまた当技術分野に周知である。

【0238】

検出される結合の量は、健康な個体由来、または罹患個体の罹患していない部位由来の同様組織試料中の結合と比較される。標準と比較して10%またはそれ以上の増大があれば、GPR43調節不全を特徴とする疾患または障害と診断される。

【0239】

10

20

30

40

50

GPR43発現はまた、組織試料中のこのポリペプチドをコードするmRNAの量を決定することにより測定可能である。mRNAのレベルは定量PCRまたは半定量PCRによって測定可能である。「定量的な(quantitative)」増幅の方法は当業者に周知であり、GPR43核酸増幅用のプライマー配列は本明細書中で開示されている。定量PCRの一般的な方法は、同一プライマーを用いる、既知量のコントロール配列の同時増幅を伴う。これはPCR反応を校正するのに使用可能な内部基準を提供する。定量PCRに関する詳細なプロトコルは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al、Academic Press, Inc.N.Y., (1990)により提供され、これは引用により本明細書中に包含される。試料中のGPR43をコードするmRNAの量が、健康な個体由来の同様組織の試料中、または罹患個体の罹患していない場所由来の組織試料中で発現される量と比較して10%またはそれ以上増大すれば、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害と診断される。

10

【0240】

B. 定性的アッセイ

GPR43ポリペプチドまたはそれをコードするmRNAが野生型であるか否かを評価するアッセイは診断に使用可能である。GPR43調節不全を特徴とする疾患または障害をこの様式で診断するため、試料から単離されたRNAを、GPR43のPCR増幅用の鋳型として用いる。増幅された配列は次いで、標準的方法を用いて直接配列決定されるか、あるいはまずベクター中にクローニングされた後に配列決定される。野生型GPR43の配列と比較して1つまたはそれ以上のエンコードアミノ酸を変化させる配列内の差異があれば、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害と診断することができる。コード配列の変化が試料内で同定される場合に、当該変異型受容体またはリガンドを発現し、その活性を野生型GPR43の活性と比較することが有用であり得る。他の利点には、このアプローチが、常時活性型および無発現変異体を含む新規突然変異体を提供できることがある。

20

【0241】

標準的配列決定方法に加えて、増幅された配列は、例えば、野生型と変異型配列を識別する分子標識(molecular beacons)のハイブリダイゼーションを用いて、特定の突然変異の存在に関してアッセイできる。1ヌクレオチド単位の変化を基準に識別するハイブリダイゼーションアッセイは当技術分野に周知である。別法では、米国特許第5,888,819号、第6,004,744号および第6,013,431号(これらは引用により本明細書中に包含される)に記載される方法を含む、任意の回数「ミニシーケンシング(minisequencing)」アッセイを行うことができる。これらのアッセイおよび当技術分野に既知の他のアッセイは、特定試料中で、既知の多型性を有する核酸の存在を決定することができる。

30

【0242】

所望により、アレイまたはマイクロアレイに基づく方法を用いて、GPR43配列中の突然変異の発現または存在を分析することができる。ミニシーケンシングおよび核酸発現の定量のためのアレイに基づく方法は当技術分野に周知である。

【0243】

C. 機能アッセイ

GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害の診断は機能アッセイを用いて行うことができる。この場合、組織試料から調製された細胞膜または細胞抽出物が、本明細書中に記載されるGPR43活性のアッセイにおいて用いられる(このようなアッセイは例えば、リガンド結合アッセイ、GTP結合アッセイ、GTPアーゼ活性、アデニル酸シクラーゼ活性、cAMPアッセイ、アラキドン酸レベル、リン脂質分解、ジアシルグリセロールまたはイノシトール三リン酸アッセイ、PKC活性化アッセイ、またはキナーゼアッセイである)。検出される活性は、健康な個体由来または罹患した個体の罹患していない部位由来の標準試料中の活性と比較される。別法として、試料または試料の抽出物をGPR43発現細胞に適用し、その後GPR43シグナル伝達活性を標準試料と比較して測定することができる。これらのいずれかのアッセイで測定される活性に関し、

40

50

標準の活性と比較して10%またはそれ以上の差異があれば、GPR43シグナル伝達の調節不全を特徴とする疾患または障害と診断される。

【0244】

本発明による細胞内GPR43活性の調節

プロピオン酸塩がGPR43のリガンドとして発見されたことにより、細胞内のGPR43ポリペプチド活性を調節する方法が提供される。細胞内のGPR43活性は、この細胞に対してGPR43ポリペプチドの機能を調節する物質を供給することによって調節される。この調節は、別の調節物質を同定するためのアッセイの部分として、培養細胞内で、または、例えばヒトを含む動物内で行うことができる。物質には、プロピオン酸塩および本明細書中で定義される他のSCFAならびに、本明細書中に記載されるスクリーニング方法を用いて同定される別の調節因子、例えば任意のプロピオン酸塩アナログが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0245】

物質は培養培地に添加することによって細胞に供給することができる。供給する量は、物質の性質に応じて、および供給の目的に応じて変化する。例えば、GPR43活性の拮抗薬を同定する培養アッセイでは、この受容体を最大半減的に活性化する量（例えばおよそのEC₅₀）で、好ましくは受容体飽和に必要なとされる用量を越えない量の物質、例えばプロピオン酸塩を加えるのが好ましい。この用量の決定は、プロピオン酸塩の量を滴定し、プロピオン酸塩をさらに添加してもGPR43活性に対してさらに影響することのないポイントを決定することにより行うことができる。

20

【0246】

GPR43活性の調節因子が疾患または障害の処置のために動物に投与される場合、当業者は所望の効果に基づいて投与量を調節できる。処置の成功が達成されるのは、病状の1つまたはそれ以上の測定可能な症状（例えば腫瘍細胞増殖、炎症性細胞の蓄積）が、処置前の該症状の値と比較して少なくとも10%変化した場合である。

【0247】

本発明の有用な候補調節因子

本発明は、本発明の受容体の調節因子である化合物を提供する。

候補調節因子は短鎖脂肪酸またはカルボン酸であるのが好ましい。

【0248】

候補化合物は合成化合物、または化合物の混合物であってよく、あるいは天然産物（例えば植物抽出物または培養上澄液）であってもよい。本発明の候補化合物には、合成可能な小分子、天然抽出物、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、脂質、抗体またはその抗原結合断片、核酸、および有機小分子が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0249】

合成または天然化合物の多数のライブラリ由来の候補調節因子化合物は、スクリーニングすることができる。現在多数の方法が、糖類、ペプチド、および核酸に基づく化合物のランダムまたは定方向合成に使用されている。合成化合物ライブラリは多数の企業、例えばMaybridge Chemical Co.(Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, NJ)、Brand on Associates (Merrimack, NH)、およびMicrosource (New Milord, CT)から市販されている。希少な化学物質ライブラリはAldrich (Milwaukee, WI)から入手可能である。組み合わせライブラリが入手可能であり、調製可能である。また、細菌、真菌、植物および動物抽出物形態の天然化合物ライブラリは、例えばPan Laboratories (Bothell, WA)またはMyco Search (NC)から入手可能であり、あるいは当技術分野に周知の方法によって容易に作成可能である。さらに、天然産の、および合成により作成されたライブラリおよび化合物は、通常の化学、物理、および生化学的方法を用いて容易に修飾することができる。

40

【0250】

有用な化合物は多数の化学物質類中に見出すことができる。有用な化合物は有機化合物または小有機化合物であってよい。小有機化合物は50ダルトンより大きい、約2,500ダルトンより小さい、好ましくは約750ダルトンより小さい、より好ましくは約3

50

50ダルトンより小さい分子量を有する。典型的な化合物類には、複素環類、ペプチド類、糖類、ステロイド類、等が含まれる。該化合物は、修飾により、有効性、安定性、医薬品適合性、等を高めることができる。物質の構造上の特性を用いて、別の物質を同定、作成、またはスクリーニングすることができる。例えば、ペプチド物質が同定された場合、これらは、その安定性を高める種々の方法で修飾することができる。このような修飾には、例えば非天然のアミノ酸、例えばD-アミノ酸、特にD-アラニンを用いる修飾、アミノ末端またはカルボキシル末端を官能化、例えばアミノ基に関しては、アシル化またはアルキル化、およびカルボキシル基に関しては、エステル化またはアミディフィケーション(amidification)することによる修飾、等がある。

【0251】

最初のスクリーニングでは、本発明の候補化合物の有用な濃度は約10 μ Mから約100 μ Mまたはそれ以上(すなわち1mM、10mM、100mM、または1M)であるが、これは1nMおよびそれ以上、1pMおよびそれ以上、または1fMおよびそれ以上であってもよい。最初のスクリーニング濃度は上限として用いられ、これに9つの追加濃度が付随する。この場合、二次スクリーニング用に、あるいは濃度曲線の作成用に、最初のスクリーニング濃度を(例えば9つの追加濃度に関して)半対数間隔で減少させ、追加濃度が決定される。

【0252】

本発明の有用な抗体

本発明はGPR43に対する抗体を提供する。抗体は当技術分野に既知の標準的プロトコルを用いて作成できる(例えばAntibodies: A Laboratory Manual, HarlowおよびLane編集(Cold Spring Harbor Press: 1988)を参照のこと)。哺乳類、例えばマウス、ハムスター、またはウサギをこのペプチドの免疫原性型(例えば、GPR43ポリペプチドまたは抗体応答を誘導する抗原性断片、または本明細書中上記の融合タンパク質)で免疫することができる。抗体を生じさせるための免疫原は、このポリペプチド(例えば単離された組換えポリペプチドまたは合成ペプチド)をアジュバントと混合することによって調製される。別法では、GPR43ポリペプチドまたはペプチドは、より大きな免疫原性タンパク質に対する融合タンパク質として作成される。またポリペプチドは、他のより大きな免疫原性タンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンと共有結合により連結可能である。別法では、引用により本明細書中に包含されるCostagliola et al (2000) J. Clin. Invest. 105: 803-811に記載されるように、GPR43ポリペプチドまたはこれらのタンパク質の断片をコードするプラスミドまたはウイルスベクターを用いて、動物内でポリペプチドを発現させ、免疫応答を引き起こすことができる。抗体を生じさせるため、免疫原は典型的に、実験動物、例えばウサギ、ヒツジ、およびマウスに皮内、皮下、または筋肉内投与される。上に議論されている抗体に加えて、遺伝子改変された抗体の誘導體、例えば単鎖抗体を作成できる。

【0253】

免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体力価を検出することによってモニターできる。標準的ELISA、フローサイトメトリーまたは他の免疫アッセイを行い、免疫原を抗原として用いて抗体のレベルを評価することもできる。抗体調製物は単に免疫化動物由来の血清であってよく、または所望であれば、例えば固定された免疫原を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより、この血清からポリクローナル抗体を単離することができる。

【0254】

モノクローナル抗体を生産するため、抗体産生脾細胞を免疫化動物から採取し、不死化細胞、例えば骨髓腫細胞を伴う標準的体細胞融合前駆体と融合させ、ハイブリドーマ細胞を作成する。このような技術は当技術分野に周知であり、これには例えば、ハイブリドーマ技術(これはKohlerおよびMilstein (1975) Nature, 256: 495-497によって最初に開発されたものである)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbar et al (1983) Immunology Today, 4: 72)、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Lis

10

20

30

40

50

s, Inc. pp. 77-96) が含まれる。ハイブリドーマ細胞は、G P R 4 3 ポリペプチドと特異的に反応する抗体およびこのようなハイブリドーマ細胞を含む培養培地から単離されるモノクローナル抗体の産生に関して免疫化学的にスクリーニングすることができる。

【 0 2 5 5 】

ハイスルーブットスクリーニングキット

本発明の高処理量スクリーニングキットは、好ましくは 1 μ M から 1 m M 濃度範囲のプロピオン酸の存在下、本発明の受容体に対する調節因子化合物、例えば作用薬、拮抗薬、逆作用薬または阻害剤を検出するために必要なすべての手段および媒体を含む。このキットは以下の連続工程を行うための材料を含む。G P R 4 3 受容体をコードするヌクレオチド配列を含み、発現している本発明の組換え細胞の培養は、固形支持体、例えばマイクロプレート、より好ましくは 9 6 ウェルマイクロタイタープレート上で、当業者に周知の方法、特に W000/02045 に記載される方法にしたがって行われる。本発明の調節因子化合物は、約 1 μ M から 1 m M またはそれ以上の濃度で、適当な濃度（好ましくは 1 μ M から 1 μ M の範囲）のプロピオン酸が存在する特定のウェルの培養培地に加えらる。

【 0 2 5 6 】

本発明のキットはまた、これらに限定されないが c A M P の細胞内レベル、細胞内イノシトールリン酸、細胞内ジアシルグリセロール濃度、アラキドン酸濃度または M A P キナーゼまたはチロシンキナーゼ活性の測定（上記参照）を含むハイスルーブットスクリーニングアッセイを担うセカンドメッセンジャーアッセイに必要な材料を含むことができる。例えば、環状 A M P アッセイで測定される G P R 4 3 活性は、以前 (Brooker, G. et al (1979) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10, 1-33.) に記載される放射性免疫アッセイによって定量される。結果は、プロピオン酸の存在下かつ添加調節因子化合物の不存在下で本発明の組換え細胞から得られるベースラインレベルの G P R 4 3 活性と比較される。調節因子不存在下の活性のレベルと比較して、少なくとも 2 倍、好ましくは 5 倍、より好ましくは 1 0 倍さらに最も好ましくは 1 0 0 倍またはそれ以上の G P R 4 3 活性増大または減少を示すウェルが次の分析用に選択される。

【 0 2 5 7 】

本発明の有用な他のキット

本発明は G P R 4 3 活性の調節因子に関するスクリーニングに有用なキット、ならびに G P R 4 3 シグナル伝達の調節不全と特徴とする疾患または障害の診断に有用なキットを提供する。本発明の有用なキットには、単離された G P R 4 3 ポリペプチド（例えば単離された膜上、G P R 4 3 発現細胞上、または S P R チップ上の、膜または細胞結合型 G P R 4 3 ポリペプチドを含む）を含ませることができる。キットは G P R 4 3 に特異的な抗体を含むこともできる。これとは別に、あるいはこれに加えて、キットは G P R 4 3 ポリペプチドを発現するように形質転換された細胞を含有することができる。さらなる態様では、本発明のキットは G P R 4 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することができる。さらに別の態様では、本発明のキットは以下に記載される G P R 4 3 の増幅に有用な特異的プライマーを含んでもよい。本発明のすべてのキットは特定の品目または品目組み合わせ、およびそれらのためのパッケージ材料を含む。キットはまた、使用に関する指示書を含むことができる。

【 0 2 5 8 】

トランスジェニック動物

トランスジェニックマウスは遺伝学および発生生物学的研究のため、および新規配列の機能決定のための有用なツールを提供する。通常のトランスジェネシスの方法では、追加コピーの正常または修飾遺伝子が接合体の雄性前核に注入され、これが受容マウスのゲノム D N A に組み込まれることになる。確立したトランスジェニック系統内では導入遺伝子はメンデル様式で遺伝する。トランスジェニック動物の作成に有用なコンストラクトは、正常プロモーターまたは誘導性プロモーター調節下の遺伝子、組織発現および調節パターンに関する分析対象であるプロモーター調節下のレポーター遺伝子、ならびに優性突然変異、変異プロモーター、および特異的発生効果に関して調査される人工融合遺伝子を含有

するコンストラクトを含む。典型的には、10キロベースまたはそれ以下のオーダーのDNA断片がトランスジェニック動物の構築に用いられる(Reeves (1998) *New. Anat.*, 25: 19)。トランスジェニック動物は、本発明の1つまたはそれ以上の多型性を含有する候補遺伝子を含むコンストラクトを用いて作成可能である。別法では、単一の多型性を含有する候補遺伝子を発現するトランスジェニック動物を、異なる多型性を含有する候補遺伝子を発現する第二のトランスジェニック動物と交雑することができ、2つの多型性の混合効果を子孫の動物で研究することができる。

【0259】

他のトランスジェニック動物

本発明は、これらに限定されないがトランスジェニックのマウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ヤギ、等を含むトランスジェニック動物を提供する。トランスジェニックブタの作成プロトコルはWhiteおよびYannoutsos, *Current Topics in Complement Research*: 64th Forum in Immunology, pp.88-94; 米国特許第5,523,226号; 米国特許第5,573,933号; PCT出願WO93/25071; およびPCT出願WO95/04744中に見出せる。トランスジェニックマウスの作成プロトコルは米国特許第5,530,177号中に見出せる。トランスジェニックラットの作成プロトコルはBaderおよびGanten (1996) *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Supp. 3: S81-S87中に見出せる。トランスジェニックウシの作成プロトコルはTransgenic Animal Technology, A Handbook, 1994, Carl A. Pinkert編, Academic Press, Inc.中に見出せる。トランスジェニックウサギの作成プロトコルはHammerら (1985) *Nature* 315: 680-683およびTaylorおよびFan (1997) *Frontiers in Bioscience* 2: d298-308中に見出せる。

【0260】

ノックアウト動物

i. 標準

ノックアウト動物は相同組換えにより遺伝子欠失を作成する方法によって作成できる。この技術は、胚性幹(ES)細胞の開発に基づくものである。このES細胞は胚由来であり、培養中に維持され、宿主胚盤胞に導入された場合にマウスのすべての組織発生に関与する能力を有するものである。ノックアウト動物の作成は、ES細胞内の特定の標的遺伝子に対する相同組換えを導き、これによりこの遺伝子の無効対立遺伝子を作成することによって行われる。(ヘテロ接合性またはホモ接合性子孫において)当該無効対立遺伝子の潜在的表現型の結果を分析することができる(Reeves, 上記)。

【0261】

ii. Cre-loxを用いるマウスのインビボ組織特異的ノックアウト

標的化された相同組換えの方法は、バクテリオファージP1部位特異的リコンビナーゼCreに基づく部位特異的組換え系の開発によって改良された。バクテリオファージP1由来のCre-loxP部位特異的DNAリコンビナーゼはトランスジェニックマウスアッセイにおいて用いられ、規定の組織または発生段階に制限された遺伝子ノックアウトが作成される。広範囲の遺伝子ノックアウトと対照的に、領域制限された遺伝子の欠失は、表現型を特定の細胞/組織に起因させることができる点で有益である(Marth (1996) *Clin. Invest.* 97: 1999)。Cre-loxP系では、一方のトランスジェニックマウス系統は、loxP部位が目的の遺伝子の1つまたはそれ以上のエキソンに隣接するように操作される。これに関するホモ接合体、いわゆる「floxed遺伝子」は、細胞/組織型転写プロモーターの調節下でCre遺伝子を発現する第二のトランスジェニックマウスと交雑される。その後Creタンパク質はloxP認識配列間のDNAを切除し、標的遺伝子機能を効果的に除去する(Sauer (1998) *Methods*, 14: 381)。現在、この方法の多数のインビボ実施例が存在し、これには哺乳類組織特異的遺伝子の誘導性不活化(Wagnerら (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 4323)が含まれる。

【0262】

iii. ノックアウト表現型のBac救出

改変されたタンパク質のインビボ機能が特定の遺伝的多型性/突然変異に帰することを

10

20

30

40

50

証明するために、問題の遺伝子の野生型コピーを導入することにより、改変されたタンパク質機能を「救出」することができる。トランスジェニックマウスで発現された細菌人工染色体 (B A C) クローンをを用いるインビボ補完はこれらの目的のために使用可能である。この方法はマウス概日時計遺伝子の同定に使用された (Antoch et al (1997) Cell 89: 655)。

【 0 2 6 3 】

材料

トリプシンはFlow Laboratories (Bioggio, Switzerland)製品である。培養培地、G418、胎児ウシ血清 (F B S)、制限酵素、プラチナ (Platinum) PfxおよびTaqDNAポリメラーゼはLife Technologies, Inc. (Merelbeke, Belgium)から購入した。放射能製品ミオ-D-[2-³H]イノシトール(17.7Ci/mmol)はAmersham(Ghent, Belgium)製品である。Dowex A G1X8(ギ酸塩型)はBio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.)製品である。ATP、プロピオン酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、酪酸塩、吉草酸塩、ベータ-ヒドロキシ酪酸塩、ガンマ-ヒドロキシ酪酸塩および他のカルボン酸はSigma Chemical Co.(St. Louis, MO)から得た。フォルスコリンはCalbiochem (Bierges, Belgium)から購入した。ロリプラムはLaboratoire Jacques Logeais (Trappes, France)から得た。pEFIN5はEuroscreen (Brussels, Belgium)により開発された発現ベクターである。二重リン酸化 (Thr²⁰²およびTyr²⁰⁴) 型Erk1およびErk2に特異的なモノクローナル抗体はNew England Biolabs (Beverly, MA)から得た。

【 0 2 6 4 】

投与の用量および様式

典型的に患者は、G P R 4 3 の調節因子 (例えば、本発明のG P R 4 3 作用薬、拮抗薬または阻害剤) を投与することによって以下のように処置することができる。本発明のG P R 4 3 の調節因子は、摂取、注射、吸入または他の多数の方法により、好ましくは生物学的適合性溶液または製薬的に許容されるデリバリーベヒクル中で患者に投与することができる。投与用量は患者に応じて変化する; 「治療的有効量」は、例えば機能を高めるレベル (例えば本明細書中に記載のセカンドメッセンジャーアッセイで決定されるレベル) によって決定することができる。プロピオン酸塩結合のモニタリングにより、当業者は投与用量を選択および調節可能である。本発明のG P R 4 3 調節因子の用量は、毎日、毎週、毎月、毎年、または担当医師が適当と考えるところにしたがってくり返し投与される。

【 0 2 6 5 】

一態様では、致死量以下の用量の、G P R 4 3 シグナル伝達活性を阻害または促進する物質を投与して患者を処置し、G P R 4 3 受容体のシグナル伝達活性を調節することができる。本発明の致死量以下の用量とは、G P R 4 3 シグナル伝達活性を阻害または刺激するための物質の用量であって、この特定物質に関するLD50であるか、あるいはそれ以下である用量を意味する。一態様では、G P R 4 3 のシグナル伝達活性を阻害する物質の用量は1 a Mから1 Mの範囲、好ましくは1 f Mから1 m Mの範囲、より好ましくは1 n Mから1 μ Mの範囲である。一態様では、G P R 4 3 シグナル伝達の調節に有用な物質は、G P R 4 3 のリガンド結合部位に特異的に結合する抗体であってよい。G P R 4 3 シグナル伝達の調節に有用な用量を達成するのに要する抗G P R 4 3 抗体の量は、G P R 4 3 の発現レベル、受容体発現の局在、および患者自身の免疫系の全般的状態に依存し得るが、一般には、抗G P R 4 3 抗体またはその結合性タンパク質0.0005から5.0 mg / 体重kgの範囲であり、0.05から2.0 mg / kg / 用量がより一般的に用いられる用量である。

【 0 2 6 6 】

医薬組成物

本発明は、生理適合性担体と混合された本発明のG P R 4 3 調節因子を含む組成物を提供する。本明細書中で用いる用語「生理適合性担体」とは、生理的に許容される希釈剤、例えば水、リン酸緩衝生理食塩水、または生理食塩水を意味し、さらにアジュバントを含むことができる。アジュバント、例えば不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニ

ウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバンは当技術分野に周知の材料である。

【0267】

また本発明は医薬組成物を提供する。これらの医薬組成物は、活性成分に加えて、製薬的に使用可能な適当な製薬的に許容される担体調製物を含んでもよい。

【0268】

経口投与用の医薬組成物は、当技術分野に既知の製薬的に許容される担体を用いて経口投与に適した製剤に製剤化できる。このような担体により、医薬組成物は、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液状剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤等として患者の摂取用に製剤化することができる。

【0269】

経口使用のための医薬調製物は次のように得ることができる：活性化化合物を固形賦形剤と混合し、場合により、得られた混合物を研磨し、所望であれば補助剤を加えた後、顆粒の混合物を加工し、錠剤または糖衣錠コアを得る。適当な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質充填剤、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、または他の植物由来のデンプン；セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム；およびアラビアゴムおよびトラガカントゴムを含むゴム；およびタンパク質、例えばゼラチンおよびコラーゲンである。所望であれば、崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを加えてもよい。

【0270】

糖衣錠コアは濃糖類溶液のような適当なコーティングを施される。コーティングは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有してもよい。製品の同定のため、または活性化化合物の量、すなわち用量を示すために、錠剤または糖衣錠コーティングに染料または顔料を加えてもよい。

【0271】

経口により使用可能な医薬調製物には、ゼラチン製の押し込み型カプセル剤、ならびにゼラチン製の軟密閉カプセル剤およびコーティング、例えばグリセロールまたはソルビトールが含まれる。押し込み型カプセル剤は、充填剤または結合剤、例えばラクトースまたはデンプン、潤滑剤例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、および、場合により、安定化剤と混合された活性成分を含有することができる。軟カプセル剤では、活性化化合物は、安定化剤を含むか、あるいは含まない適当な液状物、例えば脂肪油、流動パラフィン、または液状ポリエチレングリコール中に溶解または懸濁されてよい。

【0272】

非経口投与用の医薬製剤には活性化化合物の水溶液が含まれる。注射用には、本発明の医薬組成物は、水溶液、好ましくは生理適合性バッファー、例えばハンクス液、リンガー液、または生理緩衝食塩水中で製剤化することができる。注射用の水性懸濁液は、この懸濁液の粘性を増大させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有してもよい。さらに、活性溶媒またはベヒクルの懸濁液には、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリド、またはリポソームが含まれる。場合により懸濁液には、適当な安定化剤または、この化合物の可溶性を増大させ、高濃度溶液の調製を可能にする物質を含ませることができる。

【0273】

鼻腔投与用には、通過すべき特定の障壁に適当な浸透剤を製剤化に用いる。このような浸透剤は当技術分野で一般に知られている。

【0274】

本発明の医薬組成物は、当技術分野に既知の様式、例えば通常の混合、溶解、顆粒化、糖衣作成、浮揚(levitating)、乳化、カプセル化、包括(entrapping)または凍結乾燥

10

20

30

40

50

プロセスにより製造することができる。

【0275】

医薬組成物は塩として提供することができ、このような塩は、これらに限定されないが塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、等を含む多数の酸と形成可能である。塩は水性または他のプロトン性溶媒中でより可溶性である性質を有し、その対応する遊離塩基型で存在する。別の場合では、好ましい調製物は、1 mM - 50 mM ヒスチジン、0.1 - 2% スクロース、2% - 7% マンニトール、pH 範囲 4.5 から 5.5 中の凍結乾燥粉末であってよく、これは使用前にバッファーと混合される。

【0276】

許容される担体中で製剤化された本発明の化合物を含む医薬組成物を調製した後、これらを適当な容器内に入れ、特定症状処置用のラベルを付することができる。前記ラベルは、投与の量、頻度および方法を含む情報を含んでいる。

【0277】

走化性の調節

本発明は、PMN および関連細胞を本発明の短鎖脂肪酸分子と接触させることにより、インピトロまたはインピボでこれらの細胞の走化性を調節する方法を提供する。免疫細胞の感染部位（または抗原提示部位）への遊走は、種々の疾患状態で生じる一般的なプロセスである。本発明は部分的に、GPR43 が短鎖脂肪酸、例えば酢酸塩およびプロピオン酸塩に関する受容体として機能すること、およびこのようなSCFA に応答してPMN 走化性の媒介を担うことの発見に基づくものである。したがって本発明は、共通の作用機構として、PMN 細胞の遊走現象を共有する疾患状態の調節および/または処置のための機構を提供する。一態様では、本発明は、免疫細胞の望ましくない遊走を特徴とする疾患状態、例えば自己免疫疾患を、そのような疾患の患者に、GPR43 のシグナル伝達活性を阻害するか、あるいはこの受容体の活性化をブロックする物質（例えばGPR43 受容体に特異的に結合する抗体）を投与することによって調節および/または処置することができることを提供する。また本発明は、不十分な免疫細胞遊走を特徴とする疾患状態または、免疫応答の刺激によって排除されなければならない病原体によって引き起こされる疾患を、その調節または処置を必要としている患者に、これらに限定されないが酢酸塩および/またはプロピオン酸塩を含む、GPR43 受容体の作用薬を投与することによって調節または処置することができることを提供する。本発明の方法によって調節および/または処置することができる具体的な疾患は以下に示すものである。しかし本発明はこれらの特定疾患に制限されず、異常、または不十分な免疫細胞遊走を特徴とする他の疾患状態の処置に有用であり得る。したがって本明細書中で用いる「PMN 走化性関連疾患」とは、可溶性走化性因子の方向または逆方向へのPMN 細胞の遊走を一要素として含む疾患を意味する。「PMN 走化性関連疾患」は、例えば、炎症性疾患、自己免疫疾患、IBD（炎症性腸疾患）、肝硬変、歯周病、および当業者に既知の、少なくとも部分的にPMN 細胞の可溶性走化性因子方向または逆方向への遊走によって媒介される他の疾患であり得る。また「PMN 走化性関連疾患」とは、病原体の感染から生じるか、または個体内の内因性病原体が異常増殖することによる病理学的状態を意味し得る。

【0278】

腸関連障害：

共生植物相の生成物は、粘膜障壁障害または粘膜損傷の存在下で炎症を促進することがあり（Chadwick & Anderson, 1990）、これにより炎症性腸疾患（IBD）における粘膜免疫系の活性化が生じる（Chadwick et al., 2002）。IBD は小腸および大腸のいずれかまたは両者に影響し得る。クローン病および潰瘍性大腸炎は最もよく知られている型のIBD である。IBD の主な病理組織学的特徴は、罹患した腸における急性および慢性炎症性細胞の浸潤である。これらの免疫細胞は腸細胞を認識し、破壊することができ、これにより典型的な免疫機構がIBD 病因に関与する（Perlmann & Broberger, 1963）。さらに、免疫細胞は形態学的、臨床的および内視鏡的に明確な炎症の証拠を伴わずに腸に広く浸潤することができる（Fiocchi, 1998）。また単球細胞はすべての段階のIBD に関与す

10

20

30

40

50

ると考えられ、IBD病態生理学におけるその重要性が強調されている (Fiocchi, 1998)。さらに、活性化Tリンパ球は器官培養中で粘膜損傷を誘導し (MacDonald & Spencer, 1988)、PMNは炎症および組織損傷の増幅に重要な役割を果たし (Fiocchi, 1998)、IBD患者の炎症性結腸粘膜には顕著な好中球浸潤が伴う。全身性循環から粘膜間質腔へ遊走した後、好中球は活性化を受け、活性酸素中間体およびさらなるケモカインを生産し、炎症性応答の保持ならびに最終的な粘膜損傷を引き起こすことができる。好中球浸潤はIBDを伴う深刻な炎症性の腸に不可分の要因であるため、好中球遊走および活性化を阻害する治療戦略の開発は非常に望まれる目標である。実際、好中球遊走応答の阻害剤であるシクロスポリンAを用いる処置では、好中球およびTリンパ球が原因の炎症を減少させることによってIBD患者の炎症が改善された (Ina et al., 2002)。正常植物相が何らかの形で生理学的炎症の調節因子として機能するという概念は、Duchmannらの観察結果により強化された (Duchmann et al., 1995 & 1996)。彼らは、IBD患者由来の粘膜性であるが末梢血性でない単核細胞が、自己の腸内細菌に対して曝露されると増殖することを示した。結腸環境での因子の生産はPMNによる反応性酸素種の生産を著しく増大させる。これらの因子のうち、SCFAは腸内の複合炭水化物の嫌氣的発酵によって生産され (Pouteauら (1996) Topping & Clifton, 2001-Eftimiadi et al. (1987))、主に以下の配分の酢酸塩、プロピオン酸塩および酪酸塩である：酢酸塩 (60%)、プロピオン酸塩 (25%) および酪酸塩 (15%)。結腸管腔のトータル濃度は約70 - 100 mMである (Sellin, 1999)。酪酸塩を除く、プロピオン酸塩および酢酸塩は好中球機能の強力な調節因子であり (Nakao et al., 1992)、我々は酢酸塩およびプロピオン酸塩がGPR43に対して作用薬として作用し、好中球活性を調節することを示した。したがってGPR43の拮抗薬は好中球活性化およびIBDにおける炎症を減少させ得る。

【0279】

IBDにおける粘膜免疫系の活性化に関し、好中球遊走および活性化が重要な役割を担うことから、本発明による、GPR43受容体シグナル伝達の拮抗薬である化合物は、好中球活性化およびIBDにおける炎症を減少させるのに有用であり得る。

【0280】

宿主防御、炎症、先天性免疫の調節および造血障害

GPR43は白血球上で発現されている。GPR43のリガンドである、プロピオン酸塩および酢酸塩は、多形核細胞ならびにTリンパ球および単球を調節している (Eftimiadi et al., 1991; Nakao et al., 1992; Curi et al., 1993)。しかし、百日咳毒素およびプロテインキナーゼCの活性化剤/阻害剤を用いる実験によってGPCR機構が示唆されたかもしれないが、これらの作用はいずれも特定のGタンパク質共役受容体 (GPCR) の刺激と結び付けられていなかった。Brunkhorst et al. (1992)は、少なくともプロピオン酸塩および酢酸塩に関して、一連のPMN活性化イベント、例えば細胞骨格F-アクチン改変、PMN極性化 (polarization)、F-アクチン局在化、細胞質pHの周期的変動、細胞形態に対する作用のGPCR機構を提案した。本発明は、GPR43のリガンドが、これらに限定されないが炎症性疾患、病原体感染、リンパ腫および白血病を含む、種々の病状において白血球活性を調節するために使用可能であることを提供する。

【0281】

歯周病

歯周病は、歯肉溝への複合グラム陰性菌感染の結果であり、これは好中球応答の欠損と関連する。見込みのある治療アプローチの1つは好中球応答を高める生物学的応答の調節因子を使用することである。種々の歯周および根管の病原体、例えばバクテロイド種は大量の短鎖脂肪酸 (SCFA) を生産することができる。したがって、本発明が提供するGPR43リガンドは、好中球応答を調節し、歯周病の症状を減少させるのに有用であり得る。

【0282】

アルコール症

ほとんどのエタノールは、主にアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase, ADH

10

20

30

40

50

）およびアルデヒド脱水素酵素 (aldehy dedeshydrogenase, ALDH) によって触媒されるアルデヒドおよび酢酸塩への酸化によって排除される。アルコールは、肝代謝により、まずアセトアルデヒドに、次いで酢酸塩に、そして最終的に二酸化炭素および水になり、ほとんど完全に身体から排除される。当該代謝はミカエリス・メンテン動態学によって最もうまく説明可能な経時的除去にしたがうものである。(Fujimiya et al (2000) Alcohol Clin Exp Res 24: 16S-20S; LiおよびBosron (1986) Ann Emerg Med 15:997-1004を参照のこと)。エタノール用量の約60% - 75%が酢酸塩に変換される(Siler SQ, Neese RA, Hellerstein MK(1999) Am J Clin Nutr 70 (5): 928-36)。酢酸塩はヘッドスペース・ガス・クロマトグラフィーによりヒト血液中および尿中で評価でき(Tsukamoto et al., Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi 19983: 200-9)、アルコール摂取、大量飲酒、代謝耐性、乱用、慢性アルコール症およびアルコール禁断の重篤性に関するマーカーを示す(Pronko et al(1997) Alcohol 32: 761-8; Korri et al (1985) Alcohol Clin Exp Res 9: 468-71; Nuutinen et al (1985) Alcohol 2: 623-6)。エタノール摂取後、酢酸塩は57mg/mLに増大する(Lundquist (1962) Nature N° 4815, p579)。

【0283】

慢性中度アルコール使用、および急性中度アルコール使用でさえ、細菌およびウイルス病原体によって引き起こされる感染の宿主感受性を増大させ得る(すなわち肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)(Shellito et al (2001) 25: 872-81); および緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)の肺排除(Greensberg et al (1999) Alcohol Clin Exp Res 23: 735-44); 黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)および表皮ブドウ球菌(Staphylococcus epidermidis)の食作用(Jareo et al (1995) Alcohol 30: 311-8; Corberand et al (1989) Alcohol Clin Exp Res 13: 542-6)。アルコール曝露後の障害のある宿主防御は、炎症応答の減少、サイトカイン生産の変化および異常な反応性酸素中間体生成および好中球機能の組み合わせと関連付けられるようだ(Szabo, 1999)。1%エタノールを摂取した2時間後の健康なボランティアから得られる好中球においてシグナル伝達カスケードのイノシトールリン酸(IP)/Ca²⁺ 応答の感受性は変化する(Gann et al (1999) Psychiatry Res 89: 189-99)。エタノールによるPMN機能の損傷は好中球顆粒の超微形態構造変化から構成され、さらに自己貪食空胞の減少、再分布および異常な蓄積(Todorovic (1999) Indian J Med Res 109: 105-14; Todorovic et al (1994) J Stud Alcohol 55: 239-48)、および好中球エラスターゼ活性の変化(Sachs et al(1990) Am Rev Respir Dis 141: 1249-55)を含む。これらの現象は結果的に細菌に対する好中球の殺菌活性の欠損を促進し得る。さらに、慢性のエタノール摂取はf-met-leu-phe(fMLP)誘導性の走化活性および好中球によるスーパーオキシド生産を調節する(Bautista et al(1992) 16: 788-94)。

【0284】

また肝臓内の白血球浸潤はアルコール性肝疾患の最も重要な特徴の1つである。アルコール性肝炎では、PMNは肝臓へ選択的に遊走する(Bautista (2002) Alcohol 27: 17-21; Siratoriら(1992) J Hepatol 15: 266-8)。循環および組織内のケモカインの上方制御は肝臓における好中球浸潤の増加と関連する(Bautista (2002) Alcohol 27: 17-21)。肝硬変のアルコール依存症患者では、走化性、食作用および殺菌活性がすべて有意に減少した(Laharrague et al (1985) Ann Med Interne (Paris) 136: 210-2)。

【0285】

エタノール摂取後、酢酸塩は遊離脂肪酸(FFA)の減少を引き起こし得る。これはエタノールが健康なボランティアに対して循環FFAを低下させ得ることに基づく。したがってエタノール摂取後の血中酢酸の増大は、アシドーシスを伴わない場合でさえFFAの減少を十分に説明するものであり、酢酸塩はアルカリ化剤として知られている(Crouse JR, Gerson CD, De Carli LM, Lieber CS. (1968) J Lipid Res 9 (4): 509-12)。

【0286】

結論として、上記内容は、好中球機能が慢性アルコール依存者で損なわれ得ることを示す。このような場合、本発明により、GPR43のリガンドは好中球機能を回復させるの

10

20

30

40

50

に有用であり得る。

【0287】

走化性測定

P M N走化性は、本発明にしたがって、S. Boydenによって1962年に最初に開発された手法によってインビトロ測定することができる (S. Boyden (1962) J. Exp. Med. 115: pp .453-466を参照のこと)。簡単には、この手法ではP M N細胞懸濁液および化学物質を2つの別々の区画に配置する。これらの区画はポリカーボネートフィルターで分離されている。P M Nは例えば哺乳類の末梢血から調製することができる。あらかじめ決められた時間の後、フィルターを取り除き、細胞懸濁液含有区画側のフィルター表面の細胞を注意して取り除く。次いでフィルター上の残留細胞を固定し、染色する。ハイパワーの顕微鏡を用いてフィルターを検査し、フィルターの下側(すなわちフィルターの化学物質含有区画側)に現れた細胞の数を手動で計測する。正の走化性応答は、フィルターを通過して化学物質含有区画側へ遊走または「クロール」した細胞によって示される。時間がかかるので、典型的にはフィルター全体が検査されることはない。そのかわり、代表試料領域が検査され、計測される。本発明では、走化性因子が存在しない場合と比較して、走化性因子が区画内に存在する場合に、走化性因子含有区画に接したフィルター表面に少なくとも10%多数のP M N細胞が存在すれば、「P M N走化性」が生じたとされる。

10

【0288】

またP M N走化性は、特定部位または特定試料中のP M N細胞数を異なる二時点で比較することにより、哺乳類においてインビボで評価することもできる。適当な刺激下で、P M N細胞は末梢血循環から結合組織、および周囲構造内へ遊走する。走化性が、例えばG P R 4 3シグナル伝達活性の調節因子のような候補物質に反応して調節されたか否かを決定するため、哺乳類から結合組織試料を採取し、これを当業者に周知の組織学的技術を用いて検査し、末梢組織(例えば結合組織またはリンパ器官)に存在するP M N細胞の数を測定することができる。存在するP M N細胞の数は、次いで、後の時点(例えば1 - 5時間、1 - 5日、または1 - 5週間後)で存在する数と比較することができる。一態様では、哺乳類の組織内に存在するP M N細胞の数が候補物質の投与後に存在する数と比較され、末梢組織内に存在するP M N細胞の数が候補物質の投与後に増大または減少すれば、該物質はP M N走化性の調節物質として同定される。

20

【実施例】

30

【0289】

以下、非限定的な実施例を挙げ、本発明を説明する。この実施例では、以下の材料および方法が用いられる。本明細書中以下に引用される各参考文献の全開示内容は、引用により本明細書中に包含される。

【0290】

実施例1

クローニング、配列決定およびアライメント

特異的オリゴヌクレオチドプライマーをG P R 4 3ヒト受容体の配列に基づいて合成した：センスプライマー5'-GCGGAATTCACCATGCTGCCGACTGGAAGAG-3'(配列番号6)およびアンチセンスプライマー5'-CTAGTCTAGACTGCTACTCTGTAGTGAAGTC-3'(配列番号7)。3つの異なる脾臓c D N Aに対し、プラチナPfxD N Aポリメラーゼを用いてポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を行った。増幅条件は以下であった：94℃、15秒；50℃、30秒；68℃、2分で35サイクル。増幅により、G P R 4 3遺伝子の完全コード配列を含有する1キロベースの断片を得た。次いでこのコード配列をp c D N A 3 (Invitrogen)発現ベクターのEcoRIおよびXbaI部位間にサブクローニングし、BigDyeターミネーターサイクル配列決定キット(BigDyeTerminatorcyclesequencingkit, Applied Biosystems, Warrington, Great Britain)を用い、3つのc D N Aのそれぞれに関して両鎖に対する配列決定を行った。

40

【0291】

また、この990塩基対(bp) - オープンリーディングフレームは最近、Sawzdargo

50

らによって同定され (GenBankアクセション AF024690)、G P R 4 3 と称されるオーファン G タンパク質共役受容体をコードすることが報告された。Sawzdargoらに公開されているこのコード配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。これらを脾臓 c D N A から開始する P C R に使用した。G P R 4 3 コード配列とサイズが適合する P C R 産物を p c D N A 3 発現ベクターに挿入し、両鎖に関して配列決定した (図 1)。推定の膜貫通ドメインには下線を引き、I から V I I の番号を付している。カゼインキナーゼ (caseine kinase) による推定のリン酸化部位は太字で示す。

【 0 2 9 2 】

P A R 1 および他の P A R 関連配列と G P R 4 3 のアミノ酸配列のアライメント (図 2) は、ClustalXアルゴリズムを用いて行った。次いで、TreeViewアルゴリズムを用いて図 2 の樹状図を構築した。この図は G P R 4 3 とプロテアーゼ活性化受容体 (P A R) - 1、- 2、- 3、および - 4、血小板活性化因子受容体 (P A F)、および G タンパク質共役受容体 4 2 (G P R 4 2) の関係を示す。G P R 4 2 は常にオーファン受容体である。

【 0 2 9 3 】

実施例 2

G P R 4 3 ヒト受容体の組織分布

いくつかのヒト組織中の G P R 4 3 m R N A を R T - P C R によって増幅した (図 3)

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 実験はポリ A + R N A のパネル (Clontech) を用いて行った。G P R 4 3 プライマーは以下のものであった：G P R 4 3 センスプライマー (5'-ACTGGAAGAGCTCCTTGATC-3'; 配列番号 8) および G P R 4 3 アンチセンスプライマー (5'-CAAGTATTGAACGATGATC-3'; 配列番号 9)。増幅 D N A バンドの予想サイズは 4 3 9 b p であった。アルドラーゼコード配列に基づく 2 つの合成プライマーをコントロールとして用いて、予想サイズ 4 4 3 b p の生成物を製造した：アルドラーゼセンスプライマー 5'-GGCAAGGGCATCCTGGCTGC-3' (配列番号 1 0) およびアルドラーゼアンチセンスリバー 5'-TAACGGGCCAGAACATTGGCATT-3' (配列番号 1 1)。SuperscriptII (Life Technologies, Inc., Merelbeke, Belgium) を用いてポリ A + R N A 約 7 5 n g を逆転写し、これを P C R 用に用いた。P C R は Taq ポリメラーゼを用いて以下の条件下で行った：9 4 で 3 分変性し、9 4 で 1 分、5 8 で 2 分および 7 2 で 2 分で 3 8 サイクル。P C R 反応物の一定量 (1 0 μ L) を 1 % アガロースゲル電気泳動によって分析した。

【 0 2 9 4 】

末梢血リンパ球 (P B L) 中には 4 3 9 b p バンドがはっきりと検出された。アルドラーゼコード配列断片の増幅はコントロールとして用いた。

【 0 2 9 5 】

さらに半定量的 P C R を用いて、特定の末梢血細胞および他の細胞型中の G P R 4 3 分布を調査した (図 1 3)。半定量的 R T - P C R (TaqMan) 実験は、トータルおよびポリ A + R N A のパネル (Clontech, Ambion, Biochain) を用い、1 2 の選択ヒト組織範囲にわたって行った。血液細胞および細胞系統由来のトータル R N A は (Tripure Isolation Reagent, Boehringer Mannheim) を用いて調製した。

【 0 2 9 6 】

半定量的 R T - P C R 実験は、ヒト G P R 4 3 受容体の遺伝子特異的プライマーを用いて行った。G P R 4 3 受容体プライマーは、フォワード 5'-GGCTTCCCCGTGCAGTAC-3' (配列番号 1 2)、Taqman プローブ 5'-AGCTCTCCCGCCGGCCTCTG-3' (配列番号 1 3) およびリバー 5'-CCAGAGCTGCAATCACTCCA-3' (配列番号 1 4)。

【 0 2 9 7 】

ハウスキーピング遺伝子 G A P D H 用プライマー フォワード 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' (配列番号 1 5)、Taqman プローブ 5'-AGCTCTCCCGCCGGCCTCTG-3' (配列番号 1 6) およびリバー 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' (配列番号 1 7) を用いて参照 m R N A プロファイルを作成した。

【 0 2 9 8 】

10

20

30

40

50

強いレベルのGPR43発現は多形核好中球(PMN)で見られた。またTリンパ球および末梢血単核細胞(PBMC)では、より低いレベルでGPR43が検出された(図13)。顆粒球での発現レベルと比較して、CNSおよび他の末梢組織では有意な発現は検出できなかった(データは示していない)。

【0299】

実施例3

GPR43リガンドに関するスクリーニング

10%胎児ウシ血清、100ユニット/mlペニシリンおよび100 μ g/mlストレプトマイシンを補った栄養混合ハムF12培地(Nutrient Mixture HAM's F12 medium)でCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618 (Bethesda, MD, USA))を培養した。Fugene6 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いてヒトGPR43をコードするバイシストロン性プラスミドをCHO-K1細胞内にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、250 μ g/mlゼオシン(zeocin)を用いて個々のクローンを選択し、GPR43ポジティブクローンをノーザンブロッティングによって確認した。Gタンパク質共役受容体の天然リガンド250個を濃度1-100 μ Mで含有する参照小分子ライブラリを用いるスクリーニングにポジティブクローンをを用いた。酢酸塩を用いて特異的活性を取得し、用量応答曲線によって確認した。同一細胞を用いてさらに関連化合物を試験した。

10

【0300】

ヒトGPR43をコードしないバイシストロン性プラスミドでトランスフェクトされたCHO-K1細胞はコントロール細胞(偽トランスフェクト)として用いた。

20

【0301】

実施例4

hGPR43発現CHO-K1細胞に対するSCFAの活性

炭素数1から4の範囲のSCFAを、ヒトGPR43を安定発現するCHO-K1細胞において、フォルスコリンで刺激されたアデニル酸シクラーゼ活性の阻害能に関して試験した。

【0302】

効力の序列は以下のものであった:C2(酢酸塩) \geq C3(プロピオン酸塩)>C4(酪酸塩)>>C1(ギ酸塩)。酢酸塩は最も強力に酵素活性を阻害した。これらすべての化合物はフォルスコリン刺激性アデニル酸シクラーゼ活性を75%減少させた(図4)。

30

【0303】

観察された酢酸塩の効果は、受容体とGi/oサブユニット間の共役を乱す百日咳毒素(PTX)と一晩プレインキュベートすることにより完全に消失した(図5)。したがってヒトGPR43の共役経路はCHO-K1中では選択的にGiである。

【0304】

観察された脂肪酸の効果はGPR43発現細胞に制限され、他の組換えGPCRを発現しているか、あるいは発現していないコントロール細胞はいずれも上記活性化剤による活性を示さなかった(データは示していない)。

【0305】

上記結果はpHと無関係である。つまり試験濃度では、反応バッファーのpHは7-7.4の範囲であった。さらに、活性SCFAの種々の塩、例えばアンモニウム(NH₃⁺)、カリウム(K⁺)およびナトリウム(Na⁺)塩を用いて、等しい効力の活性が観察された(酢酸アンモニウムを用いて得られた結果に関しては図7を参照のこと)。

40

【0306】

実施例5

膜に基づく機能アッセイにおけるSCFA活性の分析

膜に基づく機能試験において酢酸の活性を試験した。このアッセイでは、ヒトGPR43を発現するCHO-K1細胞由来の膜調製物でGTP [³⁵S]結合の蓄積をモニターした(図6)。酢酸塩の効力は、cAMPレベルをモニターする細胞に基づく機能アッセイで観察された効力と匹敵した。この膜に基づくアッセイを用いて試験されたSCFAの

50

効力の序列は保存されていた。すなわち、このアッセイは $C2 \geq C3 > C4 > C1$ を示した。C4 および C1 はヒト受容体を部分的に活性化し、その最大応答は酢酸塩およびプロピオン酸塩を用いて観察された最大応答と比較して最も低かった（データは示していない）。

【0307】

酢酸塩、プロピオン酸塩および関連化合物の活性は GPR43 に制限され、これらの酸は、非関連ヒト G タンパク質共役受容体、例えばアデノシン A1 受容体、アドレナリン作動性 2C 受容体、コルチコトロピン放出因子 1 受容体、ケモカイン CCR3 受容体、ロイコトリエン LTB4 受容体、ムスカリン M4 受容体、ニューロペプチド FF2S 受容体、オピオイド 3 受容体、セロトニン 5-HT1A 受容体、およびソマトスタチン sst5 受容体を発現している CHO-K1 細胞の 10 個の異なる膜調製物ではいずれの結合も刺激できなかった。これらすべての Gi 共役受容体は同一の実験において、それぞれ自身の参照リガンドによって刺激された（データは示していない）。

10

【0308】

任意の直接対イオン効果を除外するために塩の影響を評価した。特にナトリウムカチオンは、G タンパク質共役受容体を、リガンドの存在または不存在下でポジティブまたはネガティブに調節することが既知である。ナトリウム塩またはアンモニウム塩として試験された酢酸塩は、120 mM ナトリウムまたはカリウムを含有するアッセイバッファーに懸濁された膜上の GTP [³⁵S] 結合の活性化において等しい効力を示した（図 7）。

【0309】

20

他の SCFA および関連化合物（アルコール、アルデヒド、アセトン（cetone）、二価酸...）の活性を、膜 - 細胞に基づくアッセイにおいてそれぞれ単一濃度で用いて評価した。作用薬効力の序列は、酢酸塩 = プロピオン酸塩 > n - 酪酸塩 = イソ酪酸塩 = n - 吉草酸塩 = カブロン酸塩 > > ギ酸塩 > > ピルピン酸塩 = アセトアセテートである。不活性化化合物には：C2 - エタノール、アセトアルデヒドおよびシュウ酸塩；C3 - マロン酸塩およびアセトン；C4 - DL - - ヒドロキシ酪酸塩、GABA、L - グルタミン酸塩、コハク酸塩；および C6 - クエン酸塩が含まれる（図 8）。

【0310】

実施例 6

セカンドメッセンジャー蓄積によって測定される GPR43 の活性に対する SCFA の作用

30

SCFA はヒト GPR43 を安定発現している CHO-K1 細胞においてイノシトールリン酸の生産を刺激することが可能であった（図 9）。使用する SCFA に関わらず、刺激前に PTX 前処理することによってこの活性化はわずかに影響を受けた。したがってヒト GPR43 の共役は二重であり、これには上記 Gi 共役に加えて Gq タンパク質の活性化が関与する（図 10）。

【0311】

ヒト GPR43 の cDNA を、キメラ Gqi タンパク質の同時発現を伴うか、あるいは伴わずに、COS-7、CHO および HEK 細胞に一過性トランスフェクションすると、脂肪酸が、ホスホリパーゼ C の活性化を反映するイノシトールリン酸塩の蓄積を刺激した（図 11）。Gqi のみまたは他の GPCR、例えばモチリンまたはヒスタミン H1 受容体の cDNA でトランスフェクトされたコントロール細胞は、酢酸塩および他の SCFA によって活性化されなかった（データは示していない）。イノシトールリン酸塩の蓄積は、Gqi およびヒト GPR43 cDNA でトランスフェクトされた未 SCFA 処理細胞で増大し、これは反応時点で添加リガンド不存在下の当該受容体が常時（構成性に）活性化していることの証拠を提供する（図 11）。

40

【0312】

実施例 7

GPR43 に対して活性な SCFA の化学式および活性

活性化化合物の化学式は図 12 に示す。活性化化合物の構造活性相関（SRA）は、構造上

50

密に関連する化合物（ケトン、アルコールおよびアルデヒド）が不活性であることを考慮すると、カルボン酸部分が活性に必要とされることを示した。この部分は、線状または非線状の、2 - 3 C に関して最適活性を有する 1 - 6 炭素原子を含む炭素鎖の先端で分岐されている部分である。第二のカルボン酸部分は炭素鎖の長さに関わらずシグナルを消失させることが、シュウ酸塩（C 2）、マロン酸塩（C 3）、コハク酸塩（C 4）、アスパラギン酸塩（C 4）、グルタミン酸塩（C 5）または3カルボン酸部分を有するクエン酸塩で観察された。

【 0 3 1 3 】

他の官能基で置換すると、ヒト G P R 4 3 に対する化合物の活性が種々に調節された。例えば、- O H 置換基は対応する活性化合物の活性を消失させ（n - 酪酸塩は活性であり、- ヒドロキシ酪酸塩は活性でない）、- N H 3 ⁺ は活性を減少させたが消失させはしなかった（酢酸塩 > > グリシン）。セリン（C 3）のような - O H およびの - N H 3 ⁺ 官能基の組み合わせもまた活性を消失させた。またケトン置換化合物、例えばピルビン酸塩およびアセトアセテートは、対応する活性な非置換化合物（それぞれ酢酸塩および n - 酪酸塩）と比較して減少するが一貫した活性を示した。

【 0 3 1 4 】

実施例 8

プロピオン酸塩および酢酸塩はヒト好中球の細胞内カルシウム流動（mobilization）を誘導できる。

以下の実験を行い、酢酸塩およびプロピオン酸塩を用いてヒト多形核（P M N）白血球を活性化できるか否かを試験した。これは P M N を主に含有する末梢血細胞中でこの受容体が強力に発現されていることに基づくものである。活性化は、細胞膜受容体を酢酸およびプロピオン酸塩で刺激した後に内部プールから結集される細胞内カルシウムを定量することによって測定した。

【 0 3 1 5 】

P M N は健康なボランティアの静脈血から精製した。細胞は、確立された方法にしたがって単離した。細胞内カルシウム測定では、室温で 3 0 分間 Fura-2AM (Molecular Probes) を細胞に取り込ませた。LSB50B 分光蛍光光度計 (PerkinElmer) によってカルシウム流量をモニターした。簡単には、好中球懸濁液（ 1×10^7 細胞 / ml を 2μ M Fura-2/AM と 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。次いでこの細胞を洗浄して細胞外プローブを除き、 5×10^6 細胞 / ml 再懸濁し、3 7 で 1 0 分間放置して再平衡化した。次いで細胞を蛍光光度計の温度自動調節のキュベット区画（3 7 ）に移し、蛍光をモニターした（励起および発光波長はそれぞれ 3 4 0 および 5 1 0 nm）。

【 0 3 1 6 】

プロピオン酸塩または酢酸塩を P M N に注入すると、基本条件下と比較して細胞内カルシウムの増大が生じた。図 1 4 は、プロピオン酸ナトリウム濃度の変化に対するこの増大の動態プロットを示す。細胞内カルシウムの増加は「基本蛍光」を超える「刺激性蛍光」の割合の増大によってモニターする。

【 0 3 1 7 】

増加濃度のプロピオン酸塩（図 1 5 ）または酢酸塩（図 1 6 ）を注入すると、濃度依存性の細胞内カルシウム増大が生じる。プロピオン酸塩および酢酸塩は等しい効力である（プロピオン酸塩および酢酸塩に関して、それぞれ $E C_{50} = 5 4 0 \mu$ M および $5 3 7 \mu$ M ）。

【 0 3 1 8 】

この結果はプロピオン酸塩および酢酸塩が、ヒト好中球における細胞内カルシウム流動の誘導能を有することを示す。我々の以前の結果は、G P R 4 3 が短鎖脂肪酸、例えばプロピオン酸塩および酢酸塩の細胞表面標的として薬理的に完全に特徴付けられることを説明するものであるが、我々はこれにしたがって、観察されたカルシウム流動に対する作用は目的の受容体の刺激を介して媒介されるものであることを結論する。Naccache et al (J Cell Physiol (1988) Jul; 136 (1): 118-24)、Fonteriz et al (Biochem Biophys

10

20

30

40

50

Acta (1991) Jun7; 1093(1):1-6) および Nakao et al (Infect Immun (1992) Dec; 60 (12): 5307-11) は、酢酸塩およびプロピオン酸塩が P M N 中、ミリモル濃度の EC_{50} で細胞質カルシウム流動を刺激することを記載している。しかし、百日咳毒素およびプロテインキナーゼ C の活性化剤 / 阻害剤を用いる実験が G P C R 機構を示唆したかもしれないが、これらはいずれも観察された応答を特定の G タンパク質共役受容体の刺激と結び付けていない。Brunkhorst et al (Infection and Immunity July(1992), vol60, 7: 2957-2968) は、少なくともプロピオン酸塩および酢酸塩について、一連の P M N 活性化事象、例えば細胞骨格 F - アクチン改変、P M N 極性化、F - アクチン局在化、細胞質 p H の周期的変動、細胞形態に対する作用の G P C R 機構を示唆した。

【 0 3 1 9 】

我々は、酢酸塩およびプロピオン酸塩が、組換え系で発現された組換え h G P R 4 3 の活性化剤として等しい効力であることを示した。

【 0 3 2 0 】

したがって我々は、我々のデータによって初めて、ヒト好中球でのカルシウム流動に対する酢酸塩およびプロピオン酸塩の作用が G P R 4 3 単独の活性化を介して媒介されることが示されることを結論する。

【 0 3 2 1 】

実施例 9

S C F A によって誘導される走化性：好中球に対するカルシウムおよび走化性アッセイ

以前に記載されるように、健康なボランティアの軟膜から末梢血単核細胞を精製した (Struyf S, De Meester I, Scharpe S, Lenaerts JP, Menten P, Wang JM, Proost P, Van Damme J. , Eur J Immunol (1998) Apr; 28 (4):1262-71) 。細胞内カルシウム測定では、室温で 30 分間 Fura-2AM (Molecular Probes) を細胞に取り込ませた。LS50B 分光蛍光光度計 (Perkin Elmer) によってカルシウム流量をモニターした。これは $125 \mu M$ プロベネシドを含有するバッファー中最終細胞濃度 10^6 細胞 / ml で、記載 (Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY., J Biol Chem (1985) Mar 25; 260(6): 3440-50) にしたがって行った。48 ウェル容器中、 $3 \mu m$ (メッシュサイズ) のポリカーボネートフィルター膜 (Neuroprobes, Inc.) を用いて走化性を評価した。この結果を走化性指数として表わす (図 17) 。

【 0 3 2 2 】

S C F A に対する好中性顆粒球の走化性応答：

健康なドナーから新たに単離した末梢血好中球を、酢酸ナトリウムおよびプロピオン酸ナトリウムに対するその走化性応答に関して試験した。両 S C F A は典型的な鐘形用量応答曲線を示し、最適濃度は $10^{-3} M$ であった (図 17) 。我々は、S C F A が好中球に対して走化性を誘導することを結論する。好中球走化性における S C F A の効力は、f M L P の効力より低く、f M L P は $10^{-8} M$ で依然完全に活性であった。さらにまた、f M L P の効力は S C F A の効力より高く、f M L P の最大走化性指数が平均で少なくとも 3 倍高かった (データは示していない) 。

【 0 3 2 3 】

他の態様

前記実施例は、本発明の作成および実行の際に発明者らにより行われ、考慮された実験を示している。これらの実施例は、発明の実施について当技術分野に公開し、ならびにその有用性を示す両目的を果たす技術の開示を含むものとする。当業者であれば、本明細書中に開示されている技術および態様は好ましい態様のみであり、多数の同等な一般的な方法および技術を用いて同一の結果を得ることができることを理解するだろう。

【 0 3 2 4 】

本明細書中上記特定の、特許および特許出願を含む、すべての参考文献は、その文献が、本発明の 1 つまたはそれ以上の態様を実施するために重要であり得る組成物および / または方法を記載し、説明し、その基礎を提供し、あるいはそれを可能にしている範囲まで、引用により明示的に本明細書中に包含されるものとする。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0325】

【図1】ヒトGPR43受容体のヌクレオチド配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2】GPR43受容体と関連受容体の構造的関連を示す樹状図である。GPR43のアミノ酸配列と、PAR1および他のPAR関連配列のアライメントは、ClustalXアルゴリズムを用いて行った。次いで、TreeViewアルゴリズムを用いて樹状図を構築した。プロテアーゼ活性化受容体（PAR）-1、-2、-3、-4；血小板活性化因子受容体（PAF）；Gタンパク質共役受容体43（GPR43）；Gタンパク質共役受容体42（GPR42）。GPR42は常にオーファン受容体である。

【図3】ヒトGPR43受容体の組織分布を示す。

【図4】ヒトGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞における、フォルスコリン刺激性アデニル酸シクラーゼ活性に対するSCFAの阻害活性を示す。

【図5】ヒトGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞における、フォルスコリン刺激性アデニル酸シクラーゼ活性の酢酸による阻害のPTX感受性を示す。

【図6】ヒトGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞由来の膜調製物と結合したGTP [³⁵S]の蓄積に対する、酢酸の活性を示す。

【図7】ヒトGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞由来の膜調製物と結合したGTP [³⁵S]の蓄積に対する、酢酸塩の種々の塩の等しい効力の活性を示す。

【図8】ヒトGPR43を安定発現するCHO-K1細胞由来の膜調製物と結合したGTP [³⁵S]の蓄積に対する、SCFAおよび関連分子の活性を示す。

【図9】hGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞中のトータルイノシトールリン酸の蓄積に対する、酢酸塩の活性を示す。

【図10】ヒトGPR43を安定発現しているCHO-K1細胞中のトータルイノシトールリン酸代謝産物の蓄積に対する、C2、C3およびC4-線状カルボン酸の非PTX感受性活性を示す。

【図11】ヒトGPR43および/またはキメラGタンパク質を一過性発現しているCOS-7細胞中のトータルイノシトールリン酸代謝産物の蓄積に対する、酢酸塩の活性を示す。

【図12】試験対象のSCFAおよび関連化合物の名称および化学式、およびヒトGPR43活性に対するそれらの効果を示す。

【図13】半定量RT-PCR（TaqMan）方法論を用いる、12の選択ヒト組織の範囲にわたるヒトGPR43転写物の組織分布を示す。データは、各組織に関するポリA+RNA 2.5 ng由来またはトータルRNA 25 ng由来の平均mRNAコピーの割合Zとして示す。パネルAは、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（GAPDH）遺伝子の検出mRNAの平均（+/-S.D.）mRNAコピー/ポリA+RNA 2.5 ngまたはトータルRNA 25 ng由来を示す（Y軸）。パネルBは、GPR43の平均（+/-S.D.）mRNAコピーを示す。Y軸 = 遺伝子の検出mRNAコピー/ポリA+RNA 2.5 ngまたはトータルRNA 25 ng由来。パネルCは、各組織に関するGPCR/GAPDH平均mRNAコピーの割合（Z）を示す（Y軸）。

【図14】プロピオン酸ナトリウムの濃度変化に対する、PMNの細胞内カルシウム増大の動態学プロットである。

【図15】プロピオン酸ナトリウムの濃度増加によって誘導されるPMN細胞の細胞内カルシウムレベル増大の刺激に関する用量応答曲線を示す。

【図16】酢酸ナトリウムの濃度増加によって誘導されるPMN細胞の細胞内カルシウムレベル増大の刺激に関する用量応答曲線を示す。

【図17】遊走指数として報告される、SCFA（酢酸塩およびプロピオン酸塩）濃度増加に应答する好中球遊走を示す。走化性データは5つの独立した実験の平均およびSEMを示す。

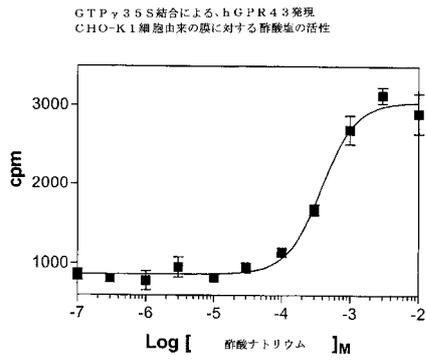
10

20

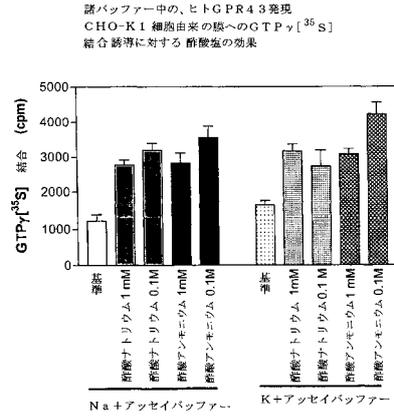
30

40

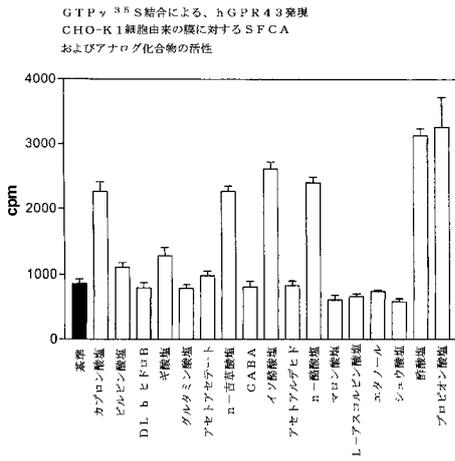
【図6】



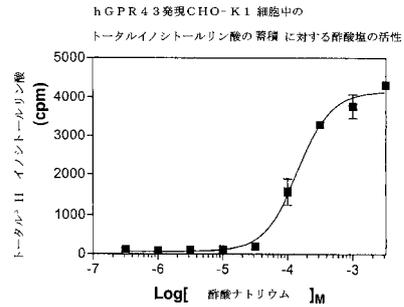
【図7】



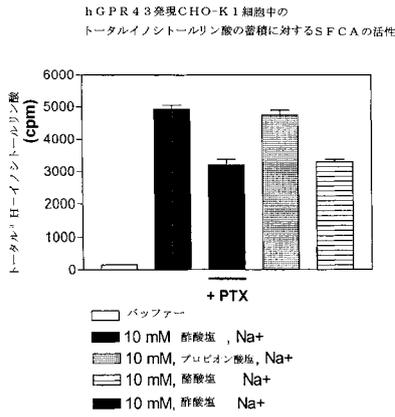
【図8】



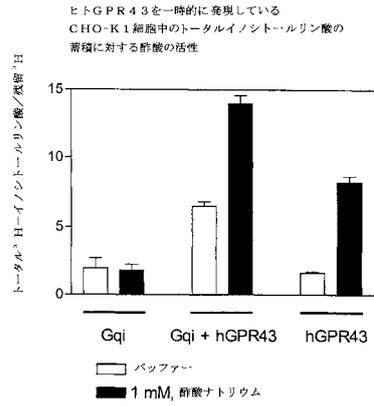
【図9】



【図 10】



【図 11】



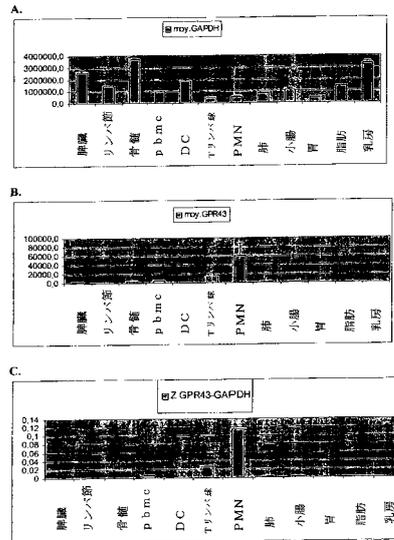
【図 12】

短鎖脂肪酸カルボン酸 (SFCA)
およびアナログの化学式
およびヒトGPR43に対する活性

R	SFCA	活性
H	ギ酸塩	弱い活性
CH3	酢酸塩	非常に活性
Cl3C	トリクロロ酢酸塩	非常に弱い活性
C2H5	プロピオン酸塩	非常に活性
CH3-CO	ビルビン酸塩	非常に弱い活性
C3H7	n-酪酸塩 イソ酪酸塩	活性 活性
CH3-CO-CH2	アセトアセテート	非常に弱い活性
C4H9	n-酪酸塩	活性
C5H11	n-カプロン酸塩	活性

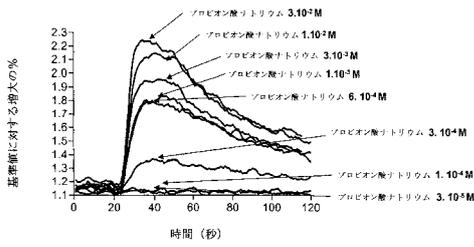
【図 13】

半定量RT-PCRによるヒトGPR43受容体の組織分布



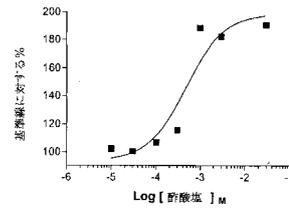
【図14】

種々の濃度のプロピオン酸ナトリウムに対する PMN中の細胞内カルシウム増大の動態プロット



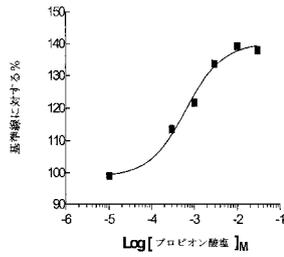
【図16】

増加濃度の酢酸塩の注入により生じる細胞内カルシウムの濃度依存性増大



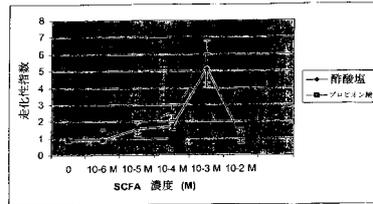
【図15】

増加濃度のプロピオン酸塩の注入により生じる細胞内カルシウムの濃度依存性増大



【図17】

SCFAによって誘導される好中球走化性



フロントページの続き

- (72)発明者 デソー, ミシェル
ベルギー国, ベー - 7 0 0 0 モン, 2 ベー シュマン ドゥ ロアシス
- (72)発明者 ブレジロン, ステファーン
ベルギー国, ベー - 1 7 0 0 デイルベーク, 8 フレッテストラート
- (72)発明者 ランノワ, ヴァンサン
ベルギー国, ベー - 5 3 1 0 リエルニュ, 9 3 ルート ドゥ ペルウェ
- (72)発明者 パルマンティエ, マルク
ベルギー国, ベー - ベールセル 1 6 5 0, 1 6 0 ラールハイデストラート

審査官 富永 みどり

- (56)参考文献 特表2001-517682(JP, A)
国際公開第00/028083(WO, A1)
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997年, Vol.239, p.543-547
Br.J.Pharmacol., 1998年, Vol.125 No.7, p.1387-1392
INFECTION AND IMMUNITY, 1992年, Vol.60, No.7, P.2957-2968

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)