

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-156323

(P2023-156323A)

(43)公開日 令和5年10月24日(2023.10.24)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
審査請求 有 請求項の数 6 O L (全122頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-118226(P2023-118226)	(71)出願人	518056003 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 1 8、ボルチモア、ノース・チャール ズ・ストリート 3 4 0 0
(22)出願日	令和5年7月20日(2023.7.20)	(74)代理人	100189131 弁理士 佐伯 拓郎
(62)分割の表示	特願2019-569449(P2019-569449)の分割	(74)代理人	100182486 弁理士 中村 正展
原出願日	平成30年6月15日(2018.6.15)	(74)代理人	100147289 弁理士 佐伯 裕子
(31)優先権主張番号	62/520,812	(72)発明者	ドン, シンチョン アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0 2 9, クラークスビル, フローティン グ クラウズ パス 1 2 0 2 4
(32)優先日	平成29年6月16日(2017.6.16)		最終頁に続く
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(特許庁注:以下のものは登録商標)			
1.ブルロニック			
2. TRITON			

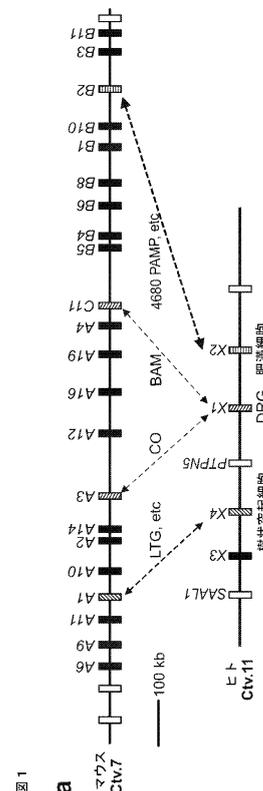
(54)【発明の名称】 Gタンパク質共役受容体媒介症状を治療するための組成物および方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 Gタンパク質共役受容体媒介症状に影響を及ぼす化合物を検出するための細胞および方法を提供する。

【解決手段】 1つ以上のMr g p r X 4またはMr g p r X 3 Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節する薬剤をスクリーニングする方法であって、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3 Gタンパク質共役受容体を発現する1つ以上の細胞を候補薬剤と接触させること、前記1つ以上の細胞の応答を検出することによって評価用の前記候補薬剤を選択して、前記Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節することを含む方法とする。

【選択図】 図 1 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つ以上のMr g p r X 4またはMr g p r X 3 Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節する薬剤をスクリーニングする方法であって、

Mr g p r X 4またはMr g p r X 3 Gタンパク質共役受容体を発現する1つ以上の細胞を候補薬剤と接触させることと、

前記1つ以上の細胞の応答を検出することによって評価用の前記候補薬剤を選択して、前記Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節することを含む方法。

【請求項 2】

前記細胞の応答が、前記Gタンパク質共役受容体の活性化として検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記候補薬剤が前記Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節するかどうかを決定することをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記Mr g p r X 4またはMr g p r X 3 Gタンパク質共役受容体媒介症状が、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および創傷治癒から選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記1つ以上の細胞が、免疫細胞、神経細胞および皮膚細胞から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記1つ以上の細胞が樹状細胞を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記1つ以上の細胞がケラチノサイトを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記1つ以上の細胞が、後根神経節の一次感覚ニューロンを含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出された応答が、細胞内カルシウムまたは活性化の増加であり、イノシトールリン酸検出によっても評価することができる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

Mr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化が、細胞内カルシウムの増加を特定することにより、またはイノシトールリン酸検出により検出される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

対象のGタンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法であって、

有効量のMr g p r X 3アンタゴニストおよび/またはMr g p r A 6アンタゴニストを前記対象に投与し、それにより前記Gタンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む方法。

【請求項 12】

前記Gタンパク質共役受容体媒介症状が、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および/または創傷治癒から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アンタゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記アンタゴニストが小分子または核酸分子を含む、請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

対象の G タンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法であって、有効量の Mr g p r X 3 アゴニストおよび / または Mr g p r A 6 アゴニストを前記対象に投与し、それにより前記 G タンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む方法。

【請求項 16】

前記 G タンパク質共役受容体媒介症状が、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、および / または皮膚障害および / または創傷治癒から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アゴニストが小分子または核酸分子を含む、請求項 15 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

対象の G タンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法であって、有効量の Mr g p r X 4 アンタゴニストおよび / または Mr g p r A 1 アンタゴニストを前記対象に投与し、それにより前記 G タンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む方法。

【請求項 20】

前記 G タンパク質共役受容体媒介症状が、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症および胆汁うっ滞性掻痒症から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アンタゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記アンタゴニストが小分子または核酸分子を含む、請求項 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

対象の G タンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法であって、有効量の Mr g p r X 4 アゴニストおよび / または Mr g p r A 1 アゴニストを前記対象に投与し、それにより前記 G タンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む方法。

【請求項 24】

前記 G タンパク質共役受容体媒介症状が、疼痛、掻痒症および胆汁うっ滞性掻痒症から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記アンタゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記アゴニストが小分子または核酸分子を含む、請求項 23 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

化合物を投与することにより誘発される、対象の薬物有害反応の重症度を軽減する方法であって、

対象に前記化合物を投与することと、

Mr g p r A 1 アンタゴニストおよび / または Mr g p r X 4 アンタゴニストを前記対

10

20

30

40

50

象に投与し、それにより前記対象の薬物有害反応の前記重症度を軽減することを含む方法。

【請求項 28】

対象が化合物に対する薬物有害反応を発現するリスクが高いかどうかを決定する方法であって、

化合物に対する薬物有害反応を有するか、化合物に対する薬物有害反応を発現するリスクのある対象から試験試料を得ることと、

前記試験試料中の少なくとも1つのGタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルを決定することと、

前記試験試料中の前記Gタンパク質共役受容体遺伝子の前記発現レベルと、参照試料中の前記Gタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルとを比較することと、 10

前記試験試料中の前記Gタンパク質共役受容体遺伝子の前記発現レベルが前記参照試料中の前記Gタンパク質共役受容体遺伝子の前記レベルと比較して差次的に発現している場合、前記対象に対する前記化合物の投与が薬物有害反応を誘発するであろうことを決定することを含む方法。

【請求項 29】

前記Gタンパク質共役受容体遺伝子がMr g p r A 1またはMr g p r X 4である、請求項 28に記載の方法。

【請求項 30】

前記Mr g p r A 1またはMr g p r X 4が変異体である、請求項 29に記載の方法。 20

【請求項 31】

有効量のGタンパク質共役受容体アンタゴニストを含む、Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害の治療のための医薬組成物。

【請求項 32】

前記Gタンパク質共役受容体アンタゴニストがMr g p r X 4またはMr g p r X 3アンタゴニストである、請求項 31に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

前記アンタゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチド、小分子、核酸またはそれらの任意の組合せを含む群から選択される、請求項 31または32に記載の医薬組成物。 30

【請求項 34】

有効量のGタンパク質共役受容体アゴニストを含む、Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害の治療のための医薬組成物。

【請求項 35】

前記Gタンパク質共役受容体アンタゴニストがMr g p r X 4またはMr g p r X 3アゴニストである、請求項 34に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

前記アゴニストが、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチド、小分子、核酸またはそれらの任意の組合せを含む群から選択される、請求項 34または35に記載の医薬組成物。 40

【請求項 37】

1) 請求項 31 から 36 のいずれか一項に記載の医薬組成物と、2) 前記Gタンパク質共役受容体症状または障害を治療するための指示書とを含むキット。

【請求項 38】

前記指示書が、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および/または創傷治癒を治療するためのものである、請求項 37に記載のキット。

【請求項 39】

m a s 関連Gタンパク質共役受容体メンバー X 3 (Mr g p r X 3) またはMr g p r A 6 を発現する組換え核酸を含む単離細胞。 50

【請求項 40】

前記組換え核酸が Mr g p r X 3 を発現する、請求項 39 に記載の単離細胞。

【請求項 41】

前記組換え核酸が Mr g p r A 6 を発現する、請求項 39 に記載の単離細胞。

【請求項 42】

Mr g p r X 3 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 40 に記載の単離細胞。

【請求項 43】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 3 タンパク質を産生する、請求項 42 に記載の単離細胞。

10

【請求項 44】

Mr g p r A 6 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 41 に記載の単離細胞。

【請求項 45】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r A 6 タンパク質を産生する、請求項 44 に記載の単離細胞。

【請求項 46】

前記単離細胞が、ヒト胎児由来腎臓 293 (HEK 293) 細胞、自然免疫細胞、幹細胞または細胞株を含む、請求項 41 に記載の単離細胞。

【請求項 47】

mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 4 (Mr g p r X 4) または Mr g p r A 1 を発現する組換え核酸を含む単離細胞。

20

【請求項 48】

前記組換え核酸が Mr g p r X 4 を発現する、請求項 47 に記載の単離細胞。

【請求項 49】

前記組換え核酸が Mr g p r A 1 を発現する、請求項 47 に記載の単離細胞。

【請求項 50】

Mr g p r X 4 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 48 に記載の単離細胞。

【請求項 51】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 4 タンパク質を産生する、請求項 50 に記載の単離細胞。

30

【請求項 52】

Mr g p r A 1 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 49 に記載の単離細胞。

【請求項 53】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r A 1 タンパク質を産生する、請求項 52 に記載の単離細胞。

【請求項 54】

前記単離細胞が、ヒト胎児由来腎臓 293 (HEK 293) 細胞、自然免疫細胞、幹細胞または細胞株を含む、請求項 47 に記載の単離細胞。

40

【請求項 55】

Mr g p r X 3 または Mr g p r A 6 のアンタゴニストを同定する方法であって、請求項 39 に記載の単離細胞を、皮膚反応または上皮反応を誘発する化合物と接触させることと、

前記単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、

Mr g p r X 3 または Mr g p r A 6 の活性化を検出することとを含み、前記化合物の非存在下での Mr g p r X 3 または Mr g p r A 6 の前記活性化と比較して Mr g p r X 3 または Mr g p r A 6 の活性化が低下していると、前記候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法。

50

【請求項56】

Mr g p r X 4またはMr g p r A 1のアнтаゴニストを同定する方法であって、
請求項47に記載の単離細胞を、薬物有害反応またはかゆみ反応を誘発する化合物と接触させることと、

前記単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、

Mr g p r X 4またはMr g p r A 1の活性化を検出することとを含み、前記化合物の非存在下でのMr g p r X 4またはMr g p r A 1の前記活性化と比較してMr g p r X 4またはMr g p r A 1の活性化が低下していると、前記候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法。

【請求項57】

Mr g p r X 3、Mr g p r X 4または他のMr g p rメンバーの二重/多価アンタゴニストを同定する方法であって、

請求項39から54 49のいずれか一項に記載の単離細胞を、皮膚または上皮反応および薬物有害反応またはかゆみ反応を誘発する化合物と接触させることと、前記単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、

Mr g p r X 4およびMr g p r X 3の活性化を検出することとを含み、前記化合物の非存在下でのMr g p r X 4およびMr g p r X 3の前記活性化と比較してMr g p r X 4およびMr g p r X 3の活性化が低下していると、前記候補化合物が多価アンタゴニストであると決定される方法。

【請求項58】

Mr g p r X 3またはMr g p r A 6のアゴニストを同定する方法であって、

請求項39から46のいずれか一項に記載の単離細胞を、皮膚反応または上皮反応を誘発する化合物と接触させることと、

前記単離細胞を候補アゴニストと接触させることと、

Mr g p r X 3またはMr g p r A 6の活性化を検出することとを含み、前記化合物の非存在下でのMr g p r X 3またはMr g p r A 6の前記活性化と比較してMr g p r X 3またはMr g p r A 6の活性化が増大していると、前記候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法。

【請求項59】

Mr g p r X 4またはMr g p r A 1のアゴニストを同定する方法であって、

請求項47から54のいずれか一項に記載の単離細胞を、薬物有害反応またはかゆみ反応を誘発する化合物と接触させることと、

前記単離細胞を候補アゴニストと接触させることと、

Mr g p r X 4またはMr g p r A 1の活性化を検出することとを含み、前記化合物の非存在下でのMr g p r X 4またはMr g p r A 1の前記活性化と比較してMr g p r X 4またはMr g p r A 1の活性化が増大していると、前記候補化合物がアゴニストであると決定される方法。

【請求項60】

mas関連Gタンパク質共役受容体メンバーX3(Mr g p r X 3)またはMr g p r A 6を発現する組換え核酸。

【請求項61】

前記組換え核酸がMr g p r X 3を発現する、請求項60に記載の組換え核酸。

【請求項62】

前記組換え核酸がMr g p r A 6を発現する、請求項60に記載の組換え核酸。

【請求項63】

Mr g p r X 3を発現する前記組換え核酸が1つ以上の変異を含む、請求項61に記載の組換え核酸。

【請求項64】

前記1つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができないMr g p r X 3タンパク質を産生する、請求項63に記載の組換え核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 65】

Mr g p r A 6 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 62 に記載の組換え核酸。

【請求項 66】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r A 6 タンパク質を産生する、請求項 65 に記載の組換え核酸。

【請求項 67】

m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 4 (Mr g p r X 4) または Mr g p r A 1 を発現する組換え核酸。

【請求項 68】

前記組換え核酸が Mr g p r X 4 を発現する、請求項 67 に記載の組換え核酸。

【請求項 69】

前記組換え核酸が Mr g p r A 1 を発現する、請求項 67 に記載の組換え核酸。

【請求項 70】

Mr g p r X 4 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 68 に記載の組換え核酸。

【請求項 71】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 4 タンパク質を産生する、請求項 70 に記載の組換え核酸。

【請求項 72】

Mr g p r A 1 を発現する前記組換え核酸が 1 つ以上の変異を含む、請求項 69 に記載の組換え核酸。

【請求項 73】

前記 1 つ以上の変異が、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r A 1 タンパク質を産生する、請求項 72 に記載の組換え核酸。

【請求項 74】

m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (Mr g p r X 3) または Mr g p r A 6 をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 75】

前記核酸配列が、1 つ以上の変異を含む Mr g p r X 3 核酸配列をコードする、請求項 74 に記載のベクター。

【請求項 76】

前記核酸配列が、1 つ以上の変異を含む Mr g p r A 6 核酸配列をコードする、請求項 74 に記載のベクター。

【請求項 77】

m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 4 (Mr g p r X 4) または Mr g p r A 1 をコードする核酸配列を含むベクター。

【請求項 78】

前記核酸配列が、1 つ以上の変異を含む Mr g p r X 4 核酸配列をコードする、請求項 77 に記載のベクター。

【請求項 79】

前記核酸配列が、1 つ以上の変異を含む Mr g p r A 1 核酸配列をコードする、請求項 77 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年6月16日に出願された米国仮特許出願第 62 / 520 , 812 号明細書の優先権の利益を主張し、その内容全体を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

10

20

30

40

50

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、国立衛生研究所により授与された R 0 1 N S 0 5 4 7 9 1 および M H 1 8 5 0 1 の下で政府の支援を受けて行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

慢性的なかゆみ（例えば、掻痒症）、炎症障害、自己免疫、皮膚障害および薬物有害反応を含む G タンパク質共役受容体媒介障害は苦痛を引き起こす。G タンパク質共役媒介障害の病態に関しては、多くのことが不明である。G タンパク質共役受容体媒介障害の治療に対する必要性は満たされていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

本発明は、新規 G タンパク質共役受容体であるヒト M r g p r X 4 およびマウス M r g p r A 1 の同定に部分的に基づく。M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は、特定の種類の自然免疫細胞に発現し、スティーブンス・ジョンソン症候群（S J S）を媒介し、自己免疫疾患に関与している可能性が高い。M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は、ラモトリギンおよびアロプリノールなど、S J S を引き起こす多くの薬物によって活性化される。さらに、M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は感覚ニューロンにも発現し、掻痒感および胆汁うっ滞性掻痒症に重要である。いくつかの実施形態では、M r g p r X 4 および M r g p r A 1 はビリルビンの受容体である。本明細書に記載されるように、この発見以前には、ビリルビン受容体は同定されていなかった。いくつかの実施形態では、ヒト M r g p r X 4 は、S J S、多発性硬化症などの自己免疫疾患、胆汁うっ滞性掻痒症および他の慢性的なかゆみ症状の薬物標的である。本明細書に記載されるように、何らかの生物学的プロセスおよび疾患に果たす M r g p r X 4 の役割は、この発見以前には完全に不明であった。いくつかの実施形態では、M r g p r X 4 発現細胞ベースのアッセイ（M r g p r X 4 細胞株および c D N A ならびに M r g p r A 1 変異マウス系統）を使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験する。本明細書に記載されるように、M r g p r X 4 発現細胞株は完全に新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに使用される。いくつかの実施形態では、M r g p r X 4 の遮断は、S J S、多発性硬化症などの自己免疫疾患、ならびに胆汁うっ滞性掻痒症および他の慢性的なかゆみ症状を治療するための新規の方法である。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

好ましい態様では、1つ以上の G タンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節する薬剤をスクリーニングする方法が提供され、この方法は、（1）G タンパク質共役受容体を発現する1つ以上の細胞を候補薬剤と接触させることと、（2）この1つ以上の細胞の応答を検出することによって評価用の候補薬剤を選択して、G タンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節することを含む。好適には、細胞の応答は、G タンパク質共役受容体の活性化として検出される。この方法は、候補薬剤が G タンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節するかどうかを決定することをさらに含み得る。

【 0 0 0 6 】

本発明はまた、ヒト M r g p r X 3 およびそのマウスホモログ M r g p r A 6 が、後根神経節（D R G）のケラチノサイト、上皮細胞および一次感覚ニューロンに発現するという発見に部分的に基づく。抗菌ペプチドのデフェンシンおよびカテリシジンが M r g p r X 3 および M r g p r A 6 のアゴニストであることも発見された。デフェンシンおよびカテリシジンは、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道障害、腸管および消化管の障害、疼痛ならびにかゆみなどの複数の疾患および症状に影響を及ぼす可能性がある。いくつかの実施形態では、M r g p r X 3 および M r g p r A 6 を標的として、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道障害、腸管および消化管の障害、疼痛ならびにかゆみを治療する。本明細書に記

10

20

30

40

50

載されるように、何らかの生物学的プロセスおよび疾患に果たす Mr g p r X 3 の役割はこれまで不明であった。いくつかの実施形態では、Mr g p r X 3 発現細胞ベースのアッセイおよび Mr g p r A 6 変異マウスを使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験する。本明細書に記載されるように、Mr g p r X 3 発現細胞株は新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに使用される。

【0007】

本明細書では、Mr g p r X 3 および Mr g p r X 4 発現細胞ベースのアッセイを使用して、これらの受容体を標的とする薬物をスクリーニングする方法がさらに提供される。本発明はまた、薬物候補のハイスループットスクリーニングのための Mr g p r X 3 および Mr g p r X 4 発現細胞株を提供する。いくつかの実施形態では、Mr g p r X 4 を遮断して、薬物有害反応（例えば、SJS）、胆汁うっ滞性掻痒症および他の慢性的なかゆみ症状ならびに自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症）を治療する。いくつかの実施形態では、Mr g p r X 3 を遮断して、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみを治療する。

10

【0008】

本発明はまた、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (Mr g p r X 3) または Mr g p r X 4 を発現する組換え核酸を含む単離細胞に部分的に基づく。例えば、組換え核酸は Mr g p r X 3 を発現する。あるいは、組換え核酸は Mr g p r X 4 を発現する。他の場合、Mr g p r X 3 を発現する組換え核酸は、1 つ以上の変異を含む。例えば、1 つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 3 タンパク質を産生する。あるいは、Mr g p r X 4 を発現する組換え核酸は、1 つ以上の変異を含む。例えば、1 つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 4 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞、神経細胞および皮膚細胞から選択される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は自然免疫細胞から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は細胞株から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物から得られる。いくつかの実施形態では、神経細胞は、後根神経節の一次感覚ニューロンからなる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は樹状細胞からなる。いくつかの実施形態では、Mr p g r X 4 または Mr p g r A 1 は、樹状細胞、および後根神経節の一次感覚ニューロンに発現する。いくつかの実施形態では、皮膚細胞はケラチノサイトである。

20

30

【0009】

本発明はまた、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (Mr g p r X 3) または Mr g p r X 4 を発現する組換え核酸に部分的に基づく。例えば、組換え核酸は発現ベクターであり、Mr g p r X 3 を発現する。あるいは、組換え核酸は Mr g p r X 4 を発現する。他の場合、Mr g p r X 3 を発現する組換え核酸は、1 つ以上の変異を含む。例えば、1 つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 3 タンパク質を産生する。あるいは、Mr g p r X 4 を発現する組換え核酸は、1 つ以上の変異を含む。例えば、1 つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない Mr g p r X 4 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、ベクターは、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (Mr g p r X 3) または Mr g p r A 6 をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、1 つ以上の変異を含む Mr g p r X 3 核酸配列をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、1 つ以上の変異を含む Mr g p r A 6 核酸配列をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 4 (Mr g p r X 4) または Mr g p r A 1 をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、1 つ以上の変異を含む Mr g p r X 4 核酸配列をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、1 つ以上の変異を含む Mr g p r A 1 核酸配列をコードする核酸配列を含む。

40

50

【 0 0 1 0 】

本明細書では、Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節する薬物をスクリーニングする方法であって、Gタンパク質共役受容体を発現する細胞を候補薬物と接触させることと、Gタンパク質共役受容体の活性化を検出することと、候補薬物がGタンパク質共役受容体媒介症状または障害を調節するかどうかを決定することとを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体はMr g p r X 4およびMr g p r X 3から選択される。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体媒介症状は、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および創傷治癒から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞、神経細胞および皮膚細胞から選択される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は自然免疫細胞から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は幹細胞から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は細胞株から選択される。いくつかの実施形態では、細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物から得られる。いくつかの実施形態では、神経細胞は、後根神経節の一次感覚ニューロンからなる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は樹状細胞からなる。いくつかの実施形態では、Mr p g r X 4またはMr p g r A 1は、樹状細胞、および後根神経節の一次感覚ニューロンに発現する。いくつかの実施形態では、皮膚細胞はケラチノサイトである。いくつかの実施形態では、Mr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化は、細胞内カルシウムの増加を特定することによって検出される。

10

【 0 0 1 1 】

また、本明細書では、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法も提供され、この方法は、Mr g p r X 3またはMr g p r A 6アンタゴニストを対象に投与し、それによりGタンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体媒介症状は、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および創傷治癒から選択される。

20

【 0 0 1 2 】

さらに、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法が提供され、この方法は、Mr g p r X 3またはMr g p r A 6アゴニストを対象に投与し、それによりGタンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体媒介症状は、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害および皮膚障害（例えば、乾癬およびアトピー性皮膚炎）から選択される。

30

【 0 0 1 3 】

そのような方法のいくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは小分子を含む。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、二本鎖リボ核酸(d s R N A)、低分子ヘアピンRNAもしくは短ヘアピンRNA(s h R N A)、もしくはアンチセンスRNA、またはそれらの任意の部分を含む。そのような方法のいくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、対象に化合物を投与する前、それと同時にまたはその後投与される。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、局所的に、経口的に、吸入により、または注射により投与される。

40

【 0 0 1 4 】

また、本明細書では、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法も提供され、この方法は、Mr g p r X 4またはMr g p r A 1アンタゴニストを対象に投与し、それによりGタンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む。そのような方法のいくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体媒介症状は、薬物有害反応、例えば、ステーブンス・ジョンソン症候群(S J S)および中毒性表皮壊死症(T E N)、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症ならびに胆汁うっ滞性掻痒症から選択される。

【 0 0 1 5 】

50

さらに、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状を治療する方法が提供され、この方法は、Mr g p r X 4またはMr g p r A 1アゴニストを対象に投与し、それによりGタンパク質共役受容体媒介症状を治療することを含む。そのような方法のいくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体媒介症状は、薬物有害反応、自己免疫障害、掻痒症および胆汁うっ滞性掻痒症から選択される。

【0016】

そのような方法のいくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチドまたはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、アンタゴニストは小分子を含む。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、二本鎖リボ核酸(d s R N A)、低分子ヘアピンRNAもしくは短ヘアピンRNA(s h R N A)、もしくはアンチセンスRNA、またはそれらの任意の部分を含む。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、対象に化合物を投与する前、それと同時にまたはその後投与される。そのような方法のいくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、局所的に、経口的に、吸入により、または注射により投与される。

10

【0017】

また、本明細書では、化合物を投与することにより誘発される、対象の薬物有害反応の重症度を軽減する方法も提供され、この方法は、対象に化合物を投与することと、Mr g p r A 1またはMr g p r X 4アンタゴニストまたはアゴニストを対象に投与し、それにより対象の薬物有害反応の重症度を軽減することを含む。

20

【0018】

また、本明細書では、対象が化合物に対する薬物有害反応を発現するリスクが高いかどうかを決定する方法も提供され、この方法は、化合物に対する薬物有害反応を有するか、化合物に対する薬物有害反応を発現するリスクのある対象から試験試料を得ることと、試験試料中の少なくとも1つのGタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルを決定することと、試験試料中のGタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルと、参照試料中のGタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルとを比較することと、試験試料中のGタンパク質共役受容体遺伝子の発現レベルが参照試料中のGタンパク質共役受容体遺伝子のレベルと比較して差次的に発現している場合、対象に対する化合物の投与が薬物有害反応を誘発するであろうことを決定することとを含む。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体遺伝子はMr g p r A 1またはMr g p r X 4である。いくつかの実施形態では、Mr g p r A 1またはMr g p r X 4は変異体である。

30

【0019】

また、本明細書では、Gタンパク質共役受容体媒介症状または障害の治療のための医薬組成物も提供され、組成物は、有効量のGタンパク質共役受容体アンタゴニストまたはアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体アンタゴニストは、Mr g p r X 4もしくはMr g p r X 3アンタゴニスト、またはMr g p r X 3、Mr g p r X 4および他のMr g p rメンバーの二重/多価アンタゴニストである。特定の他の実施形態では、Gタンパク質共役受容体アゴニストは、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3アゴニストである。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチド、小分子、核酸またはそれらの任意の組合せを含む群から選択される。いくつかの実施形態では、アンタゴニストまたはアゴニストは、局所的に、経口的に、吸入により、または注射により投与される。いくつかの実施形態では、Gタンパク質共役受容体症状または障害は、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および創傷治癒から選択される。

40

【0020】

さらに、1)本明細書に開示される医薬組成物と、2)Gタンパク質共役受容体症状または障害を治療するための指示書とを含むキットが提供される。医薬組成物は、Mr g p

50

r X 4 または M r g p r X 3 アンタゴニストなどの G タンパク質共役受容体アンタゴニストの有効量を好適に含み得る。他の実施形態では、医薬組成物は、M r g p r X 4 または M r g p r X 3 アゴニストなどの G タンパク質共役受容体アンタゴニストの有効量を好適に含み得る。指示書は、例えば、薬物有害反応、自己免疫障害、多発性硬化症、疼痛、掻痒症、胆汁うっ滞性掻痒症、炎症障害、悪性形質転換、皮膚障害および/または創傷治癒を治療するための医薬組成物の使用を開示するラベルまたはパッケージ挿入物であり得る。

【0021】

また、本明細書では、m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (M r g p r X 3) または M r g p r A 6 を発現する組換え核酸を含む単離細胞の組成物も提供される。いくつかの実施形態では、組換え核酸は M r g p r X 3 を発現する。いくつかの実施形態では、組換え核酸は M r g p r A 6 を発現する。いくつかの実施形態では、M r g p r X 3 を発現する組換え核酸は、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない M r g p r X 3 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、M r g p r A 6 を発現する組換え核酸は、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない M r g p r A 6 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、単離細胞は、ヒト胎児由来腎臓 2 9 3 (H E K 2 9 3) 細胞を含む。

10

【0022】

また、本明細書では、m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 4 (M r g p r X 4) または M r g p r A 1 を発現する組換え核酸を含む単離細胞の組成物も提供される。いくつかの実施形態では、組換え核酸は M r g p r X 4 を発現する。いくつかの実施形態では、組換え核酸は M r g p r A 1 を発現する。いくつかの実施形態では、M r g p r X 4 を発現する組換え核酸は、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない M r g p r X 4 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、M r g p r A 1 を発現する組換え核酸は、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、シグナル伝達経路を活性化することができない M r g p r A 1 タンパク質を産生する。いくつかの実施形態では、単離細胞は、ヒト胎児由来腎臓 2 9 3 (H E K 2 9 3) 細胞を含む。

20

【0023】

また、本明細書では、M r g p r X 3 または M r g p r A 6 のアンタゴニストを同定する方法であって、単離細胞（例えば、m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (M r g p r X 3) または M r g p r A 6 を発現する組換え核酸を含む単離細胞）を偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させることと、単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化を検出することとを含み、化合物の非存在下での M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化と比較して M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化が低下していると、候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法も提供される。

30

【0024】

さらに、M r g p r X 3 または M r g p r A 6 のアゴニストを同定する方法であって、単離細胞（例えば、m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 (M r g p r X 3) または M r g p r A 6 を発現する組換え核酸を含む単離細胞）を薬物有害反応を誘発する化合物と接触させることと、単離細胞を候補アゴニストと接触させることと、M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化を検出することとを含み、化合物の非存在下での M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化（すなわち対照）と比較して M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化が増大していると、候補化合物がアゴニストであると決定される方法が提供される。好ましくは、候補アゴニストは、候補アゴニストの非存在下での試験アッセイ（対照）と比較して、M r g p r X 3 または M r g p r A 6 の活性化を少なくとも 1、2、3、4 または 5 パーセント増大させ、さらに好ましくは、候補アゴニストは、試験アッセイでは、候補アゴニストの非存在下での同じ試験アッセイ（対照）と比較

40

50

して、M r g p r X 3またはM r g p r A 6の活性化を少なくとも7、10、15、20、25、30、40 50 60、70、80、90または100パーセント増大させる。候補アゴニストを評価するための好ましい試験アッセイには、以下の実施例9のアッセイが挙げられ、このアッセイでは、カルシウムイメージングまたはイノシトールリン酸検出により活性化を評価することができる。

【0025】

また、本明細書では、M r g p r X 4またはM r g p r A 1のアンタゴニストを同定する方法であって、単離細胞（例えば、m a s 関連Gタンパク質共役受容体メンバーX 4（M r g p r X 4）またはM r g p r A 1を発現する組換え核酸を含む単離細胞）を薬物有害反応を誘発する化合物と接触させることと、単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を検出することとを含み、化合物の非存在下でのM r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化（すなわち対照）と比較してM r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化が低下していると、候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法も提供される。好ましくは、候補アンタゴニストは、候補アンタゴニストの非存在下での試験アッセイ（対照）と比較して、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を少なくとも1、2、3、4または5パーセント低下させ、さらに好ましくは、候補アンタゴニストは、試験アッセイでは、候補アンタゴニストの非存在下での同じ試験アッセイ（対照）と比較して、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を少なくとも7、10、15、20、25、30、40 50 60、70、80、90または100パーセント低下させる。候補アンタゴニストを評価するための好ましい試験アッセイには、以下の実施例9のアッセイが挙げられ、このアッセイでは、カルシウムイメージングにより活性化を評価することができる。活性化は、イノシトールリン酸検出によっても評価することができる。

10

20

【0026】

さらに、M r g p r X 4またはM r g p r A 1のアゴニストを同定する方法であって、単離細胞（例えば、m a s 関連Gタンパク質共役受容体メンバーX 4（M r g p r X 4）またはM r g p r A 1を発現する組換え核酸を含む単離細胞）を薬物有害反応を誘発する化合物と接触させることと、単離細胞を候補アゴニストと接触させることと、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を検出することとを含み、化合物の非存在下でのM r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化（すなわち対照）と比較してM r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化が増大していると、候補化合物がアゴニストであると決定される方法が提供される。好ましくは、候補アゴニストは、候補アゴニストの非存在下での試験アッセイ（対照）と比較して、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を少なくとも1、2、3、4または5パーセント増大させ、さらに好ましくは、候補アゴニストは、試験アッセイでは、候補アゴニストの非存在下での同じ試験アッセイ（対照）と比較して、M r g p r X 4またはM r g p r A 1の活性化を少なくとも7、10、15、20、25、30、40 50 60、70、80、90または100パーセント増大させる。候補アゴニストを評価するための好ましい試験アッセイには、以下の実施例9のアッセイが挙げられ、このアッセイでは、カルシウムイメージングまたはイノシトールリン酸検出により活性化を評価することができる。

30

40

【0027】

本明細書では、対象に化合物を投与することにより化合物を投与することにより誘発される、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状の重症度を軽減する方法であって、M r g p r X 4アンタゴニスト、M r g p r X 3アンタゴニストまたはそれらの組合せを対象に投与し、それにより対象のGタンパク質共役受容体媒介症状の重症度を軽減する方法が提供される。

【0028】

さらに、対象に化合物を投与することにより化合物を投与することにより誘発される、対象のGタンパク質共役受容体媒介症状の重症度を軽減する方法であって、M r g p r X 4アゴニスト、M r g p r X 3アゴニストまたはそれらの組合せを対象に投与し、それに

50

より対象の G タンパク質共役受容体媒介症状の重症度を軽減する方法が提供される。

【 0 0 2 9 】

また、対象に化合物を投与することにより化合物を投与することにより誘発される、対象の薬物有害反応の重症度を軽減する方法であって、M r g p r X 4 アнтаゴニストを対象に投与し、それにより対象の薬物有害反応の重症度を軽減する方法が提供される。

【 0 0 3 0 】

また、対象の創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみの重症度を軽減する方法であって、M r g p r X 3 アнтаゴニストを対象に投与し、それにより対象の創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛および / またはかゆみの重症度を軽減する方法が提供される。

10

【 0 0 3 1 】

また、対象の創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみの重症度を軽減する方法であって、M r g p r X 3 アゴニストを対象に投与し、それにより対象の創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛および / またはかゆみの重症度を軽減する方法が提供される。

【 0 0 3 2 】

例えば、本明細書に記載の方法は、G タンパク質共役受容体媒介症状の重症度を少なくとも 1 %、例えば、少なくとも 5 %、少なくとも 1 0 %、少なくとも 1 5 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 9 % 予防または軽減する。

20

【 0 0 3 3 】

対象は、好ましくは、そのような治療または予防を必要とする哺乳動物、例えば、偽アレルギー型反応またはそれに対する素因があると診断された対象である。哺乳動物は、任意の哺乳動物、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、ならびに、家畜または食用に育てられた動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリおよびヤギである。好ましい実施形態では、哺乳動物はヒトである。

30

【 0 0 3 4 】

阻害剤またはアンタゴニストもしくはアゴニストには、限定するものではないが、それらの特定の標的、または標的の天然リガンドと結合し、生物学的活性を調節する核酸、ペプチド、抗体または小分子が挙げられ得る。

【 0 0 3 5 】

場合によっては、アンタゴニストまたはアゴニストは小分子を含む。小分子とは、質量が 2 0 0 0 ダルトン未満の化合物である。小分子の分子量は、好ましくは 1 0 0 0 ダルトン未満、さらに好ましくは 6 0 0 ダルトン未満であり、例えば、化合物は、5 0 0 ダルトン未満、4 0 0 ダルトン未満、3 0 0 ダルトン未満、2 0 0 ダルトン未満または 1 0 0 ダルトン未満である。

40

【 0 0 3 6 】

小分子は有機または無機である。例示的な有機小分子には、限定するものではないが、脂肪族炭化水素、アルコール、アルデヒド、ケトン、有機酸、エステル、単糖および二糖、芳香族炭化水素、アミノ酸および脂質が挙げられる。例示的な無機小分子は、微量ミネラル、イオン、フリーラジカルおよび代謝産物を含む。あるいは、小分子は、酵素の結合ポケットを満たすために、断片、または小部分、またはそれよりも長いアミノ酸鎖からなるように合成的に改変することができる。典型的には、小分子は 1 キロダルトン未満である。

【 0 0 3 7 】

場合によっては、アンタゴニストまたはアゴニストは核酸分子を含む。例えば、リボ核

50

酸 (RNA) またはデオキシリボ核酸 (DNA) は、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 ポリペプチドの発現を阻害し、それにより Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性を阻害する。場合によっては、核酸は、低分子干渉 RNA (siRNA)、RNA 干渉 (RNAi)、メッセンジャー RNA (mRNA)、低分子ヘアピン RNA もしくは短ヘアピン RNA (shRNA)、二本鎖リボ核酸 (dsRNA)、アンチセンス RNA もしくはマイクロ RNA またはそれらの任意の部分を含む。しかし、当業者であれば、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 を阻害 / 拮抗または活性化 / 刺激する追加の核酸を容易に同定することができるであろう。

【0038】

説明したように、アンタゴニストまたはアゴニストは、抗体、例えば、モノクローナルまたはポリクローナル Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 抗体であり得る。例えば、アンタゴニストとして使用され得る Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 抗体には、モノクローナルポリクローナル抗体、例えば、マウス、ウサギ、霊長類 (例えば、サル) またはヒト化抗体 (例えば、市販の Novus Biologicals ウサギポリクローナル Mr g p r X 4 抗体番号 NLS2429、Abcam のウサギポリクローナル Mr g p r X 4 抗体 b97784、Abcam のウサギポリクローナル Mr g p r X 4 抗体 ab188740 および Thermo Fischer の抗 Mr g p r X 3 ポリクローナル抗体 PA5-3395) が挙げられる。上記の市販の抗体の断片を含め、そのようなモノクローナル抗体の断片はまた、好適なアンタゴニストまたはアゴニストであり得る。Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 . アンタゴニストまたはアゴニストとして使用するための好適かつ好ましい抗体断片は、本明細書に開示されるアッセイにより容易に同定することができる。好適な断片は、上記の市販の抗体などの対応する抗体と少なくとも 30、40、50、60、70、80、90 または 95 の配列同一性を有する配列を含んでもよい。そのような断片は、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 . アンタゴニストまたはアゴニストとして使用される完全な薬剤であってよいか、別の配列または他の分子と共有結合して、例えば、抗体断片配列を含むか、上記の市販の抗体などの対応する抗体と同一の好適な配列を有する配列を含む融合分子を形成してもよい。

【0039】

また、本明細書で説明されるように、小分子、ポリペプチド、抗体および抗体断片ならびに核酸を含む好適かつ好ましい Mr g p r X 4 および Mr g p r X 3 アンタゴニストおよびアゴニストは、本明細書に開示されるアッセイにより容易に同定することができる、アンタゴニストまたはアゴニストは、対象に化合物を投与する前、それと同時またはその後投与される。

【0040】

様々な投与経路が利用可能である。例えば、アンタゴニストまたはアゴニストは、局所的に、経口的に、吸入により、または注射により投与される。

【0041】

アンタゴニストまたはアゴニストの有効量は、0.001 mg / kg ~ 250 mg / kg 体重、例えば、0.001 mg / kg、0.05 mg / kg、0.01 mg / kg、0.05 mg / kg、1 mg / kg、5 mg / kg、10 mg / kg、25 mg / kg、50 mg / kg、75 mg / kg、100 mg / kg、125 mg / kg、150 mg / kg、175 mg / kg、200 mg / kg、225 mg / kg または 250 mg / kg 体重である。最終的に、主治医または獣医が適切な量と投与レジメンとを決定する。

【0042】

場合によっては、アンタゴニストまたはアゴニストは、少なくとも 1 日 1 回、少なくとも 1 週間に 1 回、または少なくとも 1 カ月に 1 回投与される。アンタゴニストまたはアゴニストは、好適には、1 日、1 週間、1 カ月、2 カ月、3 カ月、6 カ月、9 カ月または 1 年の期間にわたって投与され得る。場合によっては、アンタゴニストは、連日、例えば、24 時間ごとに投与される。または、アンタゴニストは、連続的に、または 1 日に数回、例えば、1 時間ごと、2 時間ごと、3 時間ごと、4 時間ごと、5 時間ごと、6 時間ごと、

7時間ごと、8時間ごと、9時間ごと、10時間ごと、11時間ごとまたは12時間ごとに投与される。

【0043】

化合物が薬物有害反応を誘発するかどうかを決定する方法は、本明細書に記載の単離細胞を候補化合物と接触させ、Mr g p r X 4の活性化を検出することにより行われ、Mr g p r X 4が活性化していると、候補化合物が薬物有害反応を誘発すると決定される。

【0044】

例えば、Mr g p r X 3またはMr g p r A 6の活性化は、化合物の非存在下での細胞内カルシウムのレベルと比較して細胞内カルシウムの増加を特定することにより検出される。場合によっては、細胞内カルシウムのレベルは、少なくとも1%、例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%増加する。細胞内カルシウム濃度は、本明細書に記載の方法または当業者が利用可能な方法を利用して決定される。

10

【0045】

例えば、Mr g p r X 4またはMr g p r A 1の活性化は、化合物の非存在下での細胞内カルシウムのレベルと比較して細胞内カルシウムの増加を特定することにより検出される。場合によっては、細胞内カルシウムのレベルは、少なくとも1%、例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%増加する。細胞内カルシウム濃度は、本明細書に記載の方法または当業者が利用可能な方法を利用して決定される。

20

【0046】

Mr g p r X 4ポリペプチドの生物学的活性を打ち消すか、阻害するか、減少させるか、抑制することを確認するために、候補Mr g p r X 4アンタゴニストがスクリーニングされる。Mr g p r X 3ポリペプチドの生物学的活性を打ち消すか、阻害するか、減少させるか、抑制することを確認するために、候補Mr g p r X 3アンタゴニストがスクリーニングされる。

30

【0047】

また、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3のアンタゴニストを同定する方法であって、本明細書に記載の単離細胞を偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させることと、本明細書に記載の単離細胞を候補アンタゴニストと接触させることと、Mr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化を検出することとを含み、候補アンタゴニストの非存在下でのMr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化と比較してMr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化が低下していると、候補化合物がアンタゴニストであると決定される方法も提供される。好ましくは、候補アンタゴニストは、候補アンタゴニストの非存在下での試験アッセイ(対照)と比較して、Mr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化を少なくとも1、2、3、4または5パーセント低下させ、さらに好ましくは、候補アンタゴニストは、試験アッセイでは、候補アンタゴニストの非存在下での同じ試験アッセイ(対照)と比較して、Mr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性化を少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90または100パーセント低下させる。候補アンタゴニストを評価するための好ましい試験アッセイには、以下の実施例9のアッセイが挙げられ、このアッセイでは、カルシウムイメージングまたはイノシトールリン酸検出により活性化を評価することができる。

40

【0048】

また、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3のアゴニストを同定する方法であって、本

50

明細書に記載の単離細胞（例えば、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3（Mr g p r X 3）または Mr g p r X 4 を発現する組換え核酸を含む単離細胞）を偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させることと、本明細書に記載の単離細胞を候補アゴニストと接触させることと、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性化を検出することとを含み、候補アゴニストの非存在下での Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性化と比較して Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性化が増大していると、候補化合物がアゴニストであると決定される方法も提供される。好ましくは、選択された候補アゴニストは、候補アゴニストの非存在下での試験アッセイ（対照）と比較して、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性化を少なくとも 1、2、3、4 または 5 パーセント低下させ、さらに好ましくは、選択された候補アゴニストは、試験アッセイでは、候補ア
10
ゴニストの非存在下での同じ試験アッセイ（対照）と比較して、Mr g p r X 3 または Mr g p r X 4 の活性化を少なくとも 7、10、15、20、25、30、40 50 60、70、80、90 または 100 パーセント低下させる。候補アゴニストを評価するための好ましい試験アッセイには、以下の実施例 9 のアッセイが挙げられ、このアッセイでは、カルシウムイメージングまたはイノシトールリン酸検出により活性化を評価することができる。

【0049】

また、本明細書では、対象の自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症）を治療する方法であって、自己免疫疾患に罹患しているか、自己免疫疾患を発症するリスクのある対象を特定することと、Mr g p r X 4 アntagオニストを含む有効量の組成物を対象に投与し、それにより対象の自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症）を治療または予防することとを含む方法も提供される。
20

【0050】

例示的な自己免疫疾患は、セリアック病、1型糖尿病、グレース病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデス（SLE またはループス）からなる群から選択される。

【0051】

また、本明細書では、対象の創傷治癒を治療する方法であって、創傷治癒を経験しているか、創傷治癒を経験するリスクのある対象を特定することと、Mr g p r X 3 アntagオニストを含む組成物の有効量を対象に投与し、それにより対象の創傷治癒を治療または支
30
援することとを含む方法も提供される。

【0052】

また、本明細書では、対象の皮膚障害を治療する方法であって、皮膚障害に罹患しているか、皮膚障害を発現するリスクのある対象を特定することと、Mr g p r X 3 アntagオニストを含む組成物の有効量を対象に投与し、それにより対象の皮膚障害を治療または予防することとを含む方法も提供される。

【0053】

さらに、対象の皮膚障害を治療する方法であって、皮膚障害に罹患しているか、皮膚障害を発現するリスクのある対象を特定することと、Mr g p r X 3 アntagオニストを含む組成物の有効量を対象に投与し、それにより対象の皮膚障害を治療または予防することとを含む方法が提供される。
40

【0054】

そのような方法により治療される例示的な皮膚障害には、乾癬、皮膚炎、皮膚潰瘍および癌腫（例えば、メラノーマ）が挙げられる。

【0055】

また、本明細書では、対象の炎症（例えば、慢性炎症）を治療する方法であって、炎症に罹患しているか、炎症を発症するリスクのある対象を特定することと、Mr g p r X 3 アntagオニストを含む組成物の有効量を対象に投与し、それにより対象の炎症（例えば、慢性炎症）を治療または予防することとを含む方法も提供される。

【0056】

10

20

30

40

50

炎症の例は、慢性炎症、虫垂炎、滑液包炎、大腸炎、膀胱炎、皮膚炎、静脈炎、反射性交感神経性ジストロフィー/複合性局所疼痛症候群 (r s d / c r p s)、鼻炎、腱炎、扁桃炎、尋常性ざ瘡、反応性気道障害、例えば、喘息および気道感染症、自己免疫疾患、自己炎症性疾患、セリアック病、慢性前立腺炎、憩室炎、糸球体腎炎、化膿性汗腺炎、過敏症、上皮腸障害 (e p i t h e l i a l i n t e s t i n a l d i s o r d e r) を含む腸障害、例えば、炎症性腸疾患、例えば、過敏性腸症候群および大腸炎、間質性膀胱炎、耳炎、骨盤内炎症性疾患、再灌流傷害、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、移植片拒絶ならびに血管炎からなる群から選択される。

【 0 0 5 7 】

また、本明細書では、対象の悪性形質転換 (例えば、癌) を治療する方法であって、悪性形質転換に罹患しているか、悪性形質転換を発症するリスクのある対象を特定することと、M r g p r X 3 アントゴニストを含む組成物の有効量を対象に投与し、それにより対象の悪性形質転換 (例えば、癌) を治療または予防することを含む方法も提供される。

10

【 0 0 5 8 】

例示的な癌は、癌腫、肉腫、腫瘍、固形腫瘍、血液癌、白血病、リンパ腫、皮膚癌、メラノーマ、乳癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、精巣癌、大腸癌、胃癌、腸癌、膀胱癌、肺癌、非小細胞肺癌、膵癌、腎細胞癌、腎癌、肝癌、肝細胞癌、脳癌、頭頸部癌、網膜癌、神経膠腫、脂肪腫、咽頭癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、子宮内膜癌、骨髄腫および食道癌からなる群から選択される。

【 0 0 5 9 】

本明細書に記載の組成物は、経口投与、静脈内投与、局所投与、非経口投与、腹腔内投与、筋肉内投与、脊髄内投与、病巣内投与、頭蓋内投与、鼻腔内投与、眼内投与、心臓内投与、硝子体内投与、骨内投与、脳内投与、動脈内投与、関節内投与、皮内投与、経皮投与、経粘膜投与、舌下投与、経腸投与、唇下投与 (s u b l a b i a l a d m i n i s t r a t i o n)、吹送投与 (i n s u f f l a t i o n a d m i n i s t r a t i o n)、坐薬投与、吸入投与または皮下投与により投与される。

20

定義

【 0 0 6 0 】

別に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する: The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用される場合、以下の用語は、別段の指定がない限り、以下でそれらに付与される意味を有する。

30

【 0 0 6 1 】

本明細書に記載の抗体およびその断片には、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、dAb (ドメイン抗体)、単鎖、Fab、Fab' および F (a b ') 2 断片、Fv、scFv が挙げられる。抗体の断片は、そのそれぞれの抗体の免疫学的活性を有する。いくつかの実施形態では、抗体の断片は、1500以下、1250以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下のアミノ酸を含有する。例えば、タンパク質またはペプチド阻害剤は、1500以下、1250以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、100以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下、25以下、20以下、10以下のアミノ酸を含有する。例えば、本発明の核酸阻害剤は、400以下、300以下、200以下、150以下、100以下、90以下、80以下、70以下、

40

50

60以下、50以下、40以下、35以下、30以下、28以下、26以下、24以下、22以下、20以下、18以下、16以下、14以下、12以下、10以下のヌクレオチドを含有する。

【0062】

分子および細胞生化学における一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Ed. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012); Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 2002); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplift & Lowy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); および Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998) などの標準的な教科書に見出すことができる。本開示で言及される遺伝子操作のための試薬、クローニングベクターおよびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich および ClonTech などの商業ベンダーから入手可能である。

【0063】

本明細書で使用される用語「抗体」(Ab)には、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)および抗体断片が含まれる。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書では「抗体」と区別なく使用される。

【0064】

「単離抗体」とは、その自然環境の成分から分離および/または回収されたものである。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断的または治療的使用を妨げる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体は、(1)ローリー法によって決定される通り、抗体の95重量%超、最も好ましくは99重量%超まで、(2)スピニング・カップ・シークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3)還元または非還元条件下で、クマシーブルーまたは好ましくは銀染色を使用するSDS-PAGEによって均質性になるまで精製される。抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないことから、単離抗体は、組換え細胞内にインサイチュで抗体を含む。ただし、通常は、少なくとも1つの精製工程によって単離抗体が調製される。

【0065】

基本的な四鎖抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドに沿って5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、したがって、10の抗原結合部位を含有するのに対して、分泌されたIgA抗体は、重合して、J鎖に沿って2~5つの基本的な4鎖単位を含む多価集合体を形成することができる。IgGの場合、4鎖単位は一般に約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖と連結しているのに対して、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて、1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結している。各HおよびL鎖はまた、規則的間隔の鎖間ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端に、可変ドメイン(V_H)、続いて、および鎖のそれぞれについて3つの定常ドメイン(C_H)、ならびにμおよびアイソタイプについて4つのC_Hドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(

V_L)、続いて、もう一方の末端に定常ドメイン(C_L)を有する。V_LはV_Hと整列しており、C_Lは重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定の amino 酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメインの間に界面を形成すると考えられている。V_HおよびV_Lの対合は、単一の抗原結合部位を一緒に形成する。様々なクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6を参照されたい。

【0066】

10

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメイン(C_L)の amino 酸配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる2つの明確に異なる種類のうちの1つに割り当てることができる。免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメイン(C_H)の amino 酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。それぞれアルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()およびミュー(μ)と指定された重鎖を有する5つのクラスの免疫グロブリン、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがある。およびクラスは、C_H配列および機能の比較的わずかな差に基づいてサブクラスにさらに分割され、例えば、ヒトは、下記のサブクラス、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2を発現する。

【0067】

20

用語「可変」は、Vドメインの特定のセグメントでは、抗体間で配列が大幅に異なるという事実を指す。Vドメインは抗原結合を仲介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。ただし、可変性は、可変ドメインの110 amino 酸スパンにわたって均等に分布していない。代わりに、V領域は、それぞれ9~12 amino 酸長である「超可変領域」と呼ばれる極端な可変性の比較的短い領域によって分離された、15~30 amino 酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変のストレッチからなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは4つのFRをそれぞれ含み、この4つのFRは、シート構造を接続し、場合によってはこのシート構造の一部を形成するループを形成する3つの超可変領域によって接続されたシート構成を主に採用している。各鎖の超可変領域は、FRによって、他の鎖由来の超可変領域とごく近接して一緒に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照)。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接関与していないが、抗体依存性細胞傷害(ADCC)での抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。

30

【0068】

本明細書で使用される用語「超可変領域」は、抗原結合に関与する抗体の amino 酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」由来の amino 酸残基(例えば、Kabat番号付けシステムに従って番号付けした場合、V_L内の残基約24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)程度、ならびにV_H内の約31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3)程度; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); および/または「超可変ループ」由来の残基(例えば、Chothia番号付けシステムに従って番号付けした場合、V_L内の残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)、ならびにV_H内の26~32(H1)、52~56(H2)および95~101(H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)); および/ま

40

50

たは「超可変ループ」/CDR由来の残基(例えば、IMGT番号付けシステムに従って番号付けした場合、V_L内の残基27~38(L1)、56~65(L2)および105~120(L3)、ならびにV_H内の27~38(H1)、56~65(H2)および105~120(H3); Lefranc, M. P. et al. *Nucl. Acids Res.* 27: 209-212 (1999), Ruiz, M. e al. *Nucl. Acids Res.* 28: 219-221 (2000))を含む。場合により、抗体は、A_HOに従って番号付けした場合、下記の点、すなわち、V_L内の28、36(L1)、63、74~75(L2)および123(L3)、ならびにV_H内の28、36(H1)、63、74~75(H2)および123(H3)のうちの一つ以上に対称的挿入を有する; Honneger, A. and Plunkthun, A. *J. Mol. Biol.* 309: 657-670 (2001))。 10

【0069】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を含む個々の抗体は、少量存在し得る可能な自然発生の変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。モノクローナル抗体は、それらの特異性に加えて、他の抗体に汚染されずに合成され得るという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法論によって調製され得るか、細菌、真核動物または植物細胞における組換えDNA法を使用して作製され得る(例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照)。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991)およびMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)に記載された技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。 20

【0070】

モノクローナル抗体には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるのに対して、鎖の残りが、別の種に由来するか別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体、ならびに、それらが所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片が含まれる(米国特許第4,816,567号明細書およびMorrisson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984))を参照)。また、ヒト抗体に由来する可変ドメイン抗原結合配列も提供される。したがって、本明細書の主要な目的のキメラ抗体には、1つ以上のヒト抗原結合配列(例えば、CDR)を有し、非ヒト抗体に由来する1つ以上の配列、例えば、FRまたはC領域配列を含む抗体が含まれる。さらに、本明細書の主要な目的のキメラ抗体には、1つの抗体クラスまたはサブクラスのヒト可変ドメイン抗原結合配列と、別の抗体クラスまたはサブクラスに由来する別の配列、例えば、FRまたはC領域配列とを含むものが含まれる。本明細書の目的のキメラ抗体にはまた、本明細書に記載の配列に関連する、または非ヒト霊長類(例えば、旧世界ザル、類人猿など)などの異なる種に由来する可変ドメイン抗原結合配列を含むものも含まれる。キメラ抗体にはまた、霊長類化およびヒト化抗体も含まれる。 30 40

【0071】

さらに、キメラ抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに精緻化するために行われる。詳細については、Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) 50

; および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992) を参照されたい。

【0072】

「ヒト化抗体」とは、一般に、非ヒトである供給源からその中に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有するヒト抗体であると考えられる。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、「インポート」残基と称され、「インポート」残基は典型的に、「インポート」可変ドメインから採取される。ヒト化は、従来、Winterらの方法に準拠して(Jones et al., Nature, 321: 522 - 525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534 - 1536 (1988))、ヒト抗体の対応する配列をインポート超可変領域配列に置換することにより行われる。したがって、そのような「ヒト化」抗体はキメラ抗体(米国特許第4,816,567号明細書)であり、実質的にインタクトなヒト可変ドメイン未満が、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。

10

【0073】

「ヒト抗体」とは、ヒトによって自然に産生された抗体に存在する配列のみを含む抗体である。ただし、本明細書で使用される場合、ヒト抗体は、本明細書に記載される修飾および変異体配列を含む、自然発生のヒト抗体には見られない残基または修飾を含み得る。これらは典型的に、抗体性能をさらに精緻化または強化するために行われる。

【0074】

「インタクト」抗体とは、抗原結合部位、ならびにC_Lおよび少なくとも重鎖定常ドメイン、C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異体であり得る。好ましくは、インタクト抗体は1つ以上のエフェクター機能を有する。

20

【0075】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部、好ましくはインタクト抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片、ダイアボディ、線状抗体(米国特許第5,641,870号明細書; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057 - 1062 [1995])、一本鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

30

【0076】

抗体の「機能性断片またはアナログ」という語句は、完全長抗体と共通の定性的な生物学的活性を有する化合物である。例えば、抗IgE抗体の機能性断片またはアナログは、高親和性受容体FcγRIと結合する能力を有することにより、そのような分子の能力を防止するか実質的に低減させるような方法で、IgE免疫グロブリンと結合することができるものである。

【0077】

抗体のパパイン分解は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一抗原結合断片と、残りの「Fc」断片とを産生し、名称は容易に結晶化する能力を反映している。Fab断片は、H鎖の可変領域ドメイン(V_H)に沿ったL鎖全体と、1つの重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})とからなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、二価の抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合Fab断片にほぼ対応する単一の大きなF(ab')₂断片を生成し、依然として抗原を架橋させることができる。Fab'断片は、C_{H1}ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む追加の少数の残基を有することにより、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'の呼称である。F(ab')₂抗体断片は元来、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

40

【0078】

50

「Fc」断片は、ジスルフィドによって一緒に保持された両H鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列によって決定され、この領域は、特定の種類の細胞に見られるFc受容体(FcR)によって認識される部分でもある。

【0079】

「Fv」は、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は、緊密で非共有結合的に会合した1つの重鎖可変領域ドメインおよび1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これらの2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ(それぞれHおよびL鎖に由来する3つのループ)が生じる。ただし、単一可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識し結合する能力を有する。

10

【0080】

「sFv」または「scFv」とも略される「一本鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖に接続されたV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドは、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをV_HドメインとV_Lドメインとの間にさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infraを参照されたい。

20

【0081】

用語「ダイアボディ」は、Vドメインの鎖内ではなく鎖間対合が実現されるように、V_HドメインとV_Lドメインとの間にショートリンカー(約5~10残基)を有するsFv断片(前段落を参照)を構築することによって、二価断片、すなわち、2つの抗原結合部位を有する断片をもたらすことによって調製される小さい抗体断片を指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_HおよびV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する2つの「クロスオーバー」sFv断片のヘテロ二量体である。ダイアボディについては、例えば、欧州特許第404,097号明細書、国際公開第93/11161号パンフレットおよびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)にさらに完全に記載されている。

30

【0082】

本明細書で使用される場合、「内在化する」抗体とは、哺乳動物細胞(例えば、細胞表面ポリペプチドまたは受容体)上の抗原との結合時に、細胞によって取り込まれる(すなわち、中に入る)抗体である。内在化抗体には、当然ながら、抗体断片、ヒトまたはキメラ抗体および抗体コンジュゲートが含まれる。特定の治療用途では、インビボでの内在化が企図される。内在化される抗体分子の数は、細胞、特に感染細胞を死滅させるか、その増殖を阻害するのに十分または妥当なものである。抗体または抗体コンジュゲートの効力に応じて、いくつかの例では、細胞への単一の抗体分子の取り込みは、抗体が結合する標的細胞を死滅させるのに十分である。例えば、特定の毒素は、抗体にコンジュゲートされた毒素の1分子の内在化が感染細胞を死滅させるのに十分であるように、死滅させるのに高度に強力である。

40

【0083】

本明細書で使用される場合、抗体は、検出可能なレベルで、好ましくは、約 $10^4 M^{-1}$ 以上、または約 $10^5 M^{-1}$ 以上、約 $10^6 M^{-1}$ 以上、約 $10^7 M^{-1}$ 以上、または $10^8 M^{-1}$ 以上の親和定数 K_a で抗原と反応する場合、「免疫特異性」、抗原「に対して特異的」または抗原と「特異的に結合する」と言われる。そのコグネイト抗原に対する抗体の親和性は、解離定数 K_D としても一般的に表現され、特定の実施形態では、HuM2e抗体は、 $10^{-4} M$ 以下、約 $10^{-5} M$ 以下、約 $10^{-6} M$ 以下、 $10^{-7} M$ 以下または $10^{-8} M$ 以下の K_D で結合する場合、M2eと特異的に結合する。抗体の親和性は、従

50

来の技術、例えば、Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51: 660 (1949)) によって記述されているものを使用して、容易に決定することができる。

【0084】

その抗原、細胞または組織に対する抗体の結合特性は、一般に、例えば、免疫組織化学 (IHC) および/または蛍光活性化細胞選別 (FACS) などの免疫蛍光ベースのアッセイを含む免疫検出法を使用して決定および評価され得る。

【0085】

指定された抗体の「生物学的特性」を有する抗体は、他の抗体からそれを区別するその抗体の生物学的特性のうちの一つ以上を有する抗体である。例えば、特定の実施形態では、指定された抗体の生物学的特性を有する抗体は、指定された抗体によって結合されているものと同じエピトープに結合し、および/または指定された抗体として共通のエフェクター機能を有する。

【0086】

用語「アンタゴニスト抗体」は最も広い意味で使用され、それが特異的に結合するエピトープ、ポリペプチドまたは細胞の生物学的活性を部分的または完全に遮断、阻害または中和する抗体を含む。アンタゴニスト抗体を同定する方法は、候補アンタゴニスト抗体によって特異的に結合されているポリペプチドまたは細胞を候補アンタゴニスト抗体と接触させることと、そのポリペプチドまたは細胞に通常関連する一つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することとを含み得る。

【0087】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域 (天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域) に起因する生物学的活性を指し、抗体アイソタイプにより変動する。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合および補体依存性細胞傷害、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)、貪食、細胞表面受容体 (例えば、B細胞受容体) のダウンレギュレーション、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0088】

用語「抗原結合部位」または「結合部分」は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。抗原結合部位は、重 (「H」) 鎖および軽 (「L」) 鎖のN末端可変 (「V」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と呼ばれる、重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐するストレッチは、「フレームワーク領域」または「FR」として知られる保存度の高いフランキングストレッチ間に挟まれる。したがって、用語「FR」は、免疫グロブリンの超可変領域の間、およびそれに隣接して自然に見られるアミノ酸配列を指す。抗体分子では、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間に互いに対して配置されて、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面と相補的であり、重鎖および軽鎖のそれぞれの3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。

【0089】

本明細書で使用される用語「エピトープ」には、免疫グロブリン、scFvまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基が含まれる。エピトープ決定基は、アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性な表面分子団からなり、特異的な三次元構造特性と特異的な電荷特性とを有する。例えば、ポリペプチドのN末端ペプチドまたはC末端ペプチド、タンパク質の線形または非線形ペプチド配列、ならびに第1の抗原のアミノ酸および第2の抗原のアミノ酸を含むエピトープに対して抗体を生じさせることができる。

【0090】

本明細書で使用される用語「免疫細胞」には、一般に、骨髄「免疫細胞」内で産生される造血幹細胞 (HSC) に由来する白血球 (white blood cells) (白血球 (leukocytes)) が含まれ、例えば、リンパ球 (T細胞、B細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞) および骨髄由来細胞 (好中球、好酸球、好塩基球、単球、マク

10

20

30

40

50

ロファージ、樹状細胞)が含まれる。いくつかの実施形態では、免疫細胞はキメラ抗原受容体を含む。本明細書で使用される用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、免疫細胞を活性化または刺激することができる細胞内シグナル伝達ドメインに融合した抗原結合ドメインを指し、特定の実施形態では、CARは膜貫通ドメインも含む。

【0091】

本明細書で使用される用語「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」は、免疫グロブリン分子と、その免疫グロブリンが特異的である抗原との間に生じる種類の非共有相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数(K_d)の観点から表現することができ、 K_d が小さいほど親和性が高くなる。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野で周知の方法を使用して定量することができる。1つのそのような方法は、抗原結合部位/抗原複合体の形成および解離の速度の測定を伴い、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響を与える幾何学的パラメーターに依存する。したがって、濃度ならびに実際の会合および解離の速度の計算によって、「オン速度定数」(K_{on})および「オフ速度定数」(K_{off})の両方を決定することができる。(Nature 361:186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に関係しないあらゆるパラメーターの取り消しを可能にし、解離定数 K_d に等しい。Davies et al.(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。本発明の抗体は、放射性リガンド結合アッセイまたは当業者に公知の同様のアッセイなどのアッセイによって測定した際に、平衡結合定数(K_d)が、 $1\mu\text{M}$ 、好ましくは 100nM 、さらに好ましくは 10nM 、さらに好ましくは 1nM 、最も好ましくは 100pM ~約 1pM である場合に、本明細書に記載の抗原またはエピトープ(例えば、CTLA、PD1、PDL1、または他の免疫抑制タンパク質および/または腫瘍抗原)と特異的に結合すると言われている。

【0092】

本発明はまた、ポリペプチドおよび核酸断片がそれぞれ完全長のポリペプチドおよび核酸の所望の生物学的活性を示す(すなわち、Mr g p r X 3またはMr g p r X 4に拮抗する)限り、そのポリペプチドおよび核酸断片を含む。ほぼあらゆる長さの核酸断片が使用される。例えば、本発明の多くの実装には、全長が約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50塩基対の長さ(すべての中間の長さを含む)の例示的なポリヌクレオチドセグメントが含まれる。同様に、ほぼあらゆる長さのポリペプチド断片が使用される。例えば、本発明の多くの実装には、全長が約10,000、約5,000、約3,000、約2,000、約1,000、約500、約1,000、約500、約200、約100または約50アミノ酸の長さ(すべての中間の長さを含む)の例示的なポリペプチドセグメントが含まれる。

【0093】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは他の薬剤は精製および/または単離される。具体的には、本明細書で使用される場合、「単離」または「精製」された核酸分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、組換え技術によって生成される場合、他の細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学的に合成された場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。精製された化合物は、対象化合物の少なくとも60重量%(乾燥重量)である。好ましくは、調製物は、対象化合物の少なくとも75重量%、さらに好ましくは少なくとも90重量%、最も好ましくは少なくとも99重量%である。例えば、精製された化合物は、重量で、所望の化合物の少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、98%、99%または100%(w/w)のものである。純度は、任意の適切な標準法、例えばカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析によって測定される。精製または単離されたポリヌクレオチド(リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA))には、その自然発生の状態では隣接する遺伝子または配列がない。精製または単離されたポリペプチドには、その自然発生の状態では隣接するアミノ酸または配列

がない。「精製された」はまた、感染性または毒性物質を欠くなど、ヒト対象への投与に安全な無菌性の程度を定義する。

【0094】

同様に、「実質的に純粋」とは、天然にそれに付随する成分から分離されたヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。典型的には、ヌクレオチドおよびポリペプチドは、それらが少なくとも60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、95重量%またはさらには99重量%であり、それらが自然に結合したタンパク質および自然発生の有機分子を含まない場合に、実質的に純粋である。

【0095】

「単離された核酸」とは、核酸が由来する生物の自然発生のゲノム内では隣接する遺伝子がない核酸を意味する。この用語は、例えば、(a)自然発生のゲノムDNA分子の一部であるが、それが自然に発生する生物のゲノムでは分子のその一部に隣接する核酸配列の両方が隣接していないDNA、(b)ベクター中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に、結果として生じる分子がいかなる自然発生のベクターともゲノムDNAとも同一でないような方法で組み込まれた核酸、(c)合成相補DNA(cDNA)、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって産生された断片、または制限断片などの別個の分子、および(d)雑種遺伝子、すなわち、融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組換えヌクレオチド配列を網羅する。本発明による単離された核酸分子には、合成により生成された分子、ならびに化学的に改変されたおよび/または骨格が改変された任意の核酸がさらに含まれる。例えば、単離された核酸は、精製されたcDNAまたはRNAポリヌクレオチドである。単離された核酸分子には、メッセンジャーリボ核酸(mRNA)分子も含まれる。

【0096】

用語「ベクター」は、複製および発現可能な細胞への導入のために異種核酸配列を挿入することができるキャリア核酸分子を指すために使用される。この用語はさらに、同じ目的に有用な特定の生物学的媒体、例えばウイルスベクターおよびファージを意味する。これらの感染性因子はともに異種核酸配列を導入することができる

【0097】

「発現ベクター」は、宿主細胞内の特定のポリヌクレオチド配列の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換え的にまたは合成的に生成された核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスゲノムまたは核酸断片の一部であり得る。典型的には、発現ベクターは、転写され、プロモーターに作動可能に連結されるポリヌクレオチドを含む。この文脈では、「作動可能に連結された」とは、2つ以上の遺伝的エレメント、例えば、そのエレメントの適切な生物学的機能を可能にする相対位置に配置されたポリヌクレオチドコード配列およびプロモーター、例えば、コード配列の転写を誘導するプロモーターを意味する。本明細書では、用語「プロモーター」は、核酸の転写を誘導する核酸制御配列のアレイを指すために使用される。本明細書で使用される場合、プロモーターは、転写の開始部位近くの必要な核酸配列、例えば、ポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATAエレメントを含む。プロモーターはまた、場合により、転写の開始部位から数千塩基対も離れて位置することができる遠位のエンハンサーエレメントまたはリプレッサーエレメントを含む。発現ベクターに存在し得る他のエレメントには、転写を増強するエレメント(例えば、エンハンサー)、および転写を終結するエレメント(例えば、ターミネーター)、ならびに発現ベクターから産生された組換えタンパク質に特定の結合親和性または抗原性を付与するエレメントが挙げられる。

【0098】

「候補化合物」とは化学物質を意味し、それが自然発生するか、人工的に誘導されるかを問わない。候補化合物には、例えば、ペプチド、ポリペプチド、合成有機分子、天然有機分子、核酸分子、ペプチド核酸分子ならびにそれらの成分および誘導体が挙げられ得る。

【0099】

10

20

30

40

50

用語「医薬組成物」は、少なくとも1つの治療的または生物学的に活性な薬剤を含有し、患者への投与に適した任意の組成物を意味する。これらの製剤はいずれも、当技術分野の周知かつ受け入れられている方法により調製することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, (ed. A. R. Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2000を参照されたい。

【0100】

「Gタンパク質共役受容体(GPCR)」とは、細胞外の分子を感知し、細胞内で、シグナル伝達経路、最終的には細胞応答を活性化するタンパク質受容体を意味する。GPCRは、細胞膜を7回通過するため、7回膜貫通型受容体と呼ばれている。

10

【0101】

「アゴニスト」とは、受容体に結合し、受容体を活性化して生物学的応答を引き起こす化学物質を意味する。アゴニストが作用を引き起こすのに対して、「アンタゴニスト」はアゴニストの作用を遮断し、インバースアゴニストはアゴニストの作用とは反対の作用を引き起こす。本明細書で使用される用語「アンタゴニスト」および「阻害剤」は、その標的分子の生物学的活性を打ち消すか、阻害するか、減少させるか、抑制する任意の分子を指すために区別なく使用される。いくつかの実施形態では、アゴニストは、その標的分子(例えば、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3)の生物学的活性を誘発または増加させる場合、「スーパーアゴニスト」である。いくつかの実施形態では、アンタゴニストは、その標的分子(例えば、Mr g p r X 4またはMr g p r X 3)の生物学的活性を打ち消すか、阻害するか、減少させるか、抑制する場合、「スーパーアンタゴニスト」である。好適なMr g p r X 3アンタゴニスト、Mr g p r X 4アンタゴニスト、Mr g p r X 3アゴニストおよび/またはMr g p r X 4アゴニストには、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子阻害剤、リガンド融合体および抗体が挙げられる。

20

【0102】

「野生型」または「WT」とは、自然界で発生する種の典型的な形態の表現型を意味する。あるいは、野生型は、非標準的な「変異」対立遺伝子によって生成されるものとは対照的に、遺伝子座での標準的な「正常」対立遺伝子の産物として概念化される。

【0103】

本明細書で使用される用語「投与する」は、例えば疾患または症状の治療を必要とする対象に、Mr g p r X 3もしくはMr g p r X 4アンタゴニストまたはMr g p r X 3もしくはMr g p r X 4アゴニストを移すか、送達するか、導入するか、輸送する任意の様式を指す。そのような様式には、限定するものではないが、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、鼻腔内および皮下投与が挙げられる。

30

【0104】

「Mr g p r X 3またはMr g p r X 4アンタゴニスト」とは、シグナル伝達経路を活性化するMr g p r X 3またはMr g p r X 4の能力を遮断、防止、軽減または変化させることができる任意の小分子、化合物、抗体、核酸分子もしくはポリペプチドまたはそれらの断片を意味する。

【0105】

「Mr g p r X 3またはMr g p r X 4アゴニスト」とは、シグナル伝達経路を活性化するMr g p r X 3またはMr g p r X 4の能力を増加、活性化または変化させることができる任意の小分子、化合物、抗体、核酸分子もしくはポリペプチドまたはそれらの断片を意味する。Mr g p r X 3アゴニストまたはMr g p r X 4アゴニストは、以下の実施例9など、本明細書に開示されたプロトコルにより同定することができる。

40

【0106】

「変化」とは、本明細書に記載されるものなど、当技術分野で知られている標準法によって検出される、ポリペプチド、例えばMr g p r X 3またはMr g p r X 4の活性の変化(増加または減少)を意味する。本明細書で使用される場合、変化には、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性の10%以上の変化、好ましくは25%の変化、さ

50

らに好ましくは40%の変化、最も好ましくはポリペプチドの活性の50%以上の変化が含まれる。

【0107】

本明細書で使用される場合、「変化」にはまた、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性の2倍以上の変化、例えば5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、500倍、1000倍以上の変化が含まれる。

【0108】

「改善する」とは、例えば、偽アレルギー型反応などの疾患の発症または進行を減少、抑制、減弱、低下、停止または安定化することを意味する。

【0109】

「増幅する」とは、分子のコピー数を増大することを意味する。一例では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して核酸を増幅する。

【0110】

「結合」とは、分子に対して物理化学的親和性を有することを意味する。結合は、本発明の方法のいずれか、例えば、細胞上に発現した受容体を有する薬物/化合物によって測定される。

【0111】

本開示では、「含む(comprises)」、「含んでいる(comprising)」、「含有している(containing)」、「有している(having)」などは、米国特許法でそれらに付与されている意味を有することができ、「含む(includes)」、「含んでいる(including)」などを意味することができ、用語「から本質的になっている(consisting essentially of)」または「から本質的になる(consists essentially)」は、同様に米国特許法で付与されている意味を有し、これらの用語は非制限的であり、列挙されたもの以外のものの存在によって、列挙されたものの基本的特徴または新規の特徴が変化しない限り、列挙されたもの以外のものの存在も許容するが、従来技術の実施形態を除外する。

【0112】

「検出する」は、検出されるシグナル伝達経路のMr g p r X 3またはMr g p r X 4活性化の有無または量を直接または間接的に同定することを指す。

【0113】

「有効量」とは、未治療の患者と比較して疾患の症状を改善するのに必要な量を意味する。疾患の治療的処置のために本発明を実施するために使用される活性化化合物の有効量は、投与方法、対象の年齢、体重および全体的な健康状態に応じて変動する。最終的に、主治医または獣医が適切な量と投与レジメンとを決定する。そのような量は「有効」量と呼ばれる。

【0114】

本明細書で使用される用語「治療する」および「治療」は、症状の重症度および/または頻度の低下をもたらす、症状および/またはそれらの根本原因を排除する、および/または損傷の改善または修復を促進するために、有害な症状、障害または疾患に苦しむ臨床的に症候性の個体に薬剤または製剤を投与することを指す。

【0115】

本明細書で提供される範囲は、範囲内のすべての値の略記であると理解される。例えば、1~50の範囲には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50からなる群の任意の数、数の組合せ、または部分範囲、ならびに、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8および1.9などの前述の整数間のすべての介在する十進法の値が含まれると理解される。部分範囲に関しては、範囲のいずれかの終点が

10

20

30

40

50

ら延びる「入れ子状の部分範囲」が具体的に意図されている。例えば、1～50の例示的な範囲の入れ子状の部分範囲は、一方の方向に1～10、1～20、1～30および1～40、または他方の方向に50～40、50～30、50～20および50～10を含み得る。

【0116】

「組換え」とは、複数の供給源からの遺伝物質を一緒にして、普通なら生物有機体には見られないであろう配列を作成するための遺伝子組換え（分子クローニングなど）の実験室的方法によって形成された核酸分子を意味する。

【0117】

「異種プロモーター」は、遺伝子または核酸配列が自然界で作動可能に連結されているプロモーターとは異なるプロモーターである。用語「作動可能に連結された」は、核酸発現制御配列（プロモーター、シグナル配列、または転写因子結合部位のアレイなど）と第2の核酸配列との間の機能的連結を指し、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写および/または翻訳に影響を及ぼす。本明細書で使用される「異種ポリヌクレオチド」または「異種遺伝子」は、特定の宿主細胞に対して外来の供給源に由来するもの、または同じ供給源に由来する場合、その元の形態から修飾されたものである。

【0118】

「低減させる」とは、少なくとも10%、25%、50%、75%または100%の負の変化を意味する。

【0119】

「基準」とは、標準または対照条件を意味する。

【0120】

本明細書で使用される場合、具体的に記載されない限り、または文脈から明らかでない限り、用語「a」、「an」および「the」は、単数または複数であると理解される。本明細書で使用される場合、具体的に記載されない限り、または文脈から明らかでない限り、用語「または」は包括的であると理解される。

【0121】

本明細書で使用される場合、具体的に記載されない限り、または文脈から明らかでない限り、用語「約」は、当技術分野における一般公差の範囲内、例えば、平均の2標準偏差内であると理解される。約は、記載されている値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%または0.01%以内であると理解することができる。文脈からそうでないことが明らかでない限り、本明細書に提供されるすべての数値は、用語「約」によって修飾されている。

【0122】

本発明の他の特徴および利点は、その好ましい実施形態の以下の説明から、および特許請求の範囲から明らかになるであろう。別に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書に引用するすべての公開外国特許および特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用する受託番号によって示されるGenbankおよびNCBI寄託は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用する他のすべての公開参考文献、文書、原稿および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、定義を包含する本明細書が優先するものとする。さらに、材料、方法および例は、例証的なものにすぎず、限定を意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】図1A～E。ラモトリギンがマウスMrgrp1およびそのヒトオルソログMRGPRX4に直接結合することを示す一連の図、グラフ、写真および顕微鏡写真である。図1Aは、マウスおよびヒトMrgrp遺伝子を示すゲノム遺伝子座の図である。マウ

10

20

30

40

50

ス *Mrgpra3*、*Mrgprc11* およびそれらのヒトオルソログ *MRGPRX1* は、後根神経節 (DRG) の感覚ニューロンに特異的に発現し、クロロキン (CQ) および *BAM8-22* (BAM) を含むかゆみ物質に応答してかゆみ受容体として機能する。マウス *Mrgprb2* およびそのヒトオルソログ *MRGPRX2* は、肥満細胞に特異的に発現する塩基性分泌促進物質 (例えば、化合物 48/80 および PAMP) の受容体であり、薬物誘発アナフィラキシー反応を媒介する。この試験では、*MRGPRX4* オルソログ *Mrgpra1* が説明される。*Saal1*、*Ptpn5* および *Zdhhc13* は、遺伝子座内の無関係な遺伝子である。図 1 E は、LTG が *Mrgpra1*-GFP の内在化を誘導したことを示すグラフである。色素により標識した LTG は、明るい赤色蛍光 (Texas Red) を生成することができる。培地、色素を含む培地、LTG、色素を含む LTG により、血清欠乏 (>4 時間) *Mrgpra1*-GFP 細胞を 37°C で 15 分間処理した。染色により、色素を含む LTG が *Mrgpra1*-GFP 細胞内に内在化されたことが示された。図 1 C は、*MRGPRX2* / 細胞膜クロマトグラフィー (CMC) カラム および *MRGPRX4* / CMC カラムでの LTG の溶出プロファイルを示すグラフである。LTG は *MRGPRX2* / CMC カラムに保持することができない。*MRGPRX4* / CMC カラムでのラモトリギンの保持時間 16.7 分。図 1 C および図 1 D は、LTG の *MRGPRX4* / CMC ブレークスルー曲線 (図 1 C) と、 $1/[LR]_s$ 対 $1/[L]_m$ をプロットすることにより達成される回帰曲線 (図 1 D) とを示すグラフである。バー付きの各点は平均 ± 標準誤差 (n = 5) を表す。図 1 D では、ラモトリギン濃度は、それぞれ 2.0×10^{-8} 、 4.0×10^{-8} 、 8.0×10^{-8} 、 1.6×10^{-7} および $3.2 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ であった。KD ラモトリギン = $(4.17 \pm 0.24) \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ 。結果はいずれも 3 回を超えて繰り返された。

【図 2】図 2 A ~ 図 2 F。LTG は 129S1 / Sv1mJ WT マウスでは SJS 様表現型を誘導することができるが、*Mrgpra1* KO マウスでは誘導することができないことを示す一連の図、写真、顕微鏡写真およびグラフである。図 2 A は、*Mrgpra1* のオープンリーディングフレームが GFP に置換されたマウスを作製する方法を示す図である。図 2 B は、LTG 50 mg / kg^{-1} 体重の経口摂取の 7 ~ 10 日後に、WT マウスは、SJS に罹患した患者に見られる症状と同様に、それらの眼に粘膜分泌物およびそれらの足に水疱出血を発現したが、*Mrgpra1* KO マウスはこれらの症状を有しなかったことを示す写真である。図 2 C および図 2 E は、LTG による処置の 7 日目に、生理食塩水により処置した WT マウスまたは LTG により処置した KO マウスではなく、WT および HET *Mrgpra1*⁺/GFP マウスが結膜分泌物を発現したことを示す写真およびグラフである。H & E 染色は、生理食塩水および KO マウスではなく WT および HET マウスの表皮と結膜の局所組織との接合部付近の欠損、ならびに一部の炎症細胞浸潤を示した。また、WT および HET マウスの結膜では、アポトーシス細胞マーカー TUNEL の染色が増加したが (LTG WT: $40.45 \pm 2.58\%$ 、LTG HET: $40.39 \pm 1.45\%$)、生理食塩水および KO マウスでは細胞死のこの増加は示されなかった (生理食塩水 WT: $7.08 \pm 1.99\%$ 、LTG KO: $13.56 \pm 1.74\%$)、(* *, p < 0.01)。図 2 D および E は、LTG による処置の 9 日目に、WT および HET マウスの症状がさらに進行したことを示す写真およびグラフであり、生理食塩水および KO マウスではなく、WT および HET マウスでは、足に顕著な浮腫および水疱出血が示された (図 2 D)。H & E 染色では、生理食塩水および KO マウスではなく、WT および HET マウスの真皮に多数の赤血球および炎症細胞が浸潤していることが示された。図 6 A ~ 図 6 F では、黒い破線の長方形内の組織が拡大されている。TUNEL アッセイにより、生理食塩水および KO マウスではなく (生理食塩水 WT: $10.56 \pm 1.45\%$ 、LTG KO: $6.10 \pm 1.63\%$)、WT および HET マウス (LTG WT: $48.74 \pm 5.94\%$ 、LTG HET: $45.99 \pm 1.84\%$) (* *, p < 0.01) では、多くの死んだ上皮細胞 (緑色) が検出された。スケールバー、図 6 F、 $100 \mu\text{m}$ 、図 6 C、図 6 D、 $50 \mu\text{m}$ 。図 2 F は、ELISA の結果が、LTG により処置された 9 日後の足の皮膚におけるグランザイム B および TNF- α の発現の定

量を示すことを示すグラフである。* *、 $p < 0.01$ (1 遺伝子型当たり $n = 5$)。

【図3】図3A～図3F。Mr g p r a 1が樹状細胞(DC)のサブセットに発現し、これらの樹状細胞がSJS表現型の形成に重要な役割を果たすことを示す一連のグラフ、写真、顕微鏡写真、FACSプロットおよび免疫プロットである。図3Aは、RT-PCRでは、Mr g p r a 1が、KOマウスではなく、WTマウスの脾臓、リンパ節にのみ発現することが示されたことを示す免疫プロットである。図3Bは、フローサイトメリーでは、GFP⁺細胞が樹状細胞のマーカであるCD11c⁺およびMHCI I⁺であったことが示されたことを示す細胞選別プロットである。図3Cおよび図3Dは、RT-PCR(図3C)およびカルシウムイメージング(図3D)の検出のために、CD11c⁺およびMHCI I^{high}細胞、CD11c⁻およびMHCI I⁻細胞、CD11c⁺およびMHCI I^{int}細胞、CD11c⁻およびMHCI I⁺細胞がWTおよびKOマウスの脾臓から選別されたことを示す免疫プロットおよび顕微鏡写真である。図3Cに示すように、RT-PCRは、WTのCD11c⁺およびMHCI I^{high}細胞のみがMr g p r a 1を発現することを示した。図3Dに示すように、カルシウムイメージングは、WTマウスの脾臓から選別した4つの異なる細胞では、10秒(LTGの添加前)、60秒(LTGの添加後)、180秒(LTGを洗浄)の時点で反応を示した。黄色の矢印は、LTGが60秒の時点でCD11c⁺およびMHCI I^{high}細胞の2つの細胞の[Ca²⁺]_iの増加を誘発したことを示している。スケールバー、25 μm。右、代表的なイメージングトレース。各行は、固有の細胞からの応答である。CD11c⁺およびMHCI I^{high}細胞のみがLTG(0.05 mg/L)に良好に応答した。図3Eは、カルシウムイメージングアッセイの定量を示すグラフである(1 遺伝子型当たり $n = 3$ 、各実験について計数された細胞数が > 100 、* *、 $p < 0.01$)。図3Fは、尾静脈注射によりMr g p r a 1 KOマウスに250万個の細胞を注射した、WTまたはKOマウスから単離されたMHCI I⁺およびCD11c⁺樹状細胞(DC)を示す写真である($n = 6$ 、各群)。7日間のLTG摂取後(50 mg/kg - 1体重)、結膜分泌物を形成するWT DCをマウスに投与した。A1 KO DCを投与したマウスは、表現型を有しなかった。

【図4】図4A～図4E。ヒト樹状細胞がMRGPRX4を発現し、LTGにより活性化され得ることを示す一連のグラフ、写真、顕微鏡写真および免疫プロットである。図4Aは、ヒト樹状細胞(hDC)のRT-PCRの結果がhDCに発現したMRGPRX4を示したことを示す免疫プロットである。図4Bは、37°Cで15分間、培地、色素を含む培地、LTG(3 μM)、色素を含むLTG(3 μM)により処理したhDCの免疫染色から得られた代表的な画像を示すグラフである。MRGPRX4(緑)を発現する細胞内のみ内在化されたLTG(色素(赤)により標識)。スケールバー、100 μm。図4Cは、0.1 mg/LのLTGに曝露された(黒線により示された継続時間)ヒト樹状細胞(hDC)から得られた、レシオメトリックFura-2イメージングによって測定された際の[Ca²⁺]_iの変化を示す例示的なトレースを示すグラフである。各トレースは、単一の細胞から得られた応答である。図4Dは、対照siRNA(スクランブルsiRNA)およびMRGPRX4 siRNA適用を受けた後、LTGにより処理されたhDCからの応答細胞の割合を示す顕微鏡写真である。ヒトDCに、MRGPRX4に対するsiRNA、または対照siRNAをトランスフェクトした。48時間後、LTGにより細胞を処理し、カルシウムイメージングに供した。hDCの活性化は、MRGPRX4 siRNA処理細胞では、対照群と比較して有意に減少した。各群のデータは、平均±標準誤差として表した。two-tailed unpaired Student's t-testを用いて、統計比較の有意性を決定した(1 遺伝子型当たり $n = 4$; 1 実験当たり計数された細胞数が > 100 。* *、 $p < 0.01$)。図4Eは、SJS患者および寛容性の人々から得られたMRGPRX4遺伝子の分析を示し、この分析は、SJS患者の方がMRGPRX4 G/G変異が生じやすいことを示す。寛容性の人々のG/G変異の割合は7.14%であるのに対して、SJS患者では50%である。

【図5】SJS動物モデルの確立を示す一連の写真およびグラフである。129S1/S

10

20

30

40

50

v I m J WTマウスに、ラモトリギン(50 mg kg⁻¹体重)、オクスカルバゼピン(200 mg kg⁻¹体重)およびアロプリノール(100 mg kg⁻¹体重)など、SJSを誘発することができる薬物を20日間連日強制経口投与した。7日目に、3群のマウスは眼に結膜分泌物を形成した。粘膜炎の最高発生率は、LTGによって誘発される(93.33%)。

【図6】図6A~図6F。LTGにより誘発された損傷を示す一連のグラフおよび顕微鏡写真である。図6Aは、体重変化を示すグラフであり、これは、WTおよびHETマウスがLTGによる10日間の処置後に体重を減少させるのに対して(WT: -3.89 ± 0.47 g; HET: -4.48 ± 0.89 g)、生理食塩水およびKO群は体重を増加させる(生理食塩水WT: 0.84 ± 0.3 g; KO: 1.07 ± 0.69 g)ことを示す。図6Bは、生存割合が、14日間のLTGによる処置後のマウスの生存率を示すことを示すグラフである。14日目に、LTG処置WTおよびHET群ではマウスの30%のみが生存していたが、生理食塩水およびKO群ではマウスは死亡しなかった。図6Cは、図2Dに示されたWTおよびKOの長方形内の、40倍レンズを用いた顕微鏡下の皮下組織を示したH&E染色を示す顕微鏡写真である。赤血球および炎症細胞は、WT真皮にのみ見ることができた。スケールバー、50 μm。図6Dは、9日間LTGにより処置されたマウスの眼瞼内のCD8陽性細胞およびCD3陽性細胞を示した免疫蛍光二重染色を示す顕微鏡写真である。スケールバー、50 μm。図6Eは、眼瞼内のCD8陽性細胞およびCD3陽性細胞の数を計数したことを示すグラフである(ナイーブWT: 3.67 ± 1.2、LTG WT: 25 ± 8.34、LTG HET: 25 ± 2、LTG KO: 5.67 ± 0.88; **, p < 0.01; 1遺伝子型当たりn = 5)。図6Fは、LTGおよび生理食塩水により処置した後の9日目のマウスの足の皮膚におけるグランザイムBのIHC染色を示す顕微鏡写真である。青い網掛けは、グランザイムBの位置を示している。スケールバー、100 μm。

【図7】Balb/c WTおよびRag1(-/-)マウスがLTG(50 mg kg⁻¹体重)の経口摂取を20日間受けたことを示す一連の写真である。写真は、7、9および20日目のマウスの表現型を示している。7日目に、Balb/c WTの眼には粘膜炎の形成が認められた。9日目に、WTマウスは足に水疱出血を発現した。20日目に、WTマウスの耳の皮膚は粗く肥厚して剥離したように見えた。

【図8】図8A~図8C。LTG処置中のCD4およびCD8 T細胞の役割を示す一連の図、FACSプロットおよび写真である。図8Aは、マウスCD4およびCD8に対するラットモノクローナル抗体を3回i.p.注射して、CD4またはCD8 T細胞を-2、0および3日目に枯渇させる、129S1 WTマウスの処置スキームを示す図である。次いで、2回目の抗体投与後、14日間LTGによりマウスを処置した。図8Bは、マウスにCD4またはCD8 T細胞がないことを確認するためのフローサイトメトリープロットである。7日目と14日目に、フローサイトメトリー用にマウスから末梢血および脾臓の試料を採取した。図8Cは、LTG処置を受けているマウスの写真である。9日目に、生理食塩水注射を受けたマウス(「WT」と標識された左パネル)は、眼に結膜分泌物と足に水疱出血とを発現したが、これらの表現型はCD8またはCD4 T細胞枯渇群では見られなかった。

【図9】図9A~図9C。Mrgpra1細胞がCD11cおよびMHC-II陽性細胞であったことを示す一連のフローサイトメトリープロットおよび顕微鏡写真である。図9Aは、Mrgpra1 KOマウスが、GFPに置換された、Mrgpra1のオープンリーディングフレームであったことを示すフローサイトメトリープロットである。フローサイトメトリーを用いて、Mrgpra1 GFP/GFPマウス由来のGFP+細胞を特性評価した。CD4、CD8a、CD11b、CD45、CD317、CD370、F4/80、I-A/I-E、Ly6C、Ly6G、XCR1、CD3およびCD11cなどの様々な抗体により、脾細胞およびリンパ節細胞を染色した。次いで、LSR-IIフローサイトメーター(BD Biosciences)により細胞を取得した。結果は、GFP+細胞がCD11cおよびMHC-IIを高度に発現していたことを示した。図9B

10

20

30

40

50

は、免疫蛍光染色を示す顕微鏡写真であり、この免疫蛍光染色は、GFP細胞がA1KOマウス脾臓内のCD3⁺細胞ではなくCD11c⁺細胞であったことを示す。スケールバー、50 μm。図9Cは、リンパ節細胞のフローサイトメトリープロットであり、Mrgrpr1 GFP / GFP細胞がMHC-II⁺およびCD11c⁺であったことを示している。

【図10】異なる種類の脾細胞の選別を示す一連のFACSプロットである。FACS Divaソフトウェアを使用して、CD11cおよびMHC-IIの発現に基づいて、免疫細胞集団をゲーティングおよび選別した。次いで、RNA単離またはカルシウムイメージングのいずれかのために、選別された細胞を直ちに使用した。

【図11】WTおよびA1KOマウスの樹状細胞を注射したマウスの体重変化を示すグラフである。連日LTGによりA1KOマウスを処置した後、WTおよびA1KOマウスの樹状細胞(DC)を1回注射した。7日目以降、WT DCを投与したマウスの体重は減少し、A1KO DCを投与したマウスの体重は増加した。

【図12】ヒト樹状細胞におけるMRGPRX4の発現を示す一連の顕微鏡写真である。DAPI(青)およびMRGPRX4(緑)の免疫蛍光二重染色は、ヒト樹状細胞に発現したMRGPRX4を示している。HEK293およびMRGPRX2-HEK細胞を陰性対照として使用し、MRGPRX4-HEK細胞を陽性対照として使用している。スケールバー、200 μm。

【図13】図13A~図13F。胆汁うっ滞性掻痒症のモデルでは、Mrgrprクラスタ-KOマウスの掻破が少ないことを示す一連のグラフである。図13Aは、ビヒクル(オリブ油)または25 mg/kgのANITを連日経口投与したマウスの結果を示すグラフである。5日目に、自発性のかゆみを評価した。試験チャンバー内でマウスを30分間ビデオ録画し、掻破発作の回数を数えた。マウスはいずれも、8~12週齢の雄の同腹仔である。処置およびスコアリングを通して、遺伝子型に関する盲検試験を行った。n=6であったビヒクル処置クラスタ-KOを除いて、n=10/処置および遺伝子型。図13Bは、掻痒症を評価した後、心臓穿刺により血清を採取した際の結果を示すグラフである。JHUの動物病理学研究所で総ビリルビンを測定した。図13Cは、処置後の肝臓重量の結果を示すグラフである。図13Dは、血清胆汁酸値の結果を示すグラフである。対照はn=4、WT処置はn=10、KO処置はn=7。図13Eは、血清オートタキシン活性の結果を示すグラフである。対照はn=4、WT処置はn=12、KO処置はn=8。図13Fは、血清メトエンケファリン値の結果を示すグラフである。対照はn=4、WT処置はn=19、クラスタ-KO処置はn=10。

【図14A】クラスタ-KOマウスではなくWTマウスでは、ビリルビンがかゆみを引き起こすことを示す一連のグラフである。黒いバーはWTマウスである。赤いバーはクラスタ-KOマウスである。黄色のバーはMrgrprA1単一遺伝子ノックアウトである。動物に起痒物質を注射した。注射後30分にわたり、掻破発作の回数を評価した。この試験で使用したマウスは、8~12週齢の雄の同腹仔であった。スコアリング中の処置に関して盲検試験を行った。SEMによる平均を示した。図16Aは、5% DMSO(pH 6.6~7.0)を含有するビヒクル中のビリルビンを首筋に皮下注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図14B】50 μlの生理食塩水中の1 mg/kgのモルヒネを首筋に注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図14C】50 μlの生理食塩水中の1 mg/kgのDAMGOを首筋に注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図14D】示された用量のビリルビンを頬に注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図14E】1.3 mM DCAを頬に注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図14F】4 mM LPAを頬に注射したマウスの結果を示すグラフである。

【図15】図15A~図15D。ビリルビンがMrgrpr依存的に後根神経節ニューロンの集団を活性化することを示す一連のグラフである。図15Aは、WTマウス由来のDR

10

20

30

40

50

GニューロンにFluo-4 AMカルシウム色素を添加した場合の蛍光強度のトレースである。ニューロンにビヒクル(0.5% DMSO)を加えた。30秒後、1分間洗浄した。50 μMのビリルピンを加えた。陽性対照として50 mM KClを使用した。各トレースは単一のニューロンを表す。図15Bは、10秒の時点でビリルピンを適用した場合の蛍光強度のトレースである。120秒の時点で、浴液を3 mM EGTA浴液に置き換えた。この期間にビリルピンを再適用した。図15Cは、ビヒクルまたは50 μMビリルピンがWTおよびクラスターKODRGニューロンの両方に適用された場合を示すグラフである。イメージング期間中に、ニューロンのピーク蛍光がベースラインよりも少なくとも50%増加した場合、またはKClピークの50%のレベルに達した場合、ニューロンを「活性化された」としてスコア付けした。さらに、ニューロンは、少なくとも20秒間ベースラインを超えてシグナルを上昇させる必要があった。モーションアーティファクトは分析から除外した。少なくとも3匹のマウスにわたるニューロンの総数を集計して、割合を計算した。図15Dは、「活性化された」としてスコア付けされたニューロンの直径を示すヒストグラムである。

10

【図16】図16A~図16C。ビリルピン媒介搔痒症が非ヒスタミン作動性であることを示す一連のグラフである。図16Aは、ビリルピンを肥満細胞に適用した場合のヒスタミン放出(ピコグラム/細胞として示される)が対照と異ならなかったことを示すグラフである。図16Bは、腹膜肥満細胞に対するビリルピンの浴適用がカルシウム流入を誘発することができなかった場合の蛍光強度のトレースである。図16Cは、1 mMビリルピンをWT動物に注射した際の結果の棒グラフである。黒いバーは、ビヒクルを注射した動物である。赤いバーは、H1R遮断薬であるセチリジン30 mg/kgである。

20

【図17】図17A~図17F。MrgprA1およびMrgprX4がビリルピンによりGaq依存的に活性化されることを示す一連のグラフである。図17Aは、MrgprA1を安定に発現するHEK細胞にFura-2カルシウム色素を添加した際の結果を示すグラフである。50 μMのビリルピンを加えた。30秒後、1分間洗浄し、細胞をベースラインに戻した。次いで、50 μMのビリルピンを再び加えた。各トレースは単一のHEK細胞を表す。図17Bは、Gaq遮断薬であるU73122を利用した際の結果を示すグラフである。図17Cは、Gaqに対する機能を有しない、U73122と密接に関連する類似体であるU73343を利用した際の結果を示すグラフである。図17Dは、MrgprX4を安定に発現するHEK細胞を用いた以外は図17Aと同じ実験の結果を示すグラフである。50 μMのビリルピンを1回適用した。各トレースは単一の細胞を表す。図17Eは、図17Bと同じであるがX4を用いた実験の結果を示すグラフである。図17Fは、図17Cと同じであるがX4を用いた実験の結果を示すグラフである。

30

【図18】図18A~18C。MrgprA1およびMrgprX4が病態生理学的濃度でビリルピンに対するEC50を有することを示す一連のグラフである。MrgprA1またはMrgprX4のいずれかを安定に発現するHEK細胞を使用してEC50を計算した。細胞にFLIPRカルシウムイメージング色素を添加し、Flexstation 3マシン(Molecular Devices)を使用して蛍光の変化を読み取った。ウェルを3連で操作し、各プレートから得られたあらゆる値を最も反応の良いウェルに正規化した。ビヒクルのみの添加は、いずれの細胞株でも蛍光の変化を引き起こさなかった。非トランスフェクト細胞は、蛍光にいくらかの変化を示したが、用量反応曲線は示さなかった(図示せず)。X軸は、修正された対数目盛を表す。図18Aは、ビリルピンに対するMrgprA1のEC50が約49 μMであることを示すグラフである。図20Bは、ビリルピンに対するMrgprX4のEC50が約3 μMであることを示すグラフである。図18Cは、非トランスフェクトHEK細胞がEC50応答を示さなかったことを示すグラフである。

40

【図19】図19A~図19C。MrgprA1の活性化がかゆみをもたらすことを示す一連のグラフである。クラスターKOD動物ではなくWT動物では、1 mMステルコピリン、1 mMヘマチンまたは1 mM FMRFの注射が誘発された。3つの化合物はいずれもMrgprA1のアゴニストであり、他のMrgprのアゴニストではない。

50

【図20】図20A～図20C。MRGPRX3がhBD3の新規ケラチノサイト受容体であることを示す一連のグラフである。図20Aは、hBD3によるヒトMrgrX3の活性化を示す一連の代表的なCa²⁺トレースである。図20Bは、siRNAによる、ヒト初代ケラチノサイト由来のMRGPRX3の効果的なロックダウンを示すqPCRの結果のグラフである。対照としてMRGPRX4を測定した。図20Cは、MRGPRX3をロックダウンすると、hBD3に対してCa²⁺応答を生じたヒトケラチノサイトの割合が有意に減少したことを示すグラフである。

【図21】図21A～図21D。マウスMrgrA6がヒトMrgrX3の推定ホモログであることを示す一連の免疫プロット、グラフおよび図である。図21Aは、RT-PCRが精製マウスケラチノサイトにおけるMrgrA6、A12およびB3の高発現を明らかにしたことを示す免疫プロットである。図21Bは、mBD14によるマウスMrgrA6の活性化を示す一連の代表的なCa²⁺トレースである。図21Cは、MrgrB3がmBD14によって活性化されないことを示す代表的なトレースである（他のMrgrのデータは示されていない）。図21Dは、マウスおよびヒトゲノム内のMrgr遺伝子クラスターを示す概略図である。破線は対応するホモログを示す。

【図22】ヘム代謝産物およびMrgrの分析結果を示す表である。ヘム代謝産物は構造的に関連している。複数のヘム代謝産物が、マウス受容体であるMrgrA1とヒト受容体であるMrgrX4とを活性化した。物質の用量を上にも列挙し、活性化のおおよその割合を表に示す。

【図23】図23A～図23E。ビリルビンが非ヒスタミン作動性のMrgr依存性掻痒症を誘発したことを示す画像である。図23Aは、掻破発作がビリルビンの注射に関連していたことを示す棒グラフである。示された量のビリルビン（100μLの容量でマウスの首筋に注射した。青いバー（+HSA）は、1%のヒト血清アルブミンとブレインキューベートした60μgのビリルビン（1mMの100μL）を注射した動物を表す。ピヒクルn=8；6μg n=5、18μg n=11、30μg n=12、60μg n=7、+HSA n=12。図23Bは、ビリルビン、ヒスタミンまたはクロロキンの注射に関連するかゆみ行動の時間経過を示す折れ線グラフである。掻破発作は5分間隔でピンングした。ビリルビンn=16、ヒスタミンn=13、クロロキンn=11。図23Cは、WTおよびクラスター-/-同腹仔マウスの首筋に60μgのビリルビンを注射した結果を示す棒グラフである。WT n=8、クラスター-/- n=13。図23Dは、WTおよびクラスター-/-同腹仔マウスに注射された60μg（1mMの100μL）の示された代謝産物の結果を示す棒グラフである。ヘミン（WT n=10、クラスター-/- n=6）、ピリベルジン（WT n=7、クラスター-/- n=7）、ウロビリノーゲン（WT n=15、クラスターKO n=8）、ステルコビリリン（WT n=7、クラスター-/- n=5）。図23Eは、ヘム分解の経路の概略図である。各代謝産物の骨格式は、B3LYP関数と6-31G(d)基底関数セットによって計算された際のそれらの最適な3D形状の上に描かれている。青とオレンジとは、DFT計算から得られた各代謝産物のHOMOの軌道パリティを表す。図23A、図23Cおよび図23D-平均+標準誤差を示す。各白丸は個々のマウスを表す。*、P<0.05；**、P<0.01；***、P<0.001；two-tailed unpaired Student's t-test。

【図24】図24A～図24N。ビリルビンがマウスMRGPR A1およびヒトMRGPR X4を活性化したことを示すデータである。図24A～図24Eは、MRGPR A1またはMRGPR X4を安定に発現するHEK293細胞のCa²⁺イメージングと変換された結合等温式とを示すデータである（図24F～図24J）。図24A～図24Cおよび図24F～図24Hは、黒いバーによって示される場所に加えられた50μMのビリルビンを示すデータである。15秒後、1分間洗浄した。平均±95%信頼区間（CI）を示す。n=10。図24Aでは、黒いバーによって示されるように、洗浄後に30μM FMRFを加えた。図24B～図24Cおよび図24G～図24Hでは、イメージング前に30分間、10μMのPLC阻害剤U73122または10μMのGq阻害剤YM2

10

20

30

40

50

54890のいずれかと細胞をブレインキュベートした。(図24D)MRGPR A1、(図24I)MRGPR X4および(図24M)MRGPR C11に対するビリルビン、抱合型ビリルビンおよびヘミンの濃度 - Ca^{2+} 反応曲線、ならびに確立されたペプチドリガンドであるMRGPR C11に対するBAM8-22の濃度 - Ca^{2+} 反応曲線。データは、3連で実施した2~3回の独立した反復の代表的な実験であり、平均±標準誤差として示す。ビリルビン、抱合型ビリルビンおよびヘミンから(図24E)MRGPR A1、(図24J)MRGPR X4および(図24N)MRGPR C11への変換された結合等温式、ならびにBAM8-22からMRGPR C11への変換された結合等温式。データは、3つの独立した実験の平均であり、平均±標準誤差として示す。図24Kは、部分精製されたMRGPR A1、MRGPR X4およびMRGPR C11膜複合体のビリルビン刺激Gタンパク質活性の棒グラフを示す。[^{35}S]GTP S結合は、0.5% DMSOまたは50 μ Mビリルビンの存在下で測定した。平均±標準誤差を示す。*、 $P < 0.01$; two-tailed unpaired Student's t-test。図24Lは、WTおよびA1-/-動物に対する60 μ g (1mMの100 μ L)のビリルビンの注射から生じた搔破発作を示す棒グラフである。平均+標準誤差を示す。白丸は個々のマウスを表す。WT n=10、A1-/- n=12、two-tailed unpaired Student's t-testによる*、 $P < 0.05$ 。

10

【図25】図25A~図25I。ビリルビンが感覚ニューロンをMRGPR依存的に活性化したことを示すデータを示す。図25Aは、内在性Mr g p r a 1遺伝子座(Mr g p r a 1^{GFP})の制御下でのGFP発現を示す画像である。赤色は、PLAP発現が内在性Mr g p r d遺伝子座(Mr g p r d^{PLAP})によって制御されている場所の抗PLAP抗体染色を示している。青色は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)に対する抗体染色を示している。スケールバー=50 μ M。図25Bは、WTまたはA1-/-DRGニューロンのホール・セル・カレント・クランプ・レコーディング(whole-cell current-clamp recording)を表す画像である。WT DRGでは、ビリルビンは50個の小径ニューロンのうち5個で活動電位を発生させた。A1-/-DRGでは、ビリルビンは60個の小径ニューロンのうち0個で活動電位を発生させた。フィッシャー直接確率法 $P < 0.05$ 。図25Cは、50 μ Mビリルビンおよび1mMクロロキン(CQ)の両方の添加に応答するWT DRGニューロンのホール・セル・カレント・クランプ・レコーディングを表す画像である。図25Dは、WT DRGニューロンの Ca^{2+} イメージングを示すグラフである。10秒のベースライン後、50 μ Mビリルビンを加えた。20秒後、3分間洗浄してから1mMクロロキンを加えた。15秒後、50mM KClを加えた。平均+95%CIを示す。n=10ニューロン。黒いバーによって示されている場所に化合物を適用した。図25Eは、ビヒクルまたは50 μ Mビリルビンのいずれかを加えた際のWT、A1-/-およびクラスター-/-DRGのパーセント活性化を示す棒グラフである。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***、 $P < 0.001$; カイ二乗検定。図25Fは、ビヒクル、1mMクロロキンまたは50 μ Mビリルビンを用いたカルシウムイメージングにより評価した際のTg(Mr g p r a 3-Cre); lsl-tdTomatoニューロンのパーセント活性化を示すグラフである。少なくとも30秒間 $F > 0.2$ の場合、ニューロンは活性化されたと考えた。図25G~図25H、レンチウイルスによる模擬感染(n=10)、またはMr g p r a 1(n=6)、MRGPR X4(n=10)もしくはMRGPR X3(n=20)をコードするレンチウイルスによる感染の48時間後のクラスター-/-DRGニューロン(図25G)および(図25H)DRGニューロンの Ca^{2+} イメージング。黒いバーによって示されている場合、50 μ Mビリルビンを加えた。20秒後、1分間洗浄してから50mM KClを加えた。黒いバーによって示されている場所に化合物を適用した。平均±95%CIを示す。n=10ニューロン。図25Iは、ビリルビンによる、未感染、Mr g p r a 1感染、MRGPR X4感染およびMRGPR X3感染クラスター-/-ニューロンのパーセント活性化を示すグラフである。***、 $P < 0.001$ 。カイ二乗検定。

20

30

40

50

【図26】図26A～図26I。Mrgpra1^{-/-}、クラスター^{-/-}およびBVR^{-/-}動物がいずれも胆汁うっ滞性掻痒症の減少を示したことを示す画像である。図26Aは、WT、クラスター^{-/-}およびA1^{-/-}群間のビヒクルおよびANIT処置マウスの搔破発作を示す棒グラフである。30分にわたり発作を評価した。ビヒクルコホートの場合：WT n = 15、クラスター^{-/-} n = 6、A1^{-/-} n = 6。ANITコホートの場合：WT n = 20、クラスター^{-/-} n = 14、A1^{-/-} n = 14。図26Bは、WTおよびBVR^{-/-}群間のビヒクルおよびANIT処置動物の搔破発作を示す棒グラフである。30分にわたり発作を評価した。ビヒクルコホートの場合：WT n = 5およびBVR^{-/-} n = 8。ANITコホートの場合：WT n = 21およびBVR^{-/-} n = 20。図26Cは、WTおよびクラスター^{-/-} ANIT処置動物およびビヒクル処置動物から得られた血漿ビリルビン値 (mg/dL) を示す棒グラフである。ビヒクルコホートの場合：WT n = 9、クラスター^{-/-} n = 5。ANITコホートの場合：WT n = 10、クラスター^{-/-} n = 8。図26Dは、WT ANIT処置動物の搔破発作を示す棒グラフである。ビヒクルまたは1 mg/kg QWFのいずれかを腹腔内送達した。ビヒクル n = 8、QWF n = 9。図26Eは、WTおよびBVR^{-/-}動物由来のビヒクルまたはANIT処置血漿を注射したWTマウスの搔破発作を示す棒グラフである。ビヒクル血漿コホートの場合：n = 7。胆汁うっ滞性ANIT処置血漿の場合：WT n = 10およびBVR^{-/-} n = 8。図26Fは、高ビリルビン血症血漿が採取された患者の特徴を説明する表である。図26Gは、高ビリルビン血症患者血漿を注射したWTまたはA1^{-/-}マウスの搔破発作を示す棒グラフである。患者1血漿注射の場合、WT n = 7、A1^{-/-} n = 9。患者2血漿注射の場合、WT n = 8、A1^{-/-} n = 5。患者3血漿注射の場合、WT n = 7、A1^{-/-} n = 8。患者4血漿注射の場合、WT n = 6、A1^{-/-} n = 8。図26Hは、未処置 (NT) 対照ヒト血漿、FeCl₃処置対照ヒト血漿、NT胆汁うっ滞患者1血漿 ((図26G) の患者1 WTデータのコピー) またはFeCl₃処置患者1血漿のいずれかを注射したマウスの搔破発作を示す棒グラフである。対照血漿の場合、NT n = 6およびFeCl₃ n = 5。患者1血漿の場合、NT n = 7およびFeCl₃ n = 7。図26Iは、正常ウサギIgG処置患者1血漿または抗ビリルビンIgG処置患者1血漿のいずれかを注射したマウスの搔破発作を示す棒グラフである。正常IgG n = 5、抗ビリルビン n = 7。図26A～図26I、平均 + 標準誤差を示す。白丸は個々のデータ点を表す。unpaired two-tailed Student's t-testによる*、P < 0.05; **、P < 0.01; ***、P < 0.001。

【図27】図27A～図27F。ビリルビンが非ヒスタミン作動性掻痒症を誘発したが、疼痛を誘発しなかったことを示すデータを示す。図27Aは、ビリルビンの頬への注射に関連する搔破発作を示す棒グラフを示す。示された量のビリルビンを10 μlの容量で注射し、30分にわたり搔破発作の回数を評価した。ビヒクル n = 6、1.8 μg n = 5、3 μg n = 4、6 μg n = 5、6 μg (-/-) n = 6。図27Bは、頬への6 μgのビリルビン注射に関連する拭き行動を示す棒グラフを示す。注射後10分にわたり拭き行動を評価した。ビヒクル n = 5、ビリルビン n = 7。図27Cは、足への6 μgのビリルビン注射に関連する舐め時間を示す棒グラフを示す。注射後10分にわたり舐め行動を評価した。1条件当たり n = 3。図27Dは、H1遮断薬がビリルビン誘発性掻痒症を阻害しなかったことを示す棒グラフを示す。首筋にビリルビンを注射する30分前に、ビヒクルまたは30 mg/kg セチリジンのいずれかを腹腔内投与した。注射後30分にわたり搔破発作を評価した。ビヒクル n = 10、セチリジン n = 5。図27Eは、100 μMビリルビンに反応して放出された肥満細胞ヒスタミンを示す棒グラフである。化合物48/80に対するビヒクル n = 4、化合物48/80 (10 μg/mL) n = 4、ビヒクル n = 6、ビリルビン n = 8。図27Fは、マウス腹膜肥満細胞のCa²⁺イメージングを示すグラフである。10秒のベースラインの後、100 μMビリルビンを加えた。15秒後、1分間洗浄してから10 μg/mLの化合物48/80を加えた。黒いバーによって示されている場合、薬物を適用した。平均 ± 95% CIを示す。n = 26。図27A～

10

20

30

40

50

図 27C および図 27D ~ 図 27E、平均 + 標準誤差を示す。白丸は独立したデータ点を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***、 $P < 0.001$; two-tailed unpaired Student's t-test。n.s.、有意ではない。

【図 28】図 28A ~ 図 28F。ビリルビンが他の MRGPR を活性化しなかったことを示すデータである。図 28A は、マウスおよびヒトの Mrpgr 遺伝子座の画像描写であり、先に公開された機能的に相同な対が黒で強調表示されている。図 28B ~ 図 28F は、(図 28B) MRGPR A3、(図 28C) MRGPR C11、(図 28D) MRGPR D、(図 28E) MRGPR X1 または (図 28F) MRGPR X2 を一時的に発現する HEK293 細胞の Ca^{2+} イメージングを示すグラフである。黒いバーによって示されている場所に $50 \mu M$ ビリルビンを加えた。15 秒後、1 分間洗浄した。洗浄後、黒いバーによって示されているように、(図 28b) $1 mM$ クロロキン、(図 28c) $3 \mu M$ BAM8-22、(図 28d) $1 mM$ -アラニン、(図 28E) $3 \mu M$ BAM8-22 または (図 28F) $10 \mu g/mL$ の化合物 48/80 を加えた。平均 $\pm 95\% CI$ を示す。n = 10。

10

【図 29】図 29A ~ 図 29C。MRGPR A1 の CRISPR 欠失のデータを示す。図 29A は、WT および A1 - / - ゲノム配列の比較を示す概略図である。ダッシュにより示される 2 塩基対 (bp) 欠失の位置。番号は MRGPR A1 オープンリーディングフレームに対応している。図 29B は、2 bp 欠失の配列決定データを示す。図 29C は、開始コドンから始まる MRGPR A1 - / - のオープンリーディングフレームの翻訳の概略図を示す。2 bp 欠失によりフレームシフトが発生し、これにより、赤いアスタリスク (右端) によってマークされた早期終結が発生した。

20

【図 30】図 30A および図 30B。ビリルビンがクロロキンと同様の径感覚 (diameter sensory) の集団を活性化したことを示す画像を示す。図 30A は、ビリルビンおよび / または クロロキン (ビリルビン単独 = 7、クロロキン = 40、重複 = 13) のいずれかによって活性化された全ニューロンを示すベン図である。図 30B は、ビリルビン活性化ニューロン神経細胞体の直径のヒストグラムである。

【図 31】図 31A ~ 図 31K。肝損傷の病理学的マーカーの血漿中濃度が、WT、クラスター - / -、A1 - / - および BVR - / - 動物間で異なることを示すグラフである。図 31A は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物間の血漿アルカリホスファターゼ (ALP) 値を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT n = 10、クラスター - / - n = 4、A1 - / - n = 4、BVR - / - n = 6。ANIT コホートの場合: WT n = 17、クラスター - / - n = 6、A1 - / - n = 5、BVR - / - n = 15。図 31B は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物間の血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT n = 10、クラスター - / - n = 4、A1 - / - n = 4、BVR - / - n = 9。ANIT コホートの場合: WT n = 12、クラスター - / - n = 6、A1 - / - n = 5、BVR - / - n = 17。図 31C は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物間のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT n = 10、クラスター - / - n = 4、A1 - / - n = 4、BVR - / - n = 6。ANIT コホートの場合: WT n = 15、クラスター - / - n = 6、A1 - / - n = 5、BVR - / - n = 17。図 31D は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物間のグルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 値を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT n = 10、クラスター - / - n = 4、BVR - / - n = 6。ANIT コホートの場合: WT n = 17、クラスター - / - n = 6、BVR - / - n = 15。図 31E は、ANIT 処置動物およびビヒクル処置動物から得られた血漿胆汁酸値 (μM) を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT n = 4、クラスター - / - n = 5、BVR - / - n = 5。ANIT コホートの場合: WT n = 10、クラスター - / - n = 7、BVR - / - n = 14。図 31F は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物から得られた血漿間のメトエンケファリン値を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合

30

40

50

: WT n = 4、クラスター - / - および BVR - / - n = 5。ANIT コホートの場合: WT n = 19、クラスター - / - n = 10、BVR - / - n = 11。図 3 1 G は、ビヒクルおよび ANIT 処置動物から得られた血漿間のオートタキシン活性を示すグラフである。ビヒクルコホートの場合: WT および BVR - / - n = 4、クラスター - / - n = 5。ANIT コホートの場合: WT n = 12、クラスター - / - n = 8、BVR - / - n = 10。図 3 1 H は、頬に注射された 10 μ L の 1.3 mM デオキシコール酸 (DCA) に応答した搔破発作を示すグラフである。WT n = 9、クラスター - / - n = 9。図 3 1 I は、頬に注射された 10 μ L の 4 mM リゾホスファチジン酸 (LPA) に応答した搔破発作を示すグラフである。WT n = 6、クラスター - / - n = 6。図 3 1 J は、WT n = 7、クラスター - / - n = 8 を示すグラフである。図 3 1 K は、背中に注射された 25 μ g の DAMGO (容量 50 μ L) に応答した搔破発作を示すグラフである。WT n = 5、クラスター - / - n = 5。図 3 1 A ~ 図 3 1 J は、示された平均 \pm 標準誤差を示す。白丸は独立したデータ点を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; two-tailed unpaired Student's t-test. n.s.、有意ではない。

【図 3 2】図 3 2 A ~ 図 3 2 F。BVR - / - および A1 - / - 動物がインタクトなかゆみ回路を有することを示すデータである。図 3 2 A は、WT および BVR - / - マウスの全脳から得られた BLVRA 転写物の定量的 PCR 分析を示す棒グラフである。図 3 2 B は、C18 カラムを介して分離され、450 nm での吸光度により分析された、WT および BVR - / - マウスから得られた血漿の HPLC 分析の代表的なクロマトグラムである。図 3 2 C は、過剰のビリルビンを追加した、WT マウスから得られた血漿の HPLC クロマトグラムを示す。図 3 2 D は、WT および BVR - / - 動物の血漿の総ビリルビン値を示す棒グラフである。WT n = 7、BVR - / - n = 6。図 3 2 E は、150 μ g (10 mM の 50 μ L) のクロロキンに反応した搔破発作を示す棒グラフである。クロロキン注射後、30 分にわたり搔破発作を評価した。WT n = 9、BVR - / - n = 5、A1 - / - n = 6。図 3 2 F は、60 μ g (1 mM の 100 μ L) のビリルビンに反応した搔破発作を示す棒グラフである。ビリルビン注射後、30 分にわたり搔破発作を評価した。WT n = 8、BVR - / - n = 9。図 3 2 D ~ 図 3 2 F は、示された平均 + 標準誤差を示す。白丸は独立したデータ点を表す。スチューデントの t 検定による **、 $P < 0.01$ 。n.s.、有意ではない。

【図 3 3】図 3 3 A および 図 3 3 B。A1 - / - および BVR - / - 動物では、シクロスポリン A 処置に関連するかゆみが減少したことを示すグラフを示す。図 3 3 A は、ビヒクルおよびシクロスポリン A 処置 WT および A1 - / - 動物の搔破発作を示す棒グラフである。ビヒクルコホートの場合: いずれも n = 5。シクロスポリン A コホートの場合: WT n = 10 および A1 - / - n = 8。図 3 3 B は、ビヒクルおよびシクロスポリン A 処置 WT および BVR - / - 動物の搔破発作を示す棒グラフである。30 分にわたり搔破発作を評価した。ビヒクルコホートの場合: n = 5。シクロスポリン A コホートの場合: WT n = 11 および BVR - / - n = 7。図 3 3 A および 図 3 3 B は、示された平均 + 標準誤差を示す。白丸は個々のデータ点を表す。*、 $P < 0.05$; **、 $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; two-tailed unpaired Student's t-test. n.s.、有意ではない。

【図 3 4】図 3 4 A ~ 図 3 4 G。QWF 処置が胆汁うっ滞性肝損傷の重症度に影響を及ぼさないことを示すグラフを示す。図 3 4 A は、MRGPR A1 発現 HEK 細胞内のビリルビン誘発 Ca^{2+} シグナルの濃度反応曲線のグラフである。200 μ M ビリルビンは、示された用量の QWF と競合して維持された。平均 \pm 標準誤差を示す。n = 3 は 2 連で反復する。図 3 4 B ~ 図 3 4 C は、ビヒクルまたは 1 mg/kg の QWF のいずれかと同時注射された (図 3 4 B) 60 μ g (1 mM の 100 μ L) のビリルビンまたは (図 3 4 C) 150 μ g のクロロキンの搔破発作の棒グラフを示す。注射後、30 分にわたり搔破発作の回数を評価した。ビリルビンの場合: ビヒクル n = 7、QWF n = 8。クロロキンの場合: ビヒクル n = 4、QWF n = 7。平均 + 標準誤差を示す。unpaired t

wo-tailed Student's t-testによる*、 $P < 0.05$ 。d~g、ANIT肝損傷を受けたビヒクルおよびQWF投与WT動物の血漿(図34D)ビリルビン、(図34E)AST、(図34F)ALTおよび(図34G)ALP値。図34D~図34Gは示された平均±標準誤差を示す。白丸は独立したデータ点を表す。n.s.、two-tailed unpaired Student's t-testにより有意ではない。

【図35】図35Aおよび図35B。血漿ビリルビンの $FeCl_3$ および抗ビリルビン抗体の枯渇を示すデータを示す。図35Aは、 $100\mu M$ ビリベルジン+ $100\mu M$ ビリルビン標準および処置血漿試料の代表的なHPLCクロマトグラムを示している。 $405nm$ で吸光度を測定した。図35Bは、未処置、 $FeCl_3$ 、正常ウサギIgGおよびビリルビン抗体処置試料中の血漿ビリルビンの定量の棒グラフを示す。点は技術的複製を表す。平均±標準誤差を示す。**、 $P < 0.01$; n.s.、双方向ANOVAとそれに続く事後チューキー検定により有意ではない。

【発明を実施するための形態】

【0124】

本発明は、新規Gタンパク質共役受容体であるヒトMrgrx4およびマウスMrgrA1の同定に少なくとも部分的に基づく。Mrgrx4およびMrgrA1は、特定の種類の自然免疫細胞に発現し、スティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)を媒介し、自己免疫疾患に関与している可能性が高い。Mrgrx4およびMrgrA1は、ラモトリギンおよびアロプリノールなど、SJSを引き起こす多くの薬物によって活性化される。さらに、Mrgrx4およびMrgrA1は感覚ニューロンにも発現し、掻痒感および胆汁うっ滞性掻痒症に重要である。いくつかの実施形態では、Mrgrx4およびMrgrA1はビリルビンの受容体である。本明細書に記載されるように、この発見以前には、ビリルビン受容体は同定されていなかった。いくつかの実施形態では、ヒトMrgrx4は、SJS、多発性硬化症などの自己免疫疾患、胆汁うっ滞性掻痒症および他の慢性的なかゆみ症状の薬物標的である。本明細書に記載されるように、何らかの生物学的プロセスおよび疾患に果たすMrgrx4の役割は、この発見以前には完全に不明であった。いくつかの実施形態では、Mrgrx4発現細胞ベースのアッセイ(Mrgrx4細胞株およびcDNAならびにMrgrA1変異マウス系統)を使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験する。本明細書に記載されるように、Mrgrx4発現細胞株は完全に新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに使用される。いくつかの実施形態では、Mrgrx4の遮断は、SJS、多発性硬化症などの自己免疫疾患、ならびに胆汁うっ滞性掻痒症および他の慢性的なかゆみ症状を治療するための新規の方法である。

【0125】

本発明はまた、ヒトMrgrx3およびそのマウスホモログMrgrA6が、後根神経節(DRG)のケラチノサイト、上皮細胞および一次感覚ニューロンに発現するという発見に少なくとも部分的に基づく。抗菌ペプチドのデフェンシンおよびカテリシジンがMrgrx3およびMrgrA6のアゴニストであることも発見された。デフェンシンおよびカテリシジンは、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみなどの複数の疾患および症状に影響を及ぼす可能性がある。いくつかの実施形態では、Mrgrx3およびMrgrA6を標的として、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみを治療する。本明細書に記載されるように、何らかの生物学的プロセスおよび疾患に果たすMrgrx3の役割はこれまで不明であった。いくつかの実施形態では、Mrgrx3発現細胞ベースのアッセイおよびMrgrA6変異マウスを使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験する。本明細書に記載されるように、Mrgrx3発現細胞株は新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに使用される。本発明は、化合物がGタンパク質共役受容体媒介症状に影響を及ぼすかどうかを決定する方法、および

10

20

30

40

50

対象の G タンパク質共役受容体媒介症状の重症度を軽減する方法を特徴とする。本発明は、薬物有害反応および自己免疫障害に密接に関連している樹状細胞と呼ばれるある種の免疫細胞に排他的に発現する G タンパク質共役受容体、すなわち、ヒトの M r g p r X 4 およびマウスの M r g p r A 1 の発見に少なくとも部分的に基づく。

【 0 1 2 6 】

本明細書に記載される発明以前には、薬物有害反応および自己免疫障害に果たす M r g p r X 4 / M r g p r A 1 の役割は完全に不明であった。本明細書には、M r g p r X 4 / M r g p r A 1 発現細胞ベースのアッセイを使用して、薬物有害反応または自己免疫障害を誘発する薬物をスクリーニングし、これらの反応を遮断するか生じる M r g p r X 4 のアンタゴニストをスクリーニングすることが記載されている。

10

【 0 1 2 7 】

本発明の単離細胞は、カルシウムベースのスクリーニングアッセイでの受容体活性化の容易な視覚化を可能にするヒト G タンパク質共役受容体 (G P C R) M r g p r X 4 またはマウス G P C R M r g p r A 1 を発現する。これらの細胞株は、M r g p r X 4 アゴニストおよびアンタゴニストの活性について、F D A 承認薬および開発中の薬物のスクリーニングを可能にする。

【 0 1 2 8 】

薬物スクリーニングのための細胞ベースのアッセイにこれらの細胞を用いると、陽性結果 (すなわち、例えばカルシウム放出によって測定される細胞株の活性化) では、薬物が樹状細胞を通常活性化し、患者に有害反応を引き起こす可能性があることが示されるであろう。開発中の薬物のスクリーニングによって副作用プロファイルが予測され得、現在使用されている薬物のスクリーニングによって、これらの薬物の有害作用の原因が特定され得、アンタゴニストのスクリーニングによって、薬物有害反応を誘発する薬物と同時に投与することができ、細胞 (例えば、樹状細胞および一次感覚ニューロン) の活性化を阻害するが、それらの意図された用途を妨げない新たな治療薬がもたらされ得る。

20

【 0 1 2 9 】

本明細書には、この受容体を活性化するか、この受容体に拮抗する F D A 承認薬および研究用化合物のスクリーニングに使用される細胞株が記載される。これらは、薬物がアレルギー型反応を誘発するかどうかを決定するのに有用であり、これらの反応を遮断するアンタゴニストを開発するためのスクリーニングにも有用である。

30

【 0 1 3 0 】

薬物有害反応による樹状細胞および一次感覚ニューロンの活性化を試験するためのマウスモデルの導入、ならびに薬物有害反応を減少させるための治療標的としての M r g p r X 4 の同定について以下に詳述する。

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載されるように、新規 G タンパク質共役受容体、ヒト M r g p r X 4 およびマウス M r g p r A 1 が同定される。M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は、特定の種類の自然免疫細胞に発現し、ステーブンス・ジョンソン症候群 (S J S) を媒介し、自己免疫疾患に関与している可能性が高い。M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は、ラモトリギンおよびアロプリノールなど、S J S を引き起こす多くの薬物によって活性化される。さらに、M r g p r X 4 および M r g p r A 1 は感覚ニューロンにも発現し、掻痒感および胆汁うっ滞性掻痒症に重要である。M r g p r X 4 および M r g p r A 1 はビリルビンの受容体である。この発見以前には、ビリルビン受容体は同定されていなかった。したがって、ヒト M r g p r X 4 は必須の薬物標的である。本明細書に記載されるように、生物学的プロセスおよび疾患に果たす M r g p r X 4 の役割は、この発見まで完全に不明である。したがって、M r g p r X 4 発現細胞ベースのアッセイ (M r g p r X 4 細胞株および c D N A、ならびに M r g p r A 1 変異マウス系統) を使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験することは完全に新規である。M r g p r X 4 発現細胞株は完全に新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに不可欠である。M r g p r X 4 の遮断は、S J S、自己免疫疾患 (多発性硬

40

50

化症など)および胆汁うっ滞性掻痒症(および他の慢性的なかゆみ症状)を治療するための新規の方法であり得る。

【0132】

本明細書に記載されるように、ヒトのMr g p r X 3およびマウスのMr g p r A 6を標的として、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、皮膚疾患(例えば、乾癬および皮膚炎)、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみを治療することができる。本明細書に記載されるように、生物学的プロセスおよび疾患に果たすMr g p r X 3の役割は、本開示以前には不明であった。したがって、Mr g p r X 3発現細胞ベースのアッセイおよびMr g p r A 6変異マウスを使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験することも新規である。Mr g p r X 3発現細胞株は新規であり、薬物スクリー

10

【0133】

Mr g p r X 4 / Mr g p r A 1

M a s 関連Gタンパク質共役受容体メンバーX 4は、ヒトではMR G P R X 4遺伝子によってコードされるタンパク質である。M A S 1発癌遺伝子は、アンジオテンシンII代謝産物であるアンジオテンシン-(1-7)に結合するGタンパク質共役受容体である。M A S 1受容体は、アンジオテンシン-(1-7)に結合することによって活性化されると、アンジオテンシンII活性化アンジオテンシン受容体の多くの作用に拮抗する。M A S 1受容体アゴニストは、血圧の低下など、アンジオテンシンII受容体アンタゴニストと同様の治療効果を有する。

20

【0134】

薬物有害反応(ADR)は、意図しないかつ望ましくない重大な薬物安全上の懸念であり、全入院の約6%および入院費用の9%を占め、米国だけで年間最大301億ドルもの費用がかかっている(Z a l e w s k a - J a n o w s k a , A . , e t a l . , I m m u n o l A l l e r g y C l i n N o r t h A m 3 7 , 1 6 5 - 1 8 1 (2 0 1 7) ; S u l t a n a , J . , e t a l . , J P h a r m a c o l P h a r m a c o t h e r 4 , 5 7 3 - 7 7 (2 0 1 3))。最も重篤なADRの1つであるステイブンス・ジョンソン症候群(SJS)および中毒性表皮壊死症(TEN)は、大量のケラチノサイト細胞死による水疱病変、粘膜破壊および発疹/剥離を特徴とし、死亡率は最大30%に及ぶ致死的な重症の皮膚ADR(cADR)である(D o w n e y , A . , e t a l . , J A m A c a d D e r m a t o l 6 6 , 9 9 5 - 1 0 0 3 (2 0 1 2) ; L e e , H . Y . & C h u n g , W . H . , C u r r O p i n A l l e r g y C l i n I m m u n o l 1 3 , 3 3 0 - 3 3 6 (2 0 1 3))。不適切な免疫介在性細胞毒性(i m m u n e - m e d i a t e d c y t o t o x i c i t y)の関与が示されているが(D o w n e y , A . , e t a l . , J A m A c a d D e r m a t o l 6 6 , 9 9 5 - 1 0 0 3 (2 0 1 2))、薬物がSJS/TENをトリガーする方法の分子および細胞機構は大部分が不明である。本明細書で説明するように、眼粘膜損傷および足水疱出血を伴う新規薬物誘発SJSマウスモデルが確立された。いくつかの実施形態では、いくつかのSJS/TEN原因薬物は、マウスのGタンパク質共役受容体(GPCR)Mr g p r a 1と、そのヒト機能的オルソログMR G P R X 4とを直接活性化

30

40

【0135】

軽度な形態のTENであるSJSは、1922年にA l b e r t M . S t e v e n s およびF r a n k C . J o h n s o nによって最初に記述された(S t e v e n s , A

50

. M . & Johnson , F . C . , Am J Dis Child 24 , 526 - 533 (1922) 。 それ以来、SJS/TENの認知度は、その死亡率および罹患率のために医療分野で増大している。SJS/TENの病因としていくつかの種類の感染および悪性疾患が関与しているが、SJS/TENの主な原因は薬物の有害作用である (Heng , Y . K . , et al . , Br J Dermatol 173 , 1250 - 1254 (2015)) 。 抗てんかん薬 (例えば、ラモトリギン、カルバマゼピン) 、抗痛風薬 (例えば、アロプリノール) 、特定のクラスの抗生物質および非ステロイド性抗炎症薬を含む100超の臨床的に使用されている薬物がSJS/TENと関連しており、これは主要な薬物安全上の懸念であり、米国食品医薬品局 (FDA) により綿密に監視されている (Schotland , P . , et al . Eur J Pharm Sci 94 , 84 - 92 , (2016)) 。 原因薬物によって誘発される免疫学的反応は、SJS/TENの病因の根底にある機構と考えられている。原因薬物の相互作用、抗原提示細胞上のヒト白血球抗原 (HLA) 、およびT細胞上のT細胞受容体を含むいくつかのモデルが提案されているが (Adam , J . , et al . Br J Clin Pharmacol 71 , 701 - 707 (2011) ; Chung , W . H . , et al . , J Dermatol 43 , 758 - 766 (2016)) 、薬物がどのようにSJS/TENを誘発するかに関する分子および細胞機構は、少なくとも部分的には、良好かつ単純な動物モデルの欠如のために、依然として解明されていない。

10

【0136】

スティーブンス・ジョンソン症候群

20

スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) は、重度の皮膚反応の一種である。中毒性表皮壊死症 (TEN) とともに一連の疾患を形成し、SJSは比較的軽度である。初期症状には、発熱およびインフルエンザ様症状が挙げられる。数日後、皮膚に水疱ができ、皮がむけ始め、痛みを伴う皮膚のむけた領域が形成される。口腔などの粘膜も典型的に侵される。合併症には、脱水症状、敗血症、肺炎および多臓器不全が挙げられる。

【0137】

最も一般的な原因は、ラモトリギン、カルバマゼピン、アロプリノール、スルホンアミド抗生物質およびネビラピンなどの特定の薬物である。その他の原因には、肺炎マイコプラズマおよびサイトメガロウイルスなどの感染症が挙げられる場合もあるが、原因が不明のままである場合もある。危険因子には、HIV/AIDSおよび全身性エリテマトーデスが挙げられる。診断は、皮膚の10%未満が侵されていることに基づく。皮膚の30%超が侵されている場合はTENとして知られており、TENは10~30%が侵される中間形態である。多形性紅斑 (EM) は一般に別の症状と考えられる。

30

【0138】

治療は典型的には、熱傷病棟または集中治療室内などの病院内で行われる。処置には、原因の停止、鎮痛薬、抗ヒスタミン剤、抗生物質、静脈用免疫グロブリンまたはコルチコステロイドが挙げられ得る。SJSは、TENとともに、年間100~200万人に影響を及ぼす。SJSは、男性では女性の2倍見られる。典型的な発症は30歳未満である。皮膚は通常2~3週間で再生するが、完全な回復には数カ月かかる場合がある。

【0139】

40

SJSはウイルス感染および悪性腫瘍によって引き起こされる場合があるが、主な原因は薬物である。主な原因は、抗生物質、特にサルファ剤の使用であると思われる。100~200種類の薬物がSJSに関連付けられ得る。個々の症例について、特定の薬物とSJSとの関連を確立するための信頼できる試験は存在しない。原因の薬物の決定は、薬物の最初の使用から皮膚反応の開始までの時間間隔に基づく。薬物の因果関係を評価するための公表されたアルゴリズム (ALDEN) は、原因となる薬物を特定するための構造化された支援を提供する。

【0140】

SJSは、バンコマイシン、アロプリノール、バルプロエート、レボフロキサシン、ジクロフェナク、エトラピリン、イソトレチノイン、フルコナゾール、バルデコキシブ、シ

50

タグリブチン、オセルタミビル、ペニシリン、バルビツレート、スルホンアミド、フェニトイン、アジスロマイシン、オクスカルバゼピン、ゾニサミド、モダフィニル、ラモトリギン、ネビラピン、ピリメタミン、イブプロフェン、エトスクシミド、カルバマゼピン、プロピオン、テラプレビルおよびナスタチンなどの薬物の有害作用によって引き起こされる場合がある。

【0141】

SJS、多形性紅斑および中毒性表皮壊死症に至ることが従来知られている薬物には、スルホンアミド抗生物質、ペニシリン抗生物質、セフィキシム（抗生物質）、バルビツレート（鎮静剤）、ラモトリギン、フェニトイン（例えば、ディランチン）（抗痙攣薬）およびトリメトプリムが挙げられる。ラモトリギンとバルプロ酸ナトリウムとを併用すると、SJSのリスクが高まる。

10

【0142】

非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は、成人のSJSのまれな原因である。高齢患者、女性、および治療を開始した患者ではリスクは高くなる。典型的には、薬物誘発SJSの症状は、投薬開始から1週間以内に発生する。NSAIDsと同様に、パラセタモール（アセトアミノフェン）もSJSのまれな症例を引き起こしている。全身性エリテマトーデスまたはHIV感染症患者は、薬物誘発SJSに罹患しやすい。

【0143】

自己免疫疾患

自己免疫疾患は、正常な身体部分に対する異常な免疫応答から生じる症状である。少なくとも80種類の自己免疫疾患が存在する。ほぼすべての身体部分が関与する可能性がある。一般的な症状には、微熱および疲労感が挙げられる。症状は多くの場合現れたり消えたりする。

20

【0144】

原因は一般に不明である。ループスなどの自己免疫疾患の中には家族性のものもあり、特定の症例は感染または他の環境要因によって引き起こされる場合がある。いくつかの一般的な自己免疫疾患には、セリアック病、1型糖尿病、グレーブス病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスが挙げられる。診断を決定するのは難しい場合がある。

【0145】

症状の種類および重症度によって治療が決まる。非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）および免疫抑制剤が使用されることが多い。静脈用免疫グロブリンも時に使用されることがある。治療は通常症状を改善するが、典型的には疾患を治癒させることはない。

30

【0146】

米国では約2400万人（7%）の人々が自己免疫疾患に罹患している。一般的に女性は男性よりも罹患しやすい。多くの場合、自己免疫疾患は成人期に発症する。最初の自己免疫疾患は1900年代初頭に記述された。

【0147】

ヒト免疫系は、典型的には、自己抗原と反応可能なT細胞およびB細胞の両方を産生するが、これらの自己反応性細胞は、通常、免疫系内で活性化する前に死滅させられるか、免疫不応答状態に置かれるか（過剰な活性化のために免疫系内のそれらの役割からサイレントに排除される）、調節性細胞によって免疫系内でのそれらの役割から排除される。これらの機構のうちのいずれかが機能なくなると、免疫系内で機能するようになる自己反応性細胞の貯蔵庫を有することが可能になる。自己反応性T細胞の産生を妨げる機構は、T細胞が成熟した免疫細胞に発達する際に胸腺内で起こる負の選択過程によって起こる。

40

【0148】

カンピロバクター・ジェジュニなどの一部の感染症は、宿主自身の自己分子に類似する（ただし同一ではない）抗原を有する。この場合、C・ジェジュニに対する正常な免疫応答により、骨格筋上の受容体との反応性も低い抗体が産生され得る（すなわち、重症筋無力症）。自己免疫疾患の根底にある病態生理の主要な理解は、自己免疫疾患間の遺伝的共

50

有の程度を同定したゲノムワイド関連スキャンの適用であった。

【0149】

一方、自己免疫とは、それに起因する損傷または病態の有無にかかわらず、自己反応性免疫応答（例えば、自己抗体、自己反応性T細胞）の存在である。これは、特定の臓器に限定されることもあれば（例えば、自己免疫性甲状腺炎）、異なる部位の特定の組織に及ぶこともある（例えば、肺および腎臓の両方の基底膜に影響を及ぼし得るグッドパスチャー病）。

【0150】

多発性硬化症

多発性硬化症（MS）は、脳および脊髄の神経細胞の絶縁被覆が損傷している脱髄疾患である。この損傷は、神経系の一部の伝達能力を混乱させ、身体的、精神的、時に精神医学的な問題を含む様々な徴候および症状をもたらす。特定の症状には、複視、片目失明、筋力低下、感覚障害または協調障害が挙げられ得る。MSにはいくつかの形態があり、新たな症状は、単独の発作で生じるか（再発型）、経時的に蓄積する（進行型）。発作の合間に、症状が完全に消えることがある。しかし、特に疾患が進行するにつれて、永続的な神経学的問題が残ることが多い。

10

【0151】

原因は明らかではないが、根本的な機序は免疫系による破壊またはミエリン産生細胞の障害のいずれかであると考えられている。これに対して提案されている原因には、遺伝的特質、およびウイルス感染によって引き起こされるものなどの環境要因が挙げられる。MSは通常、提示された徴候および症状、ならびに裏付けとなる医学的検査の結果に基づいて診断される。

20

【0152】

多発性硬化症の治療法は分かっていない。治療では、発作後の機能を改善し、新たな発作を予防しようと試みられる。MSの治療に使用される薬物は、適度に効果的であるが、副作用を有し、忍容性が低い場合がある。理学療法は、人々が身体を機能させるのに役立つ。多くの人々は、証拠の欠如にもかかわらず、代替治療を追求している。長期的な転帰を予測するのは困難であり、女性、若年で発症した患者、再発性の経過をたどる患者、および最初に発作をほとんど経験しなかった患者の方が転帰が良好なことが多い。平均余命は平均して、罹患していない集団の平均余命よりも5～10年短い。

30

【0153】

多発性硬化症は、中枢神経系に影響を及ぼす最も一般的な自己免疫障害である。2015年には、世界中で約230万人が罹患し、その割合は様々な地域内および様々な集団間で大きく変動する。2015年には約18,900人がMSにより死亡し、1990年の12,000人から増加した。この疾患は通常20歳から50歳の間に発症し、女性では男性の2倍見られる。多発性硬化症という名称は、脳および脊髄の白質に発生する多数の瘢痕（強膜 - プラークまたは病変としてさらによく知られる）を指す。

【0154】

胆汁うっ滞性掻痒症

かゆみ（掻痒症とも呼ばれる）は、掻きたいという欲求また反射を引き起こす感覚である。感覚体験の1つにかゆみを分類しようとする多くの試みはうまくいっていない。現代の科学では、かゆみには疼痛と多くの類似点があることが示されており、いずれも不快な感覚体験であるが、行動反応パターンは異なる。疼痛は引っ込め反射を起こし、かゆみは掻破反射を起こす。かゆみおよび疼痛に対する後根神経節の一次感覚ニューロンの無髄神経線維はいずれも皮膚に由来する。しかし、それらの情報は、同じ神経束と脊髄視床路とを使用する2つの異なる系で中央に伝達される。

40

【0155】

胆汁うっ滞性掻痒症は、ほぼすべての肝疾患に起因する掻痒感であるが、最も一般的に関連する病態は、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、閉塞性総胆管結石症、胆管癌、胆汁うっ滞（薬剤性掻痒症も参照）、ならびにC型慢性肝炎ウイルス感染および他の

50

形態のウイルス性肝炎である。

【0156】

胆汁うっ滞とは、「胆汁の流れが遅くなったり止まったりすること」を意味し、肝臓（胆汁を生成する）、胆嚢（胆汁を貯蔵する）または胆道（胆管としても知られ、胆汁が肝臓および胆嚢から小腸に入ることを可能にする導管）の様々な疾患によって引き起こされ得る。これが起こると、通常は胆汁中に排泄される抱合型ビリルビンおよび老廃物が逆流して血流に戻る。これは、主に抱合型高ビリルビン血症および黄疸を引き起こす。肝臓は胆汁を抱合して水溶性にし、胆汁はすでに肝臓によって処理されているため、閉塞のために胆汁が血液中に逆流すると、血液中の抱合型ビリルビンの濃度が高くなる。これは、血清アルブミンに結合する水不溶性の形態である主に非抱合型高ビリルビン血症とは対照的

10

【0157】

皮膚に沈着する胆汁酸塩が掻痒症（かゆみ）の原因であると考えられているが、血流中のビリルビン値と掻痒症の重症度との間には強い相関は見られない。しかし、胆汁酸塩キレート剤を投与された患者ではいくらかの軽減が報告され、完全な肝細胞不全を有する（したがって、これらの物質を最初から生成することができない）患者は掻痒症を有しない。これは、肝臓によって生成される物質が掻痒症に何らかの役割を果たしているに違いないことを示唆している。

20

【0158】

慢性的なかゆみ、または掻痒症は、多くの苦痛を引き起こす（Halvorsen J A, et al. *Acta Derm Venereol* 92:543-6 (2012)）。臨床的に意味のある慢性的なかゆみは広範囲の病態に起因する（Ikoma A, et al. *Nat Rev Neurosci* 7:535-47 (2006)）。1つの主な原因が胆汁うっ滞である。胆汁うっ滞は、胆汁分泌能の障害に起因し、胆管の解剖学的閉塞および肝不全を含む多数の病態に起因して起こり得る（Bergasa NV. *Pruritus of Cholestasis. In Itch: Mechanisms and Treatment*, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of. (2014)）。胆汁うっ滞から生じる掻痒症は非ヒスタミン作動性であり、根底にある疾患の病態の解消により解消する（Bergasa NV. *Pruritus of Cholestasis. In Itch: Mechanisms and Treatment*, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of. (2014)）。胆汁うっ滞性掻痒症は、胆汁中に存在する起痒物質に起因すると仮定されている。現在、内因性オピオイド、胆汁酸（BA）およびリゾホスファチジン酸（LPA）が、胆汁うっ滞性掻痒症を媒介すると提案されている3つの主要な候補である。

30

【0159】

胆汁うっ滞性動物モデルおよび患者の血清ではともに、内因性オピオイドがアップレギュレートされている（Swain MG, et al. 1992. *Gastroenterology* 103:630-5 (1992); Thornton JR, Losowsky MS. *BMJ* 297:1501-4-29 (1988); Thornton JR, Losowsky MS. *J Hepatol* 8:53-9 (1989); Thornton JR, Losowsky MS. *Gut* 30:1392-5 (1989)）。小規模の臨床試験では、オピオイドアンタゴニストのナロキソンおよびナルメフェンが胆汁うっ滞性のかゆみの制御に効果的であることが実証された（Bergasa NV. *Am J Gastroenterol* 93:1209-10 (1998); Bergasa NV, et al. *Hepatology* 27:679-84 (1998); Bergasa NV, et al. *Gastroenterology* 102:

40

50

544-9 (1992); Swain MG, et al. 1992. Gastroenterology 103:630-5 (1992)。胆汁うっ滞患者の血清では、コレステロールのステロイド代謝産物であるBAも上昇するが、それらの値は患者から報告された掻痒感の強さと相関しない (Bergasa NV. Pruritus of Cholestasis. In Itch: Mechanisms and Treatment, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of. (2014))。一連のヒト臨床試験では、BA結合樹脂が掻痒症の軽減に有効であることが実証された (Datta DV, Sherlock S. Gastroenterology 50:323-32 (1966); European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. J Hepatol 51:237-67 (2009))。ただし、これらの結論には異議が唱えられている (Kremer AE, et al. Gastroenterology 139:1008-18, (2010); Kuiper EM, et al. Hepatology 52:1334-40 (2010))。2013年には、胆汁酸受容体であるTGR5が、かゆみをプログラムする感覚ニューロンの亜集団で同定された (Alemi F, et al. J Clin Invest 123:1513-30 (2013))。最後に、胆汁うっ滞患者の血清では、リゾホスファチジルコリンをLPAに変換する酵素であるオートタキシンがアップレギュレートされる (Kremer AE, et al. Gastroenterology 139:1008-18, (2010))。この上昇は、掻痒症を報告する患者にのみ発生する (Kremer AE, et al. Hepatology 56:1391-400 (2012))。

【0160】

内因性オピオイド、BAおよびLPAは、いずれも非ヒスタミン作動性かゆみの例である。胆汁うっ滞患者は、紅斑または腫脹などのヒスタミン放出の古典的な徴候を示さない (Bergasa NV. Pruritus of Cholestasis. In Itch: Mechanisms and Treatment, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of. (2014))。さらに、抗ヒスタミン薬は胆汁うっ滞性掻痒症の治療には効果がなく、症状の臨床的改善を報告する患者はごくわずかである (Bergasa NV. Clin Liver Dis 12:385-406 (2008); Bergasa NV. Pruritus of Cholestasis. In Itch: Mechanisms and Treatment, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of. (2014))。

【0161】

胆汁うっ滞およびビリルビン

胆汁うっ滞は、多くの場合、黄疸、皮膚および眼の黄変をもたらす。黄疸は、皮膚に沈着するビリルビン値の上昇のために発生する。ビリルビンはヘムの下流代謝産物である。細胞では、ヘムはヘムオキシゲナーゼ1 (HMOX1) によってビリベルジンに分解され、次いでこれがビリベルジンリダクターゼ (BVR) によってビリルビンに還元される。ビリルビンは極めて親油性であり、細胞膜を通過することができると考えられている。血中では、ビリルビンはアルブミンに結合している。肝臓では、UGT1A*28がビリルビンをグルクロン酸に抱合させて水溶性化合物を形成する。抱合型ビリルビンおよび非抱合型ビリルビンの両方が胆汁中に排泄される。ヒトの健康に関しては、ビリルビンは心血管保護効果のある生理的抗酸化物質であると考えられている (Bulmer AC, et al. Prog Lipid Res 52:193-205 (2013); Vitek L., et al. Atherosclerosis 160:449-56 (2002))。

【0162】

Mr g p r および非ヒスタミン作動性がゆみ

M a s 関連 G タンパク質共役受容体 (M r g p r) は、起痒性リガンドの受容体として、およびかゆみをプログラムするニューロンの分子マーカーとして、非ヒスタミン作動性がゆみに関与している (L i u Q , e t a l . J N e u r o s c i 3 2 : 1 4 5 3 2 - 7 (2 0 1 2) ; L i u Q , e t a l . C e l l 1 3 9 : 1 3 5 3 - 6 5 (2 0 0 9)) 。マウスでは、27を超える M r g p r が発現するが、既知の生理学的リガンドを有するのはそのうちのごくわずかである (M c N e i l B , D o n g X . N e u r o s c i B u l l 2 8 : 1 0 0 - 1 0 (2 0 1 2)) 。ヒトでは、4つの M r g p r (M r g p r X 1 ~ X 4) が発現する。M r g p r X 1、X 3 および X 4 は、ヒト D R G および三叉神経節 (T G) に特異的に発現していることが特定されているが、M r g p r X 2 はヒト肥満細胞に認められている (F l e g e l C , e t a l . P L O S O n e 1 0 : e 0 1 2 8 9 5 1 (2 0 1 5) ; G o s w a m i S C , e t a l . M o l P a i n 1 0 : 4 4 (2 0 1 4) ; L e m b o P M , e t a l . N a t N e u r o s c i 5 : 2 0 1 - 9 (2 0 0 2) ; M c N e i l B D , e t a l . N a t u r e 5 1 9 : 2 3 7 - 4 1 (2 0 1 5)) 。

10

【0163】

M r g p r X 3 / M r g p r A 6

m a s 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 3 は、ヒトでは M R G P R X 3 遺伝子によってコードされるタンパク質である。M A S 1 発癌遺伝子は、アンジオテンシン II 代謝産物であるアンジオテンシン - (1 - 7) に結合する G タンパク質共役受容体である。M A S 1 受容体は、アンジオテンシン - (1 - 7) に結合することによって活性化されると、アンジオテンシン II 活性化アンジオテンシン受容体の多くの作用に拮抗する。M A S 1 受容体アゴニストは、血圧の低下など、アンジオテンシン II 受容体アンタゴニストと同様の治療効果を有する。

20

【0164】

ヒト M r g p r X 3 およびそのマウスホモログ M r g p r A 6 は、後根神経節 (D R G) のケラチノサイトおよび一次感覚ニューロンに発現する。さらに重要なことに、抗菌ペプチドのデフェンシンおよびカテリシジンは、M r g p r X 3 および M r g p r A 6 のアゴニストである。デフェンシンおよびカテリシジンは、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみなどの複数の疾患および症状に影響を及ぼす可能性がある。M r g p r X 3 および M r g p r A 6 を標的として、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみを治療することができる。本明細書に記載されるように、生物学的プロセスおよび疾患に果たす M r g p r X 3 の役割は、本開示以前には不明である。したがって、M r g p r X 3 発現細胞ベースのアッセイおよび M r g p r A 6 変異マウスを使用して、これらの反応を標的とする薬物をスクリーニングおよび試験することも新規である。M r g p r X 3 発現細胞株は新規であり、薬物スクリーニングのためのハイスループットスクリーニングに不可欠である。

30

【0165】

損傷と病原体の侵入とは、損傷した組織の回復を目的とした一連の炎症反応および修復反応を引き起こす。また、反復刺激と慢性炎症とが癌の強力な危険因子であることも長い間指摘されている。したがって、創傷治癒プロセスの完全な理解は、様々な癌腫の原因、ひいてはそれらの予防のための重要な洞察をもたらす。このプロセス中に放出される多数の宿主防御分子の中には、デフェンシンと呼ばれる抗菌ペプチド (A M P) の大きなファミリーがある。これらの A M P は、病原体を直接死滅させることに加えて、炎症反応の複数の段階で様々な種類の細胞に無数の免疫調節効果を及ぼすため、特に興味深い。特に、ヒト - デフェンシン h B D 3 は、上皮細胞の遊走および増殖を刺激することにより創傷治癒を支援することが示されている。本明細書に記載されるように、新規 G タンパク質共役受容体 (G P C R)、M R G P R X 3 は、ヒトケラチノサイトおよび他の上皮細胞型でのデフェンシン受容体である。本明細書に記載されるように、リガンド相同性および発現

40

50

プロファイリングは、ヒトMRGPRX3の Mausホモログとしての Maus遺伝子Mrgrp r A 6を示し、これらの受容体の生理学的および細胞生物学的機能がインビトロおよびインビボの両方で検討される。

【0166】

皮膚は最大の免疫器官であり、感染に対する第一線の防御器官である。損傷および病原体の侵入時に、炎症性カスケードが保護反応として迅速に引き起こされる (Pasparakis, M., et al. *Nat Rev Immunol* 14, 289 - 301 (2014); Singer, A. J. & Clark, R. A. F. *N. Engl. J. Med.* 341, 738 - 746 (1999))。局所的な皮膚炎症は、古代ローマ人記録されているように「熱および疼痛を伴う発赤および腫脹」によって特徴付けられ (Owen, J. A., et al. *Immunology*. (W. H. Freeman, 2013))、複数の細胞型および多数の分子メディエーターが関与する。この複雑なプロセスは、免疫、神経、血管および上皮系の協調作用を伴い、我々の生存に不可欠である。

【0167】

ヒトデフェンシンhBD3は、ケラチノサイトの遊走と創傷治癒とを促進する。デフェンシンは、抗菌ペプチド (AMP) の大きなファミリーである。これらのカチオン性ペプチドは、組織の損傷および感染の直後に上皮細胞および免疫細胞によって産生され、広範囲の病原体を死滅させることができる (Pazgier, M., et al. *Cell Mol Life Sci.* 63, 1294 - 1313 (2006); Amid, C. et al. *BMC Genomics* 10, 1 - 13 (2009))。直接的な死滅に加えて、デフェンシンは多くの免疫調節機能も発揮する。ヒトデフェンシン3 (hBD3) は、様々な免疫細胞 (Ganz, T. *Nat Rev Immunol* 3, 710 - 720 (2003); Rohrl, J., et al. *J. Immunol.* 184, 6688 - 6694 (2010))、肥満細胞脱顆粒 (Befus, A. D. et al. *J. Immunol.* 163, 947 - 953 (1999); Subramanian, H. et al. *J. Immunol.* 191, 345 - 352 (2013)) に対する走化性活性を含む広範囲な機能を示し、創傷治癒を支援することが示された (Hirsch, T. et al. *J. Gene Med.* 11, 220 - 228 (2009); Sorensen, O. E. et al. *J. Immunol.* 170, 5583 - 5589 (2003); Aarbiou, J. et al. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 30, 193 - 201 (2004); Otte, J. - M. et al. *J. Cell Biochem.* 104, 2286 - 2297 (2008))。培養初代ヒトケラチノサイトを対象とした実験では、hBD3がケラチノサイトの遊走および増殖を促進することができることが示された (Niyonsaba, F. et al. *J. Invest. Dermatol.* 127, 594 - 604 (2016))。感染した糖尿病創傷に適用した場合、hBD3は細菌負荷を顕著に低下させ、再上皮化と創傷閉鎖とを促進した。ケラチノサイトに対するhBD3の効果は百日咳毒素によって遮断される場合があり、受容体がGPCRであることを示している (Niyonsaba, F. et al. *J. Invest. Dermatol.* 127, 594 - 604 (2016))。

【0168】

ヒトケラチノサイトにおけるhBD3の主要な受容体としてのMRGPRX3。MRGPRX3は、GPCRのMas関連Gタンパク質共役受容体 (Mrgrp r) ファミリーに属する。本明細書に記載されるように、過去10年間の研究により、感覚ニューロンおよび免疫細胞でのこれらの受容体の多様な発現パターンおよび機能が明らかにされた (Liu, Q. et al. *Cell* 139, 1353 - 1365 (2009); Han, L. et al. *Nat Neurosci* 16, 174 - 182 (2013); McNeil, B. D. et al. *Nature* 519, 237 - 241 (2015))。4つのヒトMRGPRXのうち、MRGPRX3はケラチノサイトを含む上皮細胞に高度に発現するが、その他はDRGニューロン、肥満細胞または他の免疫細胞型に特異的であ

10

20

30

40

50

る (Hruz, T. et al. *Adv. Bioinformatics* 2008, 4: 20747 (2008); Kiatsurayanon, C. et al. *J. Dermatol. Sci.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci>. (2016.05.006)。ユニバーサルプロモーターを用いた過剰発現ヒトMRGPRX3は、ラットではケラチノサイト過剰増殖を誘発した (Kaisho, Y. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 653-657 (2005)。本明細書に記載されるように、初代ヒトケラチノサイトを対象としたCa²⁺イメージングおよびロックダウン実験では、細胞がhBD3に応答するためにMRGPRX3が必要であることが示される。発現分析とリガンド相同性とは、さらにMRGPRX3のマウスホモログとしてのマウス遺伝子MrgrpA6を示し、これらの受容体のインビボ研究の機会を開いた。 10

【0169】

創傷治癒

損傷のない皮膚では、表皮（表面層）と真皮（深層）とが外部環境に対する保護バリアを形成する。バリアが破られると、生化学的事象の組織化されたカスケードが開始されて損傷を修復する。このプロセスは、予測可能な段階、すなわち、血液凝固（止血）、炎症、組織増殖（増殖）および組織再構築（成熟）に分けられる。血液凝固は、別の段階ではなく、炎症段階の一部であると考えられる場合がある。

【0170】

止血（血液凝固）は、創傷治癒プロセスの初期に始まる。損傷の最初の数分以内に、血液中の血小板が損傷部位に付着し始める。これにより血小板が活性化され、いくつかのことが生じる。血小板は、凝固に適した無定形な形状に変化し、化学信号を放出して凝固を促進する。これはフィブリンの活性化をもたらし、フィブリンはメッシュを形成し、血小板を互いに結合する「接着剤」として機能する。これにより、血管の裂け目を塞ぐのに役立つ血栓が形成され、それ以上の出血が遅くなり予防される。 20

【0171】

炎症の段階では、細菌および他の病原体または残骸とともに、損傷した細胞および死細胞が取り除かれる。これは、白血球が残骸を飲み込むことによって残骸を「食べる」貪食のプロセスを通して起こる。血小板由来の増殖因子が創傷に放出され、これにより、増殖段階で細胞の遊走および分裂が引き起こされる。 30

【0172】

増殖（新たな組織の増殖）段階では、血管新生、コラーゲン沈着、肉芽組織形成、上皮化および創傷収縮が生じる。血管新生では、血管内皮細胞が新たな血管を形成する。線維増殖および肉芽組織形成では、線維芽細胞が増殖し、コラーゲンとフィブロネクチンとを排出することにより、新たな暫定的な細胞外マトリックス（ECM）を形成する。同時に、表皮の再上皮化が起こり、そこでは上皮細胞が増殖して創傷床の上に「一面に広がり」、新たな組織を覆う。創傷収縮では、筋線維芽細胞が、平滑筋細胞の場合と同様の機構を用いて創傷端を把持し収縮することにより創傷の大きさを減少させる。細胞の役割がほぼ完了すると、不要な細胞はアポトーシスを起こす。

【0173】

成熟および再構築中、張力線に沿ってコラーゲンが再配列され、不要になった細胞はプログラム細胞死すなわちアポトーシスによって除去される。創傷治癒プロセスは複雑であるだけでなく、脆弱でもあり、治癒していない慢性創傷の形成につながる中断または失敗の影響を受けやすい。非治癒慢性創傷に寄与する因子は、糖尿病、静脈疾患または動脈疾患、感染症、および老年期の代謝欠損である。 40

【0174】

樹状細胞

樹状細胞（DC）は、哺乳動物の免疫系の抗原提示細胞（アクセサリー細胞としても知られる）である。樹状細胞の主な機能は、抗原物質を処理し、それを細胞表面で免疫系のT細胞に提示することである。樹状細胞は、自然免疫系と適応免疫系との間のメッセンジ 50

ヤーとして機能する。樹状細胞は、皮膚（ランゲルハンス細胞と呼ばれる特殊な樹状細胞型がある）ならびに鼻、肺、胃および腸の内層など、外部環境と接触している組織に存在する。樹状細胞はまた、血液中に未成熟な状態で見出され得る。樹状細胞は活性化されると、リンパ節に遊走し、そこでT細胞およびB細胞と相互作用して適応免疫応答を開始および形成する。未成熟樹状細胞は、樹状突起ではなく大きな細胞質の「ペール」を有するため、ペール細胞とも呼ばれる。

【0175】

後根神経節

後根神経節（または脊髄神経節）（後根神経節（*posterior root ganglion*）としても知られる）は、脊髄神経の後根にある神経細胞体（神経節）の集団である。後根神経節には感覚ニューロン（求心性）の細胞体が含まれる。感覚ニューロンは、求心性ニューロンとしても知られ、それらの受容体を介して特定の種類の刺激を活動電位または段階的電位に変換するニューロンである。このプロセスは感覚伝達と呼ばれる。感覚ニューロンの細胞体は、脊髄の背側神経節（*dorsal ganglia*）に位置している。一次感覚ニューロンは、受容器で始まり、多くの場合中枢神経系の核内にある二次感覚ニューロンとのシナプスで終わる求心路の最初のものである。

10

【0176】

この感覚情報は、求心性神経または感覚神経の求心性神経線維に沿って、脊髄を介して脳に伝わる。刺激は、体外の外受容器から（例えば、光および音）、または体内の内受容器から（例えば、血圧、または体位の感覚）発生し得る。異なる種類の感覚ニューロンは、異なる種類の刺激に応答する異なる感覚受容器を有する。

20

【0177】

後根神経節ニューロンの軸索は求心性神経として知られている。末梢神経系では、求心性神経とは、中枢神経系（すなわち、脳および脊髄）に感覚情報を中継する軸索を指す。ニューロンは、3つの部分、すなわち、情報を受け取り、それを神経細胞体に中継する樹状突起、ニューロンの細胞体である神経細胞体、および神経細胞体から情報を中継する軸索からなる。ニューロンでは、樹状突起がミエリンによって覆われている場合であっても、樹状突起はシナプスで別のニューロンの軸索から情報を受け取り、軸索は次のニューロンの樹状突起に情報を送る。

【0178】

プロトン感知性Gタンパク質共役受容体は、後根神経節感覚ニューロンによって発現され、酸誘発侵害受容（*acid-induced nociception*）に何らかの役割を果たす可能性がある。いくつかの実施形態では、後根神経節の一次感覚ニューロンのGタンパク質共役受容体（例えば、MrpgrX4またはMrpgrA1）は、疼痛およびかゆみなどの感覚を媒介する。

30

【0179】

後根神経節ニューロンの神経終末は、機械的、熱的、化学的および有害な刺激によって活性化される様々な感覚受容器を有する。閾値の高いチャネルは侵害受容に何らかの役割を果たす可能性がある。脊髄の背側神経終末放電のシナプス前調節は、侵害受容と疼痛伝達とを制御することができる特定の種類のGABA受容体を介して起こり得る。

40

【0180】

HEK293細胞

ヒト胎児由来腎臓293細胞は、多くの場合、HEK293、HEK-293、293細胞、またはあまり正確ではないがHEK細胞とも呼ばれ、組織培養で増殖させた（流産したヒト胚由来の）ヒト胎児由来腎臓細胞に元由来するか死産動物に元由来する特定の細胞株である。HEK293細胞は、非常に容易に増殖し、非常にトランスフェクトしやすく、細胞生物学研究では長年にわたって広く使用されてきた。HEK293細胞は、バイオテクノロジー産業により、遺伝子療法のための治療用タンパク質およびウイルスを産生するためにも使用される。本明細書には、MrpgrX3またはMrpgrX4のいずれかを安定に発現するHEK293細胞が記載される。

50

【0181】

医薬組成物

特定の実施形態では、本発明は、本発明で使用される薬剤を含む医薬組成物を提供する。薬剤は、好適に製剤化され、そのような送達のために認識されている任意の手段によって対象、または細胞の環境に導入され得る。

【0182】

そのような組成物は、典型的に、薬剤および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される用語「薬学的に許容される担体」には、薬学的投与に適合する生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。補助的な活性化化合物も組成物に組み込むことができる。

10

【0183】

医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下投与に使用される溶液または懸濁液には、以下の成分、すなわち、滅菌希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗細菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェート、および張度調整剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースが挙げられ得る。pHは、酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムにより調整することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複数回投与バイアルに封入することができる。

20

【0184】

注射用途に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌注射液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、ニュージャージー州パーシッパニー）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）が挙げられる。いずれの場合も、組成物は無菌でなければならず、容易な注射の可能性が存在する程度に流動性であるべきである。組成物は、製造および保管の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどの被覆の使用によって、分散液の場合は必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって、微生物の作用の防止を達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによって、注射用組成物の長期吸収をもたらすことができる。

30

40

【0185】

必要に応じて上に列挙した成分のうちの1つまたは組合せとともに、選択された溶媒に必要な量の活性化化合物を組み込み、続いて濾過滅菌することによって、滅菌注射液を調製することができる。一般に、基本的な分散媒、および上に列挙したものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに活性化化合物を組み込むことによって分散液が調製される。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、その事前に滅菌濾過された溶液から活性成分および任意の追加の所望の成分の粉末がもたらされる。

【0186】

50

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療投与の目的のために、活性化合物を賦形剤と混合し、錠剤、トローチまたはカプセル、例えばゼラチンカプセルの形で使用することができる。経口組成物は、口腔洗浄薬として使用するための液体担体を使用して調製することもできる。薬学的に適合する結合剤、および/またはアジユバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれか、すなわち、結合剤、例えば、微結晶セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース；崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogelもしくはコーンスターチ；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味料、例えば、スクロースもしくはサッカリン；または香味料、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジ風味を含有することができる。

10

【0187】

本発明の組成物は、ナノ粒子製剤として製剤化することもできる。本発明の化合物は、即時放出、遅延放出、調節放出、持続放出、パルス放出および/または制御放出用途のために投与することができる。本発明の医薬組成物は、体積当たり0.01~99重量%の活性物質を含有してもよい。吸入による投与の場合、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからエアゾールスプレーの形で送達される。そのような方法には、米国特許第6,468,798号明細書に記載されているものが挙げられる。

20

【0188】

全身投与は、経粘膜または経皮手段によるものでもあり得る。経粘膜または経皮投与の場合、浸透する障壁に適した浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は一般に当技術分野で知られており、例えば、経粘膜投与の場合、洗浄剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬の使用によって達成することができる。経皮投与の場合、活性化合物は、当技術分野で一般に知られているように、軟膏、膏薬、ゲルまたはクリームに製剤化される。化合物は、坐薬（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐薬基剤を含む）、または直腸送達用の保持浣腸の形で調製することもできる。

【0189】

一実施形態では、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤など、身体からの急速な排出から化合物を保護する担体とともに調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤は、標準的な技術を使用して調製することができる。また、材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することができる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染細胞を標的としたリポソームを含む）も、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号明細書に記載されているように、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

30

40

【0190】

このような化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD50（集団の50%に致死的な用量）およびED50（集団の50%に対して治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物を対象とした標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比は治療指数であり、LD50/ED50の比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用してもよいが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小限に抑え、それによって副作用を低減するために、罹患組織の部位に対してそのような化合物を標的化する送達システムを設計するのに注意を払うべきである。

50

【0191】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトに使用するための投与量の範囲を策定する際に使用することができる。そのような化合物の投与量は、毒性をほとんどまたはまったく伴わず、ED50を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動してもよい。本発明の方法に使用される化合物について、細胞培養アッセイから治療有効用量を最初に推定することができる。細胞培養で決定されたIC50（すなわち、症状の半最大阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するために、動物モデルに対してある用量が製剤化されてもよい。このような情報を使用して、ヒトに対して有用な用量をさらに正確に決定することができる。血漿中の濃度は、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定されてもよい。

【0192】

本明細書で定義されるように、薬剤の治療有効量（すなわち、有効投与量）は、選択された薬剤に依存する。例えば、約1 pg ~ 1000 mgの範囲の薬剤の単回投与量が投与されてもよい。いくつかの実施形態では、10、30、100もしくは1000 pg、または10、30、100もしくは1000 ng、または10、30、100もしくは1000 μg、または10、30、100もしくは1000 mgが投与されてもよい。いくつかの実施形態では、1 ~ 5 gの組成物を投与することができる。

【0193】

本発明の化合物の治療有効量は、当技術分野で知られている方法により決定することができる。使用される薬剤および選択された製剤/医薬製剤に依存することに加えて、本発明の医薬組成物の治療有効量は、患者の年齢および全体的な生理学的状態ならびに投与経路に依存する。特定の実施形態では、治療用量は、一般に、約10 ~ 2000 mg / 日、好ましくは約30 ~ 1500 mg / 日である。例えば、50 ~ 500 mg / 日、50 ~ 300 mg / 日、100 ~ 200 mg / 日を含む他の範囲が使用されてもよい。

【0194】

投与は、1日1回、1日2回、またはさらに頻繁であってよく、疾患または障害の維持期には、例えば、1日1回または1日2回ではなく、2日または3日に1回に減らしてもよい。用量および投与頻度は、当業者に公知の急性期の少なくとも1つ以上、さらに好ましくは2つ以上の臨床徴候の減少または欠如を伴う寛解期の維持を裏付ける臨床徴候に依存する。当業者であれば、限定するものではないが、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および/または年齢、および存在する他の疾患を含む特定の因子が、対象を効果的に治療するために必要な投与量およびタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の薬剤による対象の治療は、単回治療を含むことができるか、場合により、一連の治療を含むことができる。

【0195】

細胞の環境に薬剤を導入する方法は、細胞の種類とその環境の構成とに依存することを理解することができる。好適な量の薬剤を導入しなければならず、これらの量は標準法を使用して経験的に決定することができる。細胞の環境での個々の薬剤の例示的な有効濃度は、500ミリモル以下、50ミリモル以下、10ミリモル以下、1ミリモル以下、500ナノモル以下、50ナノモル以下、10ナノモル以下であってよいか、1ナノモル以下の濃度が使用され得る組成物であってもよい。

【0196】

医薬組成物は、投与のための指示書とともにキット、容器、パックまたはディスペンサーに含めることができる。

【0197】

以下の実施例は、本発明のアッセイ、スクリーニングおよび治療方法を作製および使用方法の完全な開示および説明を当業者に提供するように記載されており、本発明者がその発明としてみなすものの範囲を限定することを意図しない。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0198】

実施例1：実施例2～11の材料および方法

以下の材料および方法を使用した。

【0199】

動物

野生型129S1/Sv1mJ、野生型BALB/cJ、およびBALB/c遺伝的バックグラウンドにおけるRag1-/- (C.129S7(B6)-Rag1^{tm1Mōm/J})をジャクソン研究所から購入し、ジョンズ・ホプキンス大学医学部において特定病原体不在条件下で交配および飼育した。12時間の昼夜サイクルで動物を維持し、オートクレーブ処理された飼料と濾過水とを自由に摂取させた。他の実験にはいずれも8～10週齢の動物を使用した。ジョンズ・ホプキンス大学医学部の動物実験委員会によって承認されたプロトコルの下で全動物を管理した。WTおよび変異体試料ならびに動物に対する同等の処理を含む全実験が、条件を知らない実験者によって行われた。

10

【0200】

カルシウムカルシウムイメージング用の薬物調製

ラモトリギン(LTG)、アロプリノール、カルバマゼピンおよびオクスカルバゼピン(いずれもSigma製)を実験当日に新たに調製した。まずジメチルスルホキシド(DMSO)にこれらの薬物を溶解し、次いで使用前にカルシウムイメージング緩衝液で少なくとも10000倍に希釈した。対応する図の説明文に、各実験の薬物の最終濃度を示した。

20

【0201】

HEK293細胞の培養およびトランスフェクション

HEK293ヒト胎児由来腎臓細胞(ATCC)を37°Cの増殖培地(10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)、100U ml⁻¹ペニシリンおよび100mg ml⁻¹ストレプトマイシンを補充したDMEM)中で培養した。Mrgpr発現細胞を生成するために、Lipofectamine 3000(Invitrogen)を使用して、Mrgpr遺伝子(pLX304ベクターにクローニングおよび挿入したMRGPRX4および変異MRGPRX4を除く)をコードするcDNAを挿入したpcDNA3.1哺乳動物発現プラスミドをHEK293細胞に一時的にトランスフェクトした。Mrgpra1-GFP、Mrgprc11-GFPおよびMRGPRX4-GFPを発現する安定な細胞株は、前述のように生成した(24)。要約すると、プラスミド内のMrgprタンパク質のC末端に融合したGFPをコードするcDNAをHEK293細胞にトランスフェクトした。10%FBSを補充したDMEM中のゼオシンまたはブラストサイジンにより、トランスフェクトした細胞を選択した。クローニングした各細胞を安定な細胞株としてさらに選択し、受容体-GFP融合タンパク質の膜局在を確認した。

30

【0202】

HEK293細胞に対するカルシウムイメージング

最初の実験では、100μg/mlのポリ-D-リジンで被覆したガラスカバースリップ上にHEK293細胞を播種し、Mrgpr遺伝子を含むベクターを一時的にトランスフェクトし、培養の24～48時間後、37°Cの暗所で30分間、プルロニックF-127分散剤(0.1%、Molecular Probes)とともにFura2-アセトメトキシエステルカルシウムインジケータ(0.5μM、Molecular Probes)を細胞に添加し、次いで、カルシウムイメージング緩衝液(CIB; NaCl 125mM、KCl 3mM、CaCl₂ 2.5mM、MgCl₂ 0.6mM、HEPES 10mM、グルコース20mM、NaHCO₃ 1.2mM、スクロース20mM、NaOHによりpH7.4にしたもの)で洗浄した。Fura2添加細胞に薬物を加え、340nmおよび380nmの励起波長を使用して細胞内遊離カルシウムを測定し、顕微鏡ベースのイメージングシステム(Nikon Eclipse TE200)を用いて520nmで発光を測定した。340/380nm励起での発光蛍光比の変化を1秒間隔で継続的にモニターした。その後、Mrgpra1-GFP、Mrgprc

40

50

11 - GFPおよびMRGPRX4 - GFP安定細胞株を使用して実験を行って、一過性発現細胞から得られた観察結果を確認した。

【0203】

EC₅₀の決定

Mrgpra1または野生型および変異体MRGPRX4が安定に発現したHEK細胞を、96ウェルプレート上の100μlの培養培地に一晩播種した。翌日、培地をFLIPRカルシウム5アッセイキット(Molecular Devices)製の色素添加溶液に置き換え、ハンクス平衡塩類溶液(HBSS)に20mM HEPESを加えたもの(pH7.4)で希釈した。37°Cで1時間インキュベートした後、細胞を室温で暗所で10分間回復させた後、Flexstation-3(Molecular Devices)で細胞内カルシウム動員アッセイを行った。試験した薬物は、3倍濃度のHBSS/HEPES溶液中で調製した。製造業者の仕様に従って、180秒間の同時データ収集でウェルをイメージングし、イメージング開始後20秒で50μlの薬物を加えた。少なくとも3つの独立したウェルで物質を試験し、シグナルを平均化した。最大シグナル(薬物により刺激した後に得られる)から最小シグナル(薬物を加える前の基礎レベルで)を差し引くことにより応答を決定した。用量反応曲線は、SoftMax(登録商標)Pro(Molecular Devices)によって最高応答(100%)に正規化された相対蛍光シグナル(%)としてプロットした。その試験でその物質に対する正規化されたピーク応答の50%の応答を与える物質の濃度としてEC₅₀(半最大有効濃度)を決定した。

10

20

【0204】

薬物標識および内在化アッセイ

赤色蛍光色素によって薬物を標識するために、1μgのLTGを最初に50μlのジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し、さらに450μlの反応緩衝液(0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH9.0)で希釈して、7.8mMの濃度のLTGを得た。次いで、10mg ml⁻¹のDMFに溶解した50μlのTexas-red-コンジュゲートスルホニルクロリド(Thermo Fisher Scientific、T1905)をLTG溶液にゆっくりと加えた。反応物を連続的に攪拌しながら4で1時間インキュベートした。次いで、その後の使用のために混合物を細胞培養培地に希釈した。Texas Red色素によって標識したLTGは、励起/発光極大約595/615nmを有する明るい赤色蛍光を生成することができる。Mrgpra1-GFP、Mrgprc11-GFPまたはMRGPRX4-GFP融合タンパク質を安定に発現するHEK293細胞を、10%FBSを含むDMEM中で増殖させた。血清飢餓の4~6時間後、細胞を培地、色素のみ、非標識LTGまたはTexas-Red標識LTGのいずれかで37°Cで15または60分間処理した。細胞をPBSで洗浄し、PBS中の4%パラホルムアルデヒドにより固定した。倍率400倍の共焦点蛍光顕微鏡下で(Zeiss LSM700)、Mrgpr-GFPまたは薬物の細胞内局在を視覚化した。

30

【0205】

LTG結合能

ポンプ、脱ガス器、オートサンプラー、カラムオープンおよびダイオードアレイ検出器(Shimadzu、京都、日本)からなるShimadzu LC-2010A装置を用いて、CMC分析を行った。Lab-solutionプログラム(Shimadzu)によってデータを取得した。移動相は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 5mM、pH7.4)からなり、0.2ml/分の流速で送液した。標準薬を別個にメタノールに溶解することにより、ラモトリギンのストック溶液(100μM)を調製した。ストック溶液を移動相で希釈することにより、様々な濃度の標準溶液を調製した。MRGPRX2/CMCおよびMRGPRX4/CMCカラムを以下のように調製した。要約すると、MRGPRX4発現HEK293細胞(1×10⁸)を採取し、遠心分離した(1000g、10分、4°C)。4で10分間1000gで遠心分離することにより、細胞を生理食塩水(pH=7.4)で洗浄した。30分間Tris-HCl(50mM、pH=7.4)

40

50

中で超音波により細胞を溶解し、4 で10分間1000gで2回遠心分離した。次いで、回収した上清を4 で20分間12000gで遠心分離し、ペレットを5mlの氷冷生理食塩水に再懸濁した。シリカ(45mg)を105°Cで30分間活性化した。4 で一晚攪拌しながら、真空下で活性化シリカを用いて、細胞膜懸濁液をホモジナイズ/吸着した。次いで、細胞膜固定相を蒸留水で洗浄し、湿式充填法(10MPa、5分)を用いてカラムに充填し、CMCカラムを得た。

【0206】

M R G P R X 4 / C M C系によって、以下のようにラモトリギンの K_D 値を決定した。各化合物の標準溶液を別個に移動相に加え、それぞれ 2.0×10^{-8} 、 4.0×10^{-8} 、 8.0×10^{-8} 、 1.6×10^{-7} および 3.2×10^{-7} モルの濃度範囲の一連の新たな移動相を得た。各化合物の異なる濃度を有するこの移動相を、勾配プログラムの下で 0.2 ml min^{-1} の流速でM R G P R X 4 / C M Cカラムを通して別個にポンプで送液し、異なる濃度を有する化合物のブレイクスルー曲線を記録した。式4に従って、 $[LR]s$ 対 $[L]m$ の逆数値の対応するグラフを得た。さらに、切片と勾配の比を計算することにより K_D を決定することができ、切片の逆数から $[R]s$ を得た。

10

【0207】

M r g p r a 1 ノックアウト - e G F P ノックインマウスの作製
S J S / T E N マウスモデル

8~10週齢の雄マウスに、生理食塩水に懸濁した原因薬物(L T G、アロプリノール、オクスカルバゼピン)、または生理食塩水のいずれかを強制経口投与した。投与量は、示されている動物の体重の mg/kg に基づくものとした(例えば、L T G 50 mg kg^{-1} 体重)。皮膚、眼および粘膜、生存率、体重、身体的および肉眼的外観(特に眼、粘膜および皮膚に対して)を連日監視した。

20

【0208】

組織学的分析および免疫染色

ペントバルビタールにより動物を深く麻酔し、20mlの0.1M冷PBS(pH7.4)に続いて25mlの冷4%パラホルムアルデヒド(PFA)を経心臓的に灌流した。足の皮膚、眼瞼、脾臓、リンパ節を切除し、4%PFA中で2時間超かけて後固定し、20%に続いて30%スクロース溶液中で4°Cで各24時間凍結保護した。組織試料を最適切断温度(OC T)で包埋し、凍結してから $20 \mu\text{m}$ 切片に連続的に切断し、スライド上に置いた。製造業者の指示(V i t r o V i e w (商標)H&E染色キット)に従って、標準手順を使用してヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色を行った。アポトーシス細胞の量を定量するために、A p o B r d U D N A断片化アッセイキット(B i o v i s i o n)のプロトコルに従って、核酸の末端を標識することによってアポトーシス細胞から生じるDNA断片化を検出する方法である末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニック末端標識(T U N E L)アッセイを行った。組織内の全細胞数を推定するために、ヨウ化プロピジウムにより核を残らず染色した。倍率200倍の共焦点蛍光顕微鏡下で(Z e i s s L S M 700)デジタル写真を撮影した。T U N E L陽性核の数を計数し、皮膚の表皮層で観察された総核の数に対する割合として報告した。

30

【0209】

グランザイムB免疫染色のために、スライドを0.3%T r i t o n X - 100 P B S溶液で洗浄し、ブロッキング溶液(10%正常ヤギ血清)中で1時間インキュベートし、次いで、ブロッキング溶液中、抗マウスグランザイムBビオチン(e B i o s c i e n c e、クローン16G6)の1:500希釈液とともに室温で30分間インキュベートし、企業のマニュアルとしてA B Cキット(V e c t o r L a b o r a t o r i e s)およびT M B基質キット(V e c t o r L a b o r a t o r i e s)を使用して発色させた。

40

【0210】

免疫蛍光染色のために、スライドを洗浄し、10%正常ヤギ血清でブロックし、次いで、ブロッキング溶液で希釈した以下の一次抗体、すなわち、ニワトリ抗G F P (1:50

50

0、Aves Labs)、Alexa Fluor 594ハムスター抗マウスCD11c (1:500、Biolegend、クローンN418)、Alexa Fluor 647ラット抗マウスCD3 (1:500、Biolegend、17A2)、Alexa Fluor 594抗マウスCD8a (1:500、Biolegend、53-6.7)とともに4°Cで一晩インキュベートした。0.3% Triton溶液でスライドを洗浄した。GFP染色のために、続いて、Alexa Fluor 488ヤギ抗ニワトリIgY (1:1000 Thermo Fisher)中でスライドを室温で2時間インキュベートした。次いで、スライドをPBSで洗浄してから、イメージング用の退色防止溶液により封入した。

【0211】

マウスTNF- およびグランザイムBの測定

連日の薬物投与後9日目に、SJS/TENモデルマウスの足の皮膚を採取した。組織を秤量し、Bio-Gen Pro200ホモジナイザー (Pro Scientific)を使用して、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Cell Signaling Technology)を含有する冷PBS中でホモジナイズした。次いで、ホモジネートを10,000g、4°Cで10分間遠心分離した。上清を使用して、Duo set (登録商標) ELISA開発システムキット (R&D System)を使用してTNF- の値とグランザイムBの値とを測定した。各試料を最小3連ウェルでアッセイし、 $\text{pg ml}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 組織としてサイトカイン濃度を報告した。

【0212】

GFP+細胞の蛍光活性化細胞選別 (FACS)

Mrgpra1^{GFP}/GFPマウス由来のGFP+細胞を特性評価するために、それらの脾臓およびリンパ節を小片に切断し、 1mg ml^{-1} コラゲナーゼD (Sigma-Aldrich)および $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ DNase I (Worthington Biochemical)を含有するRPMI1640培地中で37°Cで30分間消化した。次いで、消化した組織を70 μm メッシュのナイロン細胞濾過器 (BD Falcon)を通して濾過して、単一細胞懸濁液を生成した。脾細胞懸濁液中の汚染赤血球を、室温で5分間、ACK溶解緩衝液 (Quality Biological)中で溶解した。残りの細胞をPBSで2回洗浄し、氷上で30分間、LIVE/DEAD Aqua (ThermoFisher、Molecular Probes)により染色した。次いで、細胞を洗浄し、FACS染色緩衝液 (2%加熱不活性化FBSを含む1倍PBS)に再懸濁し、抗マウスCD16/CD32 Fc Block (BD Biosciences)により非特異的結合を10分間ブロックした後、CD4 (クローンRM4-5)、CD8a (53-6.7)、CD11b (M1/70)、CD45 (30-F11)、CD317 (927)、CD370 (DNGR1、7H11)、F4/80 (BM8)、I-A/I-E (M5/114.15.2)、Ly6C (HK1.4)、Ly6G (1A8)、XCR1 (ZET、いずれもBiolegend製)、CD3 (145-2C11)およびCD11c (N418; eBioscience)を認識する抗体を含む蛍光色素コンジュゲート表面マーカー染色抗体の可変パネルとともに氷上で30分間インキュベートした。次いで、染色された試料をいずれも染色緩衝液で2回洗浄し、LSR-I

【0213】

RNA調製およびカルシウムイメージングのためのマウス免疫細胞選別

CD11cおよびMHC-II発現に基づいて脾細胞の様々な細胞タイプを選別するために、マウス脾細胞の単一細胞懸濁液を上記のように調製した。次いで、製造業者のプロ

10

20

30

40

50

トコルによって示唆されているように、いくつかの改変を加えて、Easy Sep (商標) マウス CD11c Positive Selection キット (Stem Cell Technologies) を用いて CD11c+ 細胞を濃縮した。要約すると、マウス FcR ブロッカーにより非特異的結合について細胞懸濁液をブロックし、次いで CD11c に対するフィコエリトリン (PE) コンジュゲート抗体により染色し、続いて PE および磁気ナノ粒子を認識した四量体抗体複合体とともにインキュベートした。次いで、免疫磁気分離から PE 標識細胞を一度回収した。反復磁気分離を行わずに、APC-Cy7 コンジュゲート抗マウス I-A/I-E (クローン M5/114.15.2) 抗体 (Biolegend) により、濃縮された CD11c+ 細胞を染色した。FACS Diva ソフトウェアを用いる FACS Aria IIu ソーター (BD Bioscience) 上で、図 12 に示すような CD11c および MHC-II の発現に基づいて、細胞集団をゲーティングおよび選別した。次いで、Mrgpra1 発現を確認するための RNA 単離、またはカルシウムイメージング (HEK 細胞について記載されているように) のいずれかのために、選別された細胞を直ちに使用した。

10

【0214】

RNA 単離および定量的 RT-PCR

様々な臓器から得られたマウス組織試料をホモジナイズし、製造業者のマニュアルに従って、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) または RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit のいずれかを用いてそれらの RNA を抽出した。RNeasy Micro Kit (Qiagen) を使用して、単離されたマウス細胞または培養ヒト樹状細胞から RNA を抽出した。ゲノム DNA (gDNA) 汚染を最小限に抑えるために、gDNA Eliminator カラム (Qiagen) を使用して RNA を精製し、カラム上で DNase I により 15 分間処理した。製造業者の指示に従って、iScript cDNA 合成キット (Bio-Rad) を使用して、oilgo-dT およびランダムプライマーにより、組織から得られた 500 ナノグラムの全 RNA、または細胞から得られた 30 ナノグラムの全 RNA を相補 DNA (cDNA) に逆転写した。gDNA の汚染を確認するために、逆転写酵素を使用しない陰性対照反応を行った。次いで、0.5 L の Taqman 特異的プライマー/プローブ (Thermo Fisher; Mrgpra1 用の Mm01703261; Actb 用の Mm04394036; MRGPRX4 用の Hs00607779; ACTB 用の Hs01060665)、7.5 L の Taqman Universal Master Mix (Thermo Fisher) および 5 L の DEPC 処理水を用いて、2 L の DNA から定量的 PCR アッセイを行った。PCR 反応は、以下の熱プロファイル、すなわち、50 °C で 2 分間、95 °C で 10 分間、次いで、45 サイクルの 95 °C (15 秒) に続いて 60 °C (1 分) により行った。2% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を視覚化した。

20

30

【0215】

CD4 および CD8 T 細胞のインビボ枯渇

CD4 / CD8 T リンパ球のインビボ枯渇に、マウス CD4 (BioXcell、クローン GK1.5) および CD8 (BioXcell、クローン 2.43) に対するラットモノクローナル抗体を使用した。-2、0 および 3 日目に、雄の野生型 129S1/Sv1mJ マウスに、200 µg の CD4 または CD8 抗体を腹腔内注射した。同様のプロトコルにより、ラット IgG2b アイソタイプ対照抗体 (BioXcell) を用いて対照群を処置した。全マウスに、0 日目から 1 日 1 回、LTG (50 mg kg⁻¹ 体重) を強制経口投与した。7 日目に、脾臓および末梢血のフローサイトメトリー分析により、枯渇の効果を評価した。この枯渇スキームにより、それぞれ、CD4 枯渇マウスの脾臓および末梢血の CD4+ 細胞が約 98.4% および 89.9% 減少したのに対し、CD8 枯渇マウスの脾臓および末梢血の CD8+ 細胞が 99.1% および 97.6% 減少した (図 10)。

40

【0216】

50

樹状細胞の養子移入

ナイーブな129S1 WTマウスまたはMr g p r a 1 - / - マウスから得られた脾臓を無菌的に除去し、製造業者のマニュアルに従って、マウスPan樹状細胞単離キット(Milt en y i B i o t e c)を用いてDCを単離した。要約すると、上記のようにコラゲナーゼD/DNase I消化によって、脾臓由来の単一細胞懸濁液を生成した。次いで、非樹状細胞に対するビオチンコンジュゲート抗体のカクテル、続いて抗ビオチン磁気マイクロビーズを細胞懸濁液に加えた。LSカラムを使用して、ビーズ標識非樹状細胞から樹状細胞を分離した。LTG(50mg/kg⁻¹体重)の連日投与を開始する前日に、ナイーブな雄のMr g p r a 1ノックアウトマウスに、200μlのハックス平衡塩類溶液(HBSS)に懸濁した、WTマウスまたはKOマウスから新たに単離した樹状細胞を静脈内(尾静脈)注射した(2×10⁶細胞/マウス)。

10

【0217】

ヒト末梢血樹状細胞の培養

Lonza(cc-2701)およびSTEMCELL Technologies(70041)から、4例の異なるドナー由来のヒト末梢血樹状細胞を購入した。未成熟樹状細胞として細胞を維持するために、細胞を解凍し、加湿した37°C 5%CO₂インキュベーター内で、10%FBS、50ng ml⁻¹のIL-4および50ng ml⁻¹のGM-CSFを補充したRPMI 1640培地中で培養した。これらの樹状細胞に関する実験はいずれも、細胞が死滅する前の7日以内に完了した。

20

【0218】

ヒトDCのsiRNAトランスフェクション

MRGPRX4に対するON-TARGET+SMARTpool siRNA(Dharmacon)を使用して、樹状細胞でのMRGPRX4の発現をダウンレギュレートした。培養開始後3日目に、ヒト樹状細胞を培地で洗浄し、回収し、室温で10分間200gで遠心分離した。次いで、Nucleofector(登録商標)溶液に細胞を再懸濁し、ヒト樹状細胞Nucleofector(登録商標)キットのプロトコルに従ってNucleofector(商標)2bデバイス(Lonza)を使用して、MRGPRX4 siRNAまたは非標的化対照siRNAのいずれかをトランスフェクトした。トランスフェクション後、500μlの添加培養培地を試料に静かに加え、48時間インキュベートする。次いで、カルシウムイメージングおよび内在化アッセイに細胞を使用した。

30

【0219】

ヒトDCの内在化

カバースリップにヒト樹状細胞を播種し、10%FBSを含むRPMI 1640培地中で5日間培養した。4~6時間の血清飢餓の後、培地、色素のみ、非コンジュゲートLTGまたはTexas RedコンジュゲートLTG(Texas Redは、上述のようにLTGにコンジュゲートした)を用いて、37°Cの暗所で細胞を15分間処理した。PBS中の4%パラホルムアルデヒドにより細胞を固定し、PBSで洗浄した。次いで、固定した細胞をブロッキング溶液(10%正常ヤギ血清)中で一時間ブロックしてから、ウサギ抗MRGPRX4(10ug ml⁻¹、Abcam, ab188740)中で4°Cで一晩インキュベートした。続いて、0.3%Triton溶液で細胞を洗浄し、Alexa Fluor 488コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(1:1000、Thermo Fisher)中で室温で2時間インキュベートした。カバースリップをPBSで洗浄し、DAPI(Vector Laboratories)を含む退色防止封入剤により封入した。

40

【0220】

患者および試料

本試験は、国立台湾大学病院(NTUH-REC番号:2015121334RINC)の研究倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言の原則に従って実施された。黄斑丘疹性発疹(MPE)、好酸球増加と全身症状を伴う薬物反応(DRESS)、およびス

50

ティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) を含む、ラモトリギンに対する重篤な有害皮膚反応 (cADR) の症例は、皮膚科専門医によって評価および診断された。ラモトリギン耐性の症例は、2カ月超のラモトリギンの使用歴のある神経科クリニックから募集したが、関連する皮膚有害反応は報告されなかった。末梢血単核球 (PBMC) は、前述のように末梢血から分離した (25)。血液試料を同量の Ficoll - Paque PLUS 溶液 (GE Healthcare) と混合し、600g で40分間さらに遠心分離した。-80 でPBMCを保存した。

【0221】

逆転写およびMRGPRX4配列決定

Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて、ヒトPBMC由来の全RNAを抽出した。RevertAid RT Reverse Transcription キット (ThermoFisher Scientific, K1691) を使用してRNAの逆転写を行った。MRGPRX4 順方向プライマー 5' - CAGAGATGATACAGCTGGTG - 3' (配列番号1) およびMRGPRX4 逆方向プライマー 5' - GACTGGGATGAAATCTGACG - 3' (配列番号2) を使用してPCRを行った。PCR条件: 94°Cで3分、および94°Cで30秒の30サイクル、52°Cで30秒、ならびに72°Cで30秒。順方向プライマーおよび逆方向プライマーの両方を用いて配列決定を行った。

【0222】

実施例2: 薬物有害反応 (ADR) に関するGタンパク質共役受容体としてのMRGPRX4の同定

本明細書に記載されるように、薬物誘発アナフィラキシー様反応 (図1A) に不可欠な肥満細胞特異的受容体 Mr g p r b 2 / MRGPRX2 (MAS 関連Gタンパク質共役受容体 (Mr g p r) サブファミリーのメンバー) が先に同定された (参照により本明細書に組み込まれる (10))。Mr g p r がティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS) などの他の種類のADRに関与しているかどうかを決定するために、HEK293細胞に個々に発現したMr g p r に対して、SJSを引き起こす薬物であるラモトリギンをスクリーニングした。Ca²⁺ イメージングアッセイを使用して、マウス Mr g p r a 1 およびヒトMRGPRX4のみが、ラモトリギン (LTG) およびオクスカルバゼピンなどのいくつかのSJS関連薬物によって特異的に活性化されることを決定した。ヒトMRGPRX4に対するLTGのEC₅₀は約200 μMであり、これは臨床で使用される用量範囲内である (11、12)。マウス Mr g p r A 1 に対するLTGのEC₅₀は約30 μMである。

【0223】

リガンドと受容体との物理的相互作用を評価するために、MRGPRX4を発現するHEK293細胞膜をカラムに固定し、カラムを介したLTGの溶出をモニターする細胞膜クロマトグラフィー (CMC) 実験を行った。このアフィニティークロマトグラフィー技術を使用して、LTGは、MRGPRX2 / CMCカラムでは保持することができないのに対して (図1B)、417 ± 24 nM (FIG 1B ~ D) の結合K_dでMRGPRX4 / CMCカラムに保持することができることが決定された。次いで、ほとんどのGPCRはリガンド 受容体相互作用に続いて細胞表面から細胞内区画に内在化されるため (13)、この薬物がMr g p r a 1 およびMRGPRX4の内在化を誘導することができるかどうかを決定した。この問題を評価するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と Mr g p r a 1 またはMRGPRX4受容体のいずれかの融合タンパク質を過剰発現するHEK293細胞を使用し、LTGとTexas Red 蛍光色素とをコンジュゲートさせた。LTGによって細胞を刺激すると、Mr g p r a 1 - GFP およびMRGPRX4 - GFP 受容体の内在化を誘導することができるが、受容体はアゴニストを伴わずほとんど細胞膜上に残った (図1E)。Texas Red 標識LTGを使用すると、GFP 標識受容体とともに細胞への薬物の取り込みが観察された (図1E)。LTGは、Mr g p r c 1 1 - GFP の内在化を誘導せず、この受容体が発現する細胞に吸収されなかった (データ

は示していない)。まとめると、これらは、LTGがMr g p r a 1およびMRGPRX4に特異的に結合し、活性化し得ることを強く示唆した。

【0224】

実施例3：MRGPRX4を介した薬物有害反応のマウスモデルの作製

SJSを引き起こす薬物であるラモトリギンにMr g p r a 1が結合することができることを知り、そのインビボでの役割を検討した。SJS/TENのマウスモデルを開発するために、野生型(WT)129S1/Sv1mJマウスに50mg/kg⁻¹体重の用量でLTGを連日強制経口投与した。このLTGの用量は臨床で推奨されている量よりも高かったが、ヒトが発症したSJSではLTGの過剰投与範囲内であった(14)。薬物治療の7~10日後、ほぼすべてのマウスでは体重が減少し、眼の粘膜分泌物および足の水疱出血を含むSJS/TEN様症状が示され、14日目までの死亡率は60%であった(図2B、図6A、図6B)。この表現型の発現は、抗原曝露後数日から数週間を要するヒト患者の薬物誘発性過敏症に似ている(15)。高用量のオクスカルバゼピンおよびアロプリノールを含む他のSJS原因薬物も、この系統のマウスに対して、比較的低い発生率で、足の異常を伴わず、眼症状を誘発することができる(図5)。特に、高用量LTGの連日の経口投与は129S1およびBALB/c系統(図8)に対してのみSJS様の特徴を誘発することができることが分かったが、C57BL/6マウスは耐性であるようである。これは、この薬物に反応したマウス系統のかなりの変動を示唆する。このため、129S1/Sv1mJバックグラウンド上でMr g p r a 1のオープンリーディングフレームがGFPに置換されたMr g p r a 1ノックアウトマウス(Mr g p r a 1^{GFP}/GFP、KOマウス)を作製した(図2A)。同じLTG処置に曝露すると、Mr g p r a 1ヘテロ接合マウス(Mr g p r a 1^{GFP/+}、HETマウス)はWTマウスと同様の表現型を発現したが、Mr g p r a 1 KOマウスには死亡も体重減少も見られず、SJS様症状を発現しなかった(図2C、Dおよび図6A、図6B)。結膜および後足切片の組織学的染色により、LTG処置KOマウスまたは生理食塩水処置対照動物ではなく、LTG処置WTおよびHETマウスの組織のみの明らかな表皮壊死および炎症細胞浸潤が明らかにされた(図2C、図2D)。

【0225】

実施例4：SJSマウスモデルに対する病態生理の検討

SJS/TEN患者の組織病理学的検査では、表皮に広範囲なケラチノサイトアポトーシスが示される(16、17)。この病態生理は、いくつかのサイトカイン(TNF-、IFN-、IL-6など)の上昇とともに、細胞傷害性CD8+T細胞から放出される細胞傷害性分子(例えば、グランザイムB、グラニュリシン、Fasリガンド)によって媒介されることが提案されている(17~21)。次いで、本明細書に記載のマウスモデルに対して、これらの特性を検討した。ヒトSJS患者と一致して、LTGを強制経口投与したMr g p r a 1 WTおよびHETマウスの皮膚では、上皮アポトーシス細胞およびCD8+T細胞の数が有意に増加するとともに、グランザイムBおよびTNF-の上昇が認められた(図2C、図2D、図2E、図2F、図6D、図6Eおよび図6F)。ただし、Mr g p r a 1 KOマウスは、薬物曝露後に細胞毒性の徴候を示さない。CD8+T細胞とそのメディエーターとが、本明細書に記載のマウスモデルのSJS様表現型の発現に必要であるかどうかを確認するために、Rag1-/-マウス(機能性TおよびBリンパ球を含有しない)およびCD8枯渇動物(抗体枯渇を介して枯渇させている)を利用した。LTGに曝露した後、CD8+T細胞の数がゼロであるか少ないこれらのマウスでは、表現型は発現しなかった(図7、図8)。これらのデータはいずれも、1)本明細書に記載の動物モデルでは、CD8+T細胞がSJSの発症に必要であり、2)Mr g p r a 1がこの免疫応答を開始するために不可欠であり得ることを示唆している。

【0226】

実施例5：MRGPRA1の樹状細胞発現

SJSの発症に果たすMr g p r a 1の役割を示唆するデータを用いて、この受容体の発現部位を決定した。逆転写PCR(RT-PCR)では、Mr g p r a 1がリンパ節お

10

20

30

40

50

よび脾臓に主に発現したことが示された(図3A)。次いで、Mrgpra1遺伝子をGFP(Mrgpra1^{GFP/GFP})に置換することによって作製されたMrgpra1 KOマウスをレポーターマウスとして使用して、Mrgpra1発現細胞を同定した。Mrgpra1^{GFP/GFP}マウスから得られた脾細胞およびリンパ節細胞のフローサイトメトリー分析では、小さな顕著なGFP⁺集団の存在が明らかにされた(図3Bおよび図9A)。その後の特性評価では、GFP⁺細胞が、従来の樹状細胞マーカー(インテグリンCD11cおよびクラスII主要組織適合抗原(MHC-II)の両方の高発現)を伴うが、他の細胞タイプのマーカーは伴わない造血細胞(CD45⁺)の特徴を示したことが示された(図3Bおよび図9B)。これらのマウスから得られた脾臓組織切片の免疫染色では、不規則な形状および樹状突起様のGFP⁺細胞がCD11c⁺とともに同定されたが、CD3⁺(T細胞のマーカー)は同定されなかった(図9C)。Mrgpra1が樹状細胞で発現および機能することをさらに検証するために、CD11cおよびMHC-II:CD11c⁺MHC-II^{high}(主に樹状細胞)、CD11c⁺MHC-II^{int}(主にマクロファージ)、CD11c⁻MHC-II⁺(主にB細胞)およびCD11c⁻MHC-II⁻(主にT細胞)の発現に基づいて、Mrgpra1^{+/+}およびMrgpra1^{GFP/GFP}マウスから得られた脾細胞を4つの集団に分類した(図10に示すゲーティング戦略)。RT-PCR分析により、WT動物のCD11c⁺MHC-II^{high}集団でのみMrgpra1の発現が決定された(図3C)。Mrgpra1^{GFP/GFP}ノックアウトマウスから得られたCD11c⁺MHC-II^{high}細胞にはMrgpra1は存在しない。機能的には、WT CD11c⁺MHC-II^{high}細胞のサブセット(約5%)のみがCa²⁺イメージングアッセイを使用してLTGに応答し、このLTG誘導活性化はKO細胞で有意に減少した(図3D、図3E)。これらデータはいずれも、Mrgpra1が樹状細胞のサブセットで特異的に発現し、他の免疫細胞では発現しないことを示唆している。続いて、これらのMrgpra1発現樹状細胞がインビボでの薬物誘発SJS/TEN症状の発現に必要であるかどうかを検討するために、Mrgpra1^{+/+}マウスから得られた樹状細胞を単離し、Mrgpra1 KO動物に養子移入した。薬物曝露の7~10日後、WT樹状細胞を受け取ったMrgpra1 KO動物では体重が減少し、その64%がSJS様の眼症状を発現したが、KO樹状細胞を受け取った対照動物では体重減少も表現型も観察されなかった(図3Fおよび図11)。ただし、WT樹状細胞を注射した動物に見られたこれらの表現型は3~4日しか続かず、12日目以降は消失した。これは、樹状細胞の活性化およびリンパ球との相互作用後の樹状細胞の寿命が短いためと考えられる(22)。これらの観察結果は、樹状細胞でのMrgpra1の同定と、SJS/TENの病因の誘発および維持に果たすその役割とを強く裏付けている。

【0227】

実施例6: SJSに果たすヒトMRGPRX4の役割

本明細書に記載のCa²⁺イメージングデータによれば、ヒトMRGPRX4は、マウスMrgpra1と同様のSJS原因薬物に応答した(図3C)。このため、MRGPRX4がヒトのSJS/TENの発症に関与している可能性を検討した。最初に、ヒトCD11c⁺樹状細胞では、RT-PCRによるMRGPRX4転写物および免疫染色によるMRGPRX4タンパク質がともに検出された(図4Aおよび図12)。次に、LTGはMRGPRX4依存的にヒト樹状細胞を活性化することができる。Ca²⁺イメージング試験では、マウス樹状細胞と同様に、約5%のヒト樹状細胞がLTGによって活性化された(図4B、図4C)。短干渉RNA(sRNA)を用いたMRGPRX4ノックダウン樹状細胞では、LTGに応答した活性化細胞数が有意に少ないことが示された(図4C)。また、MRGPRX4発現樹状細胞のみが、それらの細胞質区画にTexas Red標識LTGを内在化することができた(図4D)。cADRの発生率に関連するMRGPRX4遺伝子の変異を同定した。LTGに対するcADRを有する患者6例と耐性症例28例とを試験に登録した。cADRには、SJS、DRESSおよびMPEが含まれる。大部分のLTG耐性症例は、MRGPRX4の495番目のヌクレオチド(受託番号__

10

20

30

40

50

054032.3、rs2468774、495位)でヘテロ接合G/T対立遺伝子を示した。タンパク質レベルでp.Asn25Lysのミスセンス変異体につながる同じ遺伝子座でホモ接合G/G対立遺伝子の有意に高い有病率があった。28例の耐性患者のうち2例(7.1%)がホモ接合G/G対立遺伝子を有し、6例のcADR患者のうち3例がホモ接合対立遺伝子を有した(50%)(図4E)。まとめると、これらの結果は、MRGPRX4がMrgrp1のヒトホモログであり、ヒトのSJSを媒介することを示唆している。

【0228】

特定の薬物がどのようにして薬物特異的T細胞による細胞毒性を引き起こすことができるのか、長い間謎とされてきた。本明細書に記載される発見は、これらの薬物が、T細胞活性化のための抗原の捕捉、処理および提示に特化した最も効率的な抗原提示細胞である樹状細胞上のMRGPRX4/Mrgrp1受容体と相互作用することができることを示す最初の例である(23)。ただし、T細胞への抗原提示をもたらすために樹状細胞内で内在化された薬物が結果的にどのように処理されるかに関する機構は、さらに検討を必要とする。MRGPRX4受容体と反応する可能性のある薬物のスクリーニング、受容体アンタゴニストのスクリーニング、および薬物摂取前の患者のMRGPRX4変異のスクリーニングは、cADRのリスクを軽減するのに有益であり得る。

【0229】

実施例1~6の参考文献を以下に列挙する

1 Zalewska-Janowska, A., Spiewak, R. & Kowalski, M. L. Cutaneous Manifestation of Drug Allergy and Hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am* 37, 165-181, doi:10.1016/j.jiac.2016.08.006 (2017).

2 Sultana, J., Cutroneo, P. & Trifiro, G. Clinical and economic burden of adverse drug reactions. *J Pharmacol Pharmacother* 4, S73-77, doi:10.4103/0976-500X.120957 (2013).

3 Downey, A., Jackson, C., Harun, N. & Cooper, A. Toxic epidermal necrolysis: review of pathogenesis and management. *J Am Acad Dermatol* 66, 995-1003, doi:10.1016/j.jaad.2011.09.029 (2012).

4 Lee, H. Y. & Chung, W. H. Toxic epidermal necrolysis: the year in review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13, 330-336, doi:10.1097/ACI.0b013e3283630cc2 (2013).

5 Stevens, A. M. & Johnson, F. C. A new eruptive fever associated with stomatitis and ophthalmia: Report of two cases in children. *Am J Dis Child* 24, 526-533 (1922).

6 Heng, Y. K., Lee, H. Y. & Roujeau, J. C. Epidermal necrolysis: 60 years of errors and advances. *Br J Dermatol* 173, 1250-1254, doi:10.1111/bjd.13989 (2015).

7 Schotland, P., Bojunga, N., Zien, A., Trame, M. N. & Lesko, L. J. Improving drug safety with a systems pharmacology approach. *Eur J Pharm Sci* 94, 84-92, doi:10.1016/j.ejps.2016.06.009 (2016).

10

20

30

40

50

- 8 Adam, J., Pichler, W. J. & Yerly, D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 71, 701-707, doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03764.x (2011).
- 9 Chung, W. H., Wang, C. W. & Dao, R. L. Severe cutaneous adverse drug reactions. *J Dermatol* 43, 758-766, doi:10.1111/1346-8138.13430 (2016).
- 10 McNeil, B. D. et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 519, 237-241, doi:10.1038/nature14022 (2015).
- 11 Biton, V. Pharmacokinetics, toxicology and safety of lamotrigine in epilepsy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 1009-1018, doi:10.1517/17425255.2.6.1009 (2006).
- 12 Khanna, D. et al. 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64, 1431-1446, doi:10.1002/acr.21772 (2012).
- 20
- 13 Pavlos, N. J. & Friedman, P. A. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends Endocrinol Metab* 28, 213-226, doi:10.1016/j.tem.2016.10.007 (2017).
- 14 Alabi, A., Todd, A., Husband, A. & Reilly, J. Safety profile of lamotrigine in overdose. *Ther Adv Psychopharmacol* 6, 369-381, doi:10.1177/2045125316656707 (2016).
- 30
- 15 Pichler, W. J. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Annals of internal medicine* 139, 683-693 (2003).
- 16 Paul, C. et al. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 134, 710-714 (1996).
- 40
- 17 Chung, W. H. & Hung, S. I. Recent advances in the genetics and immunology of Steven's-Johnson syndrome and toxic epidermal necrosis. *J Dermatol Sci* 66, 190-196, doi:10.1016/j.jdermsci.2012.04.002 (2012).
- 18 Posadas, S. J. et al. Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109, 155-161 (2002).
- 50
- 19 Nassif, A. et al. Evaluation of the pot

ential role of cytokines in toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol* 123, 850 - 855, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23439.x (2004).

20 Caproni, M. et al. Expression of cytokines and chemokine receptors in the cutaneous lesions of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 155, 722 - 728, doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07398.x (2006). 10

21 Viard-Leveugle, I. et al. TNF-alpha and IFN-gamma are potential inducers of Fas-mediated keratinocyte apoptosis through activation of inducible nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis. *J Invest Dermatol* 133, 489 - 498, doi:10.1038/jid.2012.330 (2013).

22 Chen, M., Huang, L., Shabier, Z. & Wang, J. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol Immunol* 44, 2558 - 2565, doi:10.1016/j.molimm.2006.12.020 (2007). 20

23 Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 20, 621 - 667, doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828 (2002).

24 Han, S. K. et al. Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galpha q/11 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14740 - 14745, doi:10.1073/pnas.192565799 (2002). 30

25 Chen, Y. C. et al. Human herpes virus reactivations and dynamic cytokine profiles in patients with cutaneous adverse drug reactions - a prospective comparative study. *Allergy* 70, 568 - 575, doi:10.1111/all.12602 (2015). 40

【0230】

実施例 7：胆汁うっ滞性掻痒症のモデルでは Mrgpr クラスター KO マウスの掻破が少ない

マウス Mrgpr 遺伝子座は、27 個のインタクトな Mrgpr オープンリーディングフレームを含有する。マウスに発現した多くの Mrgpr は、同様の配列を有する (10 ; 20)。Mrgpr メンバー間で起こり得る補償を回避するために、一群の Mrgpr を遺伝的に欠失させる (クラスター KO) クラスター欠失戦略を追求した。クラスター KO マウスは、12 個のインタクトな Mrgpr ORF を含有する 845 kb の DNA を欠失している (22)。

【0231】

- ナフチルイソチオシアネート (ANIT) を投与すると、胆汁うっ滞性損傷および搔痒症が生じる。ANITは、未知の機構を介して胆管上皮細胞を選択的に損傷することにより、肝内胆汁うっ滞を引き起こす(8)。ANIT処置は、WTおよびクラスターK O動物の両方に対して自発性のかゆみの増加をもたらした(図13A)。クラスターK Oマウスでは、WT同腹仔よりも搔破が有意に少なく、発作が約46%減少したことが示された(図13A)。WTおよびクラスターK Oの両ビヒクル処置動物は、本質的に自発性のかゆみを示さなかった(図13A)。肝臓重量、直接ビリルビン値、総ビリルビン値および肝臓酵素などの胆汁うっ滞性損傷の指標はいずれも、対照の状態と比較して処置群の状態では有意な上昇を示した(図13B、図13C)。これらの指標の中で、WT処置群の状態とクラスターK O処置群の状態との間に差はなく、胆汁うっ滞性損傷の重症度がWTとクラスターK O動物とで同等であることが示された。これに基づいて、処置の相違はかゆみの相違を説明するものとはならない。さらに、胆汁酸、メトエンケファリンおよびオートタキシン(胆汁うっ滞性搔痒症に何らかの役割を果たすと仮定される3つの物質)のうち、ANIT処置動物では胆汁酸のみが上昇し、メトエンケファリンまたはオートタキシンの有意な上昇は認められなかった(図13D~図13F)。胆汁酸の値は、WT処置群の状態とクラスターK O処置群の状態との間で差がなかった(図13D)。

10

【0232】

実施例8: ビリルビンはMrgprA1に依存するかゆみを引き起こす

ANIT処置は多くの病理学的変化をもたらす。通常、血清中に微量に存在する胆汁成分がアップレギュレートされる。さらに、ANITは肝細胞損傷を引き起こし、これにより、生物学的恒常性にさらに混乱をもたらされる。これらの変化により、クラスターK O動物に見られる胆汁うっ滞性のかゆみの減少を説明することができる多くの仮説が存在する。これに対処するために、WTおよびクラスターK O同腹仔の両方に、胆汁うっ滞性搔痒症に關与すると仮定された多数の胆汁成分を注射した。注射後、急性のかゆみを評価した。これらの注射から、以前に発表されていない現象である起痒物質としてビリルビンを同定した。WTマウスは、ビリルビンの注射に反応して、頬または背中 of のいずれかを搔破する(図14A、図14D)。この搔破反応は用量依存的であり、比較的低用量であれば動物は搔破しない(図14A)。注目すべきことに、ビリルビンの注射は、クラスターK O動物のかゆみを誘発することができなかった(図14A)。ビリルビンはヒスタミン放出アッセイおよびカルシウムイメージングの両方で肥満細胞を活性化することができなかったため、ビリルビン媒介搔痒症は本質的にヒスタミン作動性であるとは考えられなかった(図15A、図15B)。さらに、H1受容体遮断薬は行動を阻害しなかった(図15C)。胆汁うっ滞性搔痒症の3つの提案されたメディエーターの代表的なメンバーである他の起痒物質、DAMGO、モルヒネ、LPAおよびDCAの注射はいずれも、WTおよびクラスターK O動物の両方に対して同等のかゆみ反応を誘発した(図14B、図14C、図14E、図14F)。これに基づいて、クラスターK O動物の胆汁うっ滞性搔痒症の減少の機序は、クラスター内のMrgprに対するビリルビンの活性低下に起因するものであった。

20

30

【0233】

この行動データを裏付けて、解離DRGニューロンに対するビリルビンの浴適用はカルシウムの一過性の増加を誘発した(FIG16A)。ビリルビン誘発カルシウムフラックスは、細胞外カルシウムの存在に依存していた(図16B)。50 μ Mビリルビンは、総DRGの4~6パーセントを活性化した(図16C)。重要なことに、ビヒクル対照と比較して、クラスターK O DRGは、ビリルビンに反応して活性化されるニューロンの数の増加を示さなかった(図15C)。活性化されたニューロンの平均直径は20.6 μ mであった[19.2、21.7](図16D)。大きさに基づいて、小径の侵害受容ニューロンとしてこれらのニューロンを分類した(図16D)(19;25)。

40

【0234】

クラスターK O動物では、12個のインタクトなMrgpr ORFが欠失している。

50

ビリルビン関連搔痒症の媒介に関与しているものを決定するために、ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 細胞に、クラスター内の各 Mr g p r を連続的にトランスフェクトした。カルシウムイメージングを使用して、ビリルビンの存在下でカルシウムをフラックスした細胞集団を同定するために、これらのトランスフェクトされた細胞に対してビリルビンを試験した。非トランスフェクト HEK 細胞はビリルビンに応答せず、クラスター内のあらゆる Mr g p r のうち、Mr g p r A 1 を発現する細胞のみがビリルビンに応答して陽性シグナルを示し、EC 50 は約 49 μ M であった (図 17 A、図 18 A)。U 73122 はカルシウム流入を遮断し、一過性のカルシウムの増加は G q 媒介性であることが示唆された (図 17 B、図 17 C)。Mr g p r A 1 単一遺伝子 KO 動物はビリルビン注射時に搔破しなかったため、行動からカルシウムイメージング分析を確認した (図 14 A)。受容体のマウス Mr g p r A ファミリーのメンバーは、ヒト Mr g p r X ファミリーのメンバーと最も密接に関連している。いずれかのヒト受容体がビリルビンに応答したかどうかを決定するために、4 つのヒト Mr g p r X 1 ~ X 4 のそれぞれを安定に発現する HEK 細胞株をスクリーニングした。これらの 4 つのうち、Mr g p r X 4 のみがビリルビンに対する陽性反応を示し、EC 50 は 2 μ M であった (図 17 D、図 18 B)。ここでも、カルシウムシグナルは G q 媒介性であった (図 17 E、図 17 F)。

10

【0235】

実施例 9：追加のヘム代謝産物は Mr g p r A 1 および X 4 を活性化する

ヘム代謝産物は構造的に非常に似ている。これに基づいて、追加のヘム代謝産物が Mr g p r A 1 および X 4 に対して活性を有することが予測され得る。実際、カルシウムイメージングにより評価されるように、複数のヘム代謝産物はこれらの受容体を活性化し、関連受容体 A 3 および X 1 は活性化しなかった (表 1、図 22)。ヘム代謝産物は構造的に関連している。複数のヘム代謝産物は、マウス受容体である Mr g p r A 1 とヒト受容体である Mr g p r X 4 とを活性化した。物質の用量を上にも列挙し、活性化のおおよその割合を表に示す。いくつかの同定された Mr g p r A 1 アゴニストを WT マウスに注射することによって、このカルシウムイメージングを検証した。ヘマチンおよびステルコピリンなど、Mr g p r A 1 に対する活性を有する他のヘム代謝産物はいずれも、クラスター KO 動物では見られなかったかゆみを WT 動物では誘発した。さらに、構造的に異なるアゴニストである FMRF による Mr g p r A 1 の活性化が、かゆみを引き起こした。これに基づいて、Mr g p r A 1 の活性化はかゆみを誘発するのに十分であった。カルシウムイメージングによって確立された機能的相同性に基づいて、ヒトでの Mr g p r X 4 の活性化はかゆみを引き起こす。

20

30

【0236】

実施例 7 ~ 9 の参考文献を以下に列挙する

1. Alemi F, Kwon E, Poole DP, Lieu T, Lyo V, et al. 2013. The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *J Clin Invest* 123:1513-30
2. Bergasa NV. 1998. Hypothesis: taste disorders in patients with liver disease may be mediated in the brain: potential mechanisms for a central phenomenon. *Am J Gastroenterol* 93:1209-10.
3. Bergasa NV. 2008. Pruritus in primary biliary cirrhosis: pathogenesis and therapy. *Clin Liver Dis* 12:385-406; x.
4. Bergasa NV. 2014. Pruritus of Cholestasis. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, ed. E Carstens, T Akiyama. Boca Raton (FL). Number of .

40

50

5. Bergasa NV, Schmitt JM, Talbot TL, Alling DW, Swain MG, et al. 1998. Open-label trial of oral nalmefene therapy for the pruritus of cholestasis. *Hepatology* 27:679-84.
6. Bergasa NV, Talbot TL, Alling DW, Schmitt JM, Walker EC, et al. 1992. A controlled trial of naloxone infusions for the pruritus of chronic cholestasis. *Gastroenterology* 102:544-9.
7. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. 2013. Bilirubin and beyond: a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. *Prog Lipid Res* 52:193-205. 10
8. Chisholm JW, Dolphin PJ. 1996. Abnormal lipoproteins in the ANIT-treated rat: a transient and reversible animal model of intrahepatic cholestasis. *J Lipid Res* 37:1086-98.
9. Datta DV, Sherlock S. 1966. Cholestyramine for long term relief of the pruritus complicating intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 50:323-32. 20
10. Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. 2001. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106:619-32.
11. European Association for the Study of the Liver. 2009. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51:237-67. 30
12. Flegel C, Schobel N, Altmüller J, Becker C, Tannapfel A, et al. 2015. RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS One* 10:e0128951.
13. Goswami SC, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Mishra S, Hoon MA, et al. 2014. Itch-associated peptides: RNA-Seq and bioinformatic analysis of natriuretic precursor peptide B and gastrin releasing peptide in dorsal root and trigeminal ganglia, and the spinal cord. *Mol Pain* 10:44. 40
14. Halvorsen JA, Dalgard F, Thoresen M, Bjertness E, Lien L. 2012. Itch and pain in adolescents are associated with suicidal ideation: a population-based cross-sectional study. *Acta Derm Venereol* 92:543-6.
15. Ikoma A, Steinhoff M, Stander S, Yosipovitch G, Schmelz M. 2006. The neurobiology 50

- of itch. *Nat Rev Neurosci* 7:535-47.
16. Kremer AE, Martens JJ, Kulik W, Rueff F, Kuiper EM, et al. 2010. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology* 139:1008-18, 18e1.
17. Kremer AE, van Dijk R, Leckie P, Schaap FG, Kuiper EM, et al. 2012. Serum autotaxin is increased in pruritus of cholestasis, but not of other origin, and responds to therapeutic interventions. *Hepatology* 56:1391-400. 10
18. Kuiper EM, van Erpecum KJ, Beuers U, Hanssen BE, Thio HB, et al. 2010. The potent bile acid sequestrant colesevelam is not effective in cholestatic pruritus: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 52:1334-40.
19. LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M. 2014. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci* 15:19-31. 20
20. Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy MO, et al. 2002. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci* 5:201-9.
21. Liu Q, Sikand P, Ma C, Tang Z, Han L, et al. 2012. Mechanisms of itch evoked by beta-alanine. *J Neurosci* 32:14532-7.
22. Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, et al. 2009. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 139:1353-65. 30
23. McNeil B, Dong X. 2012. Peripheral mechanisms of itch. *Neurosci Bull* 28:100-10.
24. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Undem BJ, et al. 2015. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 519:237-41. 40
25. Ross SE. 2011. Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 21:880-7.
26. Swain MG, Rothman RB, Xu H, Vergalla J, Bergasa NV, Jones EA. 1992. Endogenous opioids accumulate in plasma in a rat model of acute cholestasis. *Gastroenterology* 103:630-5. 50

27. Thornton JR, Losowsky MS. 1988. Opioid peptides and primary biliary cirrhosis. *BMJ* 297:1501-4.

28. Thornton JR, Losowsky MS. 1989. Methionine enkephalin is increased in plasma in acute liver disease and is present in bile and urine. *J Hepatol* 8:53-9.

29. Thornton JR, Losowsky MS. 1989. Plasma leucine enkephalin is increased in liver disease. *Gut* 30:1392-5.

30. Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, et al. 2002. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 160:449-56.

【0237】

実施例10: MRGPRX3はヒトケラチノサイトに発現し、hBD3に対するそれらの応答に必要である

図20Aに示すように、MRGPRX3を発現するHEK細胞は、合成ヒト-デフェンシン3(hBD3)に対して強いCa²⁺応答を生じた。RT-PCRを使用して、初代ヒトケラチノサイトでのMRGPRX3の発現を分析し、遺伝子が中間レベルで発現していることを確認した。MRGPRX3に対するsiRNAは、別のファミリーメンバーMRGPRX4に影響を及ぼすことなく、この受容体の発現を効果的に減少させた(図20B)。MRGPRX3をノックダウンすると、hBD3に応答するケラチノサイトの割合が80%超から20%未満に顕著に減少し、MRGPRX3が、細胞がリガンドを感知し応答するために必要であることが示された。

【0238】

実施例11: マウスMrgrpA6は、ヒトMRGPRX3の推定ホモログである

MrgrpA6はケラチノサイトに発現する。

ヒトMRGPRX3のマウスホモログの同定を行った。Mrgrp遺伝子クラスターは進化の過程で大きく拡大し、ヒトでは4つのMRGPRXに対して20を超える受容体がコードされていた(図21C)。第1の工程は、マウス上皮からケラチノサイトを単離し、Mrgrp遺伝子のいずれが強く発現しているかを決定することであった。RT-PCRでは、MrgrpA6、A12およびB3の3つの遺伝子のみがマウスケラチノサイトに強く発現していることが明らかにされた。MrgrpA1、A4およびB6は弱い発現を示した(図21A)。

【0239】

MrgrpA6は、hBD3の唯一のマウスマウスホモログであるmBD14に応答する。

MrgrpX3はオーファン受容体であり、hBD3はその最初に同定されたアゴニストである。hBD3のよく保存されたマウスホモログであるマウス-デフェンシン-14(mBD14)を使用して、hMrgrpX3のマウスホモログをさらに探索した。マウスケラチノサイトに発現を示した受容体の中で(図21A)、MrgrpA6はmBD14によって強く活性化された唯一の受容体であったが、MrgrpA1、A4、A12、B3およびB6は反応を示さなかった(図21B)。

【0240】

MrgrpA6 KOマウスおよびMrgrpA6-cre BACマウスを作製した。これらのマウス系統は、インビボでの創傷閉鎖アッセイおよび他の皮膚疾患モデルにとって独自かつ重要である。野生型および変異動物から単離されたケラチノサイトは、mBD14に対するそれらの応答のための、およびMrgrpA6受容体の下流の細胞内シグ

ナル伝達経路をさらに検討するための重要な細胞ベースのアッセイである。同様に、Mr g p r X 3 ノックダウンまたは変異発現を伴うヒトケラチノサイトは、皮膚疾患モデルで Mr g p r X 3 を試験するヒト細胞ベースのアッセイに不可欠である。Mr g p r X 3 機能に關与する他の潜在的な皮膚疾患には、乾癬、皮膚炎、慢性皮膚潰瘍および癌腫が挙げられる。さらに、h B D 3 および他のデフェンシンはまた気道および腸に防御を提供するため、Mr g p r X 3 の疾患適応は皮膚系から粘膜系に拡大することができる。したがって、Mr g p r X 3 および Mr g p r A 6 を標的とすると、創傷治癒、慢性炎症、悪性形質転換、乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患、気道および消化管障害、疼痛ならびにかゆみを治療する可能性がある。

【0241】

実施例10～11の参考文献を以下に列挙する

1. Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14, 289 - 301 (2014).
2. Singer, A. J. & Clark, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738 - 746 (1999).
3. Owen, J. A., Punt, J., Kubly, J. & Stranford, S. A. Kubly Immunology. (W. H. Freeman, 2013).
4. Pazgier, M., Hoover, D. M., Yang, D., Lu, W. & Lubkowski, J. Human α -defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1294 - 1313 (2006).
5. Amid, C. et al. Manual annotation and analysis of the defensin gene cluster in the C57BL/6J mouse reference genome. *BMC Genomics* 10, 1 - 13 (2009).
6. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710 - 720 (2003).
7. Rohrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. & Hehlhans, T. Human α -Defensin 2 and 3 and Their Mouse Orthologs Induce Chemotaxis through Interaction with CCR2. *J. Immunol.* 184, 6688 - 6694 (2010).
8. Befus, A. D. et al. Neutrophil Defensins Induce Histamine Secretion from Mast Cells: Mechanisms of Action. *J. Immunol.* 163, 947 - 953 (1999).
9. Subramanian, H. et al. α -Defensins Activate Human Mast Cells via Mas-Related Gene X2. *J. Immunol.* 191, 345 - 352 (2013).
10. Hirsch, T. et al. Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *J. Gene Med.* 11, 220 - 228 (2009).
11. Sorensen, O. E. et al. Wound Healing and Expression of Antimicrobial Peptides/Polypeptides in Human Keratinocytes, a Consequence of Common Growth Factors. *J. Immunol.* 170, 5583 - 5589 (2003).

10

20

30

40

50

12. Aarbiou, J. et al. Neutrophil Defensins Enhance Lung Epithelial Wound Closure and Mucin Gene Expression In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 193 - 201 (2004).

13. Otte, J. - M. et al. Human beta defensin 2 promotes intestinal wound healing in vitro. *J. Cell. Biochem.* 104, 2286 - 2297 (2008).

14. Niyonsaba, F. et al. Antimicrobial Peptides Human Beta-Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *J. Invest. Dermatol.* 127, 594 - 604 (2016).

15. Liu, Q. et al. Sensory neuron-specific GPCRs Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 139, 1353 - 1365 (2009).

16. Han, L. et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci* 16, 174 - 182 (2013).

17. McNeil, B. D. et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature* 519, 237 - 241 (2015).

18. Hruz, T. et al. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008, 420747 (2008).

19. Kiatsurayanon, C. et al. Angiogenic peptide (AG) - 30/5C activates human keratinocytes to produce cytokines/chemokines and to migrate and proliferate via MrgX receptors. *J. Dermatol. Sci.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.006>

20. Kaisho, Y. et al. Transgenic rats overexpressing the human MrgX3 gene show cataracts and an abnormal skin phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 653 - 657 (2005).

【0242】

実施例12：実施例12～17の材料および方法

以下の材料および方法を使用した。

【0243】

動物の世話および使用

実験はいずれも、ジョンズ・ホプキンス大学医学部の動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。

【0244】

ヒト血漿の分離

ジョンズ・ホプキンス大学医学部の治験審査委員会（試験番号：IRB00154650）によって承認されたプロトコルの下で、高ビリルビン血症、特に胆汁うっ滞に罹患し

10

20

30

40

50

た患者から得られた血漿を分離した。全血をPAXgeneチューブ(PreAnalytiX 761115)に収集し、300gで5分間遠心分離した。次いで、血漿を収集し、アリコートし、実験まで-20℃で保存した。正常な対照ヒト血漿は、Sigma(P9523)から購入した。

【0245】

分子および調製

以下の分子を使用した：ビリルビンIX (Frontier Scientific)。 - ナフチルイソチオシアネート (ANIT, Sigma)、ビリベルジン (Sigma)、クロロキン (Sigma)、化合物48/80 (Sigma)、シクロスポリンA (Sigma)、ヘミン (Sigma)、ヒト血清アルブミン (HSA, Sigma)、BAM8-22 (Sigma)、BOC-GLN-D- (ホルミル)TRP-PHE-ベンジルエステル (QWF, Sigma)、ビリルビンジタウレート (Lee Biosciences)。セチリジン (Tocris Biosciences)、ステルコピリン (Santa Cruz Biotechnology)、ウロビリノーゲン (Santa Cruz Biotechnology)、コレラ毒素 (Santa Cruz Biotechnology)、U73122 (Santa Cruz Biotechnology)、YM-254890 (Wako Chemicals)、百日咳毒素 (Fisher Scientific)、フィブロネクチン (Sigma)、Fluo4-AM (Molecular Probes) および Fura 2-AM (Molecular Probes)。

10

20

【0246】

ビリルビンは酸化と光分解とを非常に受けやすい。したがって、DMSOまたは0.1M NaOH中で各実験の直前にビリルビンを新たに調製し、次いで、暗所で維持した。カルシウムイメージング分析では、使用の数秒前にカルシウムイメージング緩衝液にビリルビンを希釈した。適用可能な全試験溶液中のDMSOの最終濃度は0.5%未満であった。ANITとシクロスポリンAとをオリーブ油に溶解し、必要に応じて新たに調製した。ウロビリノーゲンとステルコピリンとをリン酸緩衝食塩水に溶解し、pH7.4に調整した後、必要になるまで-20℃で100μlのアリコート中で保存した。他の薬物はいずれも、100μl~1,000μlのアリコートとして調製し、-20℃で保存してから4℃で解凍した。凍結/解凍サイクルは可能な限り回避した。

30

【0247】

行動試験

あらゆる適用可能な行動試験を行い、遺伝子型を知らない実験者が分析した。使用したマウスはいずれも、C57BL/6Jバックグラウンドで作製したか、C57BL/6Jマウスに少なくとも10世代戻し交配した8~12週齢の雄(20~30g)であった。かゆみ行動実験はいずれも午前8時から午後12時までの間に行った。実験の前日に、試験チャンバーに動物を30分間入れた後、5分間の休憩を挟んで一連の3回の模擬注射を行った。実験当日、注射の10分前に、動物を最初に試験チャンバーに順応させた。首筋または頬に搔痒性化合物を皮下注射し、搔破行動を30分間観察した。注射部位の領域に向けられたいずれかの後足による連続的な搔破運動として搔破発作を定義した。頬注射モデルでは、片方の前足によって注射部位をなでる動きとして拭き行動を定義した。顔または頬に対する両前足の使用は毛づくろい行動と解釈した。30分間の観察期間にわたって5分間隔で搔破発作の回数を数えることにより、搔破行動を定量した。10分間の観察期間にわたって2分間隔で拭き行動を定量した。H1R遮断では、ビリルビン注射の30分前に、30mg/kgの塩酸セチリジン(pH7.4)を腹腔内投与した。舐め行動は、数秒にわたり定量し、身体の内側の他の部分の舐め行動に先行も後続もしなかった、注射部位の後足指または足蹠の舐め行動として識別した。

40

【0248】

ノックインおよびノックアウトマウスの作製

前述のように、Mr g p r - クラスター - / - マウス、Mr g p r a 1^{GFP} マウス

50

、および $Mrgpr^{dPLAP}$ を作製した^{4, 21, 44}。前述のように、 $Tg(Mrgpra3-Cre)$ マウスを作製した²⁴。ジャクソン研究所から $Lsl-tdTomato$ マウス ($Ai9, 007909$) を購入した。ガイドRNA配列: $TTCC CAGCA GCA CCTGTGCAGGG$ (配列番号3) を使用して、 $C57BL/6$ バックグラウンドに対して $CRISPR-Cas9$ を使用して $Mrgpra1^{-/-}$ マウスを作製した。 $Blvra^{-/-}$ マウスは、 $C57BL/6J$ バックグラウンドで $Ozgene$ (オーストラリア) で作製された。

【0249】

カルシウムイメージングおよび分析

カルシウムイメージング緩衝液 ($CI B$; 10 mM HEPES 、 1.2 mM NaHCO_3 、 130 mM NaCl 、 3 mM KCl 、 2.5 mM CaCl_2 、 0.6 mM MgCl_2 、 20 mM グルコースおよび 20 mM スクロース ($\text{pH } 7.4$ および $290 \sim 300\text{ mOsm}$)) 中で細胞を画像化した。細胞内の変化 $[Ca^{2+}]_i$ をモニターするために、イメージングの直前に $CI B$ 中で 37°C の暗所で 30 分間、細胞に $Fura2-AM$ ($HEK293$ 細胞) または $Fluo4-AM$ (DRG ニューロンおよびマスト細胞) を添加した。 $Fura2-AM$ では、 340 nm および 380 nm の両方の励起から 510 nm での発光をモニターした。 $Fluo4-AM$ では、 488 nm での励起から 520 nm での発光をモニターした。細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ が、ベースラインと比較して 50% 、または 50 mM KCl の添加中にアッセイした $[Ca^{2+}]_i$ 変化と比較して 50% 上昇した場合に、細胞は応答しているものとして識別した (ニューロンのみ)。損傷、剥離、高ベースラインおよび運動活性化細胞は分析から除外した。

【0250】

HEK293 細胞

最初のスクリーニングでは、多種多様な $GPCR$ をホスホリパーゼ $C30$ に非選択的に結合させる独自の G タンパク質であるマウス G タンパク質 サブユニット G_{15} を安定に発現する $HEK293$ 細胞を、ポリ-D-リジンで被覆したカバースリップ上に播種し、目的の $MRGPR$ をコードする構築物を一時的にトランスフェクトした。 $12 \sim 24$ 時間後、細胞に $Fura2-AM$ を添加した。特に明記しない限り、ベースライン期間が確立された後、約 30 秒間、イメージングチャンバーに化合物を灌流した。次いで、 5 秒間隔でさらに 60 秒間応答をモニターした。

【0251】

DRG ニューロン

解離の 24 時間後 (自然遺伝子型) または解離の 48 時間後 (ウイルス形質導入) に、 $Fluo4-AM$ とともに DRG をインキュベートした。特に明記しない限り、細胞を 20 秒間画像化して、化合物を加える前にベースラインを確立した。 30 秒後、 2 分間洗浄してから別の物質を加えた。各イメージング試験の最後に、陽性対照として 50 mM KCl を加えた。割合を計算するのに含めた細胞はいずれも、 KCl を加えると、ベースラインと比較して、 $[Ca^{2+}]_i$ の少なくとも 50% の増加を示した。

【0252】

肥満細胞

肥満細胞を記載のように精製し、 30 mg/mL のフィブロネクチンでコーティングしたガラスカバースリップ上に播種し、 37°C で 2 時間回復させた。次いで、細胞に $Fluo4-AM$ を添加した。

【0253】

EC₅₀ および IC₅₀ の決定

$MRGPR A1$ 、 $MRGPR X4$ および $MRGPR C11$ のいずれかを安定に発現する $HEK293$ 細胞を、 $10,000$ 細胞/ウェルでポリ-D-リジン被覆 96 ウェルプレートに播種した。細胞に $Fura2-AM$ を添加し、 2 回洗浄し、 $CI B$ 中で維持した。ヘム代謝産物を薄明かりで $DMSO$ に新たに溶解し、次いで、 20 mM Tris およ

び 150 mM NaCl から構成される緩衝液 (pH 8.8) に希釈した。各実験の前に pH の潜在的変化を評価した。3 連で、2 ~ 4 回反復して実施した用量反応から EC₅₀ 値を決定した。ピリルビンに対する QWF による潜在的な拮抗作用を決定するために、アゴニストの適用前に、CIB 中で 1 分間、様々な用量の QWF によって細胞を処理した。

【0254】

マウス腹膜肥満細胞の精製およびカルシウムイメージング

CO₂ 吸入により、8 ~ 12 週齢の成体雄マウスを殺処分した。使用前に合計 25 mL の肥満細胞解離培地 (MCDM; 3% ウシ胎児血清および 10 mM HEPES を含む HBSS、pH 7.2) を氷上で冷却し、2 回の連続腹膜洗浄を行った。洗浄液を合わせて、200 g で遠心した。2 mL の MCDM にペレットを再懸濁し、4 mL の等張性 70% Percoll 懸濁液 (2.8 mL の Percoll、320 mL の 10% HBSS、40 mL の 1 M HEPES、830 mL の MCDM) 上に重層し、4 °C で 500 g で 20 分間遠心した。肥満細胞をペレットに回収した。10% ウシ胎児血清 (FBS) および 25 ng/mL の組換えマウス幹細胞因子 (Sigma) を含む DMEM に肥満細胞を再懸濁した。

【0255】

マウス腹膜肥満細胞ヒスタミン放出アッセイ

肥満細胞を記載のように精製し、37 °C で 2 時間回復させた。次いで、300 細胞 / ウェルで、20 mg/mL のフィブロネクチンで被覆した 96 ウェルプレートに細胞を播種した。アッセイ前に、37 °C で 45 分間プレートをインキュベートした。アッセイのために、試験化合物をいずれも CIB で希釈した。化合物添加の 5 分後、上清を吸引し、製造業者の指示に従って HTRF ヒスタミンアッセイキット (Cisbio Assays) を用いてヒスタミン値が測定されるまで -80 °C で凍結した。

【0256】

DRG の解離および培養

冷 DH10 培地 (90% ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) / F-12、10% FBS、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μg/mL)) 中に、あらゆる脊髄部位由来の DRG ニューロンを収集した。ディスパーゼ (5 mg/mL) / コラゲナーゼ I 型 (1 mg/mL) 酵素混合物を用いて、DRG を 37 °C で 45 分間消化した。粉碎後、300 g で細胞を遠心し、DH10 に再懸濁してから、ポリ-D-リジン (0.5 mg/mL) およびラミニン (10 μg/mL、Invitrogen) で被覆したガラスカバースリップに播種した。50 ng/mL の NGF を補充した DH10 を用いて、37 °C で DRG を培養した。

【0257】

DRG ウイルス形質導入

psPAX2 および pMD2.G を使用して、MRGPR の様々な cDNA をコードするレンチウイルスを生成した。100,000 g で 4 時間遠心分離することによりウイルスをペレット化し、DH10 培地で 2 回穏やかに洗浄し、DH10 に懸濁した。DRG の単離および培養の 1 日後、DRG を 24 時間一晩レンチウイルスに感染させた。翌朝、50 ng/mL の NGF を補充した新鮮な DH10 に培地を完全に置き換えた。感染の 24 時間後、カルシウムイメージングのために細胞を処理した。

【0258】

DRG の電気生理

3 ~ 5 週齢のマウス由来の DRG ニューロンを記載のように収集した。1 ~ 3 日間培養した後、NaOH により pH 7.4 に調整した、144 NaCl、2.5 KCl、2 CaCl₂、0.5 MgCl₂、5 HEPES および 10 グルコース (mM 単位) を含有する細胞外溶液とともに DRG ニューロンをチャンバーに移した。チップ抵抗 3 ~ 5 M のハウケイ酸毛細管ガラス電極 (Sutter Instrument) を用いて、約 23 °C でホール・セル・カレント・クランプ・レコーディングを行った。内部溶液には 80 K-アセテート、30 KCl、40 HEPES および 1 CaCl₂ (mM

単位)を含有させ、水酸化カリウム(KOH)によりpH7.4に調整した。パッチクランプのために直径15~25 μ mの小径ニューロンを選択した。Axopatch 700B増幅器とpClamp9.2ソフトウェアパッケージ(Axon Instrument)を備えたDigidata 1322Aデジタイザーを使用してデータを取得した。20秒間灌流することにより1mMのクロロキン(CQ)を加え、新たに生成した50 μ Mのピリルピンをピペットにより加えた。各細胞の記録の最後に、50mM KClを含有する溶液を適用した。KClを加えた後に活動電位を発生させることができるニューロンのみが、正常であり、データ分析に含めるのに適切であると考えられた。

【0259】

マイクロスケール熱泳動結合アッセイ

NanoTemper monolith NT.115機器を使用したマイクロスケール熱泳動によって、様々なリガンドに対するMRGPR A1、MRGPR X4およびMRGPR C11の結合等温式を決定した²⁷。結合緩衝液(20mM Trisおよび150mM NaCl(pH8.8))中で、室温で5分間、10 μ Mの目的のGFPタグ付き受容体とともにリガンドをブレインキュベートした。受容体を安定に発現する細胞から、膜画分として受容体を粗精製した⁴⁵。薄明かりで0.1M NaOHにヘム代謝産物を新たに溶解し、次いで、アッセイ緩衝液に希釈した。凍結乾燥したBAM8-22を結合緩衝液に溶解した。受容体とのインキュベーションの前に、各リガンドのpHを評価した。NanoTemper製のNT.115 Hydrophobic-Treated Capillariesに試料を添加した。20%LED電力および15%MST電力を使用して、マイクロスケール熱泳動実験を行った。3つの独立した実験から得られたデータを用いて、質量作用の法則を使用して K_D を計算した。ピリルピリンと受容体との間の結合は純粹に熱泳動的に評価したのに対して、BAM8-22とMRGPR C11との間の結合はT-Jumpによって評価した。初期蛍光に著しい偏差のある試料は除外した。

【0260】

[³⁵S]GTP S結合

前述のように、GTPの放射性標識された非加水分解性形態である[³⁵S]グアノシン-5'-(-チオ)トリホスフェート([³⁵S]GTP S)の結合を測定することによって、MRGPRの活性化を決定した⁴⁵。要約すると、10 μ MのGDPを補充した175 μ Lのアッセイ緩衝液(50mM HEPES、5mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM EDTA、0.1%Triton 80)に10 μ gの粗膜画分を希釈し、室温で5分間インキュベートした。次いで、50 μ Mピリルピンを補充した最終容量199 μ Lのアッセイ緩衝液中でさらに1分間膜をインキュベートした。次いで、10nM[³⁵S]GTP Sを加えて試料を200 μ Lにした。穏やかに攪拌しながら、試料を4で2時間インキュベートした。GF/Bフィルター上への急速濾過により実験を終了し、洗浄緩衝液(50mM Tris-HCl、5mM MgCl₂および50mM NaCl(pH7.4))で3回洗浄した。次いで、フィルターをシンチレーションカクテルに浸漬し、計数した。10 μ Mの非標識GTP Sとの競合によって非特異的結合を決定した。GTP S結合アッセイは、2回の独立した実験として3連で行った。

【0261】

免疫組織化学

成体マウス(5~6週齢)をペントバルビタールにより麻酔し、20mLの冷0.1M PBS(pH7.4)、続いて25mLの冷固定剤(0.1M PBS中の4%ホルムアルデヒド(v/v)および14%飽和ピクリン酸(v/v))を灌流した。灌流したマウスからDRGを切除し、4の4%パラホルムアルデヒド中に1時間かけて後固定した。20%スクロース(w/v)中で組織を24時間超かけて凍結保護してから、最適切断温度化合物(OCT)に包埋し、クライオスタットを用いて切片にした。スライド上で切片を37°Cで1時間乾燥させ、4%パラホルムアルデヒドにより21~23°Cで10分

間固定した。ブロッキング溶液（10%正常ヤギ血清（v/v）、PBS中0.2% Triton X-100（v/v）、pH7.4）中でスライドを21~23°Cで1時間ブレインキュベートし、次いで、一次抗体とともに4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体のインキュベーションを21~23°Cで2時間行った。一次抗体については、CGRP（T-4239、Peninsula、1:1,000）に対してウサギ抗体、GFPA（A-11122、Molecular Probes、1:1,000）に対してウサギ抗体とした。二次抗体については、ウサギに対するヤギ抗体（A11011、Alexa 568コンジュゲート；A11008、Alexa 488コンジュゲート；Molecular Probes）をブロッキング溶液で1:500に希釈して使用した。

【0262】

10

GFPタグ付きMRGPRを安定に発現する細胞の生成

先に記載された報告では、GFPタグ付きMRGPR A3、MRGPR C11、MRGPR D、MRGPR X1およびMRGPR X2を発現するHEK293安定細胞株が生成された^{21, 23, 46}。要約すると、Lipofectamine 3000を使用して、HEK細胞に目的の受容体を含むプラスミドをトランスフェクトした。3日後、0.5mg/mLのG418を使用して細胞を選択した。3週間後、モノクローナルコロニーを樹立し、各々の最高発現クローンを同定した。この試験では、Mrgrpr a1およびMRGPR X4をpEGFP-N1に挿入し、HEK293細胞にトランスフェクトした。0.5mg/mLのG418を使用してMRGPR陽性細胞を3週間かけて選択し、その後、FACSによりGFP陽性細胞を選別し、モノクローナル的に拡大した。試験のために、GFP蛍光によって測定された際に、同様のレベルのMRGPR A1およびMRGPR X4を発現する2つの系統を選択した。

20

【0263】

高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）

分析用LC 18カラム、25cm×4.6mm（Xterra、Waters Corporation）を用いたHPLCにより、血漿ビリルビンを検出した。移動相（60%メタノール/40%水（v/v）（pH5.2）（溶媒A）および100%メタノール（溶媒B）中の0.1M酢酸アンモニウム）の勾配でビリルビンを溶出した。ビリルビンは以下のように溶出した：0~14分：100%A~100%Bの直線勾配；14~19分：100%A~100%Bの直線勾配；19~24分：100%Aでのイソクラティック溶出。ビリルビンは約14~15分の保持時間を示し、450nmで吸光度を測定することにより検出された。内部標準として試料に10μMビリルビンを加えることにより、血漿ビリルビンに対応するピークを確認した。

30

【0264】

胆汁うっ滞のマウスモデルおよび試料収集

1-ナフチルイソチオシアネート（ANIT；Sigma）をオリーブ油（Sigma）に可溶化した。動物に25mg/kgのANITを5日間連日経口投与した。5日目に、かゆみ行動のために動物を順応させた。6日目に、動物を試験チャンバーに入れ、1時間ビデオ録画した。1時間にわたり、後足のいずれかによる連続的な搔破運動として定義される搔破発作の回数を数え、5分間隔でビンゲした。かゆみ行動を評価した後、動物にペントバルビタール（50mg/kg、i.p.）を投与した。心臓穿刺により血液を採取し、ヘパリン処理したチューブに入れた（BD Biosciences）。遠心分離後、血漿を収集し、アリコートし、分析まで-20°Cで保存した。Cell Biolabs製の蛍光測定キットにより胆汁酸値を評価した。適用可能な場合には、その後、マウスを組織学的検査に進めた。

40

【0265】

組織学的検査

ANIT誘発胆汁うっ滞の組織学的評価のために、動物に冷PBS、続いて4%PFA（w/v）を経心臓的に灌流した。肝臓を切除し、4%PFA中に一晩かけて後固定し、10~30%スクロース（w/v）の勾配により凍結保存した。肝臓をOCTに包埋し、

50

クライオスタットを用いて切片にした。切片を室温で1時間乾燥させた後、ヘマトキシリンにより染色し、エオシンにより対比染色し、リンスし、次いで脱水した。

【0266】

量子力学的計算

Spartan 16を用いてDFT計算を行い、wxMacMolPltを用いてモデル化した。6-31G(d)基底関数セットを用いたDFT-Hartree-FockハイブリッドB3LYP理論を使用して、形状の最適化とシングルポイントエネルギー計算とを行った。気相298 Kの基底状態でエネルギーを計算した。

【0267】

血漿ビリルビン枯渇

FeCl₃によるビリベルジンIX /ビリベルジンXI IIへの選択的酸化によって、または免疫沈降によって血漿ビリルビンを枯渇させた。FeCl₃は、20% FeCl₃の0.1N HCl /メタノール溶液として調製した。37°Cで10分間、最終濃度1.5% FeCl₃で血漿とともにFeCl₃をフラックスした。FeCl₃は穏やかな酸化剤であるが、ビリルビンがビリベルジンに酸化される酸化還元電位を示す⁴⁷。また、正常ウサギIgG、またはタンパク質A/Gビーズに結合した抗ビリルビン抗体(前述のように生成された¹⁰) 5 μgとともに血漿を25°Cで1時間インキュベートすることによってビリルビンを免疫沈降させた。ビリルビン枯渇を定量するために、100%メタノールを用いて試料からビリルビンを抽出し、HPLCおよびUV可視分光分析に供した。吸光度をODのベースラインに調整し、クロマトグラフィーのピーク下面積を積分することによってビリルビンを定量した。

【0268】

データ分析

特に明記しない限り、群のデータは平均±標準誤差として表した。Two-tailed unpaired Student's t-tests、フィッシャー直接確率法およびカイ二乗検定を使用して統計的比較の有意性を決定し、P<0.05で有意差があると解釈した。統計的検出力分析を使用してサンプルサイズを正当化し、分散はF検定により決定したように全処置群間で類似していると決定した。成功した手順および/または処置を受けたサンプルまたは動物は分析から除外しなかった。行動実験はいずれも、遺伝子型および処置の両方を考慮し、ブロックした方法でデザインした。

【0269】

実施例13:ビリルビンは非ヒスタミン作動性のMrgrp依存性掻痒症を誘発した

かゆみは、臨床的には掻痒症として知られており、皮膚と粘膜表面とを支配する後根神経節の一次感覚ニューロンによって知覚される⁵⁻⁸。ヒスタミン介在性のかゆみには効果的な治療選択肢が存在するが、黄疸関連掻痒症などの非ヒスタミン作動性疾患の治療は比較的困難である²。黄疸、すなわち皮膚、強膜および粘膜の黄変は、黄色の代謝産物であるビリルビンが異常に蓄積した結果である。

【0270】

ビリルビンは、複雑な生理学および病態生理学的特性を有する。生理学および軽度の濃度上昇(0.2~2.7 mg/dL、3.4~46.2 μM)では、ビリルビンは抗酸化物質⁹として作用し、神経保護物質¹⁰でも心保護物質¹¹でもある。しかし、皮膚黄疸(ビリルビン>5 mg/dL、>85.5 μM)に見られるような高値は掻痒症と関連しており、この相関は紀元前2世紀にはすでに医師によって最初に報告されている¹。

【0271】

黄疸と掻痒症との間の長期にわたる関連にもかかわらず¹²、ビリルビンそれ自体は起痒物質としてこれまでに研究されていない。ビリルビンが掻痒症を直接誘発するかどうかを決定するために、マウスの首筋にビリルビンを皮内注射した。ビリルビンの病態生理学濃度は、注射部位で用量依存的に搔破を刺激した(図23A)。ビリルビンに高親和性で結合するヒト血清アルブミンとビリルビンをプレインキュベートすると¹³⁻¹⁵、誘発される搔破が減少した(図23A)。ビリルビン誘発搔破の時間経過は、2つのよく特

10

20

30

40

50

徴付けられた起痒物質、ヒスタミンおよびクロロキンのそれを反映していた（図 2 3 B）。

【 0 2 7 2 】

ビルルピンが疼痛ではなくかゆみを誘発したことを確認するために、マウスの頬にビルルピンを注射したが、この注射部位では、かゆみ刺激と疼痛刺激とを行動的に区別することができる¹⁶。首筋と同様に、頬にビルルピンを注射すると、用量依存的な搔破が誘発された（図 2 7 A）。ビルルピンは拭き行動も舐め行動も誘発せず、疼痛ではなくかゆみが選択的に刺激されたことが示された（図 2 7 B ~ 図 2 7 C）。

【 0 2 7 3 】

マウスに同様の構造の代謝産物を注射して、ビルルピンの搔痒活性の特異性を決定した（図 2 3 D）。ビルルピンに対して直接上位の 2 つの代謝産物であるヘミンおよびピリベルジンは、テトラピロールであるにもかかわらず搔破を誘発しなかった（図 2 3 D）。ヘミン、ピリベルジンおよびビルルピンは、それらの間にわずかな原子的および電子的相違を示したにすぎなかったが、それらの物理化学的特性および構造は大幅に異なっていた（図 2 3 E）。

【 0 2 7 4 】

これらの差をさらによく理解するために、密度汎関数理論（DFT）計算を行い¹⁷⁻²⁰、続いてシングルポイントエネルギー計算を行って、各代謝産物の最適形状を解明した。ヘムおよびピリベルジンとは異なり、ビルルピンの 4 つのピロールは伸びており、いずれもが同じ平面にあるわけではない（図 2 3 E）。DFT 計算により、ビルルピンの下流にある 2 つの細菌代謝産物であるウロビリノーゲンおよびステルコビリンは同様の伸長配座が採用されていることが明らかにされた。ウロビリノーゲンおよびステルコビリンはともに搔破行動を刺激することができ（図 2 3 D）、ビルルピンのピロールの伸長配座がその搔痒活性に重要であり得ることが示された。

【 0 2 7 5 】

黄疸関連搔痒症患者には、抗ヒスタミン剤の効果がほとんどない³。これらの臨床所見と一致して、ヒスタミン受容体 1 遮断薬セチリジン（30 mg / kg、i . p .）は、ビルルピンを注射したマウスの搔破行動を抑制することができなかった（図 2 7 D）。さらに、ビルルピンは、カルシウム応答を誘発することも、腹膜肥満細胞から相当量のヒスタミン放出を誘発することもなかった（図 2 7 E ~ 図 2 7 F）。

【 0 2 7 6 】

受容体の Mas 関連 G タンパク質共役受容体（Mrgrp）ファミリーは、非ヒスタミン作動性搔痒症の主要なメディエーターである²¹⁻²⁴。Mrgrp がビルルピン誘発性搔痒症を媒介するかどうかを試験するために、12 の Mrgrp 遺伝子のクラスターを欠くマウス（クラスター - / -）にビルルピンを注射した²¹（図 2 8 A）。クラスター - / - 動物では、野生型（WT）マウスよりも搔破が約 75 % 少なく、クラスター内の 12 の Mrgrp のうちの 1 つ以上がビルルピン誘発性搔痒症を媒介することが示された（図 2 3 A）。

【 0 2 7 7 】

実施例 1 4：ビルルピンはマウス MRGPR A 1 およびヒト MRGPR X 4 を活性化した原因となる Mrgrp を特定するために、クラスター - / - マウスでは欠失させた 12 の Mrgrp の各々をヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞に個別に発現させ、ビルルピンの適用時に細胞内カルシウムの変化をモニターした。陽性のリガンド 受容体相互作用時にカルシウム応答が確実に観察されるようにするために、ホスホリパーゼ C（PLC）を介してカルシウムシグナル伝達に GPCR を結合する G タンパク質であるマウス G タンパク質 サブユニット G₁₅ を安定に発現する HEK 293 細胞を使用した。

【 0 2 7 8 】

12 のマウス受容体のうち、MRGPR A 1 を発現する HEK 細胞のみがビルルピンの適用時にカルシウム応答を示した（EC₅₀ は 145 . 9 μM [96、220]）（図 2 4 A および図 2 4 C）。ビルルピンに応答した同じ細胞が、MRGPR A 1 アゴニストであ

10

20

30

40

50

る F M R F にも応答した⁴。ビリルビンが M R G P R A 1 で細胞シグナル伝達を開始することを確実にするために、G P C R シグナル伝達の阻害剤である P L C 阻害剤 U 7 3 1 2 2 または G_q 阻害剤 Y M - 2 5 4 8 9 0 を用いて M R G P R A 1 発現細胞を前処理した。両化合物は、ビリルビン誘発カルシウム応答を無効にした (図 2 4 B ~ 図 2 4 C)。

【0279】

ビリルビン自体に加えて、黄疸に関連するかゆみでは、グルクロン酸抱合ビリルビンがアップレギュレートされることが多い。同様のビリルビン誘導体が M R G P R A 1 を活性化することができるかどうかを評価した。実際、ジタウレートビリルビン (抱合型ビリルビン) は、M R G P R A 1 発現細胞を活性化した (図 2 4 D)。最初の挙動の所見と一致して、ヘミンは M R G P R A 1 を活性化することができなかった (図 2 4 D)。スクリー 10
ニングされた 12 個のうちの他の M r g p r はビリルビンに応答しなかった (図 2 4 M、図 2 8 B ~ 図 2 8 F)。

【0280】

マウス M r g p r a ファミリーは、ヒト M R G P R X ファミリーに配列相同性が最も近い (図 2 8 A ~ 図 2 8 F)^{4, 25, 26}。4 つのヒト M R G P R X 受容体のうち、M R G P R X 4 発現細胞のみがビリルビンに応答した (E C₅₀ は 61.9 μM [44, 87]) (図 2 4 F および 図 2 4 I)。U 7 3 1 2 2 および Y M - 2 5 4 8 9 0 は、M R G P R A 1 と同様に、M R G P R X 4 発現細胞のビリルビン誘発カルシウム応答を阻害した (図 2 4 G ~ 図 2 4 H)。抱合型ビリルビンも M R G P R X 4 を活性化したが、ヘミンは効果を有しなかった (図 2 4 I)。

20

【0281】

同定された受容体にビリルビンが直接結合することを確認するために、ビリルビンの存在下および非存在下で受容体の熱泳動をアッセイした。分子の熱泳動は、サイズ、電荷および溶媒和などの物理的パラメーターの影響を受けるため、分子間の相互作用を評価するために使用することができる²⁷。この手法を使用して、ビリルビンが、92.9 ± 15 μM の K_D で M R G P R A 1 に、および 54.4 ± 13 μM の K_D で M R G P R X 4 に結合することが決定された (図 2 4 E および 図 2 4 J)。ビリルビンは、B A M 8 - 2 2 受容体 M R G P R C 1 1 に対する親和性をほとんどまたはまったく示さなかった (図 2 4 N)。カルシウムイメージングにより M R G P R A 1 または M R G P R X 4 を活性化しなかったヘミンも (図 2 4 D および 図 2 4 I)、M R G P R A 1 または M R G P R X 4 に結合 30
しなかった (図 2 4 E および 図 2 4 J)。抱合型ビリルビンは M R G P R A 1 および M R G P R X 4 の両方に結合したが、ビリルビンと比較して親和性は低かった (図 2 4 E および 図 2 4 J)。ビリルビンが結合時に M R G P R A 1 および M R G P R X 4 を活性化することを確認するために、G P C R シグナル伝達の最初の事象の 1 つであるグアノシン三リン酸 (G D P) からグアノシン三リン酸 (G T P) への交換を測定した。ビリルビンは、M R G P R A 1 膜複合および M R G P R X 4 膜複合体に対する G T P 結合を増加させたが、M R G P R C 1 1 への G T P 結合は増加させなかった (図 2 4 K)。ビリルビンがインピボで M R G P R A 1 を活性化してかゆみを誘発することを確認するために、C R I S P R - C a s 9 を使用して M r g p r a 1 (A 1 - / -) ノックアウトマウス系統を作製した²⁸ (図 2 9 A ~ 図 2 9 C)。A 1 - / - 動物では、ビリルビン注射時に W T マウスより 40
も搔破が有意に少なかった (図 2 4 L)。

30

40

【0282】

実施例 15 : ビリルビンは M R G P R 依存的に感覚ニューロンを活性化した

これまでの試験では、M R G P R A 1 および M R G P R X 4 の両方が後根神経節 (D R G) 内の感覚ニューロンのサブセットに発現することが実証されている^{4, 25, 29}。6 週齢の成体マウスは、わずかな割合の感覚ニューロンに M R G P R A 1 を発現する。(図 2 5 A)。50 μM ビリルビンの適用により、小径 (< 30 μm) W T D R G 感覚ニューロン (50 のうち 5) に強力な活動電位が誘発された。しかし、ビリルビンは、A 1 - / - ニューロンでは活動電位を誘発することができなかった (60 のうち 0) (図 2 5 B)。感覚ニューロンでの M R G P R A 1 の発現は、かゆみ感覚ニューロンの典型である 50

M R G P R A 3 発現と重複している (D o n g e t a l . , 2 0 0 1 ; H a n e t a l . , 2 0 1 2) 。電気生理および $C a^{2+}$ イメージングの両方によって決定されるように、ビリルビン応答性ニューロンは、M R G P R A 3 のリガンドである 1 m M クロロキンにも応答するニューロンと部分的に重複した (Q i n L i u , D o n g , C e l l 2 0 0 9) (図 2 5 C 、 図 3 0 A) 。ビリルビン感受性ニューロンは、かゆみ感覚ニューロンに特徴的な直径である $20.4 \pm 1.3 \mu m$ の平均細胞体直径を有した (図 3 0 B) 。W T D R G ニューロンの約 5 % が 5 0 μM ビリルビンの適用に応答したが、クラスター - / - または A 1 - / - D R G 由来の感覚ニューロンはほとんど応答しなかった (図 2 5 D ~ 図 2 5 E) 。

【 0 2 8 3 】

ビリルビンが推定 M R G P R A 3 陽性かゆみニューロンを活性化することを確認するために、M R G P R A 3 陽性ニューロンで蛍光タンパク質 t d T o m a t o を発現する T g (M r g p r a 3 - C r e) ; l s l - t d T o m a t o マウスから単離した D R G ニューロンに対してカルシウムイメージングを行った。5 0 μM ビリルビンは、かなりの割合の t d T o m a t o 陽性ニューロンを活性化した (図 2 5 F) 。

【 0 2 8 4 】

次に、M R G P R A 1 または M R G P R X 4 のいずれかの発現がニューロンをビリルビンに感受性にするのに十分であるかどうかを決定した。この問題に対処するために、クラスター - / - D R G に、M r g p r a 1 、 M R G P R X 4 または M R G P R X 3 のいずれかを保有するレンチウイルスを感染させた。ビリルビンは、M r g p r a 1 形質導入クラスター - / - D R G の 1 4 % および M R G P R X 4 形質導入クラスター - / - D R G の 3 2 % を活性化した (図 2 5 G ~ 図 2 5 I) 。対照遺伝子 M R G P R X 3 に感染させたクラスター - / - D R G はビリルビンに応答しなかった。

【 0 2 8 5 】

次に、インビボでのビリルビンの慢性的な上昇が M r g p r 依存性搔痒症を刺激することができるかどうかを検討した。この問題に対処するために、 α -ナフチルイソチオシアネート (A N I T) をマウスに投与して、肝内胆汁うっ滞、または胆汁の流れの遅延もしくは停止を誘発した³⁰。胆汁はビリルビンを排泄する主な手段であり、胆汁うっ滞患者では、血中のビリルビンおよび他の起痒性物質の値が上昇する。W T 、クラスター - / - および A 1 - / - 動物を 2 5 m g / k g の A N I T により 5 日間処置してから、自発性のかゆみを評価した。W T 、クラスター - / - および A 1 - / - 動物は、肝組織像、ならびに血漿ビリルビン、胆汁酸、アルカリホスファターゼ (A L P) 、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) 、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) およびグルタミルトランスフェラーゼ (G G T) の相対的增加によって決定されるように、胆汁うっ滞性損傷の同等の重症度を示した (図 3 1 A ~ 図 3 1 D) 。

【 0 2 8 6 】

実施例 1 6 : M r g p r a 1 - / - 、クラスター - / - および B V R - / - 動物は胆汁うっ滞性搔痒症の減少を示した。

ビヒクル処置と比較して、A N I T 処置では、全動物の搔痒症が有意に増加した (図 A) 。しかし、クラスター - / - および A 1 - / - マウスは W T マウスよりも著しく搔破が少なく (図 2 6 A) 、M R G P R A 1 が胆汁うっ滞性搔痒症の成分を媒介したことが示唆された。ヒトでは、胆汁酸、内因性オピオイドおよび L P A が胆汁うっ滞性血清中で増加することが多く、搔痒症を媒介することが示されている³¹⁻³⁴。A N I T 処置動物の血清は胆汁酸の上昇を示したが (図 3 1 E) 、内因性オピオイドペプチドであるメトエンケファリン^{35、36}も L P A 産生酵素オートタキシンも上昇しなかった (図 3 1 F ~ 図 3 1 G) 。

【 0 2 8 7 】

一部の他の胆汁うっ滞性起痒物質ではなく、ビリルビンはもはや M R G P R A 1 依存性のかゆみを刺激することができないことから、クラスター - / - および A 1 - / - マウスでは A N I T による搔破が少なかったことを確認するため、W T およびクラスター - / -

10

20

30

40

50

に胆汁酸、オピエートおよびLPAを注射した。他の胆汁うっ滞性起痒物質はいずれも、WTおよびクラスター-/-動物で同等のかゆみを誘発したため、MRGPR A1依存性ではない(図31H~図31K)。したがって、MRGPR A1は黄疸による搔痒症を特異的に媒介するため、クラスター-/-およびA1-/-マウスではANITによる搔破が少なかった。

【0288】

ビリルビンがMRGPR A1と相互作用して胆汁うっ滞のかゆみを刺激することをさらに実証するために、ビリルビンの生合成酵素であるビリベルジンリダクターゼ(BVR-/-)³⁷を欠くマウスを作製した(図23E、図32A)。BVRを欠くマウスでは、血漿中のビリルビンは検出可能な値ではなかった(図32B~図32D)。ANITにより処置した場合、BVR-/-マウスではWTマウスよりも搔破が有意に少なかった(図26B)。胆汁酸、ALP、AST、ALTおよびGGTの血漿中濃度は、処置されたBVR-/-動物とWT対照との間で区別することができなかった(図31A~図31D)。BVR-/-マウスにクロロキンまたは外因性ビリルビンを注射すると正常に搔破したことから(図32E~図32F)、ANITに対する応答低下は異常なかゆみ回路によるものではない。

10

【0289】

胆汁うっ滞性搔痒症に観察された差がANITに特異的なものではなかったことを確認するために、WT、A1-/-およびBVR-/-マウスに肝毒素シクロスポリンAを投与した³⁸。50mg/kgのシクロスポリンAまたはビヒクルによりマウスを8日間処置してから、自発性のかゆみを評価した(図33Aおよび図33B)。シクロスポリンAはWT動物に対して自発性のかゆみを誘発したが、A1-/-およびBVR-/-マウスでは再びWTマウスよりも搔破が有意に少なかった(図33Aおよび図33B)。

20

【0290】

MRGPRの薬理的拮抗作用が胆汁うっ滞性のかゆみを軽減することができるかどうかを評価した。近年、3-アミノ酸ペプチド、QWFがMRGPR A1アンタゴニストとして同定された³⁹。QWFは、MRGPR A1発現細胞のビリルビン関連カルシウムシグナル伝達を無効にし、IC₅₀は2.9μMであった^[1,5](図34A)。インビトロでのその薬理作用を反映して、ビリルビンとともに注射された0.25mg/kgのQWFは、ビリルビンに関連した搔痒症を有意に軽減した(図34B)。QWFによる拮抗作用は、クロロキン-MRGPR A3に関連するかゆみを減弱させなかったため、ビリルビンに特異的であった(図34C)。

30

【0291】

MRGPR A1アンタゴニストQWFがインビボで胆汁うっ滞性搔痒症を軽減することができるかどうかを評価した。前述のようにWT動物にANITを投与したが、行動分析の30分前にビヒクルまたは1mg/kgのQWFのいずれかをマウスに腹腔内注射した。QWFにより処置したマウスでは、ビヒクルにより処置した動物よりも搔破が有意に少なかった(図26D)。QWF処置は総ビリルビン、AST、ALTまたはALPの血漿中濃度を変化させず、QWF処置が、根底にある肝臓の病態を変化させなかったことが示唆された(図34D~図34G)。

40

【0292】

胆道ドレナージは、胆汁うっ滞性搔痒症の最も効果的な治療法である⁴⁰。この観察に基づいて、胆汁うっ滞性動物から分離された血漿が搔痒症を誘発し得ることが予測された。実際、胆汁うっ滞を有するWT動物から得られた血漿は、ナীবWT動物に注射するとかゆみを誘発した(図26E)。ビリルビンを欠くBVR-/-マウスから分離された胆汁うっ滞性血漿(図32B~図32D)は、WT胆汁うっ滞性血漿よりも有意に少ない搔破を誘発した(図26E)。ALP、ASTおよびALTの値は、WT胆汁うっ滞性血漿とBVR-/-胆汁うっ滞性血漿との間で区別がすることができず(図31A~図31D)、元のWTおよびBVR-/-マウスと同等の肝障害が示唆された。代わりに、BVR-/-血漿はビリルビンを欠いているため、搔痒症が減少する可能性がある。

50

【0293】

高ビリルビン血症（図26F）をもたらす様々な症状に罹患した患者4例の血漿を分離した。4例の患者の血漿はいずれもWT動物に対してかゆみを誘発した（図26G）。各患者の血漿は、A1-/-動物に注射した場合、掻痒症をそれほど誘発しなかった（図26G）。胆汁うっ滞性血漿からビリルビンを除去することが治療に効果的であり得るかどうかを評価するために、選択的酸化または抗ビリルビン抗体によってビリルビンを枯渇させた後、その掻痒能力を再評価した。HPLCおよびUV-可視微分分光法の両方により、ビリルビンの除去を検証した（図35A~図35B）。FeCl₃またはビリルビン抗体により処置した後の患者#1の血漿をWTマウスに注射したところ、未処置血漿および正常IgG処置患者血漿と比較して掻痒症が少なかった（図26H~図26I）。

10

【0294】

実施例17

様々な病態により黄疸、ビリルビンの蓄積による皮膚の黄変が生じる。黄疸を有する患者は、一般に、激しい非ヒスタミン作動性のかゆみを経験すると報告されている^{1~3}。この関連にもかかわらず、ビリルビン自体の起痒能力は検討されておらず、ビリルビン受容体も同定されていない。本明細書では、ビリルビンの病態生理学的レベルが末梢かゆみ感覚ニューロンを刺激し、一次感覚ニューロンに発現するGタンパク質共役受容体のファミリーであるMrgprを介して掻痒症を誘発することが実証された⁴。ビリルビンは、これまで特徴付けられていなかった2つのMrgpr、マウスMRGPR A1およびヒトMRGPR X4に結合し活性化する。病理学的高ビリルビン血症の2つのマウスモデルでは、ビリルビン産生酵素であるMrgpra1またはBVRのいずれかの遺伝子欠失がかゆみを減弱することが示された。同様に、高ビリルビン血症患者から分離した血漿は野生型動物に対してかゆみを誘発したが、Mrgpra1-/-動物には誘発しなかった。ビリルビンを除去すると、患者血漿の起痒能力が低下した。これらのデータに基づいて、MRGPRを標的とすることは黄疸に関連するかゆみを軽減するための有望な戦略である

20

【0295】

今日まで、ビリルビンの細胞表面受容体は分かっていない。本明細書の結果は、ビリルビンがMRGPRに結合し活性化することにより掻痒症を誘発する可能性が高いことから、疾患の不活性なバイオマーカーとして不適切に見落とされ得ることを実証した。

【0296】

胆汁うっ滞性掻痒症に罹患する患者がいずれも黄疸を示すわけではなく、ビリルビンが胆汁うっ滞性掻痒症に罹患したこれらの患者に存在するいくつかの起痒物質のうちの1つである可能性が高いことが示唆される。他の原因となる起痒物質には胆汁酸、内因性オピオイドおよびLPAが挙げられる可能性が高く、これらは非Mrgpr機構を介して作用し得る（図31H~図31K）。さらに、黄疸を有する患者がいずれもかゆみを経験するわけではない。例えば、ビリルビントランスポーターABC C2の変異が関与する常染色体劣性遺伝障害であるデュビン・ジョンソン症候群患者では、血清抱合型ビリルビンが増加しているが、掻痒症の訴えがあるのはまれである⁴¹。これらの患者と、黄疸を有する他の患者とが掻痒症を経験しないことがある理由はいくつかある。ビリルビンは血清アルブミンに強く結合される親油性分子であるため、血清中の総ビリルビン値と組織内の値との間に不一致が存在する可能性が高い。特に、胆汁うっ滞性掻痒症の最良の予測指標の1つは、血清ビリルビンおよびアルブミンの両値を使用するMayoリスクスコアである¹²。さらに、これらの非掻痒性の黄疸障害の血清ビリルビンは、掻痒性の黄疸の血清ビリルビン値よりも有意に低い⁴¹。原発性胆汁性胆管炎患者では、総ビリルビンの典型的な血清値がデュビン・ジョンソン症候群患者よりも約2~3倍高く、非掻痒性の黄疸を有する患者が掻痒症を誘発するのに十分な値のビリルビンを有しない可能性が高いことを示唆している⁴¹。さらに、孤発性高ビリルビン血症患者では、ほとんどのビリルビンがアルブミンおよび他の血清タンパク質に結合している可能性が高いため、ビリルビンが皮膚に侵入したり、感覚神経に存在する受容体と相互作用したりすることはできない^{13、42、43}。これらの問題にもかかわらず、結果は、MRGPR X4を遮断することにより黄疸

30

40

50

関連搔痒症患者に緩和を提供し得ることを示唆した。

【0297】

実施例12～17の参考文献を以下に列挙する

1. Bassari, R. Jaundice associated pruritus: A review of pathophysiology and treatment. *World J. Gastroenterol.* 21, 1404-11 (2015).
2. Kremer, A. E., Elferink, R. P. J. O. & Beuers, U. Pathophysiology and current management of pruritus in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35, 89-97 (2011). 10
3. Carstens, E., Akiyama, T. & Bergasa, N. V. Pruritus of Cholestasis. (2014).
4. Dong, X., Han, S.-K., Zylka, M. J., Simon, M. I. & Anderson, D. J. A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons. *Cell* 106, 619-632 (2001).
5. LaMotte, R. H., Dong, X. & Ringkamp, M. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nature Publishing Group* 15, 19-31 (2014). 20
6. Bautista, D. M., Wilson, S. R. & Hoon, M. A. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat. Neurosci.* 17, 175-182 (2014).
7. Yosipovitch, G. & Bernhard, J. D. Clinical practice. Chronic pruritus. *N. Engl. J. Med.* 368, 1625-1634 (2013).
8. Ikoma, A., Steinhoff, M., Stander, S., Yosipovitch, G. & Schmelz, M. The neurobiology of itch. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 535-547 (2006). 30
9. Baranano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D. & Snyder, S. H. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16093-16098 (2002).
10. Dore, S. et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2445-2450 (1999). 40
11. Clark, J. E. et al. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H643-H651 (2000).
12. Talwalkar, J. A., Souto, E., Jorgensen, R. A. & Lindor, K. D. Natural history of pruritus in primary biliary cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 297-302 (2003).
13. Jacobsen, J. & Brodersen, R. Albumin-bilirubin binding mechanism. *J Biol Chem* 258, 50

6319 - 6326 (1983) .

14. Breaven, G.H., D'Albis, A. & Gratzer, W.B. The interaction of bilirubin with human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 33, 500 - 509 (1973) .

15. Griffiths, W.C., Diamond, I. & Dextraze, P. The albumin binding of unconjugated bilirubin in serum. *Clin. Biochem.* 8, 254 - 260 (1975) .

16. Shimada, S.G. & LaMotte, R.H. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain* 139, 681 - 687 (2008) . 10

17. Hohenberg, P. & Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B* 136, B864 - + (1964) .

18. Kohn, W. & Sham, L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* 140, 1133 - & (1965) .

19. Becke, A.D. Density-Functional Thermochemistry .3. the Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics* 98, 5648 - 5652 (1993) . 20

20. Stephens, P.J., Devlin, F.J., Chabalowski, C.F. & Frisch, M.J. Ab-Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular-Dichroism Spectra Using Density-Functional Force-Fields. *Journal of Physical Chemistry* 98, 11623 - 11627 (1994) .

21. Liu, Q. et al. Sensory Neuron-Specific GPCR Mrgprs Are Itch Receptors Mediating Chloroquine-Induced Pruritus. *Cell* 139, 1353 - 1365 (2009) . 30

22. Sikand, P., Dong, X. & LaMotte, R.H. BAM8-2 peptide produces itch and nociceptive sensations in humans independent of histamine release. *Journal of Neuroscience* 31, 7563 - 7567 (2011) .

23. Liu, Q. et al. Mechanisms of itch evoked by β -alanine. *Journal of Neuroscience* 32, 14532 - 14537 (2012) . 40

24. Han, L. et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat. Neurosci.* 16, 174 - 182 (2012) .

25. Lembo, P.M.C. et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat. Neurosci.* 5, 201 - 209 (2002) .

26. Zhang, L. et al. Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and hu 50

- man. Brain Res. Mol. Brain Res. 133, 187 - 197 (2005).
27. Duhr, S. & Braun, D. Why molecules move along a temperature gradient. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 19678 - 19682 (2006).
28. Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science 337, 816 - 821 (2012).
29. Flegel, C. et al. RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. PLoS ONE 10, e0128951 (2015). 10
30. Eliakim, M., Eisner, M. & Ungar, H. Experimental intrahepatic obstructive jaundice following ingestion of alphanaphthyl-iso-thiocyanate. Bull Res Counc Isr Sect E Exp Med 8E, 7 - 17 (1959).
31. Kremer, A. E., Martens, J., Kulik, W. & Rueff, F. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. Gastroenterology (2010). doi:10.1053/j.gastro.2010.05.009 20
32. Alemi, F. et al. The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. J. Clin. Invest. 123, 1513 - 1530 (2013).
33. Bergasa, N. V. et al. A controlled trial of naloxone infusions for the pruritus of chronic cholestasis. YGAST 102, 544 - 549 (1992). 30
34. Bergasa, N. V. et al. Open-label trial of oral nalmefene therapy for the pruritus of cholestasis. Hepatology 27, 679 - 684 (1998).
35. Thornton, J. R. & Losowsky, M. S. Methionine enkephalin is increased in plasma in acute liver disease and is present in bile and urine. J. Hepatol. 8, 53 - 59 (1989).
36. Thornton, J. R. & Losowsky, M. S. Plasma leucine enkephalin is increased in liver disease. Gut 30, 1392 - 1395 (1989). 40
37. Kutty, R. K. & Maines, M. D. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 256, 3956 - 3962 (1981).
38. Laupacis, A., Keown, P. A., Ulan, R. A., Sinclair, N. R. & Stiller, C. R. Hyperbilirubinaemia and cyclosporin A levels. Lancet 2, 1426 - 1427 (1981).
39. Azimi, E. et al. Dual action of neuroki 50

nin-1 antagonists on Mas-related GPCRs. JCI Insight 1, e89362 (2016).

40. Hegade, V. S. et al. The safety and efficacy of nasobiliary drainage in the treatment of refractory cholestatic pruritus: a multicentre European study. Aliment. Pharmacol. Ther. 43, 294-302 (2016).

41. Levitt, D. G. & Levitt, M. D. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. Clin Exp Gastroenterol 7, 307-328 (2014). 10

42. Kozaki, N. et al. Significance of serum delta-bilirubin in patients with obstructive jaundice. J. Surg. Res. 79, 61-65 (1998).

43. Kalir, T., Catanese, G. S. & Clejan, S. Clinical Diagnostic Utility of Delta Bilirubin. Lab Med 21, 159-162 (1990).

44. Liu, Q. et al. Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. Nat. Neurosci. 10, 946-948 (2007). 20

45. Vasavda, C., Zaccor, N. W., Scherer, P. C., Sumner, C. J. & Snyder, S. H. Measuring G-protein-coupled Receptor Signaling via Radio-labeled GTP Binding. J Vis Exp (2017). doi: 10.3791/55561

46. McNeil, B. D. et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. Nature 519, 237-241 (2015). 30

47. Dolphin, D. The Porphyrins: Biochemistry, part A-B. (Academic Pr, 1978).

【0298】

実施例18: MrgprX4インバースアゴニストおよびアンタゴニスト

製造業者のワンステッププロトコルによって説明されているように、384ウェルのホモジニアス時間分解蛍光法(HTRF IP-One(登録商標)、CisBio International、Bagnols/Ceze、フランス、カタログ番号62IP APEJ)を使用して、細胞内イノシトールリン酸値を決定した。要約すると、組換えヒトMrgprX4を安定に発現するHEK293細胞を採取し、フェノールレッド不含OptiMEM(ThermoFisher)中に懸濁し、15,000細胞/ウェルで100μL/ウェルの容量で、384ウェルアッセイプレート(Perkin Elmer、Proxiplate-Plus(登録商標)カタログ番号6008280)中に播種した。次いで、加湿CO₂インキュベーター内でこれらの細胞プレートを37°Cで一晩インキュベートした。試験化合物をDMSOに溶解し、アッセイ緩衝液(Tris.HCl 40mM、NaCl 300mM、LiCl 350mM、pH8)でさらに希釈し、細胞に加えた(2μL添加、最終アッセイ濃度は典型的には10μM)。この構成では、アッセイはアゴニストおよびインバースアゴニストを検出することができる。アンタゴニストの検出のために、試験化合物を加えた後、ビリルビンを加えた(2μL添加、最終アッセイ濃度100μM)。次いで、アッセイ形式(アゴニスト/インバースアゴニスト対ア 40 50

ンタゴニスト)とは関係なく、プレートを37℃で1時間インキュベートし、続いて室温で30分間インキュベートした。次いで、溶解/検出試薬(6μL/ウェル)を加え、プレートを室温で1時間インキュベートした後、Perkin Elmer EnVision(登録商標)またはBMG Pherastar(登録商標)などのHTRF互換リーダーにより読み取る。

【0299】

MrgprX4受容体に対する代表的な化合物のインバースアゴニストおよびアンタゴニスト活性を以下の表1に示す。上記で開示された技術を用いて、市販の小分子ライブラリーをスクリーニングすることにより、表1の化合物を同定した。MrgprX4インバースアゴニスト活性に関して、「++++」は、ベースラインよりも少なくとも3標準偏差低い活性を示し、「+++」は、ベースラインよりも2標準偏差から3標準偏差未満低い活性を示す。MrgprX4アンタゴニスト活性に関して、「++++」は、少なくとも85%のピリルビン誘発シグナルの遮断を示し、「+++」は、70%から85%未満のピリルビン誘発シグナルの遮断を示す。

【0300】

10

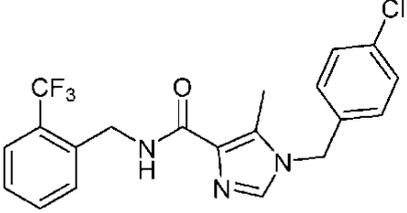
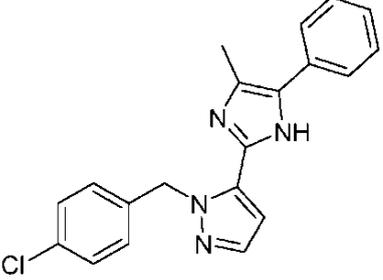
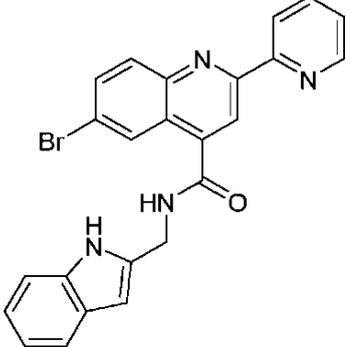
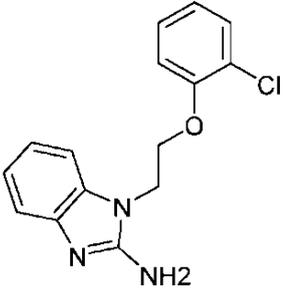
20

30

40

50

【表 1】

化合物 番号	構造	MrgprX4 調節因子		インバース アゴニスト 活性	アンタゴニスト 活性	
		計算されたm/z				
1		407.10		++++	++++	10
2		348.11		++++	++++	20
3		456.06		+++	++++	30
4		287.08		+++	+++	40

【0301】

他の実施形態

本発明をその詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を例示するものであり、限定するものではない。他の態様、利点および修正は、添付の特許請求の範囲内に入る。

【0302】

本明細書で言及される特許および科学文献は、当業者が利用可能な知識を確立するものである。本明細書に引用するすべての米国特許および公開または未公開の米国特許出願は、参照により組み込まれる。本明細書に引用するすべての公開外国特許および特許出願は

、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用する受託番号によって示された Genebank および NCBI 寄託は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用する他のすべての公開参考文献、文書、原稿および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0303】

本発明をその好ましい実施形態を参照して特に示し、説明してきたが、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、その中の形態および詳細に様々な変更を加えることができることを当業者であれば理解するであろう。

【図面】

【図1A】

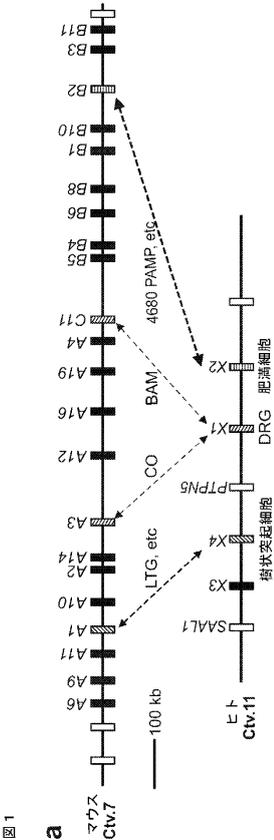
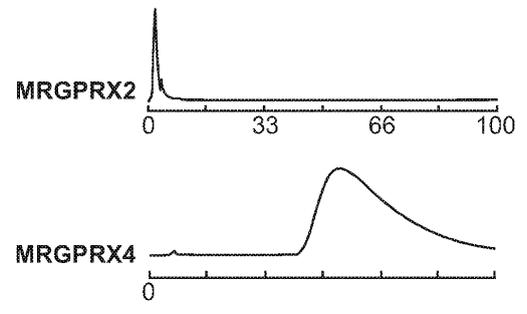


図1

【図1B】

b



10

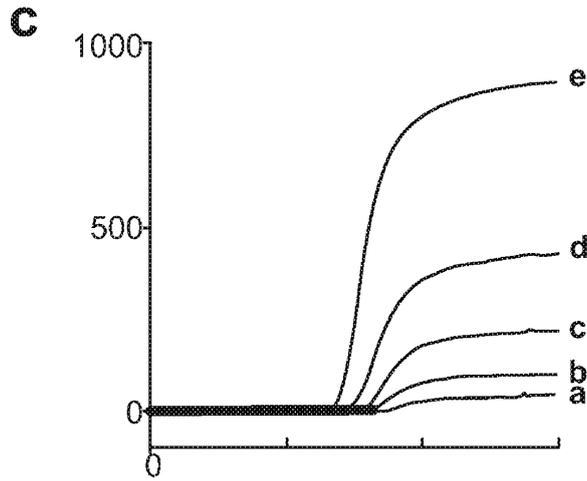
20

30

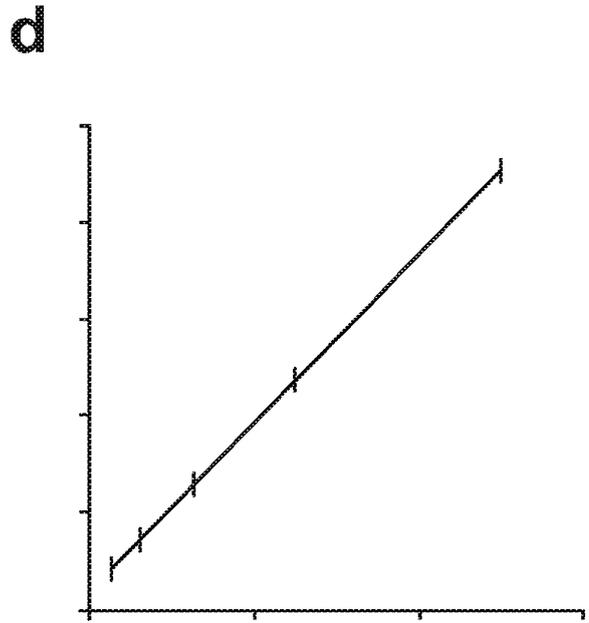
40

50

【 図 1 C 】



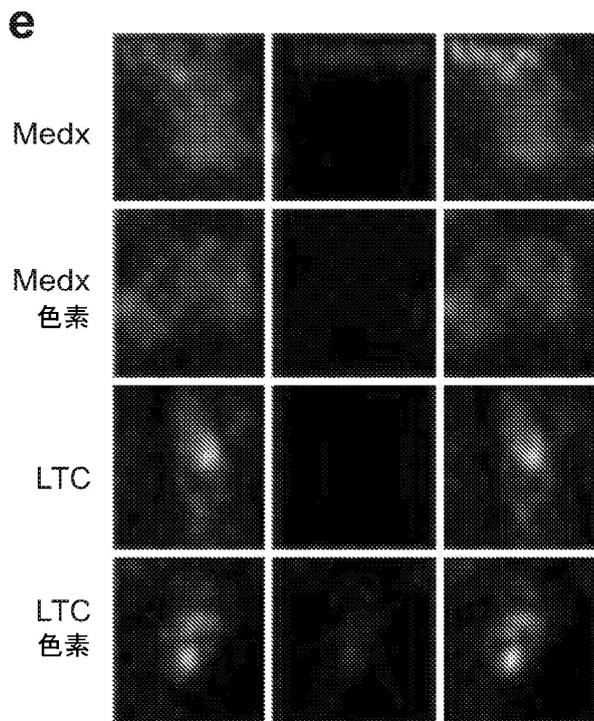
【 図 1 D 】



10

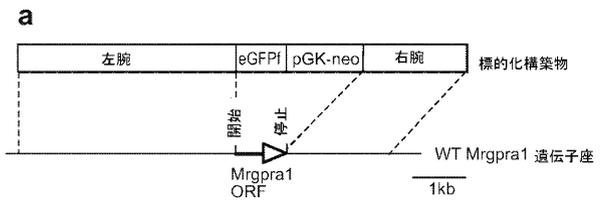
20

【 図 1 E 】



【 図 2 A 】

图 2

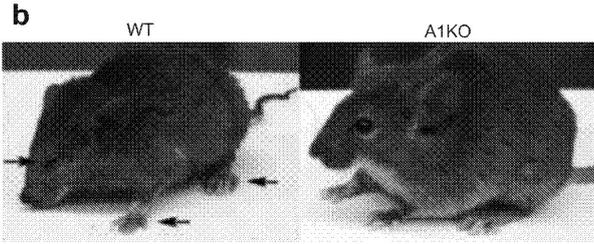


30

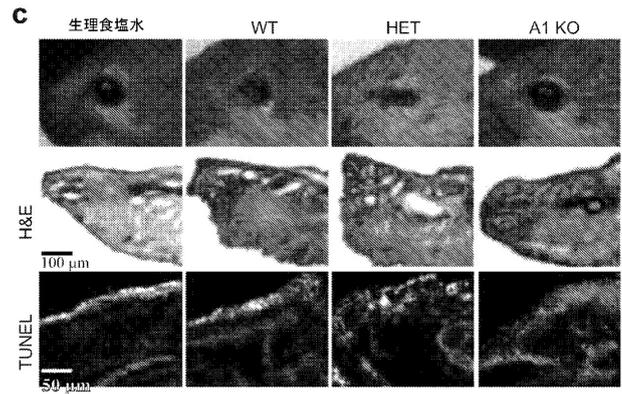
40

50

【 図 2 B 】

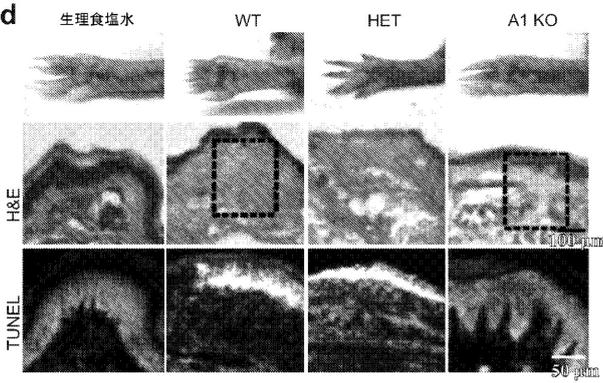


【 図 2 C 】

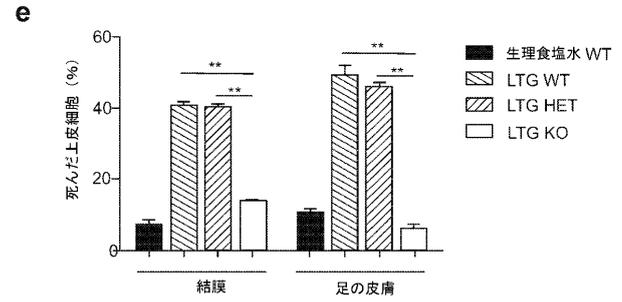


10

【 図 2 D 】



【 図 2 E 】



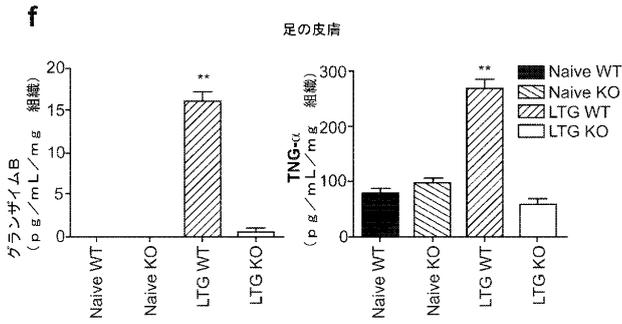
20

30

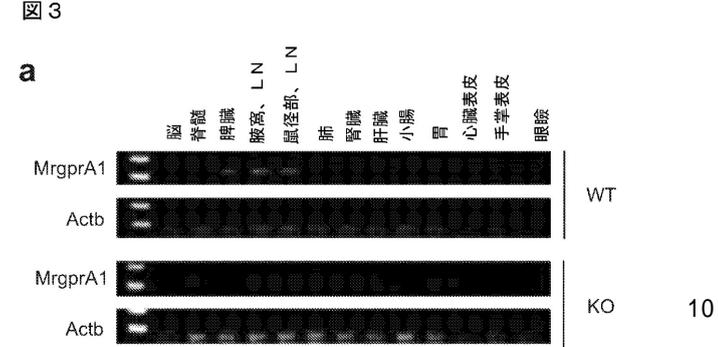
40

50

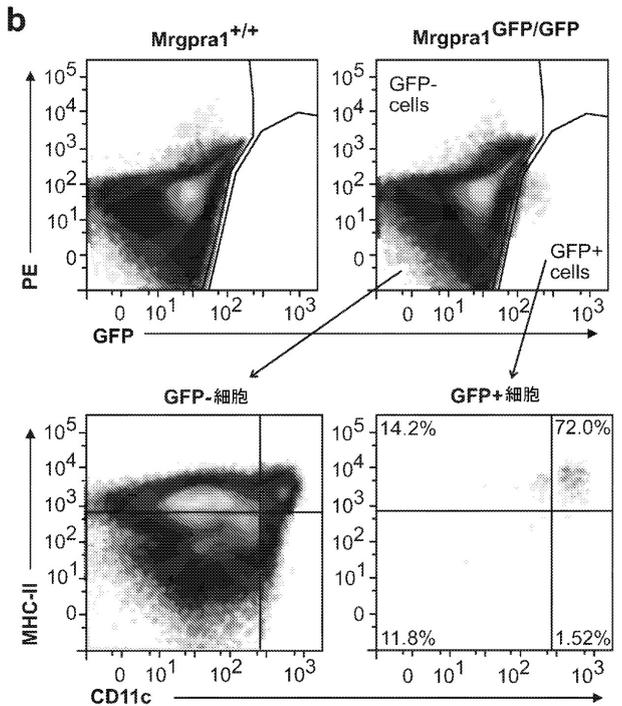
【 図 2 F 】



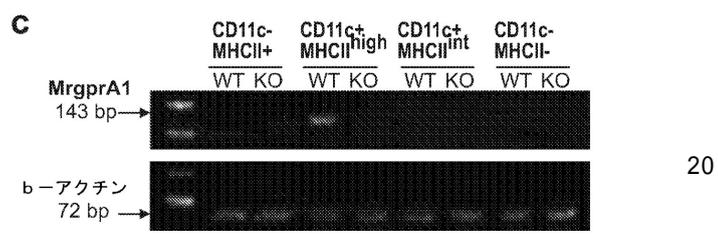
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 3 C 】



10

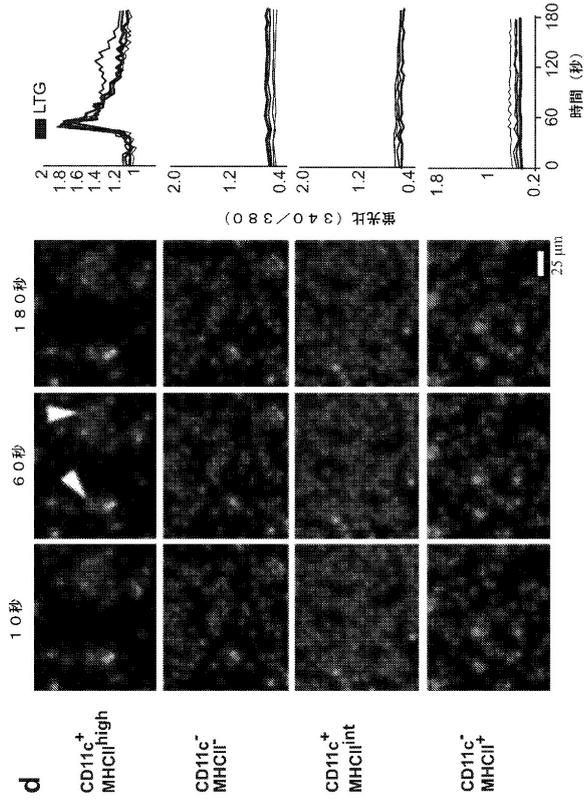
20

30

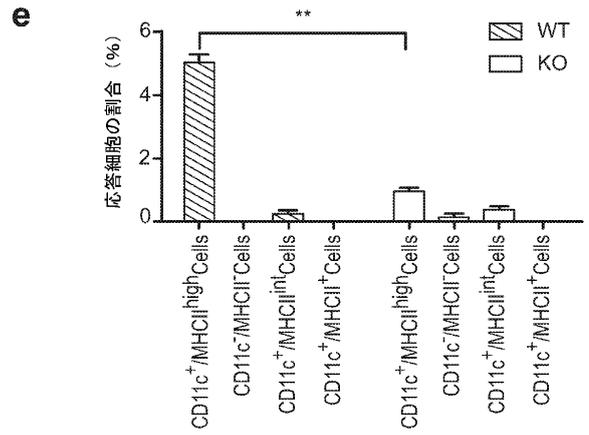
40

50

【 図 3 D 】



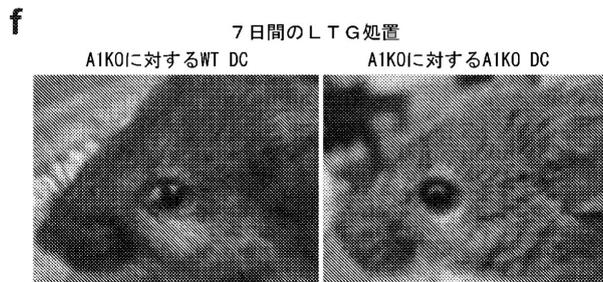
【 図 3 E 】



10

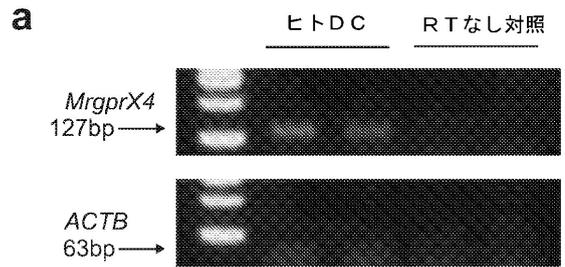
20

【 図 3 F 】



【 図 4 A 】

図 4

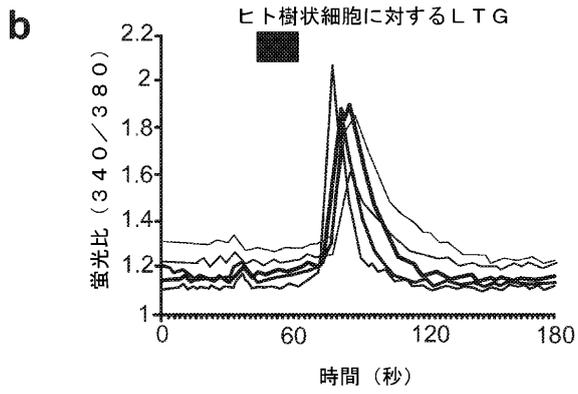


30

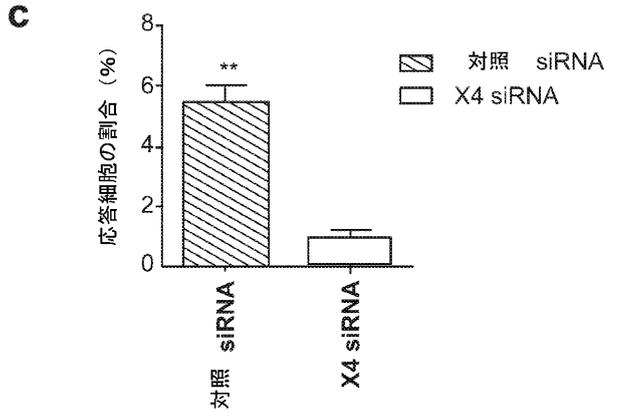
40

50

【 図 4 B 】

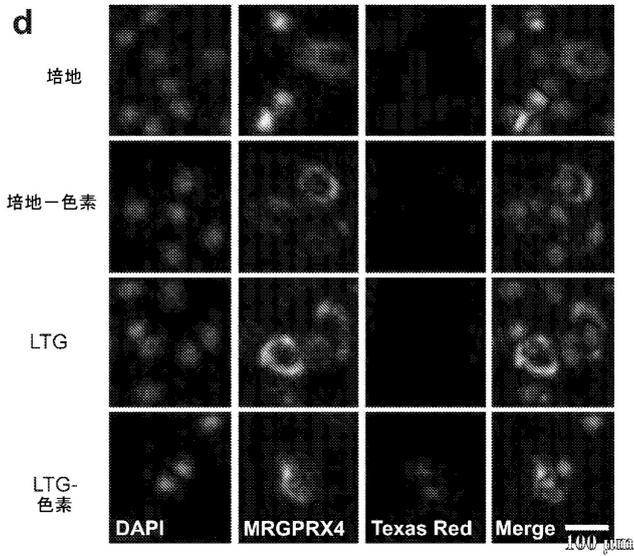


【 図 4 C 】

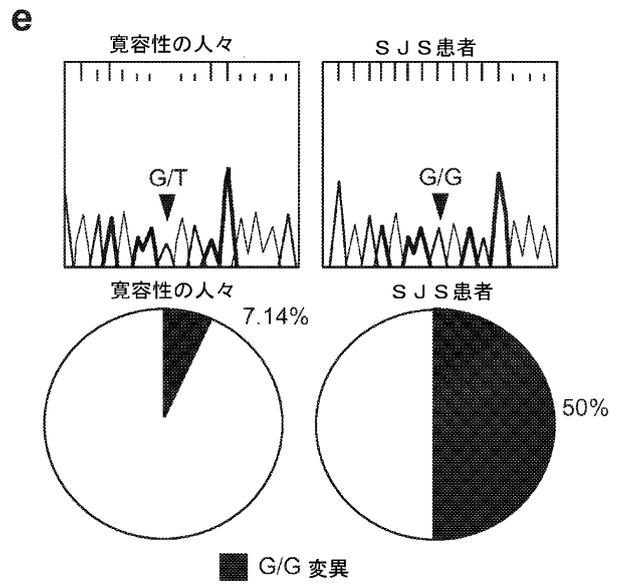


10

【 図 4 D 】



【 図 4 E 】



20

30

40

50

【 図 5 】

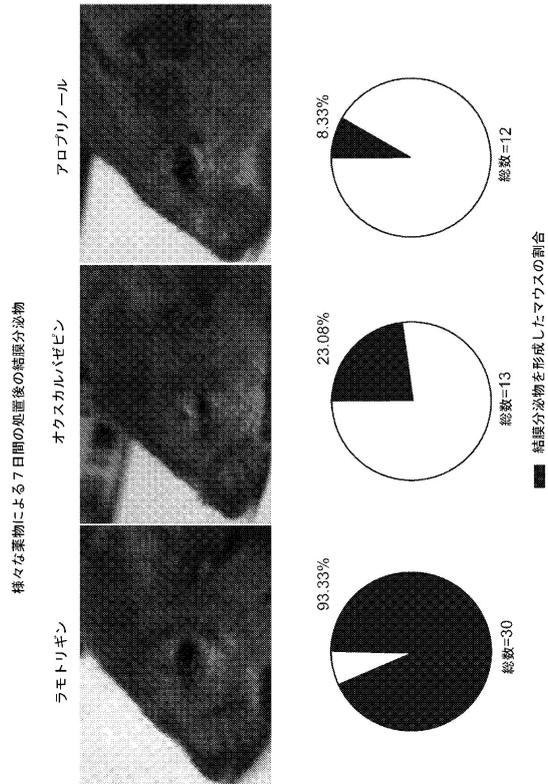
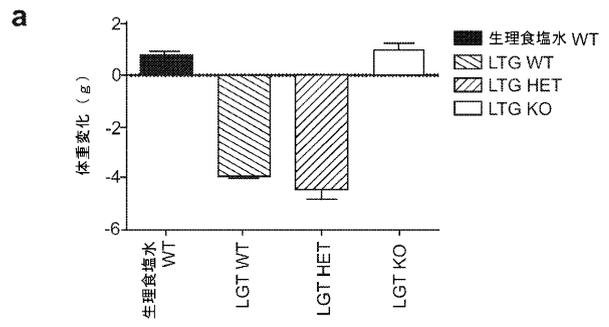


図 5

【 図 6 A 】

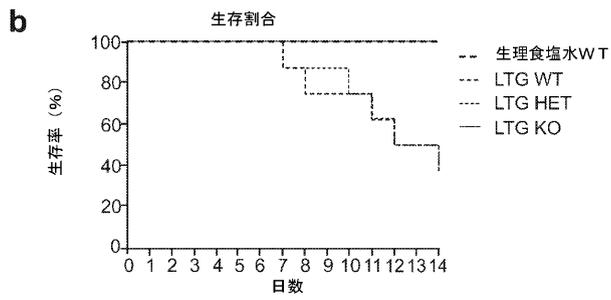
図 6



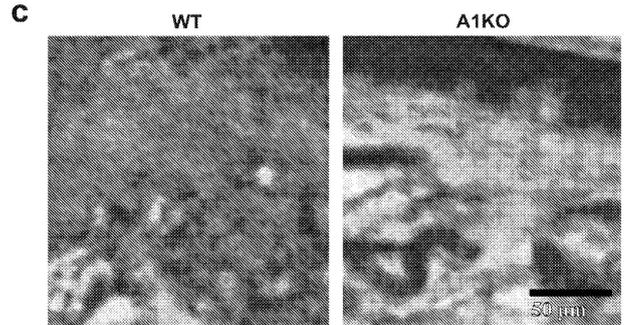
10

20

【 図 6 B 】



【 図 6 C 】

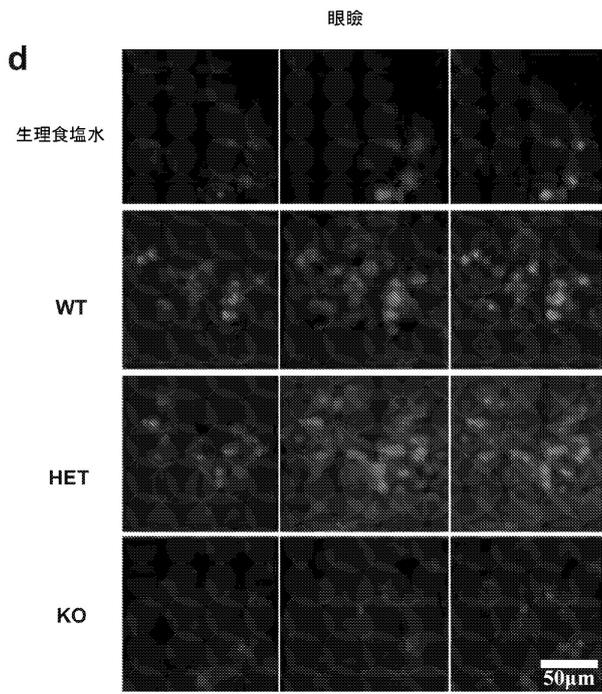


30

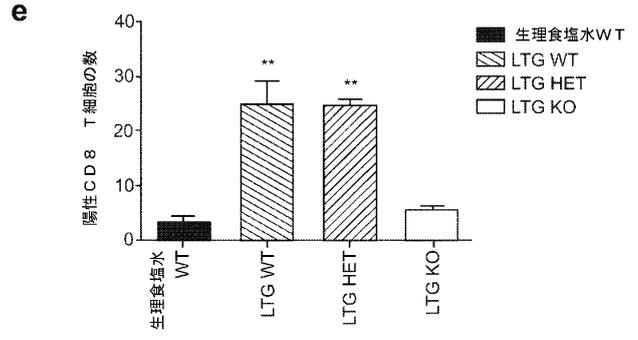
40

50

【 図 6 D 】



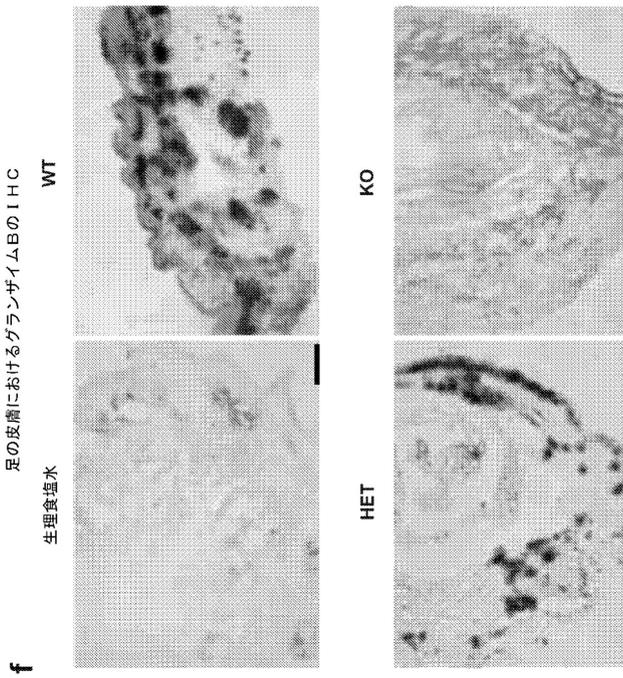
【 図 6 E 】



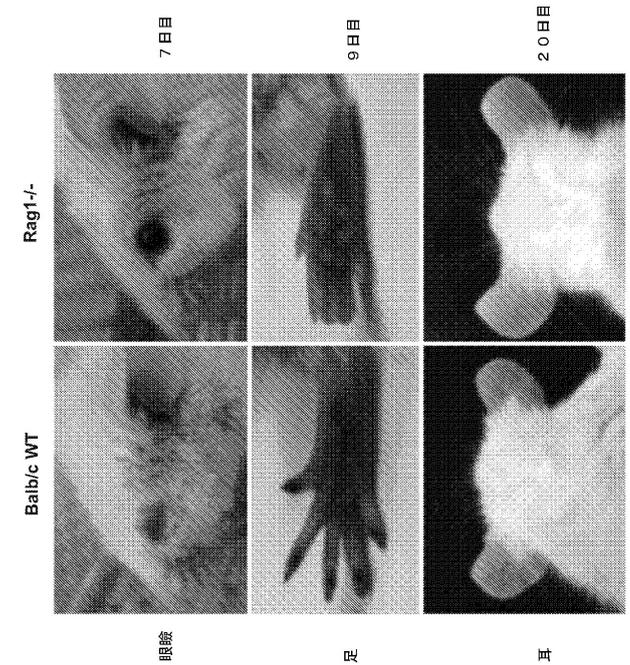
10

20

【 図 6 F 】



【 図 7 】

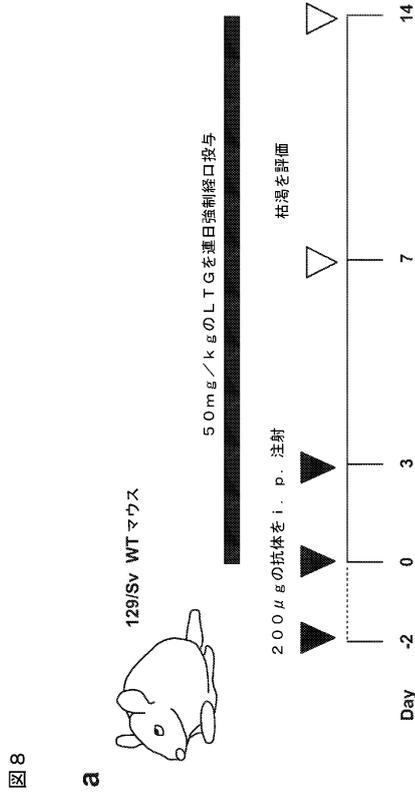


30

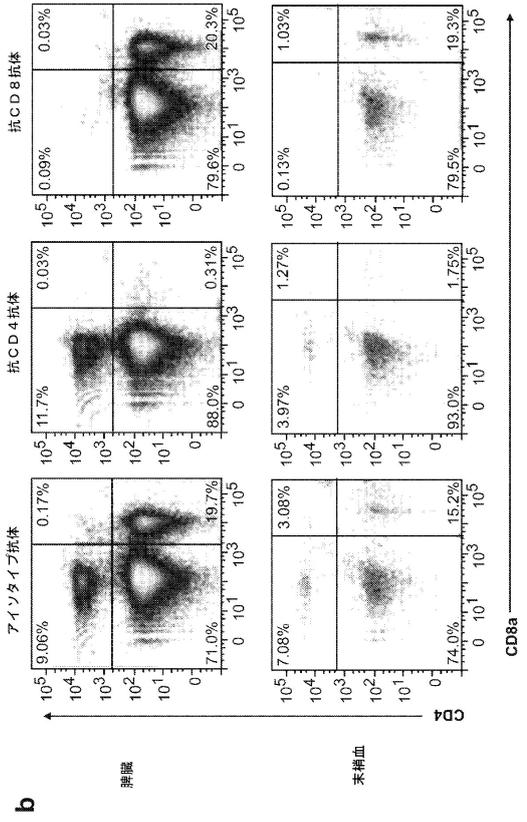
40

図 7

【 図 8 A 】



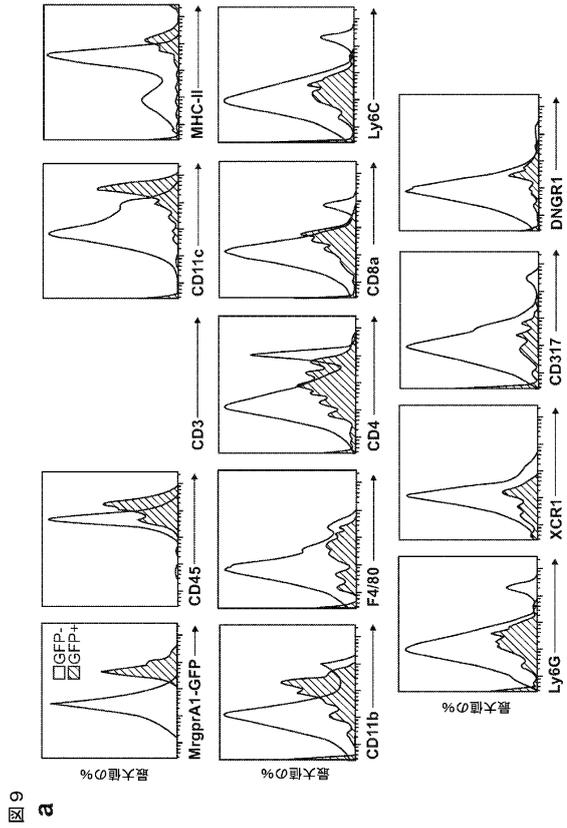
【 図 8 B 】



【 図 8 C 】



【 図 9 A 】



10

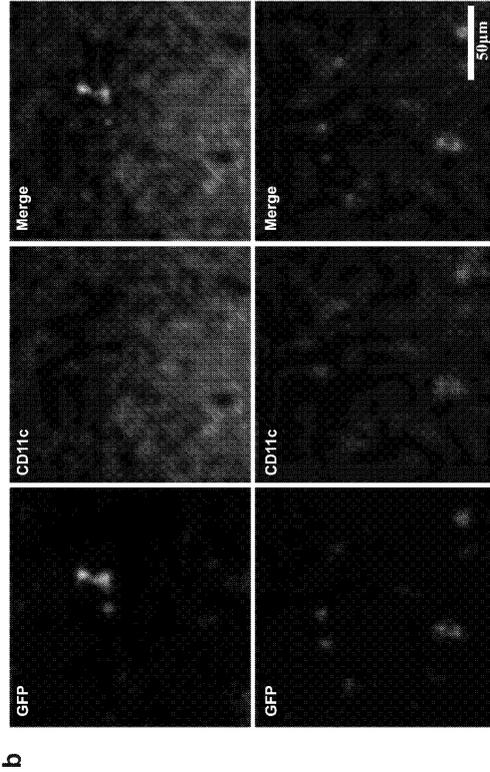
20

30

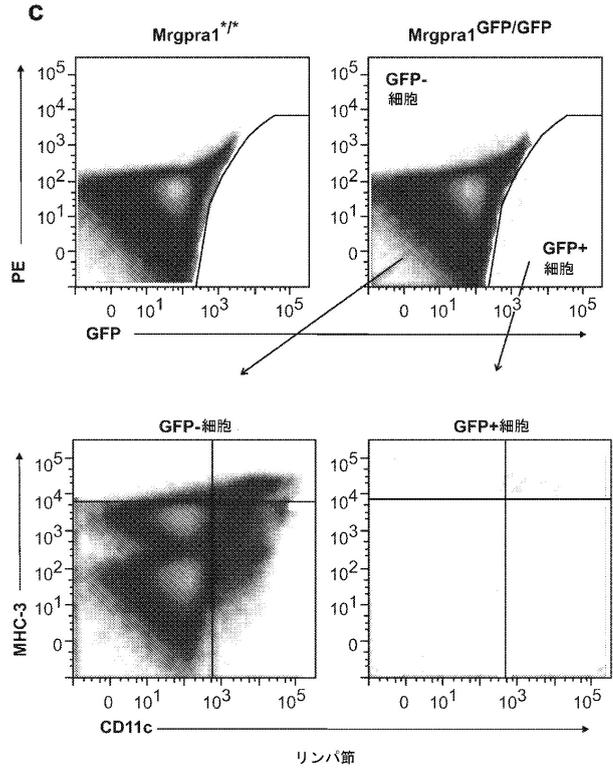
40

50

【 図 9 B 】



【 図 9 C 】



10

20

【 図 10 】

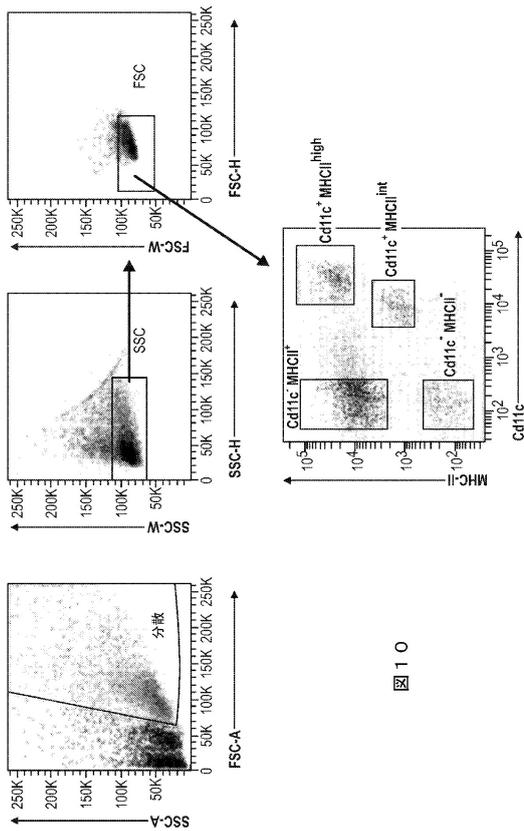


図 10

【 図 11 】

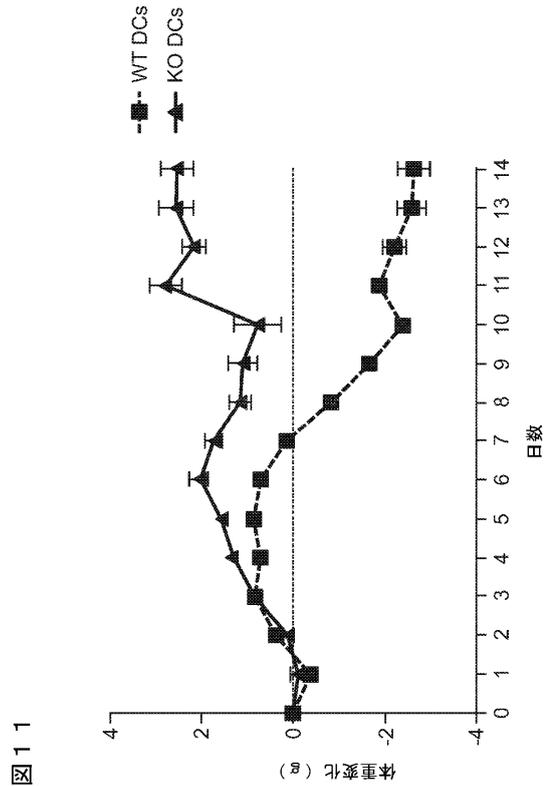


図 11

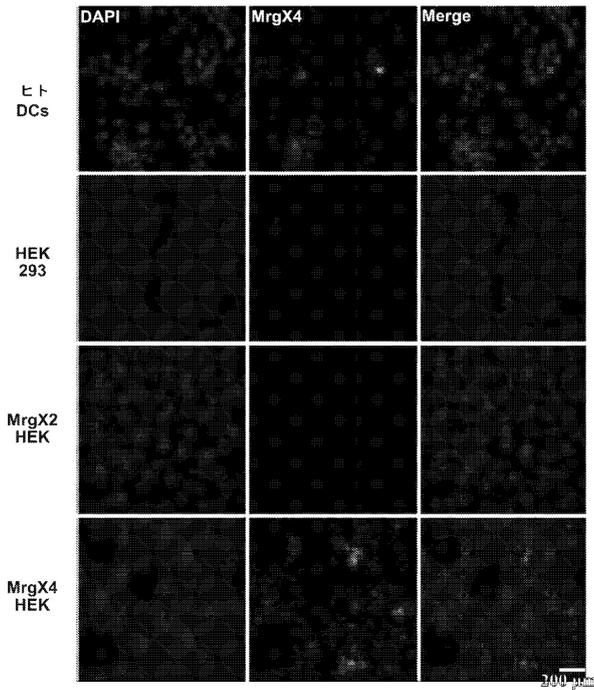
30

40

50

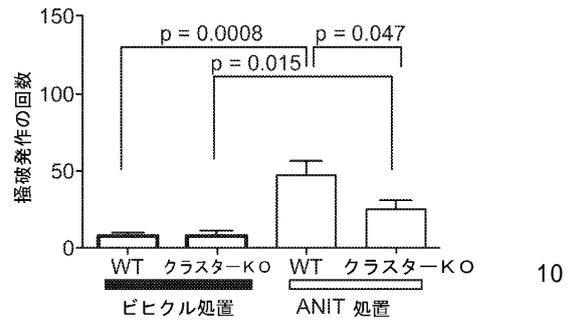
【 図 1 2 】

図 1 2



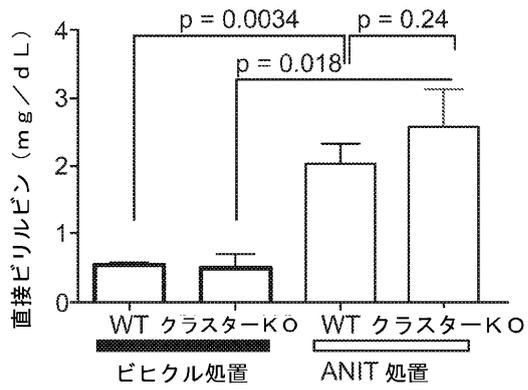
【 図 1 3 A 】

図 1 3 a



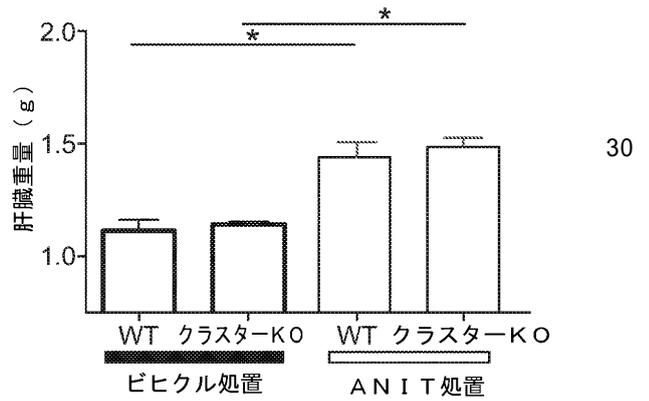
【 図 1 3 B 】

b



【 図 1 3 C 】

c



10

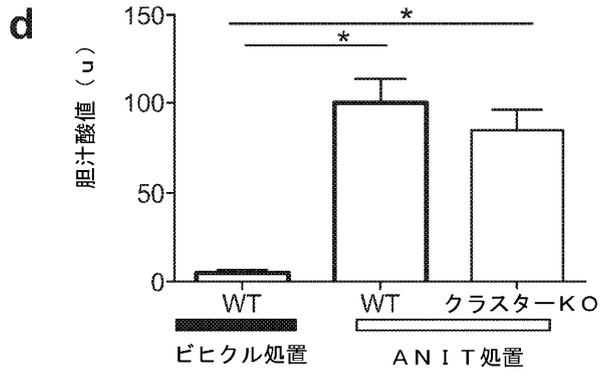
20

30

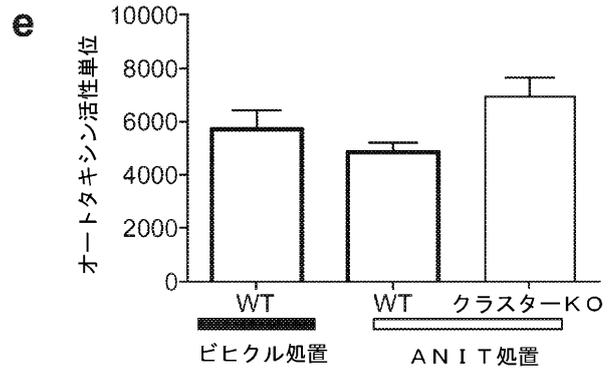
40

50

【図 1 3 D】

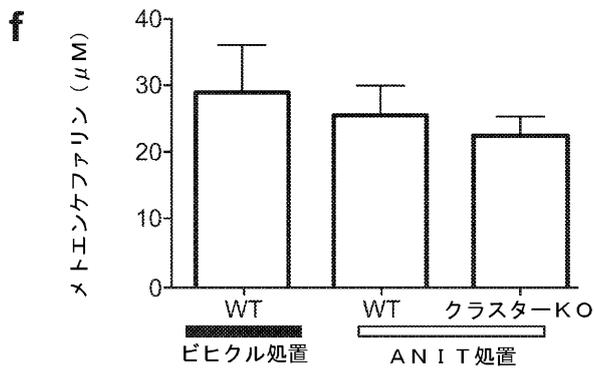


【図 1 3 E】

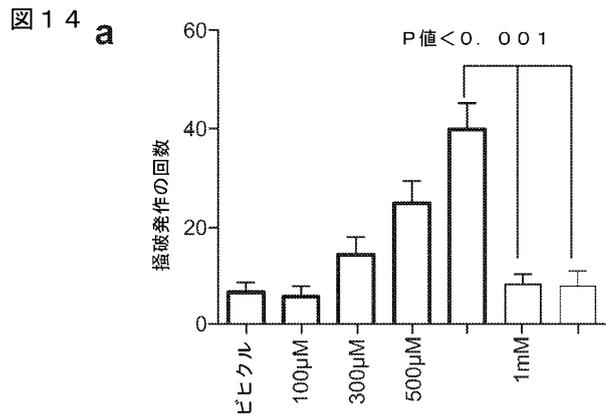


10

【図 1 3 F】



【図 1 4 A】



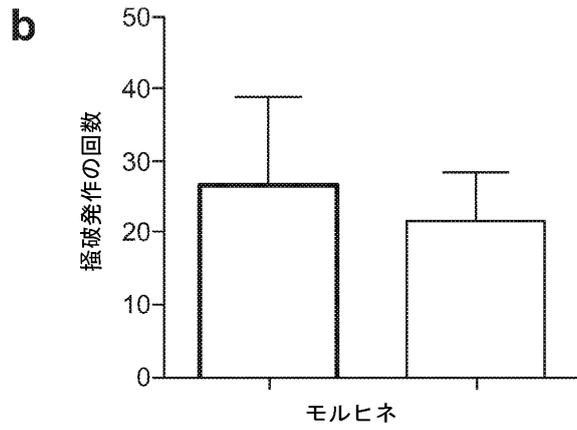
20

30

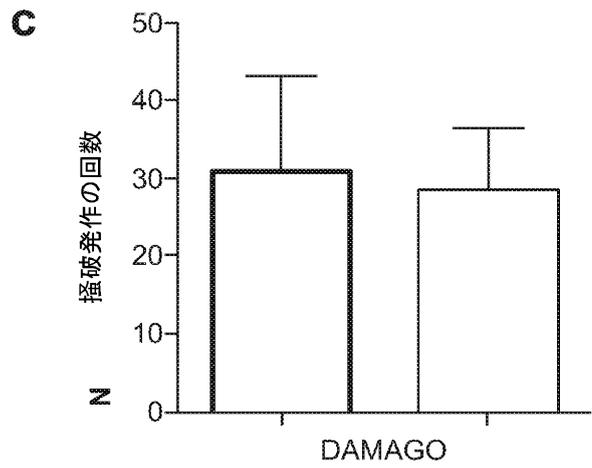
40

50

【図 1 4 B】

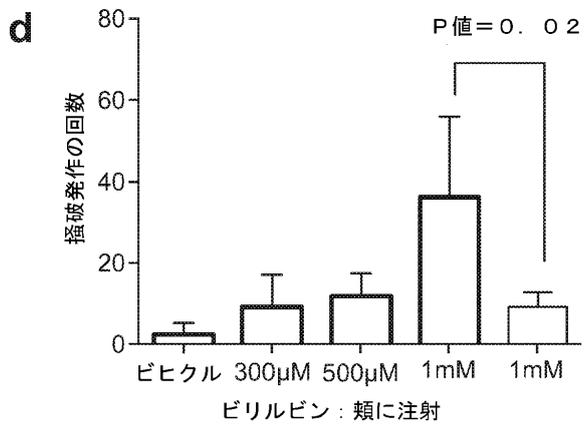


【図 1 4 C】

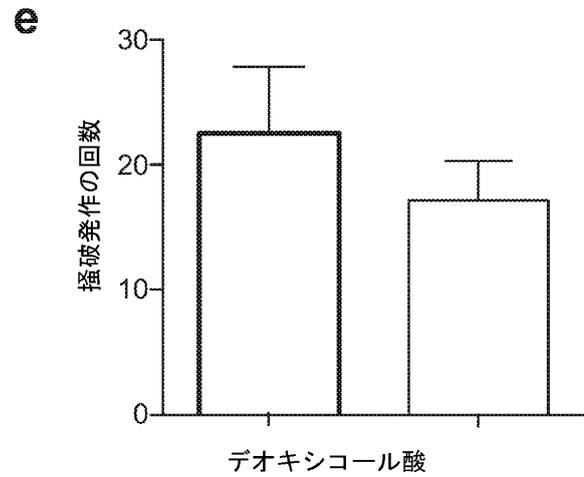


10

【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



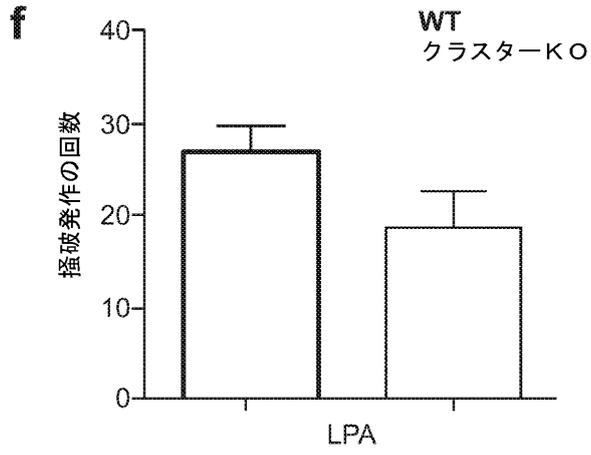
20

30

40

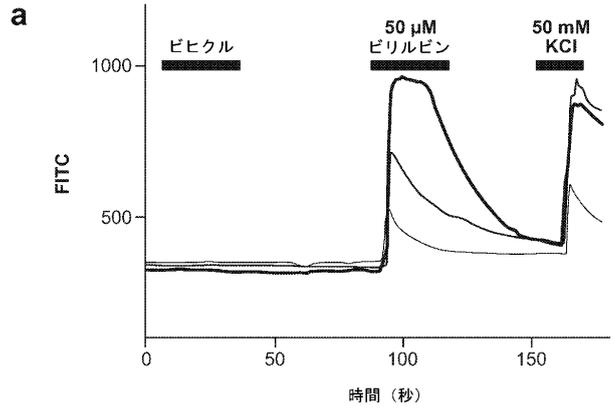
50

【 図 1 4 F 】



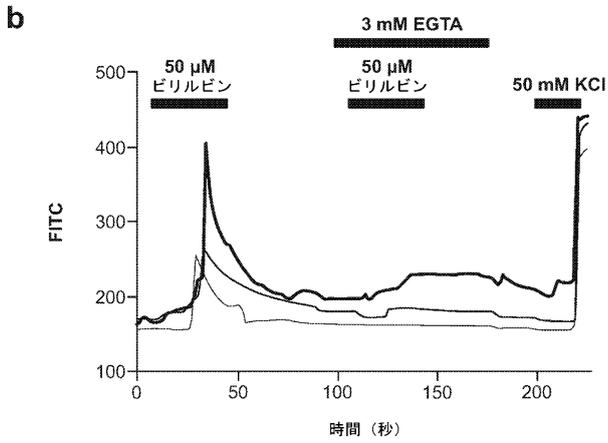
【 図 1 5 A 】

図 1 5

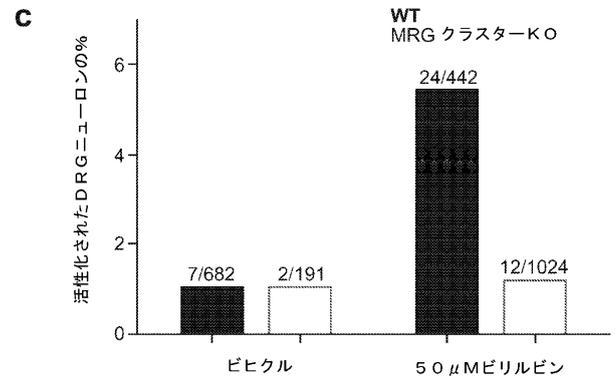


10

【 図 1 5 B 】



【 図 1 5 C 】



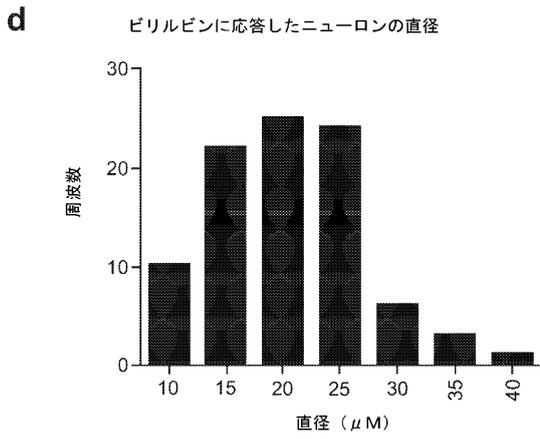
20

30

40

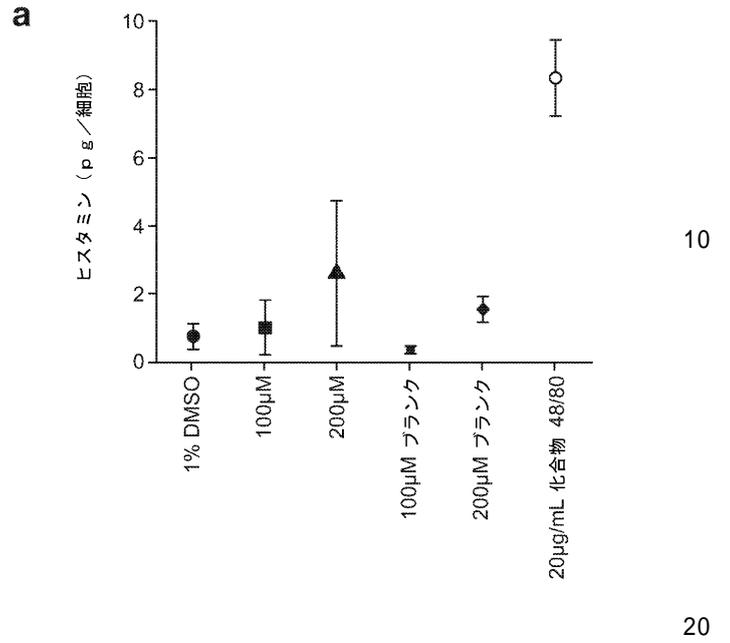
50

【 図 1 5 D 】

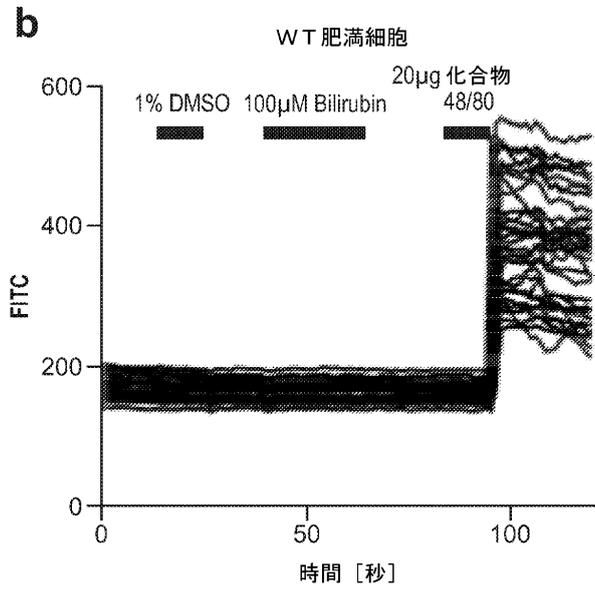


【 図 1 6 A 】

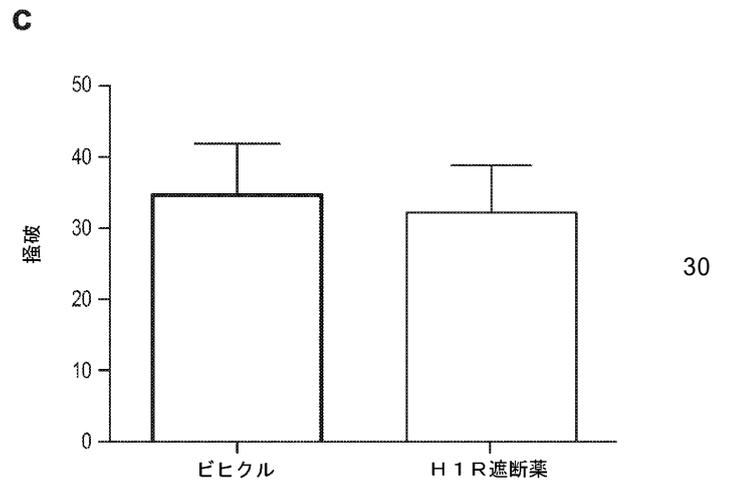
図 1 6



【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C 】

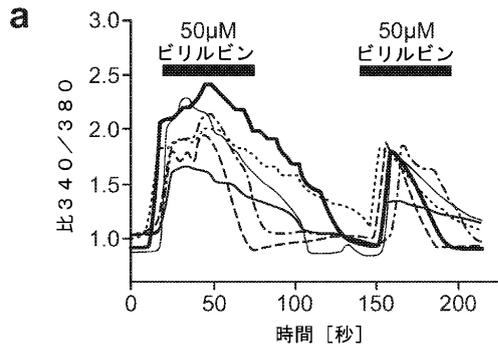


40

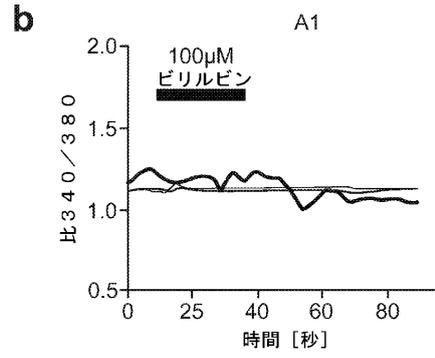
50

【図 17 A】

図 17

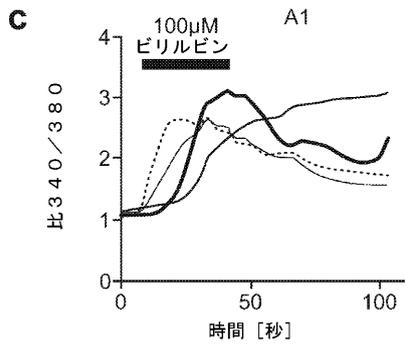


【図 17 B】

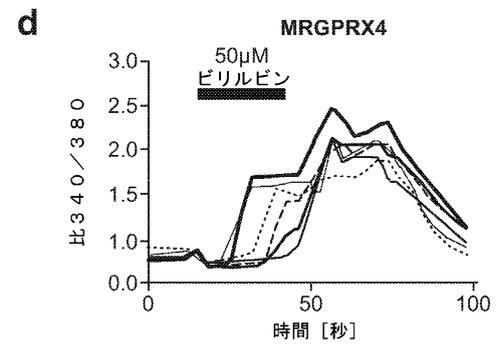


10

【図 17 C】

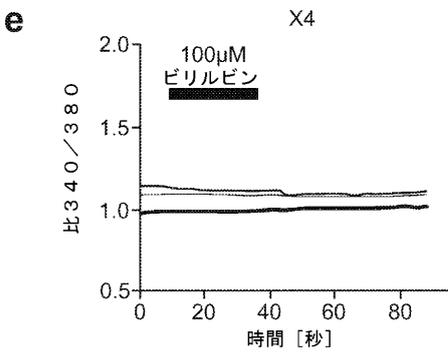


【図 17 D】

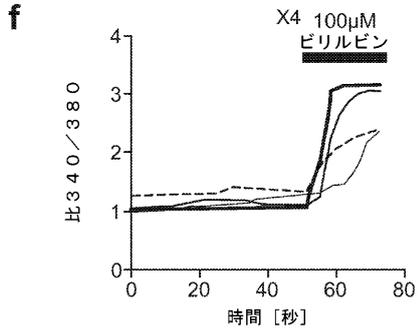


20

【図 17 E】



【図 17 F】



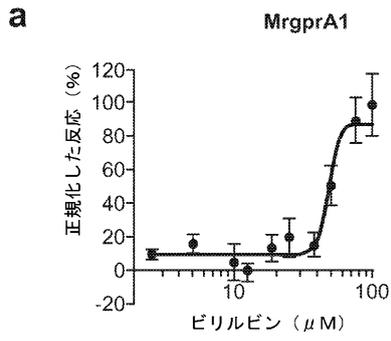
30

40

50

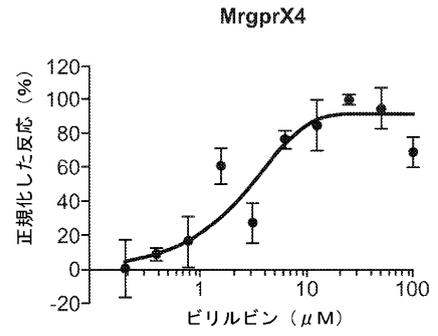
【 図 18 A 】

図 18



【 図 18 B 】

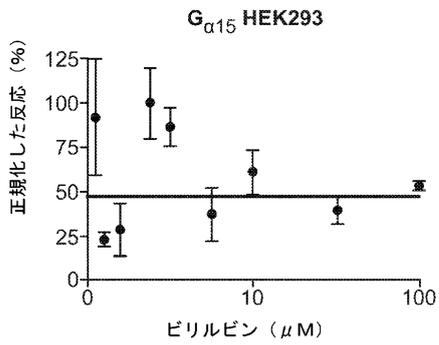
b



10

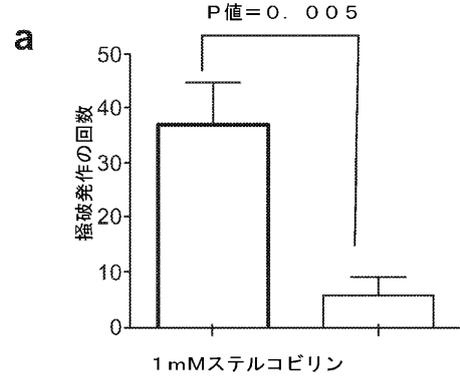
【 図 18 C 】

c



【 図 19 A 】

図 19



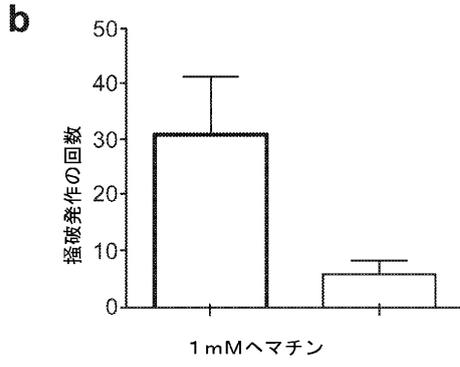
20

30

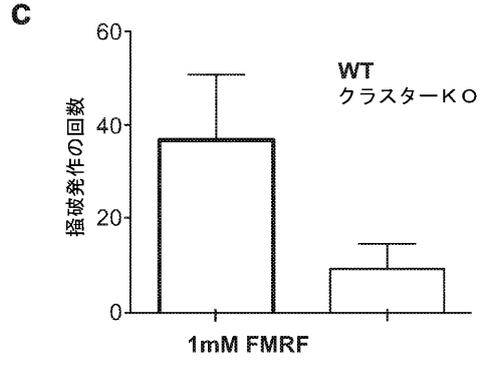
40

50

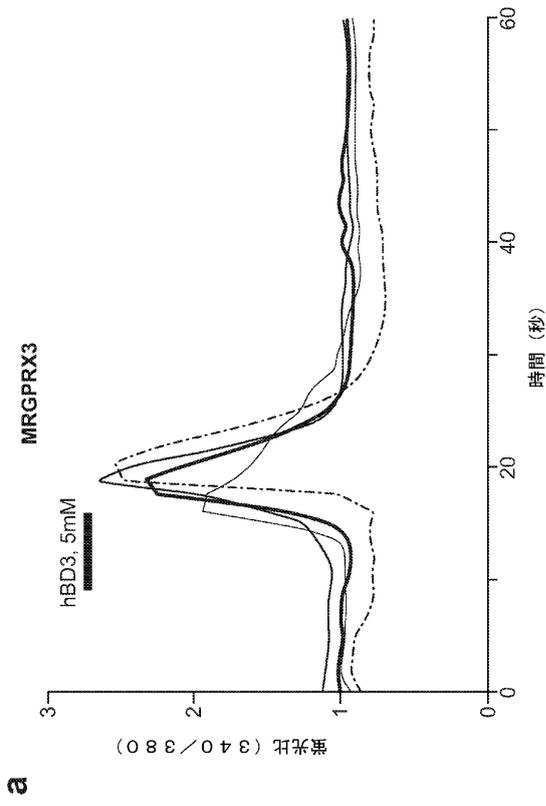
【 図 19 B 】



【 図 19 C 】



【 図 20 A 】



【 図 20 B 】

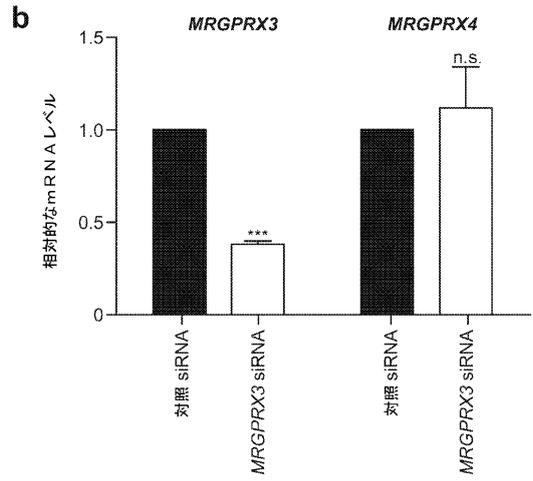


図 20

10

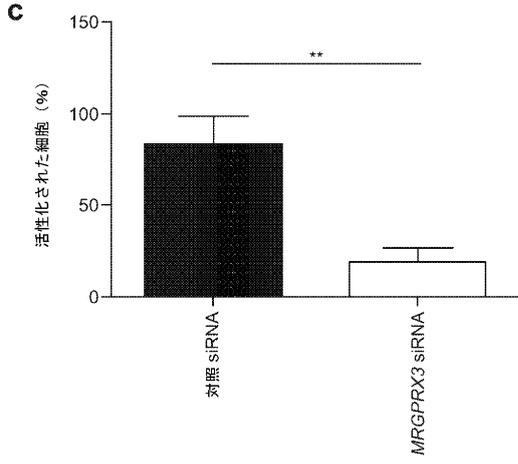
20

30

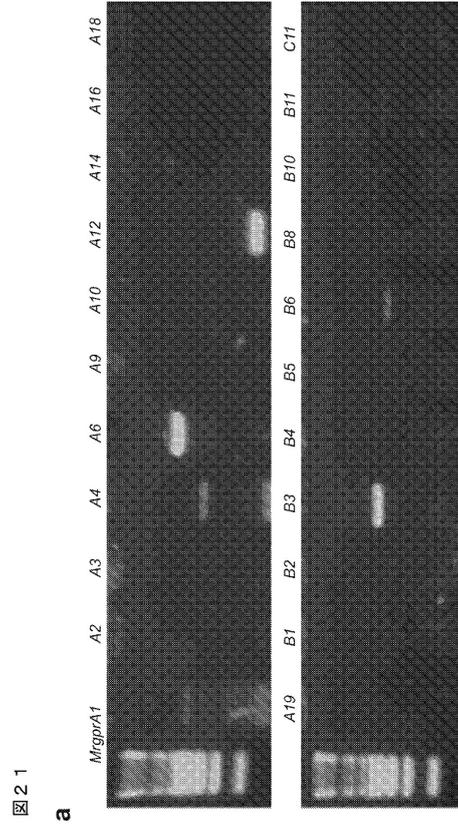
40

50

【 図 2 0 C 】



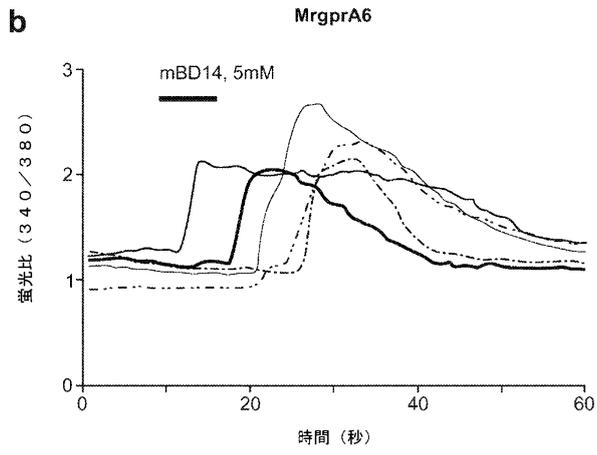
【 図 2 1 A 】



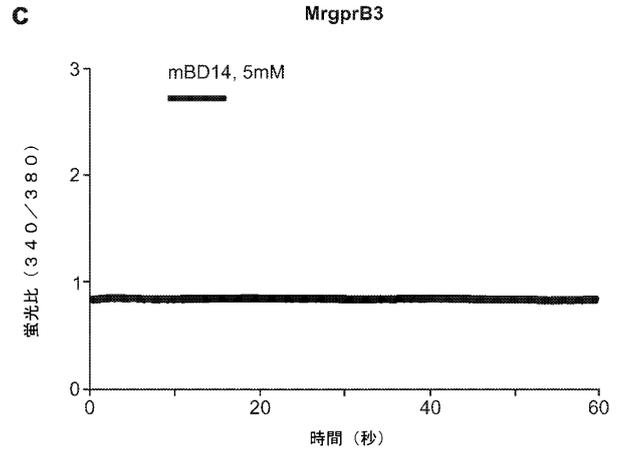
10

20

【 図 2 1 B 】



【 図 2 1 C 】

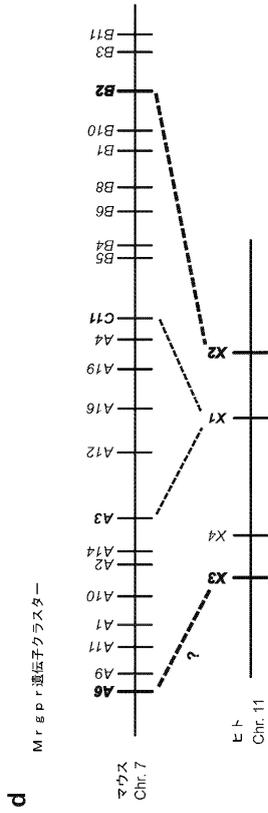


30

40

50

【 図 2 1 D 】



【 図 2 2 】

	ヘマチン (100mM)	ビリルビン 100μM	ビリルビン 50μM	スチロコピリン 1mM	クロロキノゲン 1mM	複合型 ビリルビン 1mM	チオキシン コービル酸 100μM	キルヒネ 1.75mM	DAMGO 1mM
mrgprA1	+ 40-50%	-	+ 40-50%	+ 60-70%	*	+ 15-20%	<1%	-	<1%
mrgprA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRGPRX1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRGPRX4	-	+ 10-15%	+ >80%	+ 40-50%	+ 60-70%	+ 50-80%	+ >80%	-	-

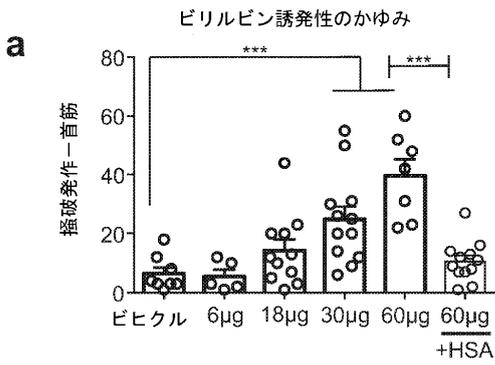
図 2 2

10

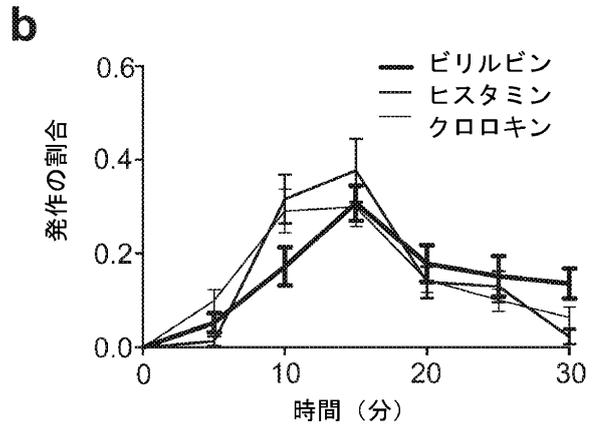
20

【 図 2 3 A 】

図 2 3



【 図 2 3 B 】



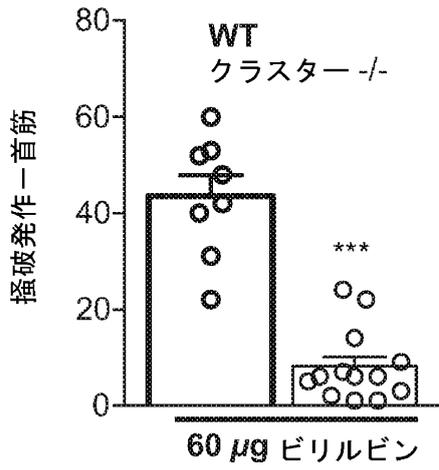
30

40

50

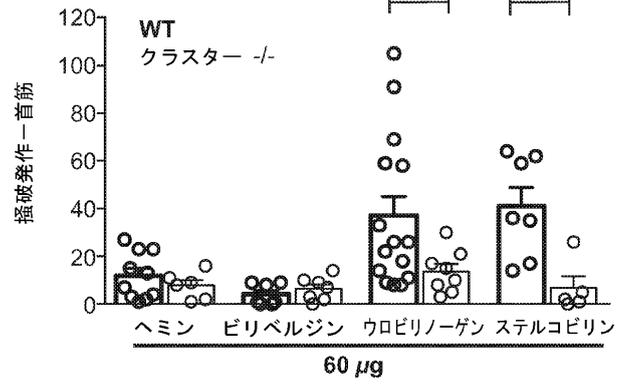
【図 2 3 C】

C

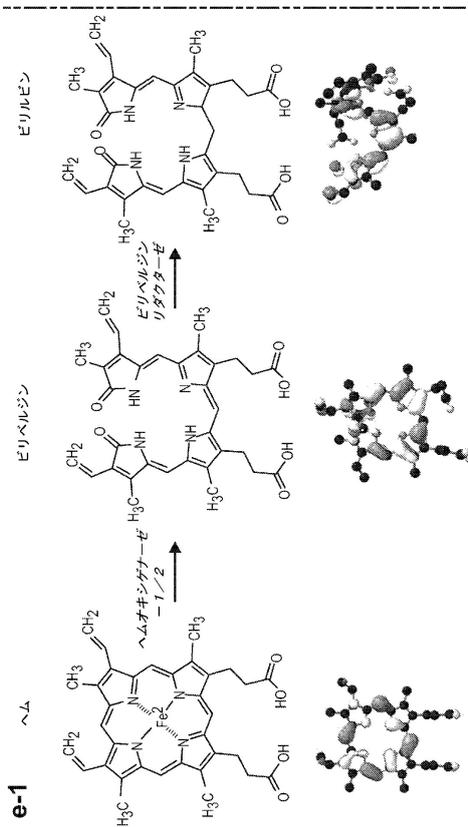


【図 2 3 D】

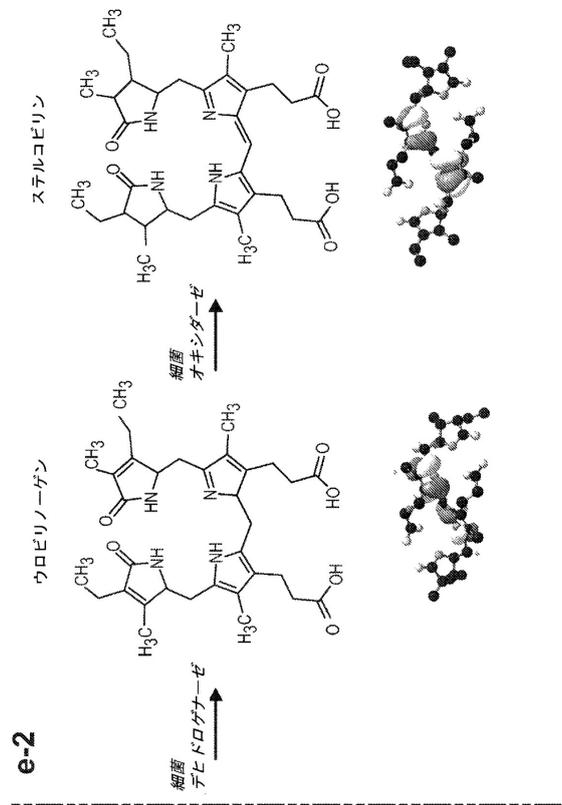
d



【図 2 3 E - 1】



【図 2 3 E - 2】



10

20

30

40

50

【 図 2 4 - 1 】

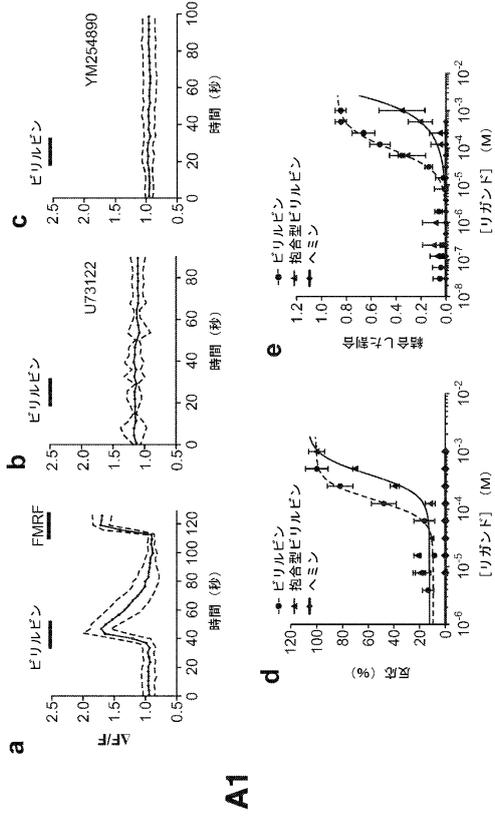


図 24A - 24E

A1

【 図 2 4 - 2 】

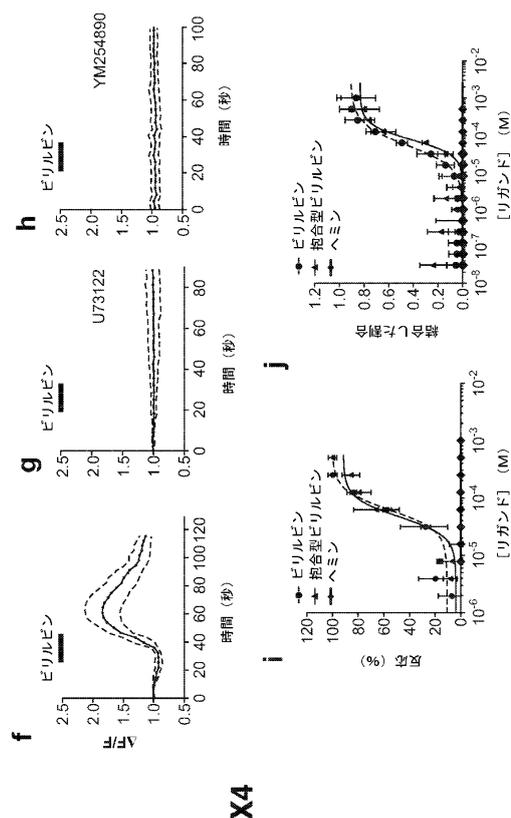


図 24F - 24J

X4

【 図 2 4 - 3 】

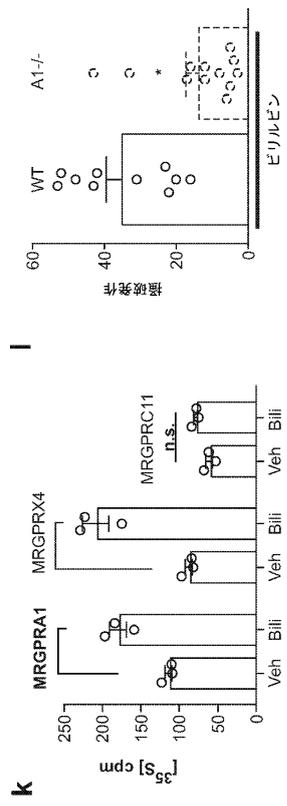


図 24K - 24L

【 図 2 4 - 4 】

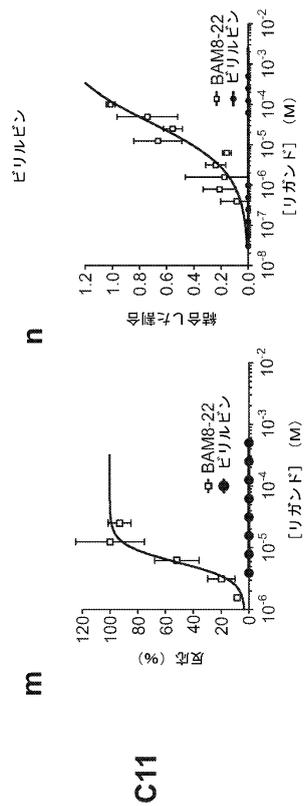


図 24M - 24N

C11

10

20

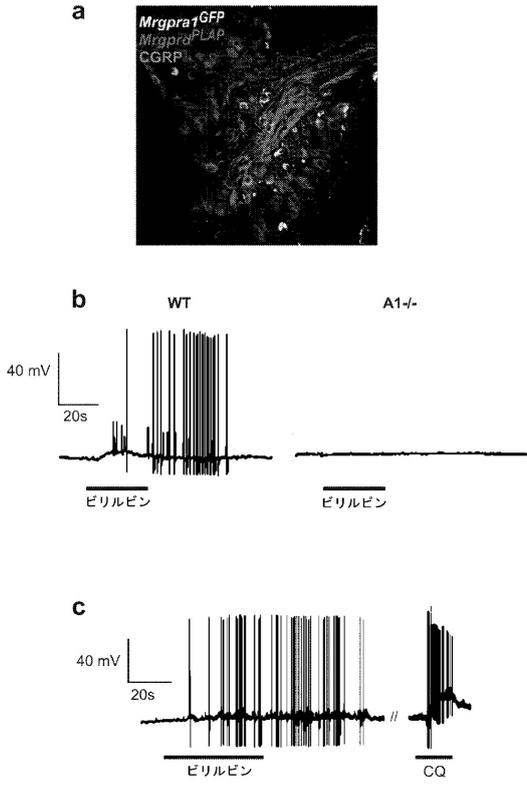
30

40

50

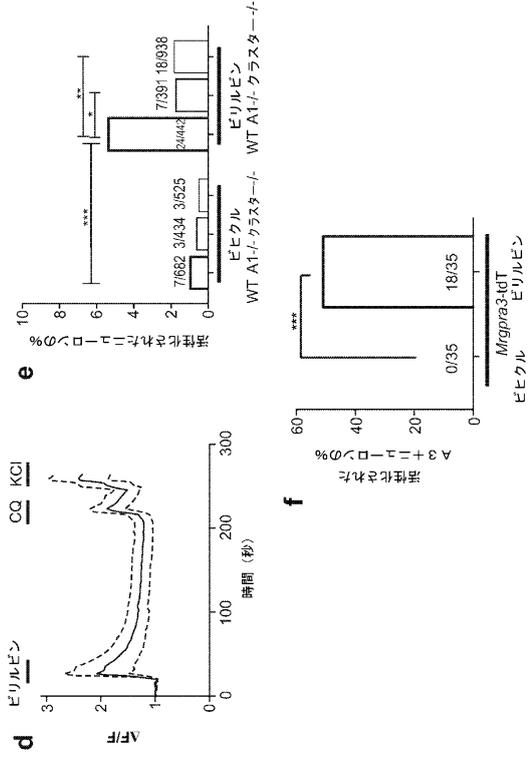
【 図 2 5 - 1 】

図 25A - 25C



【 図 2 5 - 2 】

図 25D - 25F

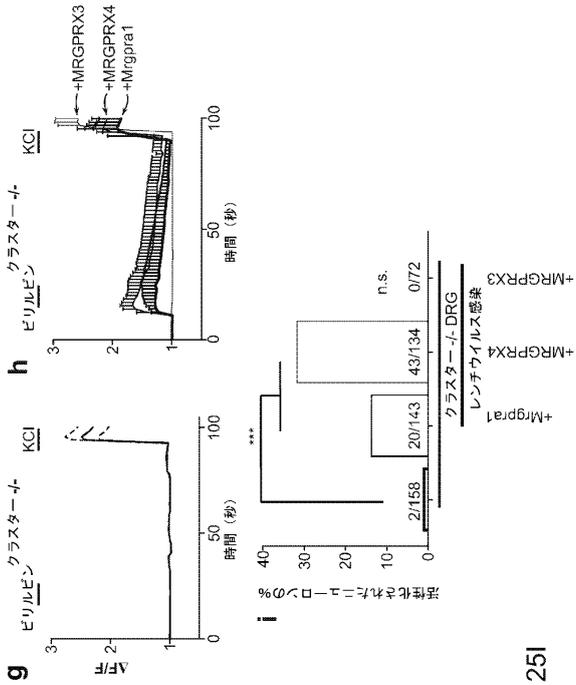


10

20

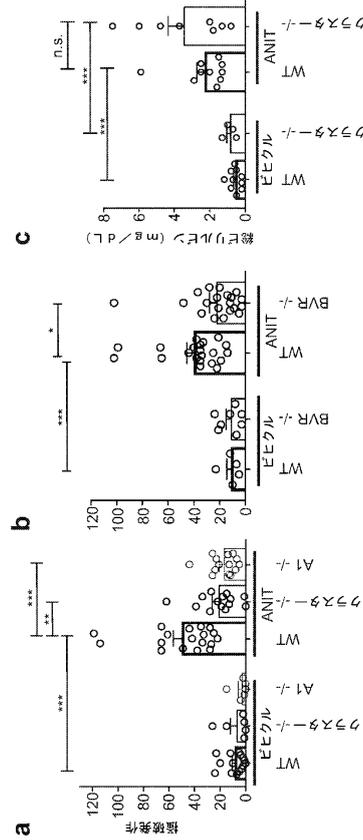
【 図 2 5 - 3 】

図 25G - 25I



【 図 2 6 - 1 】

図 26A - 26C



30

40

50

【図 26 - 2】

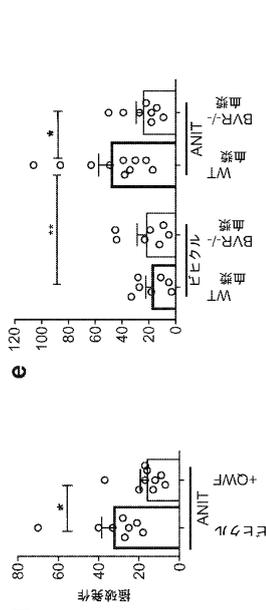


図 26D - 26F

患者 I D	年齢	性別	肝疾患の病因	総ビリルビン (μM)	アルブミン (g/dL)	総タンパク質 (g/dL)	クレアチニン (mg/dL)	胆汁酸の存在
1	28	M	PSC	185	1.9	6.1	0.5	有
2	52	F	慢性胆汁性肝硬変	80	3.4	6.3	0.7	有
3	56	M	移植/胆道狭窄	41	3.9	7	1.3	無
4	43	F	PBC	68	2.5	6.2	0.8	有

f

【図 26 - 3】

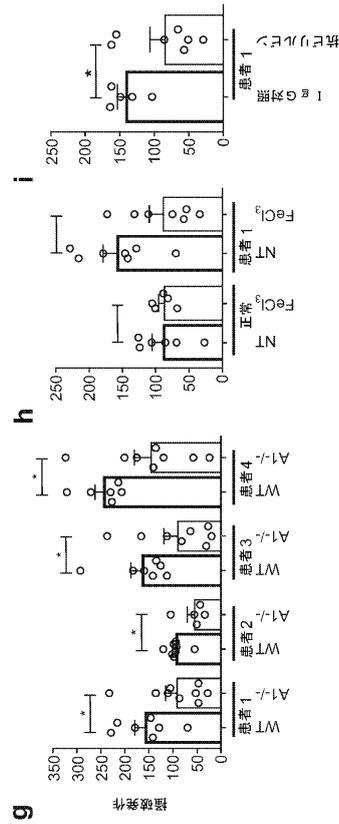


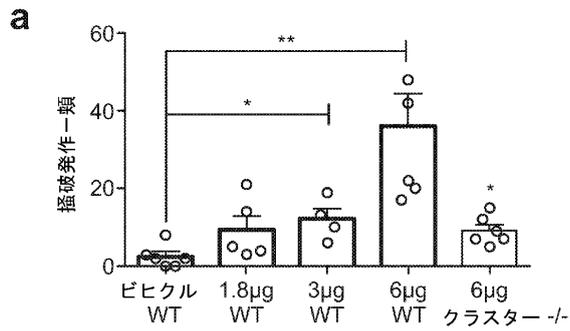
図 26G - 26I

10

20

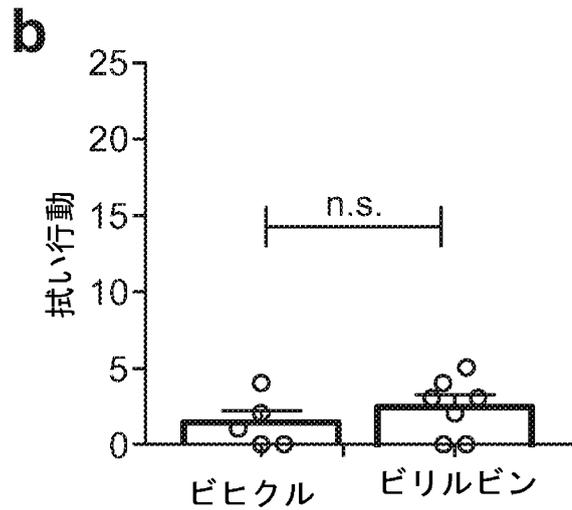
【図 27 A】

図 27



a

【図 27 B】



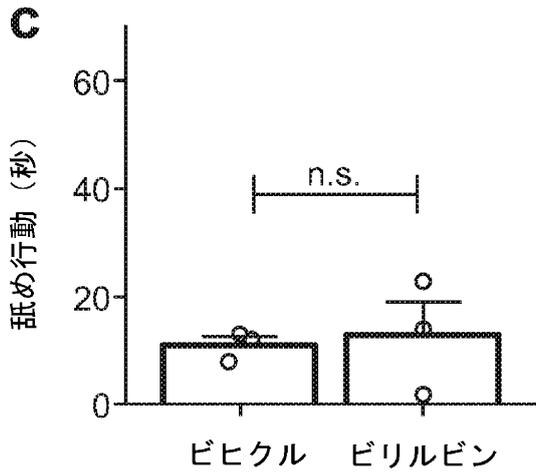
b

30

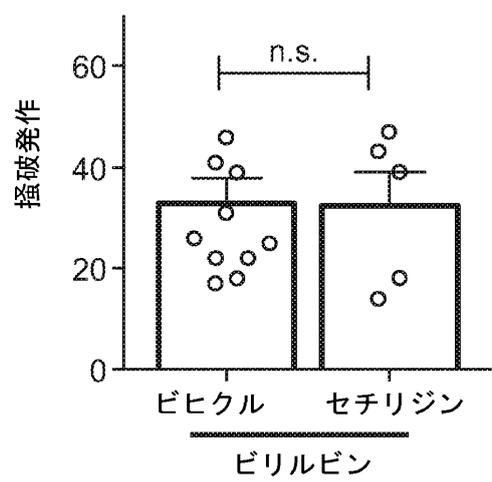
40

50

【図 27 C】

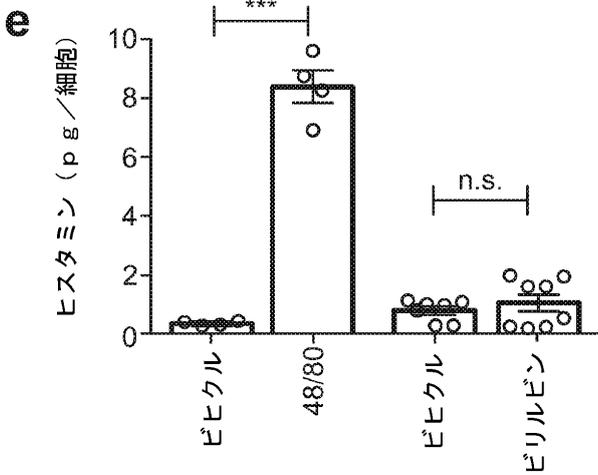


【図 27 D】

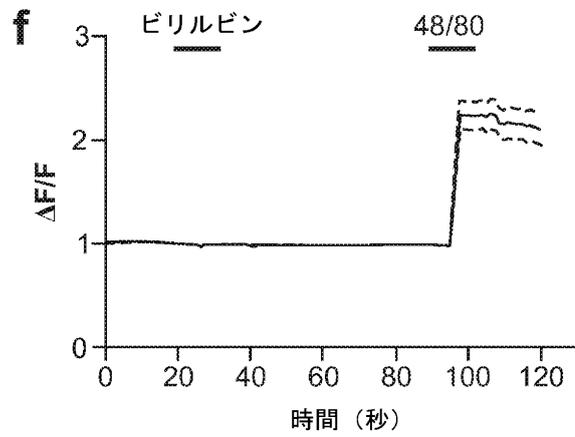


10

【図 27 E】



【図 27 F】



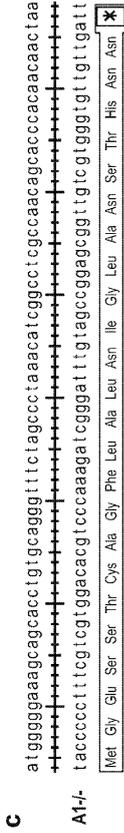
20

30

40

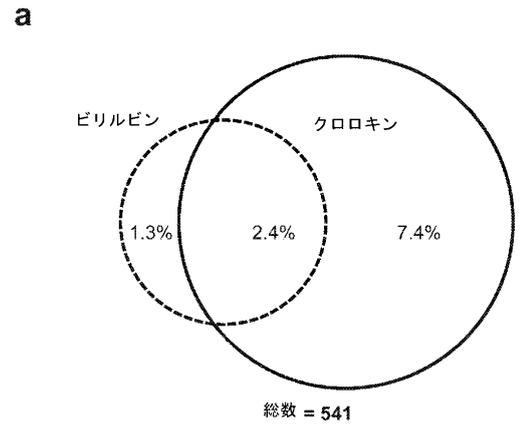
50

【 図 2 9 C 】



【 図 3 0 A 】

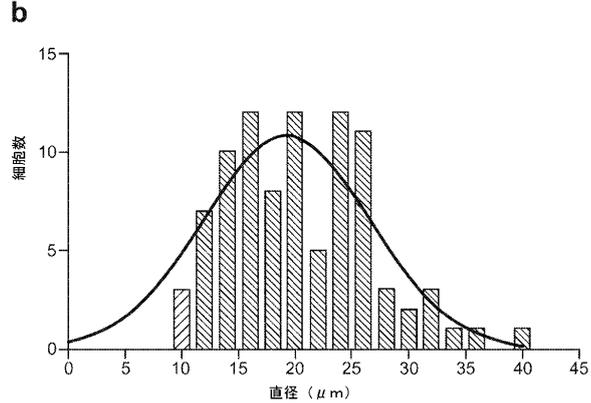
図 3 0



10

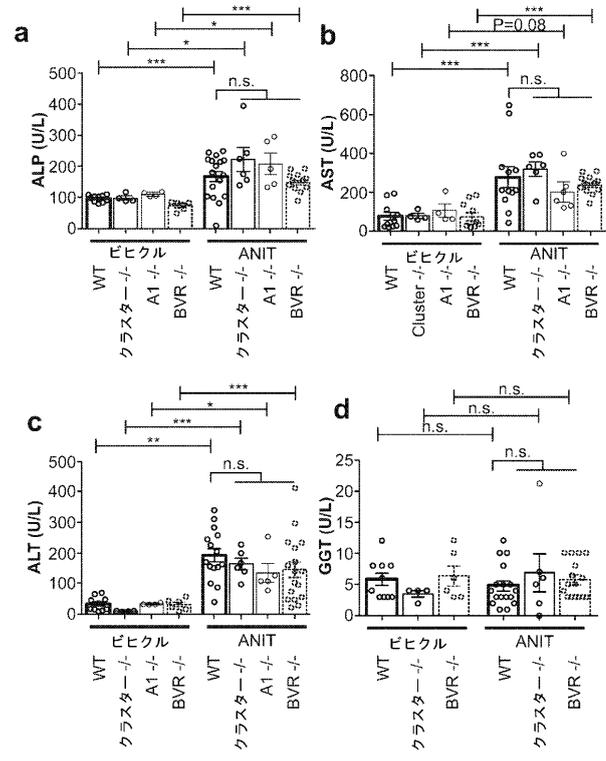
20

【 図 3 0 B 】



【 図 3 1 - 1 】

図 31A - 31D

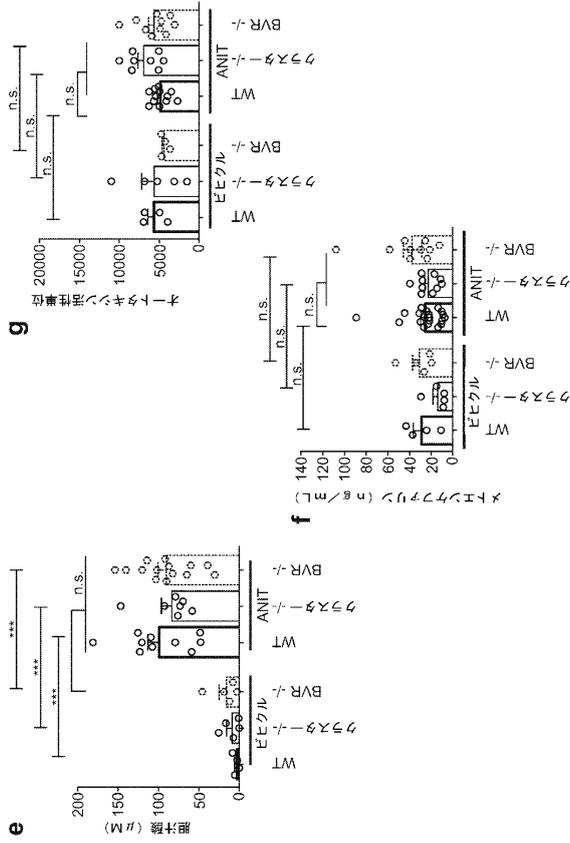


30

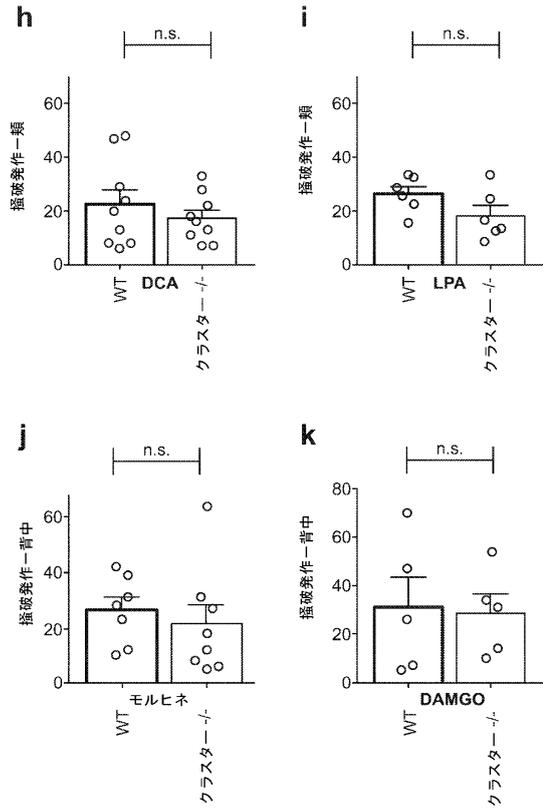
40

50

【 図 3 1 - 2 】



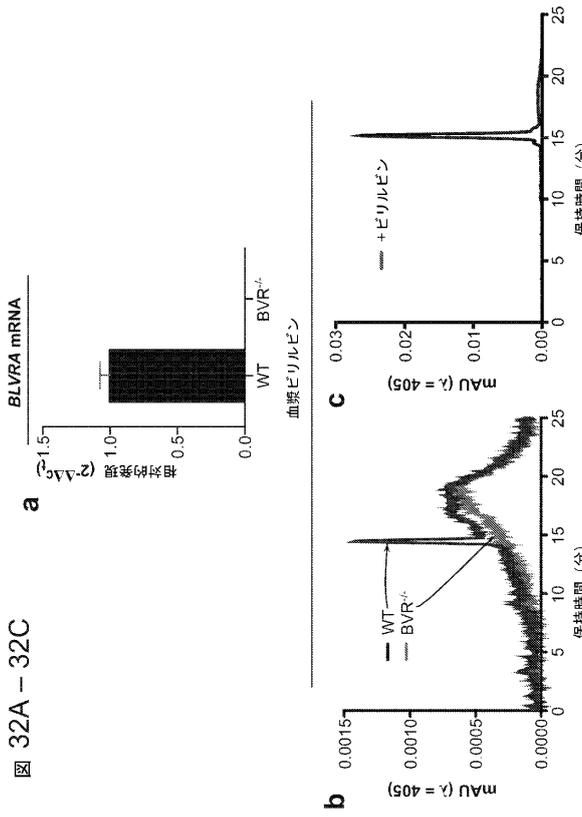
【 図 3 1 - 3 】



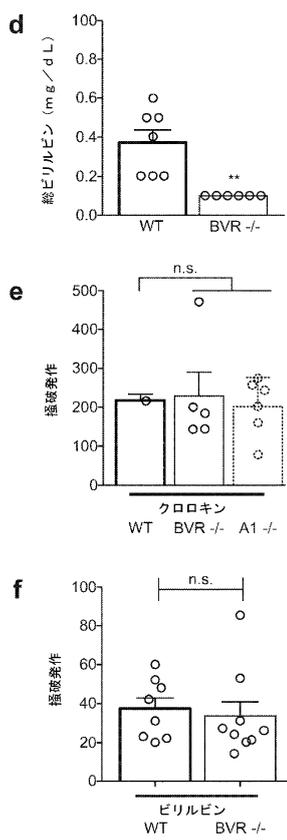
10

20

【 図 3 2 - 1 】



【 図 3 2 - 2 】



30

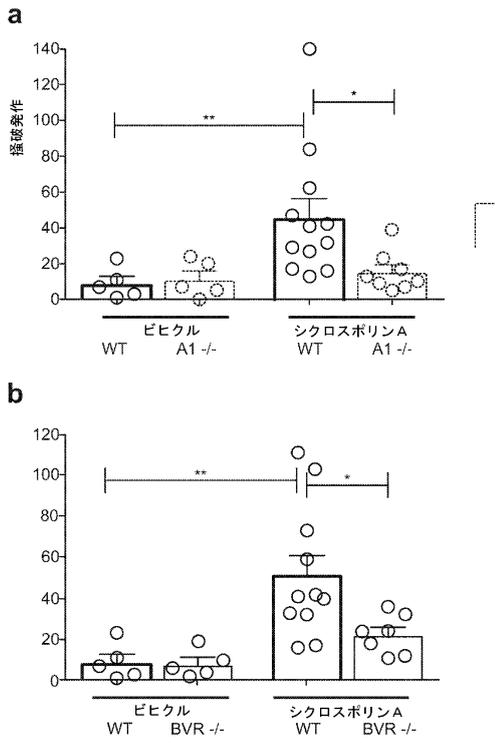
40

図 32A - 32C

50

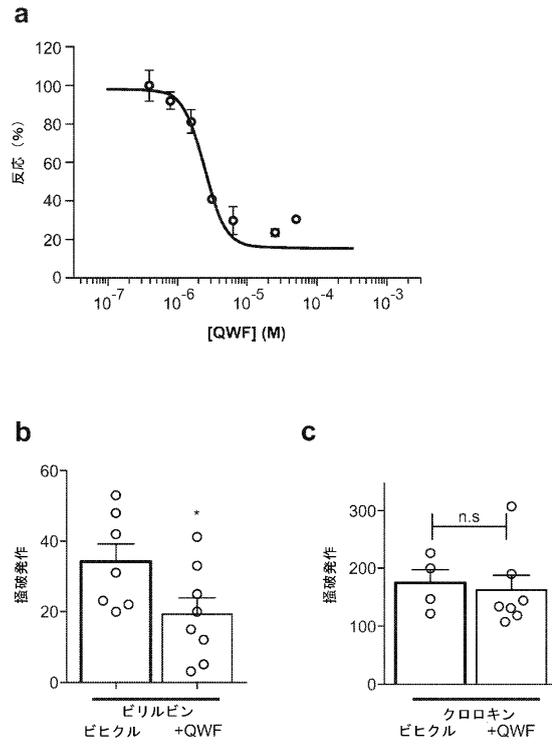
【 図 3 3 】

図 33A - 33B



【 図 3 4 - 1 】

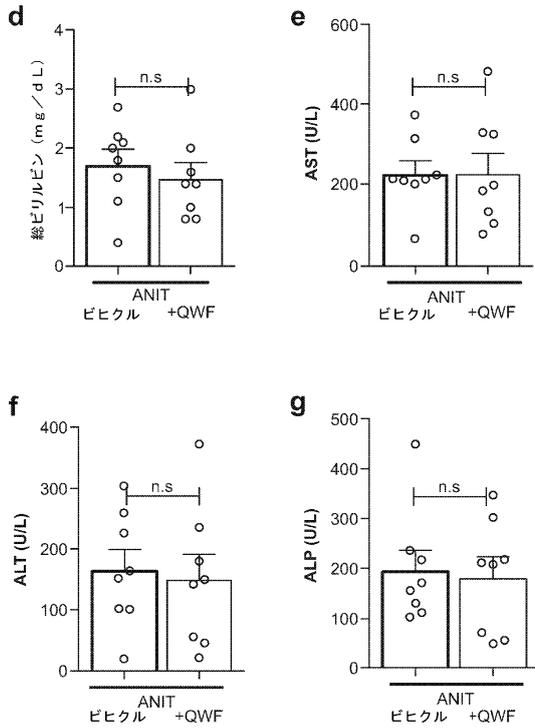
図 34A - 34C



10

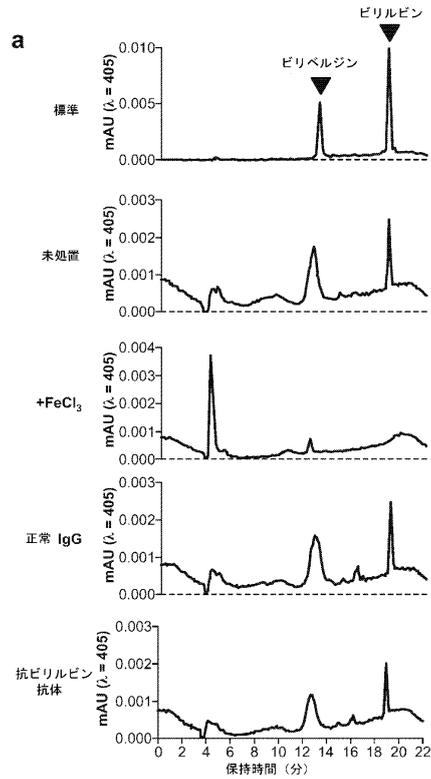
20

【 図 3 4 - 2 】



【 図 3 5 A 】

図 3 5

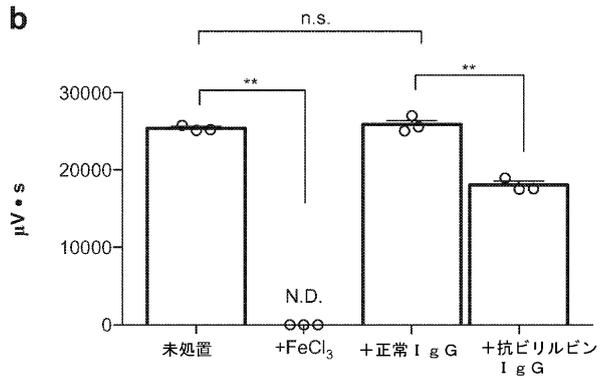


30

40

50

【 図 3 5 B 】



10

【 配列表 】

2023156323000001.xml

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年8月15日(2023.8.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

有効量の小分子M r g p r X 4アンタゴニストを含む、慢性的なかゆみ症状を治療するための医薬組成物。 10

【請求項2】

前記慢性的なかゆみ症状が掻痒症である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記慢性的なかゆみ症状が、胆汁うっ滞性掻痒症である、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

慢性的なかゆみ症状の治療薬の製造における小分子M r g p r X 4アンタゴニストの使用

【請求項5】 20

前記慢性的なかゆみ症状が掻痒症である、請求項4に記載の使用。

【請求項6】

前記慢性的なかゆみ症状が胆汁うっ滞性掻痒症である、請求項4または5に記載の使用。

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/15	Z

- (72)発明者 ヴァサダ, チラグ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0
- (72)発明者 スナイダー, ソロモン エイチ.
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0
- (72)発明者 メイション, ジェームズ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0
- (72)発明者 チェン, インイン
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0
- (72)発明者 リンジャンヤウオン, ナタチット
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0
- (72)発明者 ドン, シントン
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 5 , ボルチモア, アッシュランド アベニュー 1 8
1 2 スイート 1 1 0