

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2021年7月1日(01.07.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/132691 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)  
A61K 31/192 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
A61K 31/197 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 31/198 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
A61K 31/455 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
A61K 31/616 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/049031

(22) 国際出願日: 2020年12月25日(25.12.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2019-239834 2019年12月27日(27.12.2019) JP

(71) 出願人: K A G A M I 株式会社(KAGAMI INC.)  
[JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7

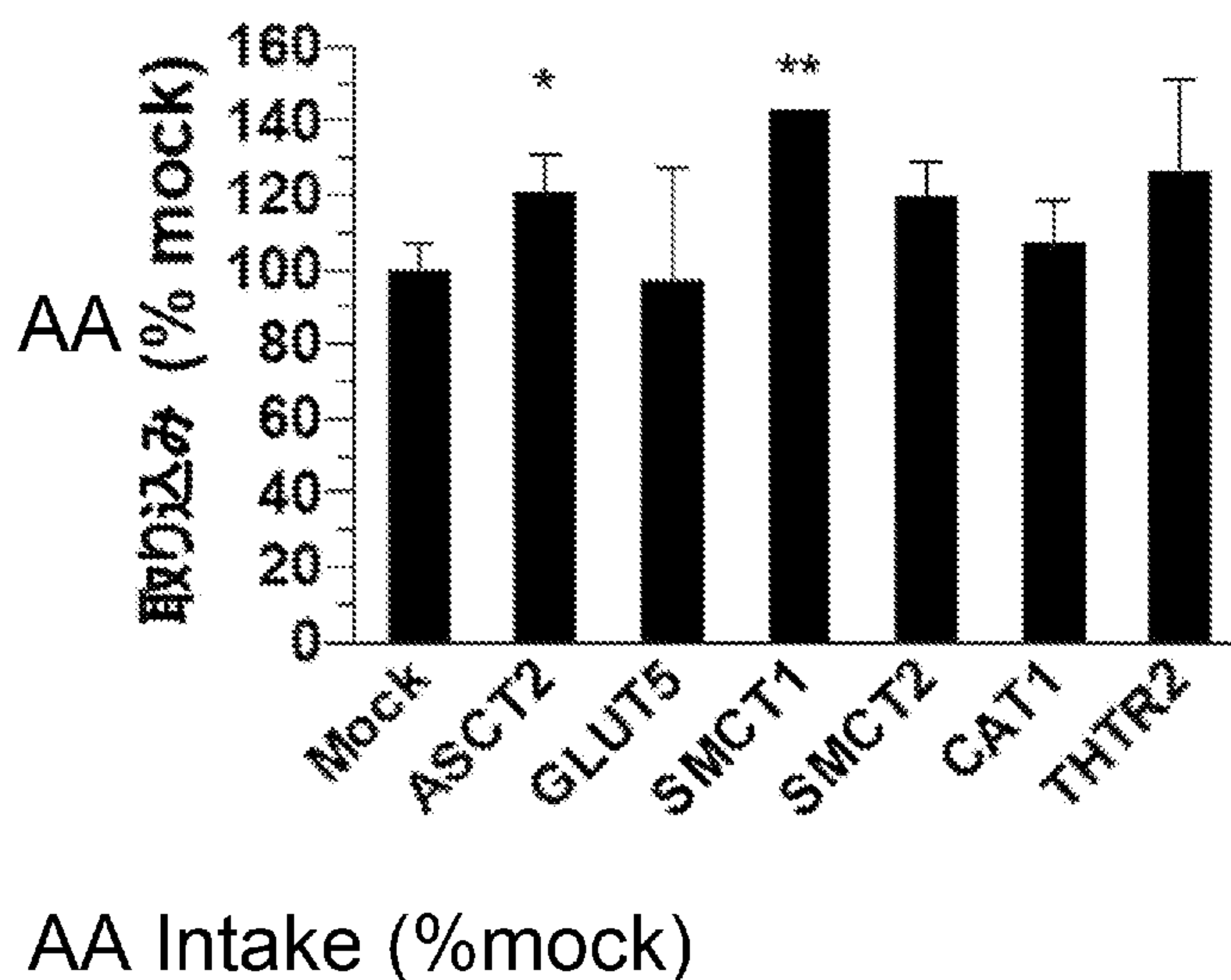
丁目 7 番 1 5 号 Osaka (JP). 公立大学法人奈良  
県立医科大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPO-  
RATION NARA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/  
JP]; 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0  
Nara (JP). 国立研究開発法人医薬基盤・健  
康・栄養研究所(NATIONAL INSTITUTES OF  
BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND  
NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市  
彩都あさぎ 7 丁目 6 番 8 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 三田 真史(MITA, Masashi); 〒5670085  
大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 1 5 号  
K A G A M I 株式会社内 Osaka (JP). 鈴木 理  
香子(SUZUKI, Rikako); 〒1040061 東京都中央  
区銀座 7 丁目 5 番 5 号 株式会社資生堂内  
Tokyo (JP). 永森 收志(NAGAMORI, Shushi);  
〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大  
学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP). ウィ  
リヤサムクン パッタマ(WIRIYASERMKUL,

(54) Title: D-SERINE TRANSPORT MODIFIER AND SCREENING METHOD THEREOF, AND SCREENING METHOD OF D-SERINE TRANSPORTER PROTEIN

(54) 発明の名称: D-セリン輸送調節剤及びそのスクリーニング方法、並びにD-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法

〔図18〕



(57) Abstract: The present invention provides a D-serine transport modifier which is characterized by controlling the transport of D-serine into and out of cells by a D-serine transporter protein, a pharmaceutical composition which comprises the same as an active component and treats or prevents diseases relating to an increase or decrease in the amount of D-serine, and a screening method of substances that control the transport of D-serine. The present invention also provides a screening method of a D-serine transporter protein.

**Pattama**); 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4  
0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP).  
コンプラシャ ポーンパン (**KONGPRACHA, Pornparn**); 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4  
0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP).  
森山 理美 (**MORIYAMA, Satomi**); 〒6348521 奈良県橿原市四条町 8 4 0 公立大学法人奈良県立医科大学内 Nara (JP). 木村 友則 (**KIMURA, Tomonori**); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 6 番 8 号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 青 木 篤, 外 (**AOKI, Atsushi et al.**);  
〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 2 3  
番 1 号 虎ノ門ヒルズ森タワー 青和特  
許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,  
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,  
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則5.2(a))

(57) 要約: 本発明は、D-セリン輸送体タンパク質による細胞内外へのD-セリンの輸送を制御することを特徴とするD-セリン輸送調節剤、それを有効成分として含むD-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物、及びD-セリンの輸送を制御する物質のスクリーニング方法を提供する。また、本発明は、D-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法を提供する。

## 明 細 書

発明の名称：

D-セリン輸送調節剤及びそのスクリーニング方法、並びにD-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、D-セリン輸送調節剤、D-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物、D-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患を治療又は予防する方法、及びD-セリンの輸送を制御する物質のスクリーニング方法に関する。また、本発明は、D-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法に関する。

### 背景技術

[0002] 従来、哺乳類の生体内には存在しないと考えられていたD-アミノ酸が、様々な組織に存在し、生理機能を担うことが明らかにされてきている。D-アミノ酸の1つであるD-セリンは、腎機能や腎臓病を反映するバイオマーカーの一つとなり得ることが明らかにされている（非特許文献1～3）。

[0003] しかしながら、D-セリンを腎臓病マーカーとして開発していく過程において、腎臓におけるD-セリンの輸送システムは明確ではなかった。D-セリンの生理的意義を理解するためには、D-セリンの細胞内外への輸送機構に関連する輸送体分子の同定が必要であり、それが強く求められていた。

[0004] ASCT1（SLC1A4）（非特許文献4及び5）、ASCT2（SLC1A5）（非特許文献5）、Asc1（SLC7A10）（非特許文献6及び7）、PAT1（SLC36A1）（非特許文献8）、及びATB<sup>0, +</sup>（SLC6A14）（非特許文献9）が、D-セリンの膜輸送体タンパク質の役割を担っていることが知られている。しかしながら、腎臓において、これらのタンパク質が、D-セリンの膜輸送体タンパク質の役割を担っているかは明らかにされていない。

### 先行技術文献

## 非特許文献

[0005] 非特許文献1: Sasabe J., et al., Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers. PLoS One. 2014 Jan 29; 9 (1) :e86504.

非特許文献2: Silbernagl S., et al., D-Serine is reabsorbed in rat renal pars recta. Am J Physiol. 1999 Jun; 276 (6) :F857-63.

非特許文献3: Hesaka A., et al., D-Serine reflects kidney function and diseases. Sci Rep. 2019 Mar 25; 9 (1) :5104.

非特許文献4: Kaplan E. et al., ASCT1 (SLC1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Sep 18; 115 (38) :9628-9633.

非特許文献5: Foster AC., et al., D-Serine Is a Substrate for Neutral Amino Acid Transporters ASCT1/SLC1A4 and ASCT2/SLC1A5, and Is Transported by Both Subtypes in Rat Hippocampal Astrocyte Cultures. PLoS One. 20

16 Jun 7; 11 (6) : e0156551.

非特許文献6: Kasai Y., et al., Transport systems of serine at the brain barriers and in brain parenchymal cells. J Neurochem. 2011 Jul; 118 (2) : 304-13.

非特許文献7: Rosenberg D., et al., Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. J Neurosci. 2013 Feb 20; 33 (8) : 3533-44.

非特許文献8: Chen Z., et al., Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. J Physiol. 2003 Jan 15; 546 (Pt 2) : 349-61.

非特許文献9: Hatanaka T., et al., Transport of D-serine via the amino acid transporter ATB (0, +) expressed in the colon. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Feb 22; 291 (2) : 291-5.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] D-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患、例えば腎臓病を、治療又は予防する薬剤の開発が望まれている。そのためには、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリンの量を調整し得る新規D-セリン輸送体タンパク

質を同定することが必要であり、そのスクリーニング方法が希求されている。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らが鋭意研究を行った結果、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリンの量を調節し得るD-セリン輸送体タンパク質を発見し、斯かるD-セリン輸送体タンパク質やこれに作用する物質をD-セリン輸送調節剤として用いることにより、D-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患（例えば腎臓病）を治療又は予防することが可能となることを見出した。また、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリンの量を調節し得る新規のD-セリン輸送体タンパク質や、D-セリン輸送体タンパク質に作用する新規の物質を簡便にスクリーニングし得る方法を開発し、本発明に至った。すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

[0008] [1] D-セリン輸送体タンパク質による細胞内外へのD-セリンの輸送を制御することを特徴とする、D-セリン輸送調節剤。

[2] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、S M C Tファミリー、G L U T 5、C A T 1、T H T R 2及びS N A T 2からなる第1のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択される、項目1に記載のD-セリン輸送調節剤。

[3] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、A S C TファミリーA s c 1、P A T 1及びA T B<sup>0, +</sup>からなる第2のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質をさらに含む、項目2に記載のD-セリン輸送調節剤。

[4] 細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量を調節することを特徴とする、項目1～3のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。

[5] 血液中及び／又は尿中のD-セリン量を調節することを特徴とする、項目1～3のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。

[6] 前記D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を阻害することを特徴とする、項目1～5のいずれか1項

に記載のD-セリン輸送調節剤。

[7] アンチセンスRNA又はDNA分子、RNA i誘導性核酸、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、ゲノム編集核酸及びそれらの発現ベクター、低分子化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、項目6に記載のD-セリン輸送調節剤。

[8] 前記D-セリン輸送体タンパク質の基質又は阻害剤である、項目6に記載のD-セリン輸送調節剤。

[9] イブプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、プロベネシド、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、ピログルタミン酸、フェノキシ酢酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、L-乳酸、D-乳酸、ピルビン酸、ニコチン酸、アセト酢酸、 $\beta$ -D-ヒドロキシ酪酸、 $\beta$ -L-ヒドロキシ酪酸、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸、安息香酸、サリチル酸、5-アミノサリチル酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、4-クロロフェノキシ酢酸 (4-CPA)、2-クロロフェノキシ酢酸 (2-CPA)、2,3-ジクロロフェノキシ酢酸、3,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、N-(4-メタンスルホニル-2-ニトロフェニル)-2H-1,3-ベンゾジオキソル-5-アミン (MSNBA)、フルクトース、N-エチルマレイミド (NEM)、N-アミノ-L-アルギニン、N-アミノ-L-ホモアルギニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン、L-オルニチン、メトホルミン、クロロキン、2,4-ジアミノピリミジン、フェドラチニブ (Fedratinib)、AZD1480、セルドゥラチニブ (Cerdulatib)、チアミン、メチル-アミノ-イソ酪酸 (MeAIB)、 $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド (GPNA)、2-アミノ-4-ビス (アリロキシベンジル) アミノブタン酸 (AABA)、L-アラニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-セリン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、グリシン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる前記D

ーセリン輸送体タンパク質の第1の基質又は阻害剤の群から1又は複数選択される、項目6に記載のDーセリン輸送調節剤。

[10] フェニルグリシン類似体、ベンジルセリン、ベンジルシステイン、SーベンジルーLーシスチン、Lーγーグルタミルーpーニトロアニリド、Lーセリン、Lースレオニン、Lーメチオニン、Lーアラニン、Lーシステイン、Lーグルタミン、Dーアラニン、フェニルグリシン類似体、アラニン類似体、Lーセリン、Lーアラニン、Lーシステイン、グリシン、Lースレオニン、タウリン、GABA、トリプトファン、トリプタミン誘導体、5ーヒドロキシーLートリプトファン、セロトニン、インドールー3ープロピオン酸、 $\alpha$ ーメチルーD Lートリプトファン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる前記Dーセリン輸送体タンパク質の第2の基質又は阻害剤の群から1又は複数選択される物質をさらに含む、項目9に記載のDーセリン輸送調節剤。

[11] 項目6～10のいずれか1項に記載のDーセリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。

[12] 前記Dーセリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、項目11に記載の医薬組成物。

[13] 項目6～10のいずれか1項に記載のDーセリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防する方法。

[14] 前記Dーセリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、項目13に記載の方法。

[15] 前記Dーセリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのDーセリンの輸送を促進することを特徴とする、項目1～5のいずれか1項に記載のDーセリン輸送調節剤。

[16] 前記Dーセリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現するベクター、低分子化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並

びにそれらの組合せからなる群から選択される、項目 15 に記載の D-セリン輸送調節剤。

[17] ジクロフェナック、クルクミン、アクチビン A、並びに、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2、SNAT2 及び PDZK1 発現ベクター、からなる群から選択される項目 15 に記載の D-セリン輸送調節剤。

[18] 項目 15～17 のいずれか 1 項に記載の D-セリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中の D-セリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。

[19] 前記 D-セリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、項目 18 に記載の医薬組成物。

[20] 項目 15～17 のいずれか 1 項に記載の D-セリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中の D-セリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防する方法。

[21] 前記 D-セリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、項目 20 に記載の方法。

[22] D-セリン輸送体タンパク質による細胞内外への D-セリンの輸送を制御する物質のスクリーニング方法であって、

D-セリン輸送体タンパク質を発現する細胞に、候補物質及び D-セリンを適用し、細胞毒性の発現を指標として、細胞内外への D-セリンの輸送の程度を評価する工程、を含む、方法。

[23] 前記 D-セリン輸送体タンパク質が、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2 及び SNAT2 からなる第 1 の D-セリン輸送体タンパク質の群から 1 又は複数選択される、項目 22 に記載の方法。

[24] 前記 D-セリン輸送体タンパク質が、ASCTファミリー Asc1、PAT1 及び ATB<sup>0, +</sup> からなる第 2 の D-セリン輸送体タンパク質の群から 1 又は複数選択される D-セリン輸送体タンパク質をさらに含む、項目

23に記載の方法。

〔25〕 前記細胞が、前記D-セリン輸送体タンパク質を発現するベクターを外部から導入して得られた細胞である、項目22～24のいずれか1項に記載の方法。

〔26〕 前記D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を阻害する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防する物質をスクリーニングする、項目22～24のいずれか1項に記載の方法。

〔27〕 前記D-セリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、項目26に記載の方法。

〔28〕 前記D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を促進する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防する物質をスクリーニングする、項目22～24のいずれか1項に記載の方法。

〔29〕 前記D-セリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、項目28に記載の方法。

〔30〕 細胞へのD-セリンの輸送を指標とする、D-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法。

〔31〕 D-セリンの添加によって生じる細胞毒性の発現を、前記細胞へのD-セリンの輸送の指標とする、項目30に記載の方法。

〔32〕 前記細胞が、候補輸送体タンパク質を発現させた細胞である、項目30又は31に記載の方法。

〔33〕 前記細胞が、前記候補輸送体タンパク質を発現するベクターを導入することによって得られた細胞である、項目32に記載の方法。

〔34〕 前記ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、人工染色体ベクター、及びウイルスベクターからなる群から選択される、項目33に記載の方法。

**発明の効果**

[0009] 本発明によれば、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリンの量を調節することが可能となり、ひいてはD-セリン量の上昇又は低下に関連する疾患、例えば腎臓病等を、治療又は予防することが可能となる。また、本発明によれば、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリンの量を調節し得る、新規のD-セリン輸送体タンパク質や、D-セリン輸送体タンパク質に作用する新規の物質を見出すことが可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、マウス刷子縁膜小胞(BBMV)におけるD-セリン輸送が、主に $\text{Na}^+$ 依存的に輸送されたことを示す。BBMVにおける $10\text{ }\mu\text{M}$ (A)又は $50\text{ }\mu\text{M}$ (B)のD- $[\text{}^3\text{H}]$ セリン取り込み活性の経時的変化を、 $\text{Na}^+$ 存在下( $\text{Na}^+$ )、非存在下( $\text{K}^+$ )で測定した。 $*P<0.05$ 。

[図2]図2は、BBMVにおけるD-セリン輸送が、主にASCT2およびSMCT阻害薬によって阻害されたことを示す。 $1\text{ mM}$ ニコチン酸又は $2\text{ mM}$ レスレオニン(L-Thr)の存在下・非存在下(−)のD- $[\text{}^3\text{H}]$ セリン輸送( $10\text{ }\mu\text{M}$ )活性を測定した結果を示す。 $*P<0.05$ 、NS:有意差なし。

[図3]図3は、ヒトSMCT1及びhSMCT2がD-セリンを輸送することを示す。FlpIn293TR-hSLC5A8-3xFLAG(hSMCT1)、又はFlpIn293TR-hSLC5A12-3xFLAG(hSMCT2)安定細胞株を作製し、(A)Flp-In TREx 293細胞をASCT2 siRNAノックダウンし、抗ASCT2抗体を用いたウェスタンブロットにより発現を確認した。(B)取り込み実験を行う2日前に、hSMCT1およびSMCT2細胞にdoxycyclineを添加し、発現を誘導した。その発現を、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。(C) $100\text{ }\mu\text{M}$ D- $[\text{}^3\text{H}]$ セリン取り込みの経時的変化を、ASCT2内在性のhSMCT1および2安定細胞株において測定した。(D)ASCT2ノックダウンを用いてhSMCT1およびSMCT2安定細胞株で測定した。(E)(D)のグラフより、hSMCT1お

よびSMCT2安定細胞株における観測値からMock細胞における観測値を差し引いたグラフを示した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、NS：有意差なし。

[図4]図4は、SMCTトランスポーターにより介されるD-セリン輸送が、NSAIDsにより阻害されたことを示す。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

[図5]図5は、マウス刷子縁膜小胞（BBMV）におけるD-セリン輸送活性が、SMCTs阻害薬のイブプロフェンにより阻害されたことを示す。 $**P<0.01$ 。

[図6]図6は、D-セリンがFilp-TREx293細胞の増殖を抑制したことを示す。Filp-TREx293細胞をL-またはD-セリンで2日間処理し、細胞増殖をXTTアッセイにより測定した。同じデータを（A）線形曲線プロット（B）片対数プロットで示している。 $*P<0.05$

[図7]図7は、D-セリン輸送が細胞株のNa<sup>+</sup>依存性輸送体によって駆動されたことを示す。10  $\mu$ M D-<sup>3</sup>Hセリン取り込み活性の経時的変化は（A）HEK293細胞、（B）Filp-TREx293細胞株を用いて測定した。 $**P<0.01$ 。

[図8]図8は、D-セリン輸送がASCT2阻害薬によって相対的に阻害されたことを示す。 $**P<0.01$ 、NS：有意差なし。

[図9]図9は、Filp-TREx293細胞にはASCT2トランスポーターが発現し、そのKDはD-セリンの毒性を軽減したことを示す。（A）ウェスタンブロット法により、ASCT2トランスポーターがFilp-TREx293細胞に内因的に発現することを示した。（B）Filp-TREx293対照細胞およびASCT2ノックダウン細胞をL-またはD-セリンにより2日間処理し、細胞増殖をXTT測定により計測した。 $*P<0.05$ 。

[図10]図10は、SMCT1およびSMCT2の一過性発現系によるD-セ

リンの毒性試験を示す。D-セリンの毒性試験は (A) pCMV14-hSLC5A8-3xFLAG (SMCT1) または (B) pCMV14-hSLC5A12-3xFLAG (SMCT2) を一過性トランスフェクションしたHEK293細胞において行った。\* $P < 0.05$ 。

[図11-1]図11は、hSMCT安定細胞株の構築を示す。(A) hSMCT1-3xFLAG安定細胞株を作製するためのpCDNA5-hSLC5A8-3xFLAGのベクターマップ。(B) hSMCT2-3xFLAG安定細胞株を作製するためのpCDNA5-hSLC5A12-3xFLAGのベクターマップ。

[図11-2]図11は、hSMCT安定細胞株の構築を示す。(C) hSMCT1-3xFLAG (矢頭) 及びhSMCT2-3xFLAG (矢印) を、抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

[図12]図12は、SMCT2がD-セリンによる増殖抑制を増強したことを示す。セリン処理による細胞増殖効果を、Flipln293TR-Mock (Mock) またはFlipln293TR-hSLC5A12-3xFLAG (SMCT2) 安定細胞株で調べた。

[図13]図13は、イブプロフェンがSMCT2安定細胞株におけるD-セリン感受性を低下させたことを示す。\* $P < 0.05$ 、NS：有意差なし。

[図14]図14は、SMCT1がD-セリン感受性を増加させ、イブプロフェンがその増加したD-セリン感受性を打ち消したことを示す。\* $P < 0.05$ 、NS：有意差なし。

[図15]図15は、腎虚血再灌流傷害 (IRI) マウスからの腎刷子縁膜画分のプロテオーム火山プロットを示す。 $\log_2$  (Fold Change; 倍率変化) (8h/0h) を、全ての同定されたタンパク質 (A) またはトランスポーター (B) のデータからの統計的有意差P値 ( $-\log_{10}$ ) に対してプロットした火山プロットを示す。0.54の $\log_2$  (Fold Change) と0.80の $-\log_{10}$  P値を示す既知のD-セリントランスポーターASCT2 (SLC1A5) をカットオフ値 (矢印) とし

て使用した。

[図16]図16は、D-セリントランスポーター候補によりトランスフェクトされたHEK293細胞におけるD-セリン誘発性細胞毒性を示す。HEK293細胞を図に記載された各トランスポーター候補によりトランスフェクトした。その細胞を15 mM (A) または25 mM (B) の濃度のD-セリンで2日間処置した。細胞毒性をXTTアッセイにより評価した。各トランスフェクト細胞におけるD-セリン毒性効果を、D-セリン処置なしのものにより正規化し、同じD-セリン濃度でのMockの効果と比較した。有意な低下をt検定により計算した。\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  。

[図17]図17は、ASCT2ノックアウトHAP1細胞におけるD-セリントランスポーターとしてのSNAT2の同定結果を示す。(A) D-セリン輸送を野生型HAP1細胞およびASCT2ノックアウトHAP1細胞において測定した。D-セリン輸送はASCT2ノックアウト細胞において～30%減少することが認められた。(B) D-セリン輸送を、野生型HAP1細胞およびASCT2ノックアウトHAP1細胞においてSNAT1及びSNAT2阻害剤であるMeAIBの存在下と非存在下で測定した。

[図18]図18は、cDNA候補を安定発現するASCT2ノックアウトHAP1細胞におけるD-セリン輸送を示す。ASCT2ノックアウトHAP1細胞を用いて、指摘したようなcDNAクローンを発現する安定細胞系を作製した。ASCT2安定細胞系をポジティブコントロールとして用いた。

[<sup>3</sup>H] D-セリン取り込みをMeAIBの存在下で10分間測定し、SNAT1及びSNAT2活性をバックグラウンドから差し引いた。取り込み値をMockのものにより正規化した。この結果、SMCT1が高度のD-セリン取り込みを示した。\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  。

[図19]図19は、GABAによる[<sup>3</sup>H] D-セリン輸送の阻害を示す。(A) [<sup>3</sup>H] D-セリン輸送をHEK293細胞において測定した結果を示す。ASCT2基質とGABAが[<sup>3</sup>H] D-セリン取り込みを阻害することが示

された。(B)  $[^3\text{H}]$  D-セリン輸送を、ASCT2でトランスフェクトされたHEK293細胞において測定した。L-セリンおよびGABAを添加してそれらの阻害効果を調べた。GABAとL-セリンの両方が $[^3\text{H}]$  D-セリン輸送を著しく阻害した。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための形態について説明するが、本発明の技術的範囲は下記の形態のみに限定されない。

[0012] 本明細書において、「第1」「第2」・・・等の用語は、1つの要素をその他の要素と区別するためだけに用いており、それ以上の含意はない。よって、例えば第1の要素を第2の要素と表現し、同様に第2の要素を第1の要素と表現してもよく、これによって本発明の範囲を逸脱するものではない。

[0013] 本発明の一実施態様は、D-セリン輸送体タンパク質による、細胞内外へのD-セリンの輸送を制御することを特徴とする、D-セリン輸送調節剤を提供する。

[0014] 「D-セリン」とは、タンパク質を構成するアミノ酸の一種であるL-セリンの光学異性体である。本明細書において、「D-セリン輸送体タンパク質（「D-セリントランスポーター」ともいう。）」とは、生体膜を貫通し、膜を通してD-セリンの輸送をするタンパク質の総称をいう。

[0015] 本明細書中において、「D-セリンの細胞内外への輸送」とは、D-セリン輸送体タンパク質を介した、D-セリンの細胞内から細胞外への輸送、細胞外から細胞内への輸送、又は複数の細胞間の輸送を含む概念であることを意味する。

[0016] 一実施態様において、本発明は、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2及びSNAT2からなるD-セリン輸送体タンパク質の群（適宜「第1のD-セリン輸送体タンパク質の群」という。）から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質による、細胞内外へのD-セリンの輸送を制御するD-セリン輸送調節剤であってもよい。本明細書において、「SMCTファミリー」とは、SMCT1及びSMCT2を含むSMCT

のタンパク質ファミリーをいう。

[0017] SMCT1とは、ヒトSLC5A8遺伝子によってコードされているSodium-coupled monocarboxylate transporter1タンパク質である。ヒトSMCT1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_\_145913（配列番号1）及びNP\_\_666018（配列番号2）として提供され、本発明において利用し得る。

[0018] SMCT2とは、ヒトSLC5A12遺伝子によってコードされているSodium-coupled monocarboxylate transporter2タンパク質である。ヒトSMCT2のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_\_178498（配列番号3）及びNP\_\_848593（配列番号4）として提供され、本発明において利用し得る。

[0019] GLUT5とは、ヒトSLC2A5遺伝子によってコードされているGlucose transporter5タンパク質である。ヒトGLUT5のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_\_003039（配列番号5）及びNP\_\_003030（配列番号6）として提供され、本発明において利用し得る。

[0020] CAT1とは、SLC7A1遺伝子によってコードされているCationic amino acid transporter1タンパク質である。ヒトCAT1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_\_003045（配列番号7）及びNP\_\_003036（配列番号8）として提供され、本発明において利用し得る。

[0021] THTR2とは、SLC19A3遺伝子によってコードされているThi

amine transporter 2タンパク質である。ヒトTHTR2のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_025243（配列番号9）及びNP\_079519（配列番号10）として提供され、本発明において利用し得る。

[0022] SNAT2とは、SLC38A2遺伝子によってコードされているSodium-coupled neutral amino acid transporter 2タンパク質である。ヒトSNAT2のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_018976（配列番号11）及びNP\_061849（配列番号12）として提供され、本発明において利用し得る。

[0023] 他の実施態様において、本発明は、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2及び／又はSNAT2に加え、ASCTファミリーAsc1、PAT1及びATB<sup>0, +</sup>からなるD-セリン輸送体タンパク質の群（適宜「第2のD-セリン輸送体タンパク質の群」という。）から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質をさらに含む、D-セリン輸送体タンパク質によって、細胞内外へのD-セリンの輸送を制御するD-セリン輸送調節剤であってもよい。なお、本明細書において、「ASCTファミリー」とは、ASCT1及びASCT2を含むASCTのタンパク質ファミリーをいう。

[0024] ASCT1とは、SLC1A4遺伝子によってコードされているSodium-dependent alanine, serine, cysteine, threonine transporter 1タンパク質である。ヒトASCT1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_003038（配列番号13）及びNP\_003029（配列番号14）として提供され、本発明において利用し得る。

[0025] ASCT2とは、SLC1A5遺伝子によってコードされているSodium-dependent alanine, serine, cysteine, threonine transporter 2タンパク質である。ヒトASCT2のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_005628（配列番号15）及びNP\_005619（配列番号16）として提供され、本発明において利用し得る。

[0026] Asc1とは、SLC7A10遺伝子によってコードされているSodium-independent alanine, serine, cysteine transporter 1タンパク質である。ヒトAsc1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_019849（配列番号17）及びNP\_062823（配列番号18）として提供され、本発明において利用し得る。

[0027] PAT1とは、SLC36A1遺伝子によってコードされているProton-coupled amino acid transporter 1タンパク質である。ヒトPAT1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_078483（配列番号19）及びNP\_510968（配列番号20）として提供され、本発明において利用し得る。

[0028] ATB<sup>0, +</sup>とは、SLC6A14遺伝子によってコードされているSodium-and chloride-dependent neutral and basic amino acid transporter B<sup>(0, +)</sup>タンパク質である。ヒトATB<sup>0, +</sup>のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、それぞれ受入番号NM\_007231（配列番号21） NP\_009162（配列番号22）として提供され、本発明において利用し得る。

[0029] 一実施態様において、本発明は、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD

ーセリン量を調節することを特徴とするDーセリン輸送調節剤を提供する。本明細書において、「細胞内のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、細胞内におけるDーセリン量を増加または減少させて、Dーセリン量を任意の範囲に調節することを意味する。本明細書において、「組織内のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、組織内（例えば、尿細管、糸球体など）におけるDーセリン量を増加または減少させて、Dーセリン量を任意の範囲に調節することを意味する。本明細書において、「器官内のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、器官内（例えば、腎臓内、心臓内など）におけるDーセリン量を増加または減少させて、Dーセリン量を任意の範囲に調節することを意味する。本明細書において、「体液中のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、体液中（例えば、血液中、尿中など）におけるDーセリン量を増加または減少させて、Dーセリン量を任意の範囲に調節することを意味する。

- [0030] 一実施態様において、本発明は、血液中及び／又は尿中のDーセリン量、好ましくは血液中及び尿中のDーセリン量から算出されるDーセリンの排泄率を調節することを特徴とするDーセリン輸送調節剤を提供する。本明細書において、「血液中のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、血液中におけるDーセリン量を増加または減少させて、任意の範囲内となるように調節することを意味する。例えば、血液中において、Dーセリン量を $0.5 \sim 3.0 \text{ nmol/mL}$ 、好ましくは $0.7 \sim 2.5 \text{ nmol/mL}$ 、より好ましくは $1.0 \sim 2.0 \text{ nmol/mL}$ の範囲に調節すればよい。「尿中のDーセリン量を調節する」とは、Dーセリン輸送調節剤を適用することによって、尿中におけるDーセリン量、すなわち、Dーセリンの排泄率を増加または減少させて、任意の範囲内となるように調節することを意味する。例えば、Dーセリンの排泄率が、 $20 \sim 80\%$ 、好ましくは $30 \sim 70\%$ 、より好ましくは $40 \sim 60\%$ の範囲にな

るように調節すればよい。

[0031] 本明細書において、「Dーセリンの排泄率」とは、Dーセリンが糸球体で濾過された量のうち、再吸収・分泌という尿細管の調節機能を経て、どの程度が尿中に排泄されるかを示す指標であり、割合や百分率の他、任意の単位で表されるものである。また、補正因子による補正により水の再吸収や濃縮の影響を排除した値を算出することができ、部分排泄率（fractional excretion: FE）と表されることもある。尿は濃縮率が一定でない場合があるため、尿の濃縮率を補正する「補正因子」を用いて、対象のDーセリンの排泄率を補正してもよい。例えば、本発明の一実施態様において、Dーセリンの排泄率は、血液及び／又は尿由来の補正因子で補正してもよい。Dーセリンの排泄率は、最も単純には尿中のDーセリン量を、Dーセリンの糸球体濾過量で除した割合で表され、計算にイヌリンクリアランス等より得られる糸球体濾過量や実計測した尿量、血液中のDーセリン量を用いてもよい。Dーセリンの排泄率の算出には、尿量補正因子として尿中のLーアミノ酸量（好ましくは、Lーセリン量）を用いることができる。補正因子として尿中のクレアチニン量や血液中のクレアチニン量で算出されるクレアチンクリアランスを用いることができる。例えば、Dーセリンの排泄率は下記の式で表すことができる。これに100を乗じてパーセント（%）で表してもよい。

[数1]

$$\text{Dーセリンの排泄率(Fe}_{\text{D-Ser}}) = \frac{U_{\text{D-Ser}} / P_{\text{D-Ser}}}{U_{\text{Cre}} / P_{\text{Cre}}}$$

[式中、 $U_{\text{D-Ser}}$ は、尿中のDーセリンの量を表し、 $P_{\text{D-Ser}}$ は、血液中のDーセリンの量を表し、 $U_{\text{Cre}}$ は、尿中のクレアチニンの量を表し、 $P_{\text{Cre}}$ は、血液中のクレアチニンの量を表す。]

[0032] Dーセリン及びLーセリン量は、任意の方法によって測定することができ

、例えばキラルカラムクロマトグラフィーや、酵素法を用いた測定、さらにはアミノ酸の光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって定量することができる。本発明における試料中のD-セリン及びL-セリン量の測定は、当業者に周知ないかなる方法を用いて実施しても構わない。例えば、クロマトグラフィー法や酵素法 (Y. Nagata et al., *Clinical Science*, 73 (1987), 105. *Analytical Biochemistry*, 150 (1985), 238., A. D'Aniello et al., *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 66 (1980), 319. *Journal of Neurochemistry*, 29 (1977), 1053., A. Berneman et al., *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2 (2010), 139., W. G. Gutheil et al., *Analytical Biochemistry*, 287 (2000), 196., G. Molla et al., *Methods in Molecular Biology*, 794 (2012), 273., T. Ito et al., *Analytical Biochemistry*, 371 (2007), 167. 等)、抗体法 (T. Ohgusu et al., *Analytical Biochemistry*, 357 (2006), 15., 等)、ガスクロマトグラフィー (GC) (H. Hasegawa et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 46 (2011), 502., M. C. Waldhier et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394 (2009), 695., A. Hashimoto, T. Nishikawa et al., *FEBS Letters*, 296 (1992), 33., H. Bruckner and A. Schieber, *Biomedical Chromatography*, 15 (2001), 166., M. Junge et al., *Chirality*, 19 (2007), 228., M. C. Waldhier et al., *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 4537. 等)、キャピラリー電気泳動法 (CE) (H. Miao et al., *Analytical Chemistry*, 77 (2005), 7190., D. L. Kirschner et al., *Analytical Chemistry*, 79 (2007), 736., F. Kitagawa, K. Otsuka, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011), 3078., G. Thorsen and J. Bergquist, *Journal of Chromatography B*, 745 (2000), 389. 等)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (N. Nimura and T. Kinoshita, *Journal of Chromatography*, 352 (1986), 169., A. Hashimoto et al., *Journal of Chromatography*, 582 (1992), 41., H. Bruckner et al., *Journal of Chromatography A*, 666 (1994), 259., N. Nimura et al., *Analytical Biochemistry*, 315(

2003), 262., C. Muller et al., Journal of Chromatography A, 1324 (2014), 109., S. Einarsson et al., Analytical Chemistry, 59 (1987), 1191., E. Okuma and H. Abe, Journal of Chromatography B, 660 (1994), 243., Y. Gogami et al., Journal of Chromatography B, 879 (2011), 3259., Y. Nagata et al., Journal of Chromatography, 575 (1992), 147., S. A. Fuchs et al., Clinical Chemistry, 54 (2008), 1443., D. Gordes et al., Amino Acids, 40 (2011), 553., D. Jin et al., Analytical Biochemistry, 269 (1999), 124., J. Z. Min et al., Journal of Chromatography B, 879 (2011), 3220., T. Sakamoto et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408 (2016), 517., W. F. Visser et al., Journal of Chromatography A, 1218 (2011), 7130., Y. Xing et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408 (2016), 141., K. Imai et al., Biomedical Chromatography, 9 (1995), 106., T. Fukushima et al., Biomedical Chromatography, 9 (1995), 10., R. J. Reischl et al., Journal of Chromatography A, 1218 (2011), 8379., R. J. Reischl and W. Lindner, Journal of Chromatography A, 1269 (2012), 262., S. Karakawa et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 115 (2015), 123., 等) がある。

[0033] 本発明における光学異性体の分離分析系は、複数の分離分析を組み合わせてもよい。より具体的に、光学異性体を有する成分を含む試料を、移動相としての第一の液体と共に、固定相としての第一のカラム充填剤に通じて、前記試料の前記成分を分離するステップ、前記試料の前記成分の各々をマルチループユニットにおいて個別に保持するステップ、前記マルチループユニットにおいて個別に保持された前記試料の前記成分の各々を、移動相としての第二の液体と共に、固定相としての光学活性中心を有する第二のカラム充填剤に流路を通じて供給し、前記試料の成分の各々に含まれる前記光学異性体を分割するステップ、及び前記試料の成分の各々に含まれる前記光学異性体を検出するステップを含むことを特徴とする光学異性体の分析方法を用いることにより、試料中のD-／L-アミノ酸量を測定することができる（特許

第4291628号)。HPLC分析では、予めo-フタルアルデヒド(OPA)や4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール(NBD-F)のような蛍光試薬でD-及びL-アミノ酸を誘導体化したり、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-システイン(Boc-L-Cys)等を用いてジアステレオマー化する場合がある(浜瀬健司及び財津潔、分析化学、53巻、677-690(2004))。代替的には、アミノ酸の光学異性体を識別するモノクローナル抗体、例えばD-セリン、L-セリン等に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によってD-アミノ酸を測定することができる。また、D体及びL体の合計量を指標とする場合、D体及びL体を分離して分析する必要はなく、D体及びL体を区別せずにアミノ酸を分析することもできる。その場合も酵素法、抗体法、GC、CE、HPLC等で分離及び定量することができる。

[0034] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤は、腎臓の細胞に発現するD-セリン輸送体タンパク質に作用する。これにより、血液中及び／又は尿中のD-セリン量、好ましくはD-セリンの排泄率を調節することが可能となる。

[0035] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤は、D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を阻害することを特徴とするものであり、例えば、D-セリン輸送体タンパク質の基質又は阻害剤(例えば、選択的阻害剤又は非選択的阻害剤)であってもよく、D-セリン輸送体タンパク質の発現自体を阻害する物質であってもよく、D-セリン輸送体タンパク質の発現に関連する遺伝子を直接的又は間接的に抑制する物質であってもよい。本明細書において、「D-セリン輸送体タンパク質の選択的阻害剤」とは、D-セリン輸送体タンパク質に選択的に作用して阻害活性を示す阻害剤であり、例えば、D-セリン輸送体タンパク質に対する $K_i$ がその他のタンパク質に対する $K_i$ 値の $1/5$ 倍、好ましくは $1/10$ 倍、より好ましくは $1/25$ 倍、さらに好ましくは $1/100$ 倍以下である阻害剤等が挙げられる。D-セリン輸送体タンパク質の選択的阻害剤の $K$

i 値は、当技術分野で周知の種々の方法を使用して測定することができる。  
D-セリン輸送体タンパク質の選択的阻害剤は、例えば、低分子化合物、ア  
プタマー、抗体、抗体フラグメント及びそれらの組合せであってもよい。ま  
た、本明細書において、「D-セリン輸送体タンパク質の非選択的阻害剤」  
とは、D-セリン輸送体タンパク質に非選択的に作用して阻害活性を示す阻  
害剤をいう。

[0036] 本明細書において、「低分子化合物」とは、医薬品で一般的に使用される  
有機分子と同程度の大きさの分子のことをいい、例えば、約5000Da以  
下、好ましくは約2000Da以下、より好ましくは約1000Da以下の  
範囲の分子量を有する化合物をいう。一実施態様において、本発明のD-セ  
リン輸送調節剤としての低分子化合物は、SMCTファミリー、GLUT5  
、CAT1、THTR2及びSNAT2からなる第1のD-セリン輸送体タ  
ンパク質の群から選択されるD-セリン輸送体タンパク質に対する基質又は  
阻害剤の群（適宜「第1の基質又は阻害剤の群」という。）から1又は複数  
選択される低分子化合物であってもよい。一実施態様において、本発明のD  
-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、SMCT1に対する基質又は  
阻害剤であってもよく、例えば、イブプロフェン、フェノプロフェン、ケト  
プロフェン、プロベネシド、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、ピログル  
タミン酸、フェノキシ酢酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、L-乳酸、D-乳  
酸、ピルビン酸、ニコチン酸、アセト酢酸、 $\beta$ -D-ヒドロキシ酪酸、 $\beta$ -  
L-ヒドロキシ酪酸、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸、安息  
香酸、サリチル酸、5-アミノサリチル酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢  
酸（2,4-D）、4-クロロフェノキシ酢酸（4-CPA）、2-クロロ  
フェノキシ酢酸（2-CPA）、2,3-ジクロロフェノキシ酢酸、3,4  
-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸及びそ  
の誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されても  
よく、これらに限定されない。

[0037] 本明細書において、「誘導体」とは、特定の化合物やタンパク質の分子内

の一部を各種の置換基や糖鎖等で修飾したもの等が含まれることを意図する。本明細書において、「医薬的に許容されるその塩」とは、D-セリン輸送調節剤として用いられる物質から形成されるあらゆる非毒性の塩を示す。斯かる塩は、例えば：塩酸、硫酸、リン酸、臭化水素酸等の無機酸；シュウ酸、マロン酸、クエン酸、フマル酸、乳酸、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、グルコン酸、アスコルビン酸、メチルスルホン酸、ベンジルスルホン酸等の有機酸；水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、水酸化アンモニウム等の無機塩基；メチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン、グアニジン、コリン、シンコリン等の有機塩基、またはリジン、アルギニン、アラニン等のアミノ酸との反応によって得ることができる。また、「医薬的に許容されるその塩」は、D-セリン輸送調節剤として用いられる物質の含水生成物および溶媒和物（例えば水和物等）などを包含する。

[0038] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、SMCT2に対する基質又は阻害剤であってもよく、例えば、イブuproフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、プロベネシド、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、ピログルタミン酸、フェノキシ酢酸及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されてもよく、これらに限定されない。

[0039] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、GLUT5に対する基質又は阻害剤であってもよく、例えば、N-（4-メタンスルホニル-2-ニトロフェニル）-2H-1,3-ベンゾジオキソル-5-アミン（MSNBA）、フルクトース及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されてもよく、これらに限定されない。

[0040] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、CAT1に対する基質又は阻害剤であってもよく、例えば、N-エチ

ルマレイミド (NEM)、N-アミノ-L-アルギニン、N-アミノ-L-ホモアルギニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン、L-オルニチン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されてもよく、これらに限定されない。

[0041] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、THTR2に対する基質又は阻害剤であってもよく、例えば、メトホルミン、クロロキン、2,4-ジアミノピリミジン、2,4-ジアミノピリミジン基を含有する薬剤（例えば、フェドラチニブ (Fedratinib)、AZD1480、セルドゥラチニブ (Cerdulatinib)、チアミン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されてもよく、これらに限定されない。

[0042] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤としての低分子化合物は、SNAT2に対する基質又は阻害剤であってもよく、例えば、メチル-L-アミノ-イソ酪酸 (MeAIB)、 $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド (GPNA)、2-アミノ-4-ビス (アリロキシベンジル) アミノブタン酸 (AABA)、L-アラニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-セリン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、グリシン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択されてもよく、これらに限定されない。

[0043] 他の実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤は、第1の基質又は阻害剤の群から選択される1又は複数の低分子化合物に加え、ASCTファミリー、Asc1、PAT1及びATB<sup>0, +</sup>からなる第2のD-セリン輸送体タンパク質の群から選択されるD-セリン輸送体タンパク質に対する基質又は阻害剤の群（適宜「第2の基質又は阻害剤の群」という。）から1又は複数選択される低分子化合物をさらに含むものであってもよい。例えば、ASCTファミリー（例えば、ASCT1及びASCT2）に対する基質又は阻害剤であるフェニルグリシン類似体（例えば、L-4-フルオロフェニルグリシン、L-4-クロロフェニルグリシン等）、ベンジルセリン、ベンジ

ルシステイン、S-ベンジル-L-シスチン、L-γ-グルタミル-p-ニトロアニリド、L-セリン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-アラニン、L-システイン、L-グルタミン、D-アラニン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択される物質を含むものであってもよい。また、例えば、Asc 1に対する基質又は阻害剤であるフェニルグリシン類似体（例えば、L-4-ブロモフェニルグリシン、L-4-ヒドロキシフェニルグリシン等）、アラニン類似体（例えば、2-アミノイソブチル酸（AIB）等）、L-セリン、L-アラニン、L-システイン、グリシン、L-スレオニン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択される物質を含むものであってもよい。また、例えば、PAT 1に対する基質又は阻害剤であるタウリン、GABA、トリプトファン、トリプタミン誘導体、5-ヒドロキシー-L-トリプトファン、セロトニン、インドール-3-プロピオン酸、及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択される物質を含むものであってもよい。また、例えば、ATB<sup>0, +</sup>に対する基質又は阻害剤であるα-メチル-D-トリプトファン、及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる群から選択される物質を含むものであってもよい。

[0044] 本明細書において、「アプタマー」とは、特異的に標的物質に結合する能力を持つ合成DNA又はRNA分子及びペプチド性分子をいい、試験管内において化学的に短時間で合成することができる。本発明に用いられるアプタマーは、例えば、D-セリン輸送体タンパク質に結合し、D-セリン輸送体タンパク質の活性を阻害し得るものである。本発明に用いられるアプタマーは、例えば、SELEX法を用い、小分子、タンパク質、核酸など各種の分子標的への結合を、インビトロで反復して選択することにより得ることができる（Turk C., Gold L., Science, 1990, 249 (4968), 505-510; Ellington AD, Szostak JW., Nature, 1990, 346 (6287): 818-822; 米国特許第6, 867, 289号明細書; 米国特許第5, 567,

588号明細書；米国特許第6,699,843号明細書を参照）。

[0045] 本明細書において、「抗体フラグメント」とは、抗原に結合し得る活性を維持した完全長抗体の一部をいい、一般的には、その抗原結合ドメインあるいは可変ドメインを含むものである。抗体フラグメントの例として、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b又はF v抗体フラグメント（s c F v抗体フラグメントを含む。）などが挙げられる。また、抗体をプロテアーゼ酵素により処理し、場合により還元して得ることができる断片も、抗体フラグメントに含まれる。本発明に用いられる抗体又は抗体フラグメントは、ヒト由来抗体、マウス由来抗体、ラット由来抗体、ウサギ由来抗体、ラマなどのラクダ科由来抗体又はヤギ由来抗体のいずれの抗体でもよく、さらにそれらのポリクローナル若しくはモノクローナル抗体、完全型若しくは短縮型（例えば、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a bまたはF vフラグメント）抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体又は完全ヒト型抗体のいずれのものでもよい。

[0046] 一実施態様において、本発明のD-セリン輸送調節剤は、D-セリン輸送体タンパク質の発現を直接的又は間接的に阻害するものであってもよく、例えば、低分子化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並びに、アンチセンスRNA又はDNA分子、RNA i誘導性核酸、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、ゲノム編集核酸及びそれらの発現ベクターから選択されるものであってもよい。

[0047] 本明細書において、「アンチセンスRNA又はDNA分子」とは、メッセージンジャーRNA（mRNA）など、ある機能を持つRNA（センスRNA）と相補的な塩基配列を持ち、センスRNAと2本鎖を形成することで、そのセンスRNAが担うべきタンパク質の合成を阻害する機能を有する分子をいう。本発明において、アンチセンスRNA又はDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、D-セリン輸送体タンパク質のmRNAに結合することによってタンパク質に翻訳されることを阻害する。それにより、D-セリン輸送体タンパク質の発現量を低減させ、D-セリン輸送体タンパク質の活性を阻害することができる。アンチセンスRNA又はDNA分子を合成

する方法は、当該技術分野で周知であり、本発明に用いることができる。

[0048] 本明細書において、「RNA i 誘導性核酸」とは、細胞内に導入されることにより、RNA 干渉 (RNA i) を誘導し得るポリヌクレオチドをいい、通常、19～30ヌクレオチド、好ましくは19～25ヌクレオチド、より好ましくは19～23ヌクレオチドを含むRNA、DNA、又はRNAとDNAのキメラ分子であり、任意に修飾が施されている。RNA i は、mRNA に対して生じてよいし、プロセッシング前の転写直後のRNA、すなわちエキソン、イントロン、3' 非翻訳領域、及び5' 非翻訳領域を含むヌクレオチド配列のRNAであってもよい。本発明で使用可能なRNA i 法は、(1) 短い二重鎖RNA (siRNA) を細胞内に直接導入するか、(2) 低分子ヘアピンRNA (shRNA) を各種発現ベクターに組み込み、そのベクターを細胞内に導入するか、或いは(3) 対立方向に並ぶ2個のプロモーターを持つベクターに、siRNAに対応する短い二重鎖DNAをプロモーター間に挿入してsiRNAを発現させるベクターを作製し、細胞内に導入する、などの手法によりRNA i を誘導させてもよい。RNA i 誘導性核酸は、D-セリン輸送体タンパク質のRNAの切断又はその機能抑制を可能にするsiRNA、shRNA又はmiRNAを含んでもよく、これらのRNA i 核酸は、リポソームなどを用いて直接導入されてもよいし、これらのRNA i 核酸を誘導する発現ベクターを用いて導入されてもよい。

[0049] 一実施態様において、本発明で用いられるD-セリン輸送体タンパク質に対するRNA i 誘導性核酸は、D-セリン輸送体タンパク質の発現を阻害する、又は有意に抑制する生物学的効果を示す核酸であればよく、当業者であれば、D-セリン輸送体タンパク質の塩基配列を参考に合成することが可能である。例えば、固相ホスホアミダイト法などのDNA合成技術を利用したDNA (／RNA) 自動合成装置を使用して化学的に合成するか、或いは、siRNA関連の受託合成会社 (例えばLife Technologies社など) に委託して合成することも可能である。一実施形態において、本発明に用いられるsiRNAは、その前駆体であるshort-hairp

i n 型二本鎖RNA (s h RNA) から、細胞内RNAseであるダイサー (D i c e r) によるプロセッシングを介して誘導されるものであってもよい。

[0050] 本明細書において、「マイクロRNA (m i RNA)」とは、21～25塩基長の1本鎖RNA分子であり、真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与する分子をいう。m i RNAは、一般にmRNAの3' UTRを認識して、標的mRNAの翻訳を抑制し、タンパク質産生を抑制する。従って、D-セリン輸送体タンパク質の発現量を直接的及び／又は間接的に低減させることができるm i RNAも、本発明の範囲に含まれる。

[0051] 本明細書において、「リボザイム」とは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子の総称をいう。リボザイムには、グループIイントロン型やRNAse Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（例えば、小泉誠及び大塚栄子、タンパク質核酸酵素、1990、35、2191を参照）。

[0052] 例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15又はU15でも切断され得ることが示されている（例えば、K o i z u m i , M. e t a l . , F E B S L e t t , 1988, 228, 228. を参照）。基質結合部位が標的部位近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UU又はUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを得ることが可能であり、当業者であれば、以下の文献を参考に製造可能である：K o i z u m i , M. e t a l . , F E B S L e t t , 1988, 239, 285. ; 小泉誠及び大塚栄子、タンパク質核酸酵素、1990、35、2191. ; K o i z u m i , M. e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . , 1989, 17, 7059. 。

[0053] また、ヘアピン型リボザイムも本発明に用いることができる。このリボザイムは、例えば、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される（Buzayan, J.M., Nature, 1986, 323, 349.）。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている（例えば、Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl. Acids. Res., 1991, 19, 6751.; 菊池洋, 化学と生物, 1992, 30, 112. を参照）。リボザイムを用いてD-セリン輸送体タンパク質をコードする遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、D-セリン輸送体タンパク質の発現を阻害することができる。

[0054] 本明細書において、ゲノム編集核酸とは、遺伝子ターゲティングに用いられるヌクレアーゼを利用したシステムにおいて、所望の遺伝子を編集するために用いられる核酸をいう。遺伝子ターゲティングに用いられるヌクレアーゼは、公知のヌクレアーゼの他、今後遺伝子ターゲティングのために使用される新たなヌクレアーゼも包含される。例えば、公知のヌクレアーゼとしては、CRISPR/Cas9（Ran, F. A., et al., Cell, 2013, 154, 1380-1389）、TALEN（Mahfouz, M., et al., PNAS, 2011, 108, 2623-2628）、ZFN（Urnov, F., et al., Nature, 2005, 435, 646-651）等が挙げられる。

[0055] 本発明の一実施態様に用いることができる、CRISPR/Cas9を用いたCRISPR/Cas9システムについて説明する。

[0056] CRISPR/Cas9システムは、DNAの任意の部位に二本鎖切断を導入することを可能とする。CRISPR/Cas9システムを用いるためには、少なくとも、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM配列）、ガイドRNA（gRNA）、Casタンパク質（Cas, Cas9）の3つの要素を必要とする。

[0057] PAM配列（5' - NGG）に隣接する標的部位に相補的な配列を形成す

るように gRNA を設計し、所望の細胞に Cas タンパク質と共に導入する。導入された gRNA と Cas タンパク質は複合体を形成する。gRNA がゲノム上の標的配列に結合し、Cas タンパク質がそのヌクレアーゼ活性によって標的のゲノム DNA の二重鎖を切断する。

[0058] その後、ヌクレアーゼによる二本鎖切断を受けた細胞では、相同組換え型修復 (Homology Directed Repair (HDR))、又は非相同性末端結合修復 (non-homologous end joining (NHEJ)) が生じる。当該細胞内に適切な DNA 断片 (例えば、HDR 修復用鋳型) が存在する場合には、相同組換えが生じ、任意のゲノムにおいて欠失、挿入、破壊などの改変を行うことができる。HDR 修復用鋳型が存在しない場合は、NHEJ の過程で数塩基の欠失又は追加が生じる場合がある。これにより、タンパク質をコードする領域においてフレームシフトが生じ、タンパク質の読み取り枠が崩壊したり、未成熟な終止コドンが導入され、結果として、所望のタンパク質をノックアウトすることが可能となる。

[0059] 本発明の一実施態様において、ゲノム編集核酸は、D-セリン輸送体タンパク質をコードする遺伝子をターゲティングする gRNA 又はそれを発現するベクターであってもよい。他の実施態様において、ゲノム編集核酸は、さらに、遺伝子ターゲティングに用いられるヌクレアーゼを発現する核酸を含んでもよい。gRNA と遺伝子ターゲティングに用いられるヌクレアーゼ (好ましくは、Cas タンパク質) は、同一のベクターにコードされたものであってもよく、別々にコードされたベクターを用いてもよい。他の実施態様において、ゲノム編集核酸は、さらに、HDR 修復用鋳型核酸を含んでもよい。

[0060] 一実施態様において、本発明は、D-セリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中の D-セリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を提供する。

[0061] 本発明の D-セリン輸送調節剤、又は D-セリン輸送調節剤を含む医薬組

成物は、作用部位の濃度を適正に調整することが可能ならば、任意の投与経路で投与することができる。投与経路としては、局所投与（皮膚上、吸入、注腸、点眼、点耳、経鼻、腔内等）、経腸投与（経口、経管、経注等）、非経口投与（経静脈、経動脈、経皮、筋肉注等）が挙げられる。

[0062] 本明細書において、「細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の上昇に関連する疾患」とは、細胞内、組織内、器官内又は体液中におけるDーセリン量の上昇と相関がある疾患をいい、例えば、腎臓病である。一実施態様において、本発明が適用され得る「腎臓病」とは、例えば、糸球体及び／又は尿細管の障害を伴う状態であり、例えば、急性腎障害、慢性腎臓病、骨髄腫腎、糖尿病性腎症、IgA腎症、間質性腎炎または多発性嚢胞腎、又は、全身性エリトマトーデス、原発性アルドステロン症、前立腺肥大症、ファブリー病または微小変化型ネフローゼ症候群に起因する腎臓病が挙げられる。

[0063] 一実施態様において、本発明は、Dーセリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防する方法を提供する。本明細書において、「治療」とは、罹患した疾患又は病害及び／又はそれに伴う症状を緩和又は除去することをいい、例えば、それは糸球体濾過量の回復及び／又は維持を確認することによって、治療効果を評価することができる。本明細書において、「予防」とは、疾患又は病害の罹患を防ぐことをいう。

[0064] 一実施態様において、本発明は、Dーセリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのDーセリンの輸送を促進することを特徴とするDーセリン輸送調節剤を提供する。

[0065] 本発明の一実施態様において、Dーセリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのDーセリンの輸送を促進することを特徴とするDーセリン輸送調節剤は、例えば、Dーセリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現するベクターであってもよく、Dーセリン輸送体タンパク質の発現を直接的又は間接的に上昇させるものであってもよく、例えば、低分子

化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並びに、アンチセンスRNA又はDNA分子、RNA i誘導性核酸、マイクロRNA (miRNA)、リボザイム、ゲノム編集核酸及びそれらの発現ベクターから選択させるものであってもよい。

[0066] 本明細書において、「ベクター」とは、それに挿入された核酸分子を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子（キャリアー）であり、適当な宿主細胞内において、挿入された核酸分子を複製可能であり、且つ、その発現が可能である限り、その種類や構造は特に限定されない。例えば、ベクターは、プラスミドベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、人工染色体ベクター、及びウイルスベクターからなる群から選択されるものであってもよい。本発明の一実施態様において、ベクターを細胞へ導入する方法は、公知の方法を用いることができる。

[0067] 「D-セリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現するベクター」とは、D-セリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部をコードした核酸が挿入されたベクターであり、適当な宿主細胞に導入された場合に、D-セリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現することができるベクターをいう。なお、本発明に用いられ得る「D-セリン輸送体タンパク質又はその誘導体を発現するベクター」には、上述のD-セリン輸送体タンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性（好ましくは同一性）を有するD-セリン輸送体タンパク質を発現可能なベクターが含まれる。また、本発明に用いられ得る「D-セリン輸送体タンパク質又はその誘導体を発現するベクター」は、上述のD-セリン輸送体タンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性（好ましくは同一性）を有し、かつ、基質（例えば、D-セリン）結合部位のアミノ酸配列が保存されたD-セリン輸送体タンパク質を発現可能なベクターであってもよい。

[0068] なお、本明細書において、2つのアミノ酸配列の「相同性」とは、両アミノ酸配列をアラインメントした際に各対応箇所に同一又は類似のアミノ酸残基が現れる比率であり、2つのアミノ酸配列の「同一性」とは、両アミノ酸配列をアラインメントした際に各対応箇所に同一のアミノ酸残基が現れる比率である。

[0069] 2つのアミノ酸配列の「相同性」及び「同一性」は、例えば、EMBOSSパッケージ (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277) (好ましくはバージョン5.00又はそれ以降) のNeedleプログラムにより、Needleman-Wunschアルゴリズムを使用して決定することができる (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)。

[0070] また、類似のアミノ酸としては、例えば、以下に記載の構造・特性・側鎖の種類等に基づく分類において、同一の群に属するアミノ酸が挙げられる。

芳香族アミノ酸：F、H、W、Y；

脂肪族アミノ酸：I、L、V；

疎水性アミノ酸：A、C、F、H、I、K、L、M、T、V、W、Y；

荷電アミノ酸：D、E、H、K、R等；

正荷電アミノ酸：H、K、R；

負荷電アミノ酸：D、E；

極性アミノ酸：C、D、E、H、K、N、Q、R、S、T、W、Y；

小型アミノ酸：A、C、D、G、N、P、S、T、V等；

超小型アミノ酸：A、C、G、S；

脂肪族側鎖を有するアミノ酸：G、A、V、L、I；

芳香族側鎖を有するアミノ酸：F、Y、W；

硫黄含有側鎖を有するアミノ酸：C、M；

脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸：S、T；

塩基性側鎖を有するアミノ酸：K、R、H；

酸性アミノ酸及びそれらのアミド誘導体：D、E、N、Q。

[0071] 本発明の一実施態様において、D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を促進することを特徴とするD-セリン輸送調節剤は、例えば、ジクロフェナック、クルクミン、アクチビンA、並びに、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2、SNAT2及びPDZK1発現ベクター、からなる群から選択されるものであってもよい。

[0072] PDZK1とは、PDZ domain containing 1と呼ばれる足場タンパク質であり、当該タンパク質の発現量が増加すると、SMCTファミリータンパク質の膜における発現量と活性が増えることが知られている(Liu Y., et al., Drug Metab Pharmacokinet. 2013; 28(2): 153-8.; Srivastava S., et al., J Physiol Sci. 2019 Mar; 69(2): 399-408. を参照)。ヒトPDZK1のmRNA及びアミノ酸の配列は、例えば、GenBankデータベース及びGenPeptデータベースにおいて、受入番号NM\_002614(配列番号23)及びNP\_002605(配列番号24)として提供される。本発明において用いられ得る「PDZK1、その誘導体又はその一部を発現するベクター」とは、PDZK1タンパク質、その誘導体又はその一部をコードした核酸が挿入されたベクターであり、適当な宿主細胞に導入された場合に、D-セリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現することができるベクターをいう。なお、本発明に用いられ得る「PDZK1、その誘導体又はその一部を発現するベクター」には、上述のPDZK1タンパク質のアミノ酸配列と、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性(好ましくは同一性)を有するPDZK1タンパク質を発現可能なベクターが含まれる。

[0073] 一実施態様において、本発明は、D-セリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の低下に関連する

疾患を治療又は予防するための医薬組成物を提供する。

[0074] 本明細書において、「細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の低下に関連する疾患」とは、細胞内、組織内、器官内又は体液中におけるDーセリン量の低下と相関がある疾患をいい、例えば、腎臓病である。一実施態様において、本発明が適用され得る「腎臓病」とは、例えば、糸球体及び／又は尿細管の障害を伴う状態であり、例えば、急性腎障害、慢性腎臓病、骨髄腫腎、糖尿病性腎症、IgA腎症、間質性腎炎または多発性嚢胞腎、又は、全身性エリトマトーデス、原発性アルドステロン症、前立腺肥大症、ファブリー病または微小変化型ネフローゼ症候群に起因する腎臓病が挙げられる。

[0075] 一実施態様において、本発明は、Dーセリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防する方法を提供する。

[0076] 一実施態様において、本発明は、Dーセリン輸送体タンパク質による細胞内外へのDーセリンの輸送を制御する物質のスクリーニング方法であって、  
Dーセリン輸送体タンパク質を発現する細胞に、候補物質及びDーセリンを適用し、細胞毒性の発現を指標として、細胞内外へのDーセリンの輸送の程度を評価する工程、  
を含む、方法を提供する。

[0077] 本明細書において、「候補物質」とは、スクリーニングの対象となる物質であり、例えば、低分子化合物、ペプチド、タンパク質、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物又は細胞培養上清、植物由来の化合物又は抽出物（例えば、生薬エキス、生薬由来の化合物）、及び微生物由来の化合物若しくは抽出物又は培養産物などであってもよく、これに限定されない。

[0078] 本明細書において、「細胞毒性の発現」とは、生きている細胞に対して何らかの傷害（細胞の死、増殖能、代謝能力等の細胞の営む種々の機能の何らかの変調や低下等）を与える事象が発生することをいう。一実施態様におい

て、本発明のスクリーニング方法で用いられる得る細胞は、動物由来、好ましくは、哺乳動物由来（例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、モルモット等）、ウサギ、イヌ、ウシ、ウマ、ブタ、ネコ、ヤギ、ヒツジ等）、より好ましくはヒト及びヒト以外の霊長類由来の細胞である。また、本発明のスクリーニング方法において用いられる得る細胞は、脳由来、又は腎臓由来の細胞であってもよく、これに限定されない。

[0079] 一実施態様において、本発明のスクリーニング方法で用いられ得る細胞は、D-セリン輸送体タンパク質が発現している腎臓又は脳由来の細胞であってもよい。また、他の実施態様において、本発明のスクリーニング方法で用いられ得る細胞は、D-セリン輸送体タンパク質として、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2及びSNAT2からなる第1のD-セリン輸送体タンパク質の群から選択されるD-セリン輸送体タンパク質が発現するものであってもよく、第1のD-セリン輸送体タンパク質の群から選択されるD-セリン輸送体タンパク質に加え、ASCTファミリー、Asc1、PAT1及びATB<sup>0, +</sup>からなる第2のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質がさらに発現するものであってもよい。

[0080] 一実施態様において、本発明のスクリーニング方法で用いられ得る細胞は、D-セリン輸送体タンパク質を発現するベクターを外部から導入して得られた細胞であってもよい。

[0081] 一実施態様において、本発明のスクリーニング方法は、D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を阻害する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の上昇に関連する疾患（例えば、腎臓病）を治療又は予防する物質をスクリーニングする方法であってもよい。また、一実施態様において、本発明のスクリーニング方法は、D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を促進する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液

中のD-セリン量の低下に関連する疾患（例えば、腎臓病）を治療又は予防する物質をスクリーニングする方法であってもよい。

[0082] 一実施態様において、本発明は、細胞へのD-セリンの輸送を指標とする、D-セリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法を提供する。

[0083] 本発明の一実施態様において、「細胞へのD-セリンの輸送の指標」は、細胞内へD-セリンが輸送されたことを示す任意の指標であればよく、例えば、放射線同位体で標識されたD-セリンを細胞へ添加することによって、細胞へ取り込まれたD-セリンをシンチレーションカウンタ等によって測定した放射線同位体の量であってもよく、D-セリンの添加によって生じる細胞の毒性発現の程度を、細胞へのD-セリンの輸送の指標としてもよい。

「細胞へのD-セリンの輸送の指標」が、D-セリンの添加によって生じる細胞の毒性発現の程度である場合、アッセイ系が簡便になり、好ましい。

[0084] 一実施態様において、本発明に用いられる細胞は、候補輸送体タンパク質を発現させた細胞であってもよく、例えば、候補輸送体タンパク質を発現するベクターを導入することによって得られた細胞であってもよい。本明細書において、「候補輸送体タンパク質」とは、膜輸送体タンパク質としては知られているが、D-セリン輸送体タンパク質としては知られていないタンパク質をいう。本発明のスクリーニング方法において適用され得る候補輸送体タンパク質は、公知の遺伝子データベース等を用いることでその遺伝子配列を入手することが可能である。従って、当業者であれば、公知の遺伝子データベース等を用いることで候補輸送体タンパク質を発現するベクターを作製することが可能である。

[0085] 一実施態様において、本発明のスクリーニング方法では、D-セリンに加え、ナトリウムイオン、カリウムイオン、プロトン、塩化物イオンからなる群より選択されるイオンをさらに添加する方法であってもよい。

## 実施例

[0086] 以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0087] (実施例 1)

## 1. 材料

一般化学品は、特記のない限り富士フィルム和光化成株式会社から購入した。細胞培養培地は富士フィルム和光化成株式会社、細菌培養培地はナカライテスク株式会社から入手した。制限酵素は、米国マサチューセッツ州NEW ENGLAND BioLabsから入手した。DNAプライマーの合成およびDNA配列決定は、韓国のMacrogenによって行なわれた。Flip-In TREx293細胞株は、米国カリフォルニア州Invitrogenから入手したものであり、牛胎児血清、p3XFLAG-CMV-14発現ベクターおよびHRP結合抗FLAG M2モノクローナル抗体（抗FLAG-HRP）は、米国ミズーリ州Sigma-Aldrichから購入した。ASCT2-siRNAは、米国マサチューセッツ州Thermo Fisher Scientificから入手した。D-[<sup>3</sup>H]セリン（10 Ci/mmol）は、米国カリフォルニア州Moravekから購入した。抗SMCT2（H4）モノクローナル抗体は、米国テキサス州Santa Cruz Biotechnologyから入手した。動物実験では、8週齢の雄C57BL/6 Jマウス（体重21～27 g）を日本エスエルシー社から購入し、これらのマウスを12時間の明暗サイクル下で1ケージ当たり4匹以下の群に分けて飼育し、給餌した。動物実験は奈良県立医科大学動物実験利用委員会のガイドラインに従って実施した。

## [0088] 2. 実験手順

## 2-1. マウス腎臓における刷子縁膜小胞（Brush Border Membrane Vesicles; BBMV s）の調製

マウス全腎をPBS緩衝液pH 7.4を用いた灌流により摘出した後、速やかに液体窒素により瞬間凍結し、使用まで-80℃で保存した。凍結腎臓を20 mM Tris-HCl pH 7.6、250 mM Mannitol、1 mM EDTA、cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail（Roche, Sw

i t z e r l a n d) 含む緩衝液に再懸濁し、PHYSCOTRON (マイクロテック・ニチオン株式会社) を用いて粉碎した。次いで、試料を P o t t e r - E l v e h j e m ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。1, 000×g で5分間、4℃で遠心後、その上清を3, 000×g で5分間、4℃で遠心した。遠心後、上清と1M MgCl<sub>2</sub>を最終濃度が11 mM MgCl<sub>2</sub>になるように混合し、20分間氷上でインキュベートした。その後、3, 000×g で15分間、4℃で遠心し、粗膜小胞を含む上清を438, 000×g で30分間、4℃で超遠心した。超遠心後に残ったペレット (BBMV s) は20 mM Tris-HCl pH 7.6、250 mM Mannitol を含む緩衝液に懸濁した。BBMV s はBCAタンパク質定量キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。BBMV s は使用するまで-80℃で凍結保存した。

[0089] 2-2. マウスBBMV sによる輸送活性測定

輸送活性測定を行う前に、BBMV内にカリウムを導入する目的で、凍結保存していたBBMV sを解凍後、438, 000×g で30分間、4℃で超遠心後、ペレットを5 mg/mLのタンパク質濃度になるように10 mM Tris-HCl pH 7.6、100 mM KCl、100 mM Mannitol を含む緩衝液に懸濁し、BBMV懸濁液を一晩氷上でインキュベートした。輸送活性測定を開始する前に、最終濃度が5 μMになるようにValinomycinをBBMV sサンプルに添加し室温で30分間インキュベートした。輸送活性測定は、取り込み緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl -またはNaClの代わりにKCl、50 mM Mannitol、D-[<sup>3</sup>H]セリン含有) にBBMVサンプル (100 μg含有) を5倍希釈することによって開始した。反応物は30℃の恒温槽で指示された時間保温し、よく冷えた10 mM Tris-HCl pH 7.6、200 mM Mannitolを含む緩衝液を添加することで反応を停止した。0.45 μmニトロセルロースフィルター (Millipore) に通して濾過し、続いて同じ緩衝液で1回洗

浄した。濾過したフィルターはC l e a r - s o l     l（ナカライテスク）によって融解し、 $\beta$ -シンチレーションカウンター（L S C - 8 0 0 0, H I T A C H I）によってフィルター上の放射能を計測した。阻害実験のために使用した阻害剤は、D - [  $^3$  H ] セリン取り込み緩衝液と同時に添加した。

[0090] 2 - 3 . F l p l n 2 9 3 T R 安定発現細胞株の構築

(1) p c D N A 5 - h S L C 5 A 8 ( h u m a n   S L C 5 A 8 / S M C T 1 ) のクローニング

現在、h S L C 5 A 8 の c D N A 配列 : N M \_ 1 4 5 9 1 3（配列番号1）、A F 5 3 6 2 1 6（配列番号25）、A F 5 3 6 2 1 7（配列番号26）およびA K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）がN C B I データベースで利用可能である。A F 5 3 6 2 1 6（配列番号25）が機能的解析研究において使用され、N M \_ 1 4 5 9 1 3（配列番号1）がいくつかのゲノム／プロテオーム研究から同定されている。h S L C 5 A 8 \_ A K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）のc D N A を独立行政法人 製品評価技術基盤機構（N B R C, N I T E）から入手した。N M \_ 1 4 5 9 1 3（配列番号1）と比較してA K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）はV 1 9 3 I、A 2 0 1 T およびM 4 9 0 I のバリエーションを含む。したがって、c D N A クローンN M \_ 1 4 5 9 1 3（配列番号1）は、A K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）から構築した。

[0091] はじめにN B R C から入手したh S L C 5 A 8 \_ A K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）のc D N A をp 3 X F L A G - C M V - 1 4 発現ベクターに組み込み、3 x F L A G タグがC 末端に付加したh S L C 5 A 8 \_ A K 3 1 3 7 8 8 を得た。h S L C 5 A 8 \_ A K 3 1 3 7 8 8（配列番号27）のコーディング配列が、

5' -ACTAAGCTTATGGACACGCCACGGGGC-3'（5' 末端にH i n d I I I）（配列番号28）および、

5' -GCCGGATCCCAAACGAGTCCCATTGCTCTTG-3'（3' 末端にB a m H I）（配列番号29）

のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により増幅した。P

PCR反応とサーマルサイクルプロファイルはQ5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼ (New England BioLabs) を用い、製造元のプロトコルに従って行なった: PCR反応は100 ngのベクター鋳型、0.2 mM dNTPs、0.5  $\mu$ Mの各プライマー、Q5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼを混合し全量を50  $\mu$ Lとして行なった。98 °Cで30秒間反応させた後、98 °C 10秒、55 °C Ramp 50% 30秒、72 °C 1分のサイクルを35回行なった。さらにその後、72 °Cで2分間反応させた。

[0092] PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動で分析し、1.9 kbpの予想サイズを得た。PCR産物をGel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany) を用いて精製し、プラスミドベクターをFavorPrep plasmid extraction mini kit (Favorgen) を用いて製造元のプロトコルに従って行なった。精製したプラスミドベクターおよびPCR産物をHindIIIとBamHIで切断し、切断したPCR挿入物はT4 DNA ligase (NEB) を用いて切断済みのベクターにライゲーションした。ベクターとPCR挿入物は8:1の割合で混合し、16 °Cで1時間反応させた。その後、ヒートショック法によりDH5 $\alpha$ 大腸菌コンピテントセル (BioDynamics Laboratory) に形質転換を行なった。それらの細胞は100 mg/L Ampicillinを含むLB培地プレート上に、16時間、37 °Cで培養した。アンピシリン耐性クローンを収集し、DNAサイズスクリーニングによりスクリーニングした。DNAサイズスクリーニングは、溶解緩衝液 (10% w/v sucrose、100 mM NaOH、100 mM KCl、5 mM EDTA、0.25% w/v SDS、0.05% w/v bromophenol blue) 中に大腸菌コロニーを混合し、37 °Cで5分間インキュベート後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分析することによって行なった。このスクリーニング手法により、陽性クローンはアガロースゲル上でベクターバッ

クボーンよりも大きいDNAサイズを示した。最後に陽性クローンのDNA配列を確認した。コンストラクトの名前は「pCMV14-hSLC5A8\_\_AK313788-3xFLAG」とした。

[0093] 次のステップは、ベクターバックボーンとしてpcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) を用い、テンプレートとしてpCMV14-hSLC5A8\_\_AK313788-3xFLAGを用いて「pcDNA5-hSLC5A8\_\_NM145913-3xFLAG」を生成し、hSLC5A8\_\_NM145913-3xFLAGの挿入断片を生成することである。hSLC5A8\_\_AK313788には3つの変異 (V193I, A201T, M490I) が存在するため、これらをさらに変異させHiFi DNA Assembly (NEB) を用いて同時にサブクローニングを行うことを目的とした。pcDNA5-hSLC5A8\_\_NM145913-3xFLAGを生成する前に、「pcDNA5-hSLC5A8\_\_M490I-3xFLAG」 (V193とA201がそれぞれI193とT201に変異したクローン) を構築した。以下のように3つのプライマーセットを用いて、PCR産物を作製した。

[0094] 1) 5' -TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGCGGCCATGGACACGCCACGGGGC-3' (配列番号30)  
5' -AAATCCAGCCACCATGATCCCAACTTGAAAAACATCTGTCCAG-3' (配列番号31)  
2) 5' -TTGGGATCATGGTGGCTGGATTTGCATCCGTGATTATACAGGC-3' (配列番号32)  
5' -CCACCAACCATACCAAATACGCTGAGTGCTGCCTGC-3' (配列番号33)  
3) 5' -GCGTATTTGGTATGGTTGGTGGACCACTTA-3' (配列番号34)  
5' -TTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCTACTTGTTCATCGTCATCCTTG-3' (配列番号35)

[0095] PCR反応はQ5 High-Fidelity DNAポリメラーゼを用いて、以下のように改変を加えた製造元のプロトコルに従って行なった。1

00 ngのベクター鑄型、0.2 mM dNTPs、0.5  $\mu$ Mの各プライマー、Q5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼを混合し全量を50  $\mu$ Lとして行なった。98 °Cで30秒間反応させた後、98 °C 10秒、55 °C Ramp 50% 30秒、72 °C 30秒のサイクルを35回行なった。さらにその後、72 °Cで2分間反応させた。PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動で分析し、1.9 kbpの予想サイズを得た。PCR産物を1%アガアロースゲルで電気泳動して分析した。3ピースのPCR産物を生成後、HiFi DNA Assembly Kit (NEB) によってBamHI + XhoI を付加した線状化pcDNA5/FRT/TOをベクター：挿入物の比=8：1として組み合わせた。混合物を50 °C、1時間インキュベートし、ヒートショック法によりDH5 $\alpha$ 大腸菌コンピテントセルに形質転換した。アンピシリン耐性LB培地で増殖した陽性クローンを、DNAサイズスクリーニングによりスクリーニングし、配列を確認した。最終的に「pcDNA5-hSLC5A8\_\_M490I-3xFLAG」(C末に3xFLAGタグ付加)を得ることができた。

[0096] pcDNA5-hSLC5A8\_\_M490I-3xFLAGを鑄型として用い、M490をI490に変異誘導した。PCR反応は以下のプライマーを用いて部位特異的に変異を誘導した。

[0097] 5'-CTACAATGAGACAAATTTGATGACAACCACAGAAATGC-3' (配列番号36)

5'-GCATTTCTGTGGTTGTCATCAAATTTGTCTCATTGTAG-3' (配列番号37)

[0098] PCR反応はQ5 High-Fidelity DNAポリメラーゼを用いて、以下のように改変を加えた製造元のプロトコルに従って行なった。

100 ngのベクター鑄型、0.2 mM dNTPs、0.5  $\mu$ Mの各プライマー、Q5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼを混合し全量を50  $\mu$ Lとして行なった。98 °Cで30秒間反応させた後、98 °C 30秒、55 °C 30秒、72 °C 7分のサイクルを18回行なった。さらにその後、72 °C 7分間反応させた。全プラスミドのPCR産物にDpnIを添加し、37 °C、2時間インキュベート後、Gel and

PCR clean-up kit を用いて精製した。精製されたプラスミドをヒートショック法により DH5 $\alpha$  大腸菌コンピテントセルに形質転換した。その後、陽性クローンをアンピシリン耐性 LB 培地で増殖させ、配列を確認した。最終的に pcDNA5-hSLC5A8\_\_NM145913-3xFLAG の陽性クローンを得ることができ、これを「pcDNA5-hSLC5A8-3xFLAG」とした。

[0099] (2) pcDNA5-hSLC5A12 (human SLC5A12 / SMCT2) のクローニング

hSLC5A12 はヒト腎臓 cDNA ライブラリから増幅した。このタンパク質は hSLC5A12 cDNA を p3xFLAG-CMV-14 発現ベクターにクローニングすることにより、C 末端に 3xFLAG をタグ付けするように設計した。hSLC5A12 のコード配列を、以下のプライマーを用い、PCR により増幅した。

[0100] 5'-TTAGGTACCCATGGAGGTGAAGAACTTTGCAG-3' (5' 末端に KpnI) (配列番号 38)

5'-CCGGGATCCGTAGAAATGGGTAGTCTC-3' (3' 末端に BamHI) (配列番号 39)

[0101] PCR 反応とサーマルサイクルプロファイルは Q5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼ (New England BioLabs) を用い、製造元のプロトコルに改変を加え行なった: PCR 反応は 100 ng のベクター鋳型、0.2 mM dNTPs、0.5  $\mu$ M の各プライマー、Q5 High-Fidelity DNA ポリメラーゼを混合し全量を 50  $\mu$ L として行なった。98 °C で 30 秒間反応させた後、98 °C 10 秒、55 °C Ramp 50% 30 秒、72 °C 1 分のサイクルを 35 回行なった。さらにその後、72 °C で 2 分間反応させた。PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動で分析し、1.9 kbp の予想サイズを得た。PCR 産物を Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany) を用いて精製し、プラスミ

ドベクターをFavorPrep plasmid extraction mini kit (Favorgen) を用いて製造元のプロトコルに従って行なった。精製したプラスミドおよびPCR産物をKpnIとBamHIで切断し、切断したPCR挿入物はT4 DNA ligase (NEB) を用いて線形ベクターにライゲーションした。ベクターとPCR挿入物は8 : 1の割合で混合し、16 °Cで1時間反応させた。その後、ヒートショック法によりDH5 $\alpha$ 大腸菌コンピテントセル (BioDynamics Laboratory) に形質転換を行なった。それらの細胞は100 mg/L Ampicillinを含むLB培地プレート上に、16時間、37 °Cで培養した。アンピシリン耐性クローンを収集し、SLC5A8と同様にDNAサイズスクリーニングによりスクリーニングした。得られた陽性クローンはDNA配列を確認し、「pCMV14-hSLC5A12-3xFLAG」とした。

[0102] プラスミドpCMV14-hSLC5A12-3xFLAGを鋳型として用い、PCRによってpCDNA5/FRT/TOに挿入しhSLC5A12-3xFLAGを生成した。用いたプライマーは以下のものである。

[0103] 5' -TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGCGCGCCATGGAGGTGAAGAACTTTGC-3' (配列番号40)

5' -TTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCTACTTGTCATCGTCATCCTTG-3' (配列番号41)

[0104] PCR反応とサーマルサイクルプロファイルはpCMV14-hSLC5A12-3xFLAGのクローニング時と同様である。XhoIとBamHIで終わるPCR産物を対応する酵素で切断した。挿入物はHiFi DNA Assembly Kit (NEB) によってXhoI+BamHIを付加した線状化pCDNA5/FRT/TOをベクター : 挿入物の比=1 : 4として組み合わせた。混合物を50 °C、1時間インキュベートし、ヒートショック法によりDH5 $\alpha$ 大腸菌コンピテントセルに形質転換した。アンピシリン耐性クローンを収集し、SLC5A8と同様にDNAサイズスクリー

ニングによりアガロースゲル上でスクリーニングした。DNA配列決定により陽性クローンを確認し、「p c D N A 5 - h S L C 5 A 1 2 - 3 x F L A G」とした。

[0105] (3) F l p l n 2 9 3 T R 安定発現細胞株の構築

F l p - l n T R E x 2 9 3 細胞株は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml Penicillin G および100  $\mu$ g/ml streptomycin (P/S) を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて、37℃、5% CO<sub>2</sub>環境下で培養を行なった。細胞は、以下のように対応するp c D N A プラスミド構築物を用いて、3つのタイプの安定な細胞株を構築した。

[0106] 1) p c D N A 5 / F R T / T O ( e m p t y v e c t o r ) → “F l p l n 2 9 3 T R - M o c k” (M o c k)

2) p c D N A 5 - h S L C 5 A 8 - 3 x F L A G → “F l p l n 2 9 3 T R - h S L C 5 A 8 - 3 x F L A G” (h S L C 5 A 8 / h S M C T 1)

3) p c D N A 5 - h S L C 5 A 1 2 - 3 x F L A G → “F l p l n 2 9 3 T R - h S L C 5 A 1 2 - 3 x F L A G” (h S L C 5 A 1 2 / S M C T 2)

[0107] 安定な細胞株を構築するために、F l p - l n T R E x 2 9 3 細胞を、対応するp c D N A 5 - プラスミド構築物とp O G 4 4 F l p - リコンビナーゼ発現ベクター (I n v i t r o g e n) を用いて同時トランスフェクションを行なった。トランスフェクション後の細胞は、DMEM + 10% FBS + P/S + 5 mg/L blasticidin + 150 mg/L hygromycin Bにおいて1:20の割合で播種し、培養した。細胞を1:20で3回継代培養し、DNA挿入と遺伝子発現を確認した。細胞は使用するまで同じ培地を用いて定期的に維持した。F l p l n 2 9 3 T R - h S L C 5 A 8 - 3 x F L A G と F l p l n 2 9 3 T R -

hSLC5A12-3xFLAGは抗FLAG抗体と抗SLC5A12抗体を用いたウェスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色により、hSLC5A8およびhSLC5A12の発現を確認した。FlipIn293TR-hSLC5A8-3FLAGおよびFlipIn293TR-hSLC5A12-3xFLAGは、細胞膜において発現していた。

[0108] 2-4. 安定細胞株における輸送活性測定

FlipIn293TR安定細胞株はpoly-D-lysine-coated 24穴プレートにそれぞれ $5 \times 10^4$  cells/well (Mock)、 $6 \times 10^4$  cells/well (hSLC5A8およびhSLC5A12細胞)播種し、24時間後に組み替え遺伝子発現誘導のために1 mg/L doxycycline hyclateを添加した。細胞を2日間連続培養し、80-90%コンフルエントで輸送活性測定を行なった。ASCT2ノックダウン実験では、細胞播種後12時間後に10 pmol/wellのASCT2 siRNAを、Lipofectamine 3000を用いてトランスフェクションした。

[0109] 輸送活性測定を行う前に、37℃で温めた輸送活性緩衝液(PBS + 1 g/L D-グルコース)で細胞を3回washし、500  $\mu$ Lの緩衝液で10分間、37℃でインキュベートした。輸送活性測定は指定した濃度のD-[<sup>3</sup>H]セリン含有輸送活性緩衝液を添加することにより開始した。添加後の反応物は指示された時間、37℃でインキュベートした。反応はD-[<sup>3</sup>H]セリン含有輸送活性緩衝液を除去することにより停止させ、よく冷えた輸送活性緩衝液で3回washした。細胞は500  $\mu$ Lの0.1 N NaOHにより溶解し、少なくとも1時間インキュベートした。細胞の溶解物は、BCAタンパク質定量によりタンパク質濃度を測定した。溶解物は1 mLのEmulsifier Safe (PerkinElmer, MA, USA)と混合し、 $\beta$ -scintillation counter (LSC-8000, HITACHI)により溶解液中の放射能を測定した。

[0110] Na<sup>+</sup>有無の輸送活性測定では、PBSの代わりにHBSS (+Na<sup>+</sup>: 1

25 mM NaCl、 $-Na^+$ :choline chloride、4.8 mM KCl、1.2 mM  $MgSO_4$ 、1.2 mM  $KH_2PO_4$ 、1.3 mM  $CaCl_2$ 、5.6 mM D-グルコース、25 mM HEPESを用いた。阻害実験では、図に示すように取り込み基質に非放射性標識化合物を含めた。

[0111] 2-5. 統計解析

全ての実験は少なくとも4回繰り返し行なった。データは平均 $\pm$ SEMで表記し、対応のないt検定 (Student's t-test) により検定した。統計解析ソフトは、Prism 8.0を用いた。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ で示した。

[0112] 3. 結果

3-1. BBMVにおけるD-セリン輸送は、主に $Na^+$ 依存的に輸送された (図1)。

[0113] マウス刷子縁膜小胞 (BBMV) における10  $\mu$ M (A) および50  $\mu$ M (B) のD- $[^3H]$ セリン取り込み活性の経時的変化を、 $Na^+$ 存在下 ( $Na^+$ )、非存在下 ( $K^+$ ) で測定し、D-セリン輸送系を区別した。5  $\mu$ Mになるようにバリノマイシンを添加し、膜電位を発生させた。高いD-セリンの取り込みは、 $Na^+$ の取り込み条件で観察され、D-セリン輸送が主に $Na^+$ 依存性輸送体によって駆動されることを示した。

[0114] 3-2. BBMVにおけるD-セリン輸送は、主にASCT2およびSMCT阻害薬によって阻害された (図2)。

[0115] マウスBBMVにおいて、1 mM ニコチン酸または2 mM レースレオニン (L-Thr) の存在下・非存在下 (ー) のD- $[^3H]$ セリン輸送 (10  $\mu$ M) 活性測定を行なった (測定時間は30秒)。 $Na^+$ 依存性取り込みの約30%は、ニコチン酸によって阻害されたことから、SMCT輸送体がこの作用に寄与していることが示唆された。一方で、取り込み活性の約70%は、レースレオニンにおいて阻害されたことから、ASCT2がこの作用に関与していることが示唆された。

[0116] 3-3. human SMCT1 および hSMCT2 は D-セリンを輸送した (図3)。

[0117] FlpIn293TR-hSLC5A8-3xFLAG (hSMCT1) または FlpIn293TR-hSLC5A12-3xFLAG (hSMCT2) 安定細胞株を作製し、(A) Flp-In TREx 293細胞を ASCT2 siRNA ノックダウンし、抗 ASCT2 抗体を用いたウェスタンブロットにより発現を確認した。(B) 取り込み実験を行う2日前に、hSMCT1 および SMCT2 細胞に doxycycline を添加し、発現を誘導した。その発現を、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。(C) 100  $\mu$ M D- [ $^3$ H] セリン取り込みの経時的変化を、ASCT2 内在性の hSMCT1 および 2 安定細胞株において測定した。(D) ASCT2 ノックダウンを用いて hSMCT1 および SMCT2 安定細胞株で測定した。(E) (D) のグラフより、hSMCT1 および SMCT2 安定細胞株における観測値から Mock 細胞における観測値を差し引いたグラフを示した。

[0118] D- [ $^3$ H] セリンの取り込みは、両細胞で観測され、hSMCT1 および SMCT2 を介する D-セリン輸送を示した。対照群と比較し、有意差が認められた。

[0119] 3-4. SMCT トランスポーターにより介される D-セリン輸送は、NSAID により阻害された (図4)。

[0120] 20  $\mu$ M D- [ $^3$ H] セリンの取り込みを、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) : イブuproフェンまたはアセチルサリチル酸の存在下で、FlpIn293TR-hSLC5A8-3xFLAG (hSMCT1) または FlpIn293TR-hSLC5A12-3xFLAG (hSMCT2) 安定細胞株のいずれかで 10 分間測定した。イブuproフェンおよびアセチルサリチル酸は、どちらの細胞株においても D- [ $^3$ H] セリン輸送を阻害したことから、これらの NSAID は hSMCT1 および hSMCT2 輸送体を標的とすることが示唆された。対照群と比較し、有意差が認められた。

[0121] 3-5. BBMVにおけるD-セリン輸送活性は、SMCTs阻害薬イブuproフェンにより阻害された(図5)。

[0122] SMCT阻害剤であるイブuproフェンの存在下で、マウスBBMVにおいて50  $\mu$ M D- $^3$ Hセリンの取り込みを1分間測定した。D- $^3$ Hセリン輸送活性は、1および3 mM イブuproフェンにおいて強く阻害された。

[0123] (実施例2)

1. 材料

実施例1と同様の材料を用いて、以下の実験を行った。

[0124] 2. 実験手順

2-1. HEK 293およびFlip-In TREx 293 細胞における輸送活性測定

HEK 293およびFlip-In TREx 293細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml Penicillin G および100  $\mu$ g/ml streptomycin (P/S) を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub>環境下で培養を行なった。Poly-D-lysineコーティングした24穴プレートに、 $6 \times 10^4$  cells/wellの細胞を播種した。10%

FBSおよびP/Sを添加したDMEM培地に3日間培養した後、細胞を輸送活性測定に用いた。輸送活性測定を行う前に、37 °Cであらかじめ温めた輸送活性測定緩衝液(PBS + 1 g/L D-グルコース)でwashし、500  $\mu$ Lの緩衝液で10分間、37 °Cでインキュベートした。輸送活性測定は指定した濃度のD- $^3$ Hセリン含有輸送活性緩衝液を添加することにより開始した。添加後の反応物は指示された時間、37 °Cでインキュベートした。反応はD- $^3$ Hセリン含有輸送活性緩衝液を除去することにより停止させ、よく冷えた輸送活性緩衝液で3回washした。細胞は500  $\mu$ Lの0.1 N NaOHにより溶解し、少なくとも1時間インキ

ュベートした。細胞の溶解物は、BCAタンパク質定量によりタンパク質濃度を測定した。溶解物は1 mLのEmulsifier Safe (PerkinElmer, MA, USA) と混合し、 $\beta$ -scintillation counter (LSC-8000, HITACHI) により溶解液中の放射能を測定した。Na<sup>+</sup>有無の輸送活性測定では、PBSの代わりにHBSS (+Na<sup>+</sup>: 125 mM NaCl、-Na<sup>+</sup>: choline chloride、4.8 mM KCl、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.3 mM CaCl<sub>2</sub>、5.6 mM D-グルコース、25 mM HEPESを用いた。阻害実験では、図に示すように取り込み基質に非放射性標識化合物を含めた。

[0125] 2-2. FlpIn293TR安定発現細胞株の構築

実施例1の2-3. に記載の手順にてFlpIn293TR安定発現細胞株を構築した。

[0126] 2-3. ウェスタンブロッティングによるタンパク質発現の評価

Flp-In TREx293およびFlpIn293TR安定細胞株は、抗生物質を含まないDMEM + 10% FBS培地中に10<sup>6</sup> cells/6 cm細胞培養プレートに播種した。培養の翌日に10 pmol/wellのASCT2 siRNAを、Lipofectamine 3000を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの8時間後に、遺伝子発現増加を促すため1 mg/Lのdoxycycline hyclateを加えた。トランスフェクションの2日後、よく冷えたリン酸緩衝食塩水 (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7.4で2回細胞をwashし、セルスクレーパーで回収後、遠心してペレットを得た。ペレットは液体窒素で急速冷凍した。凍結細胞は、1% w/v Fos-Choline-12 (Avanti Polar Lipids, AL, USA)、1% w/v n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM; Dojindo Molecular Technolog

ies, Japan)、cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland) を含むPBSに30分間溶解した。15,000×gで溶解液を遠心し、上清のタンパク質量をBCAタンパク質定量キット (Thermo Scientific) によって測定した。50 μg (溶解液から得られたタンパク質) /wellを10% SDS-PAGEを行い、PVDF membrane (Millipore, MA, USA) に転写後、5% skim milk/TBS-T (Tris buffer saline (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)、0.1% v/v Tween-20) またはBlocking One (ナカライテスク) を用いてブロッキングした。一次抗体は抗FLAG-HRP (1:20,000) および抗ASCT2 (1:2,500) 抗体を用い、二次抗体はHRP conjugation (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) またはStarBright 蛍光標識二次抗体 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) をBlocking Oneに1:2,500の割合で希釈し、使用した。HRP結合タンパク質のシグナルは、化学発光検出法 (Immobilon Forte Western HRP substrate, Millipore) を用いて検出した。画像はChemIDoc Touch Imaging system (Bio-Rad Laboratories) を用いて得た。

#### [0127] 2-4. 細胞生存測定

一過性発現系によるD-セリンの毒性試験は、HEK293を用いて行った。細胞を96穴プレートに10,000 cells/wellで播種し、0.1 μg DNA (MockはpCMV14、SMCT1はpCMV14-hSLC5A8-3×FLAG、SMCT2はpCMV14-hSLC5A12-3×FLAG) でトランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後にD-セリンを処理し、さらに2日間インキュベートした。

増殖した細胞数はX T T測定により決定した。X T T溶液は、1 m g / m l の X T T (2, 3-B i s - (2-M e t h o x y - 4 - n i t r o - 5 - s u l f o p h e n y l) - 2 H - t e t r a z o l i u m - 5 - c a r b o x a n i l i d e, d i s o d i u m s a l t : B i o t i u m, C A, U S A) を7. 5  $\mu$  g / m l P h e n a z i n e m e t h o s u l f a t e (ナカライテスク) と混合し、培養細胞に添加した。反応は37℃、5% C O<sub>2</sub>、4時間インキュベートした。その後、450 n mの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

[0128] 安定細胞下部による毒性試験は、F l p l n 2 9 3 T R安定細胞株を用いて行った。細胞をp o l y - D - l y s i n e - コーティング96穴プレートにそれぞれ6. 5 x 1 0<sup>3</sup> c e l l s / w e l l (M o c k)、8 x 1 0<sup>3</sup> c e l l s / w e l l (h S L C 5 A 8およびh S L C 5 A 1 2細胞) を、抗生物質を含まないD M E M + 透析済みF B S培地中に播種した。24時間後、異なる濃度のL - またはD - セリンを処理し、1 m g / L d o x y c y c l i n e h y c l a t eを細胞に添加し、組換え遺伝子発現を誘導した。A S C T 2ノックダウン実験は、細胞播種後12時間経過してから2 p m o l / w e l lのA S C T 2 s i R N Aを、L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0を用いてトランスフェクションした。イブプロフェンの効果はD - セリン処理と同時に添加した。細胞は2日間培養し、80%コンフルエントに達した。増殖した細胞数は、上記と同様にX T T測定を行ない決定した。

[0129] 2 - 5. 統計解析

実施例1の2 - 5. と同様の手順にて統計解析を行った。

[0130] 3. 結果

3 - 1. D - セリンはF l p - l n T R E x 2 9 3細胞の増殖を抑制した(図6)。

[0131] F l p - l n T R E x 2 9 3細胞をL - またはD - セリンで2日間処理し、細胞増殖をX T Tアッセイにより測定した。同じデータを(A)線形曲

線プロット (B) 片対数プロットで示した。D-セリン処理による細胞増殖減少の  $EC_{50}$  は  $18.7 \text{ mM}$  だった。

D-セリンはトランスポーターを介して細胞内に輸送され、細胞内D-セリンは細胞増殖を抑制することが示唆された。D-セリン濃度が  $10 \sim 40 \text{ mM}$  において有意差がみられた。

[0132] 3-2. D-セリン輸送は細胞株の  $Na^+$  依存性輸送体によって駆動された (図7)。

[0133]  $10 \mu\text{M}$  D- $[^3\text{H}]$  セリン取り込み活性の経時的変化は (A) HEK293細胞、(B) Flp-In TREx 293細胞株を用いて測定した。両細胞株において、 $Na^+$  による取り込み条件でD-セリンの高い取り込みが見られた。

[0134] 3-3. D-セリン輸送はASCT2阻害薬によって相対的に阻害された (図8)。

D- $[^3\text{H}]$  セリンの取り込みは、いくつかの阻害薬存在下でFlp-In TREx 293 cell株において10分間測定した。1) ASCT2非特異的阻害薬: Benzyl-Cys (S-benzyl-L-cysteine) およびGPNA (L- $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide)、2) ASCT2の基質: L-セリン、L-スレオニン、L-メチオニン、3) system A/N阻害薬: MeAIB ( $\alpha$ -Methylaminoisobutyric acid)。取り込み活性はASCT2非特異的阻害薬および基質により阻害されたが、system A/N阻害薬では阻害されなかったことから、ASCT2がFlp-In TREx 293細胞株におけるD-セリンの取り込みに寄与することが示唆された。

[0135] 3-4. Flp-In TREx 293細胞にはASCT2トランスポーターが発現し、そのKDはD-セリンの毒性を軽減した (図9)。

(A) ウェスタンブロット法により、ASCT2トランスポーターがFlp-In TREx 293細胞に内因的に発現することを示した。Flp-In

In TREx 293細胞におけるASCT2ノックダウンをASCT2-siRNAトランスフェクションを用いて行なった。Flip-In TREx 293細胞の膜画分におけるASCT2の発現をウェスタンブロット法により検出した。このことから、内因性ASCT2の発現が、ASCT2ノックダウン細胞で高く抑制されることを示した。

(B) Flip-In TREx 293対照細胞およびASCT2ノックダウン細胞をL-またはD-セリンにより2日間処理し、細胞増殖をXTT測定により計測した。L-セリンは両対照細胞に影響を及ぼさなかった。一方で、細胞増殖に対するD-セリンの毒性は、ASCT2ノックダウン細胞で緩和された。このことから、ASCT2が細胞内D-セリン取り込みに寄与することが強く示唆される。

[0136] 対照細胞におけるD-セリンと比較して、ASCT2-siRNA処理細胞におけるD-セリンの有意な効果は、20～25 mMの濃度で観察された。

[0137] 3-5. SMCT1およびSMCT2の一過性発現系によるD-セリンの毒性試験(図10)。

[0138] D-セリンの毒性試験は(A) pCMV14-hSLC5A8-3xFLAG (SMCT1)または(B) pCMV14-hSLC5A12-3xFLAG (SMCT2)を一過性トランスフェクションしたHEK293細胞において行った。SMCT1およびSMCT2発現細胞において、D-セリン処理はMock細胞(Mock)と比較してより高い細胞毒性を誘導した。

[0139] 3-6. hSMCT安定細胞株の構築(図11-1及び図11-2)

(A) hSMCT1-3xFLAG安定細胞株を作製するためのpCDNA5-hSLC5A8-3xFLAGのベクターマップ

(B) hSMCT2-3xFLAG安定細胞株を作製するためのpCDNA5-hSLC5A12-3xFLAGのベクターマップ

(C) hSMCT1-3xFLAG(矢頭)および hSMCT2-3xFLAG

L A G（矢印）を、抗 F L A G 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。どちらの安定細胞株に対応するタンパク質を発現することを示した。

[0140] 3-7. S M C T 2 は D-セリンによる増殖抑制を増強した（図 1 2）。

[0141] セリン処理による細胞増殖効果を、F l p l n 2 9 3 T R-M o c k （M o c k） または F l p l n 2 9 3 T R-h S L C 5 A 1 2-3 x F L A G （S M C T 2）安定細胞株で調べた。両細胞における L-セリン処理は細胞増殖に影響しなかった。D-セリン処理により、M o c k 細胞（●）よりも S M C T 2 細胞（■）においてより細胞増殖の減少が見られた。これらのことから、S M C T 2 が D-セリンにより増殖減少効果を増強することを示し、S M C T 2 が D-セリンの取り込みに寄与することを示唆した。

\* M o c k と比較した S M C T 2 における D-セリンの有意な影響は、1 5 ~ 2 5 m M の濃度で観察された。P < 0. 0 5。

[0142] 3-8. イブプロフェンは S M C T 2 安定細胞株における D-セリン感受性を低下させた（図 1 3）。

D-セリン処理による細胞増殖効果を F l p l n 2 9 3 T R-M o c k （M o c k）および F l p l n 2 9 3 T R-h S L C 5 A 1 2-3 x F L A G （S M C T 2）安定細胞株で行なった。S M C T 2 細胞（●）における D-セリン処理は、M o c k 細胞（○）と比較して強い増殖低下をもたらした。S M C T 2 の阻害薬である 5 0 0 μ M イブプロフェン（■）の S M C T 2 細胞への添加は、D-セリン効果を M o c k 細胞と同レベルに低下させた。これらのことから、イブプロフェンが S M C T 2 を介した D-セリンの取り込みを阻害することを示唆した。S M C T 2 安定発現細胞における D-セリンの蓄積は減少し、D-セリンの毒性作用は軽度だった。

[0143] S M C T 2 と比較したイブプロフェン添加 S M C T におけるイブプロフェンの有意な効果は、1 7. 5 ~ 2 0 m M の濃度で観察された。S M C T 2 + 5 0 0 μ M イブプロフェンと M o c k 細胞間に有意な差は見られなかった。

[0144] 3-9. SMC T1はD-セリン感受性を増加させ、イブプロフェンはその増加したD-セリン感受性を打ち消した(図14)。

[0145] D-セリン処理による細胞増殖効果をF l p l n 2 9 3 T R - M o c k ( M o c k ) およびF l p l n 2 9 3 T R - h S L C 5 A 8 - 3 x F L A G ( S M C T 1 ) 安定細胞株で行なった。SMC T1細胞(●)におけるD-セリン処理は、M o c k 細胞(O)と比較して強い増殖低下をもたらした。SMC T1の阻害薬である500  $\mu$ M イブプロフェン(■)のSMC T1細胞への添加は、D-セリン効果をM o c k 細胞と同レベルに低下させた。これらのことから、イブプロフェンがSMC T1を介したD-セリンの取り込みを阻害することを示唆した。SMC T1細胞におけるD-セリンの蓄積は減少し、D-セリンの毒性作用は軽度だった。

[0146] SMC T1と比較したイブプロフェン添加のSMC Tにおけるイブプロフェンの有意な効果は、10~20 mMの濃度で観察された。SMC T1 + 500  $\mu$ M イブプロフェンとM o c k 細胞間で有意な差は見られなかった。

[0147] (実施例3)

1. I R I マウス由来の腎刷子縁膜画分のプロテオーム解析

以前の研究では、腎虚血再灌流傷害(I R I)を有するマウスモデルが、尿中と血清中にL-/D-セリン恒常性(ホメオスタシス)の不均衡を有することを示した。おそらく腎D-セリン輸送の改変に関連した、D-アミノ酸オキシダーゼ(D A O)の低活性が、血清中のD-セリンの高度な蓄積を引き起こすものと考えられる。このことから、I R Iの際のD-セリントランスポーターの発現に基づいて、腎頂端膜上のD-セリントランスポーターを同定するという発想に至った。我々は虚血再灌流傷害(I R I)マウスの腎臓からの腎刷子縁膜画分のプロテオミクス分析を実施した。全ての同定されたタンパク質から、 $\log_2$  (F o l d C h a n g e) (8 h / 0 h) を統計的有意差P値( $-\log_{10}$ )に対して火山プロットを行った(図15(A))。トランスポーターの火山プロットを図15(B)に示す。既知

のD-セリントランスポーターであるASCT2は、0.54のlog2値、0.80の-log10 P値を示し、それをカットオフ値として使用した（図15）。頂端膜に発現し、ASCT2より大きい発現変化（増加と減少の両方）を示すトランスポーターを、候補として選択した。結果として、19のトランスポーターが選択され、そのうち18の候補はSLCであり、1つはMFSであった（表1）。

[0148]

[表1]

表1: IRIマウス由来腎臓画分の質量分析からの候補トランスポーター。リストはSLCsおよびMFSとして分類され、8h/0hでのIRIの比により再整理されている。

| トランスポーター                   | 登録番号   | Log2比<br>8h/0h    | -Log10<br>(P-値)  | ペプ<br>チド | Mascot<br>スコア | 存在量<br>0h <sup>a</sup> | 存在量<br>8h <sup>a</sup> |
|----------------------------|--------|-------------------|------------------|----------|---------------|------------------------|------------------------|
| Slc1a5/Asct2 <sup>b</sup>  | P51912 | 0.54              | 0.80             | 4        | 767           | 1.36E+07               | 2.07E+07               |
| 増加が認められたSlcトランスポーター        |        |                   |                  |          |               |                        |                        |
| Slc38a2/Snat2              | Q8CFE6 | 6.64 <sup>c</sup> | *** <sup>d</sup> | 1        | 66            | ND                     | 4.424E+06              |
| Slc7a1/Cat1                | Q09143 | 1.00              | 2.55             | 1        | 131           | 2.21E+06               | 5.50E+06               |
| Slc16a10/Tat1              | Q3U9N9 | 0.88              | 1.73             | 1        | 121           | 2.12E+06               | 3.56E+06               |
| 減少が認められたSlcトランスポーター        |        |                   |                  |          |               |                        |                        |
| Slc10a2/Ntcp2              | P70172 | -1.02             | 3.75             | 1        | 18            | 6.84E+06               | 4.53E+06               |
| Slc4c1/Oatp-h              | Q8BGD4 | -0.93             | 4.09             | 9        | 4011          | 1.55E+08               | 8.42E+07               |
| Slc19a3/Thtr2              | Q99PL8 | -0.88             | 3.63             | 3        | 160           | 4.26E+07               | 2.58E+07               |
| Slc2a5/Glut5               | Q9WV38 | -0.88             | 3.6              | 2        | 1140          | 6.17E+07               | 3.43E+07               |
| Slc2b1/Oatp2b1             | Q8BX86 | -0.87             | 1.98             | 1        | 36            | 1.28E+06               | 6.76E+05               |
| Slc36a1/Pat1               | Q8K4D3 | -0.84             | 2.58             | 3        | 103           | 6.16E+06               | 3.67E+06               |
| Slc15a2/Pept2              | Q9ES07 | -0.8              | 3.11             | 9        | 2379          | 1.64E+08               | 9.99E+07               |
| Slc23a1/Svct1              | Q9Z2J0 | -0.79             | 2.88             | 21       | 17542         | 2.57E+09               | 1.82E+09               |
| Slc51a/Ost                 | Q8RD00 | -0.66             | 1.19             | 1        | 39            | 1.26E+05               | 1.17E+05               |
| Slc6a18/B <sup>0</sup> at3 | Q8E576 | -0.61             | 2.24             | 11       | 4310          | 1.88E+08               | 1.33E+08               |
| Slc22a13/Oatn1             | Q6A4L0 | -0.6              | 1.87             | 15       | 5948          | 5.71E+08               | 3.32E+08               |
| Slc5a8/Smct1               | Q8BYF6 | -0.57             | 1.75             | 25       | 26044         | 2.69E+09               | 1.83E+09               |
| Slc5a9/Sglt4               | Q8VDT1 | -0.55             | 1.64             | 11       | 7598          | 2.96E+08               | 2.18E+08               |
| Slc22a7/Oat2               | Q91WU2 | -0.52             | 1.51             | 13       | 6100          | 4.24E+08               | 2.65E+08               |
| Slc5a12/Smct2 <sup>e</sup> | Q49B93 | -0.22             | 0.5              | 12       | 4725          | 4.02E+08               | 3.52E+08               |
| TMEM27 <sup>f</sup>        | Q9ESG4 | -0.22             | 0.88             | 9        | 23686         | 2.77E+09               | 2.67E+09               |
| 増加が認められたMfsトランスポーター        |        |                   |                  |          |               |                        |                        |
| Mfsd5/sMot2                | Q921Y4 | 0.57              | 0.86             | 1        | 26            | 3.49E+5                | 3.92E+5                |

<sup>a</sup> 2回測定の前平均値の平均；各実験でn=3

<sup>b</sup> Asct2はD-セリントランスポーター候補の選択のためのベースラインとして使用

<sup>c</sup> 8hにだけ検出され0hには検出されないタンパク質。Proteome Discoverer 2.2での8h/0hのデフォルト値を100とし、それによりlog2比は6.64であると算出された。

<sup>d</sup> \*\*\* p<0.00001

<sup>e</sup> Smct1は判定基準を通過したので、同じファミリーの一員であるSmct2も選択された。

<sup>f</sup> コレクトリンは、B<sup>0</sup>at3関連タンパク質であり、B<sup>0</sup>AT3機能に必要であるため、表中に含めた。

ND: 検出されず。

## [0149] 2. 細胞毒性試験を使ったD-セリントランスポーターのスクリーニング

プロテオームの結果から、D-セリントランスポーターの19候補を選択した。D-セリントランスポーターの機能を介して蓄積された細胞内D-セリンが細胞毒性を誘発するという着想に基づいて、D-セリントランスポー

ターのスクリーニング用の細胞毒性試験を開発した。H E K 2 9 3 細胞を c D N A クローンにより一過性トランスフェクトし、毒性効果の初期段階と静止（定常）段階を観察するために、該細胞を 1 5 m M または 2 5 m M の D - セリンでそれぞれ処置した。D - セリン処置から 2 日後、細胞を X T T 細胞増殖アッセイに供した。各構成物における D - セリン毒性効果を M o c k 細胞のものと比較した。測定膜において内因性発現される既知の D - セリントランスポーター A s c 1 をポジティブコントロールとして使用した。その結果から、S M C T 2、C A T 1、T A T 1 および S N A T 2 でトランスフェクトされた細胞は、1 5 m M D - セリン処置の毒性を増加させることが示された（図 1 6 （A））。2 5 m M D - セリン処置では、G L U T 5、S M C T 1、S M C T 2、C A T 1、T H T R 2 および S N A T 2 でトランスフェクトされた細胞において有意な毒性が観察された（図 1 6 （B））。

[0150] 3. D - セリントランスポーターとしての S N A T 2 の同定

D - セリントランスポーターのポジティブ候補を確かめるために、細胞モデルにおいて輸送機能を解明することを目標とした。A S C T 2 は数種の細胞系で発現され、D - セリン蓄積の強バックグラウンドとなり、新規な D - セリントランスポーターの同定の妨げとなることが示された。ほぼ一倍体の細胞系である H A P 1 細胞（H o r i z o n D i s c o v e r y）は、細胞モデルとして有利に使用できる。それらはほぼ全ての染色体の単一コピーを有するため、遺伝子改変を容易にし、それらのトランスクリプトーム分析は確立されており、幾つかの遺伝子ノックアウト細胞系が利用可能である。従って、A S C T 2 ノックアウト H A P 1 細胞を入手し、それを D - セリンスクリーニングのモデルとして使用することにした。

[0151] 野生型細胞に比較して、A S C T 2 ノックアウト H A P 1 細胞は D - セリン取り込みの減弱を示した（図 1 7 （A））。しかしながら、A S C T 2 ノックアウト H A P 1 細胞において依然として D - セリン輸送のバックグラウンドが観察された。H A P 1 細胞のプロテオーム分析（表 2）を用いて、S N A T 1 と S N A T 2 の両方の発現を検出した。S N A T 1 と S N A T 2 は

ナトリウム依存性小型アミノ酸トランスポーターである「システムAファミリー」に属する。我々は、S N A TがH A P 1細胞でのDーセリン輸送に寄与するのではないかと考えた。この仮説を検証するために、システムA阻害剤であるM e A I BによるDーセリン輸送の阻害効果を調べた。その結果は、M e A I BがA S C T 2ノックアウトH A P 1細胞において、Dーセリン輸送を著しく減少させることを示し（図17（B））、このことはS N A T 1またはS N A T 2のいずれか一方またはその両方がDーセリン取り込みに関与していることを示唆している。S N A TによるDーセリン輸送の i n v i t r o分析と共に、今回 I R Iマウスの腎臓からS N A T 2が検出されたことから、S N A T 2がDーセリントランスポーターの1つであると強く示唆される。

[0152] [表2]

表2：Dーセリントランスポーター候補の概要。本表は I R Iマウスでのタンパク質発現、15 mMまたは25 mM Dーセリン処置のいずれかによる毒性効果、およびA S C T 2ノックアウトH A P 1細胞におけるDーセリントランスポーター機能を示す。毒性試験と取り込みアッセイの両方においてポジティブな結果を示すトランスポーターをDーセリントランスポーターであると見なした。

| トランスポーター      | Log2 比<br>8h/0h | 15 mM<br>D-Ser<br>での毒性 <sup>a</sup> | 25 mM<br>D-Ser<br>での毒性 <sup>a</sup> | ASCT2-KO HAP1<br>細胞における<br>D-Ser輸送 | プロテオーム<br>分析による<br>HAP1細胞での<br>内因性発現 |
|---------------|-----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| SLC38A2/SNAT2 | 6.64            | +                                   | +                                   | +                                  | +                                    |
| SLC7A1/CAT1   | 1.00            | ++                                  | ++                                  | ~                                  | +                                    |
| SLC16A10/TAT1 | 0.88            | +                                   | ~                                   | ~                                  | ~                                    |
| SLC19A3/THTR2 | -0.88           | ~                                   | ++                                  | +                                  | ~                                    |
| SLC2A5/GLUT5  | -0.88           | ~                                   | +                                   | ~                                  | ~                                    |
| SLC5A8/SMCT1  | -0.57           | ~                                   | ++                                  | +                                  | ~                                    |
| SLC5A12/SMCT2 | -0.22           | +                                   | ++                                  | +                                  | ~                                    |

<sup>a</sup>+ p < 0.05; ++ p < 0.01; ~有意でない低下  
<sup>b</sup>M e A I B阻害実験から得られた取り込み活性

[0153] 4. A S C T 2ノックアウトH A P 1細胞を使用したDーセリントランスポーターのスクリーニング

細胞毒性試験から導出されたDーセリントランスポーターのポジティブ候補を確認するために、A S C T 2ノックアウトH A P 1細胞においてトラン

スポーター機能を調べた。候補トランスポーターを安定発現する細胞を構築した。その細胞を、cDNAを含む発現ベクターによりトランスフェクトし、選択培地中に維持した。SNAT2により生じるD-セリン輸送活性のバックグラウンドを減少させるMeAIBの存在下で、D-セリン輸送を10分間測定した。ASCT2安定細胞系を構築し、ポジティブコントロールとして使用した。その結果、SMCT1が最大のD-セリン取り込みを示した。SMCT2とTHTR2はD-セリン取り込みを僅かに増加させた（図18）。

[0154] D-セリン誘発細胞毒性試験および取り込み試験の結果は、SNAT2とSMCT1が新たなD-セリントランスポーターでありうるという強力な示唆を与えた（表2）。SMCT2のポジティブな結果は同様に統計的に有意ではなかったが、SMCT2は別の好適な候補である可能性がある。SMCT2はSMCTのもう1つのメンバーであり、低親和性トランスポーターであると報告されているので、SMCT2は低親和性でD-セリンを輸送するものと考えられる。従って、SMCT1とSMCT2を輸送分析のために選択した。

[0155] 5. GABAはASCT2により媒介されるD-セリン輸送を阻害した

[0156] ASCT2は以前にD-セリントランスポーターであると報告されている。その以前の研究はHEK293細胞での我々の本実験の結果と一致した。本実験では、ASCT2の内因性発現とD-セリン輸送機能を観察した。更に、 $[^3\text{H}]$  D-セリン輸送は、ASCT2基質であるL-セリン、L-スレオニンおよびL-メチオニンにより阻害されたが、MeAIBによっては阻害されなかった（図19（A））。特に、GABA（ $\gamma$ -アミノ酪酸）によるD-セリン輸送の阻害を調べた結果、GABAがD-セリン輸送を阻害することが認められた。GABAによる阻害効果を、ASCT2でトランスフェクトされたHEK293細胞においても更に測定した。GABAは、L-セリン輸送に比較して、 $[^3\text{H}]$  D-セリン輸送を同じように阻害した（図19（B））。これらの結果は、GABAが阻害剤としてASCT2と相互作用

用することを強く示唆する。

## 請求の範囲

- [請求項1] D-セリン輸送体タンパク質による細胞内外へのD-セリンの輸送を制御することを特徴とする、D-セリン輸送調節剤。
- [請求項2] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、S M C Tファミリー、G L U T 5、C A T 1、T H T R 2及びS N A T 2からなる第1のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択される、請求項1に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項3] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、A S C TファミリーA s c 1、P A T 1及びA T B<sup>0, +</sup>からなる第2のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質をさらに含む、請求項2に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項4] 細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量を調節することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項5] 血液中及び／又は尿中のD-セリン量を調節することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項6] 前記D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を阻害することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項7] アンチセンスRNA又はDNA分子、RNA i誘導性核酸、マイクロRNA (m i RNA)、リボザイム、ゲノム編集核酸及びそれらの発現ベクター、低分子化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項6に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項8] 前記D-セリン輸送体タンパク質の基質又は阻害剤である、請求項6に記載のD-セリン輸送調節剤。
- [請求項9] イブプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、プロベネシド、アセチルサリチル酸、ナプロキセン、ピログルタミン酸、フェノ

キシ酢酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、L-乳酸、D-乳酸、ピルビン酸、ニコチン酸、アセト酢酸、 $\beta$ -D-ヒドロキシ酪酸、 $\beta$ -L-ヒドロキシ酪酸、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸、安息香酸、サリチル酸、5-アミノサリチル酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、4-クロロフェノキシ酢酸(4-CPA)、2-クロロフェノキシ酢酸(2-CPA)、2,3-ジクロロフェノキシ酢酸、3,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、N-(4-メタンスルホニル-2-ニトロフェニル)-2H-1,3-ベンゾジオキソル-5-アミン(MSNBA)、フルクトース、N-エチルマレイミド(NEM)、N-アミノ-L-アルギニン、N-アミノ-L-ホモアルギニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン、L-オルニチン、メトホルミン、クロロキン、2,4-ジアミノピリミジン、フェドラチニブ(Fedratinib)、AZD1480、セルドゥラチニブ(Cerdulatinib)、チアミン、メチル-アミノ-イソ酪酸(MeAIB)、 $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド(GPNA)、2-アミノ-4-ビス(アリロキシベンジル)アミノブタン酸(AABA)、L-アラニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-セリン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、グリシン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる前記D-セリン輸送体タンパク質の第1の基質又は阻害剤の群から1又は複数選択される、請求項6に記載のD-セリン輸送調節剤。

[請求項10]

フェニルグリシン類似体、ベンジルセリン、ベンジルシステイン、S-ベンジル-L-シスチン、L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド、L-セリン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-アラニン、L-システイン、L-グルタミン、D-アラニン、フェニルグリシン類似体、アラニン類似体、L-セリン、L-アラニン、L-システイン、グリシン、L-スレオニン、タウリン、GABA、トリプトフ

ァン、トリプタミン誘導体、5-ヒドロキシ-L-トリプトファン、セロトニン、インドール-3-プロピオン酸、 $\alpha$ -メチル-D-L-トリプトファン及びその誘導体、並びに医薬的に許容されるその塩、からなる前記D-セリン輸送体タンパク質の第2の基質又は阻害剤の群から1又は複数選択される物質をさらに含む、請求項9に記載のD-セリン輸送調節剤。

[請求項11] 請求項6～10のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。

[請求項12] 前記D-セリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、請求項11に記載の医薬組成物。

[請求項13] 請求項6～10のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防する方法。

[請求項14] 前記D-セリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 前記D-セリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのD-セリンの輸送を促進することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤。

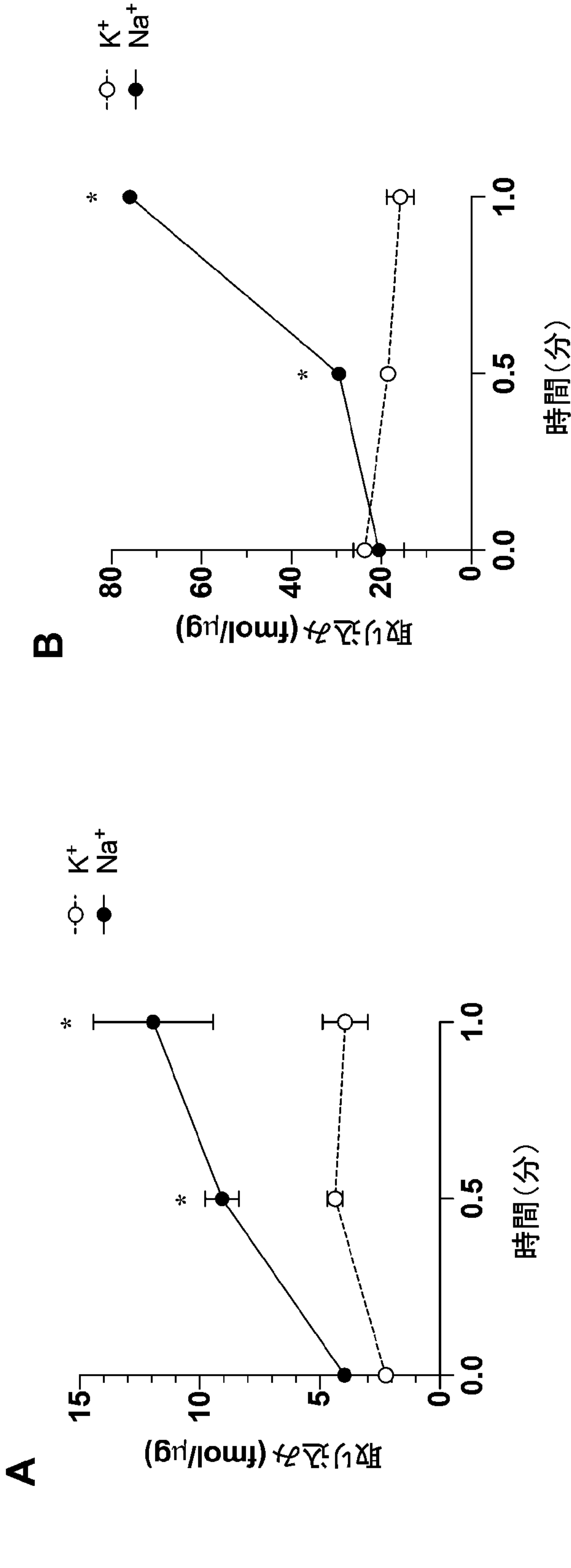
[請求項16] 前記D-セリン輸送体タンパク質、その誘導体又はその一部を発現するベクター、低分子化合物、アプタマー、抗体、抗体フラグメント、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項15に記載のD-セリン輸送調節剤。

[請求項17] ジクロフェナック、クルクミン、アクチビンA、並びに、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2、SNAT2及びPDZK1発現ベクター、からなる群から選択される請求項15に記載のD-セリン輸送調節剤。

- [請求項18] 請求項15～17のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤を有効成分として含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。
- [請求項19] 前記D-セリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、請求項18に記載の医薬組成物。
- [請求項20] 請求項15～17のいずれか1項に記載のD-セリン輸送調節剤を、それを必要とする対象に投与することを含む、細胞内、組織内、器官内又は体液中のD-セリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防する方法。
- [請求項21] 前記D-セリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、請求項20に記載の方法。
- [請求項22] D-セリン輸送体タンパク質による細胞内外へのD-セリンの輸送を制御する物質のスクリーニング方法であって、  
D-セリン輸送体タンパク質を発現する細胞に、候補物質及びD-セリンを適用し、細胞毒性の発現を指標として、細胞内外へのD-セリンの輸送の程度を評価する工程、  
を含む、方法。
- [請求項23] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、SMCTファミリー、GLUT5、CAT1、THTR2及びSNAT2からなる第1のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択される、請求項22に記載の方法。
- [請求項24] 前記D-セリン輸送体タンパク質が、ASCTファミリーAsc1、PAT1及びATB<sup>0, +</sup>からなる第2のD-セリン輸送体タンパク質の群から1又は複数選択されるD-セリン輸送体タンパク質をさらに含む、請求項23に記載の方法。
- [請求項25] 前記細胞が、前記D-セリン輸送体タンパク質を発現するベクターを外部から導入して得られた細胞である、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。

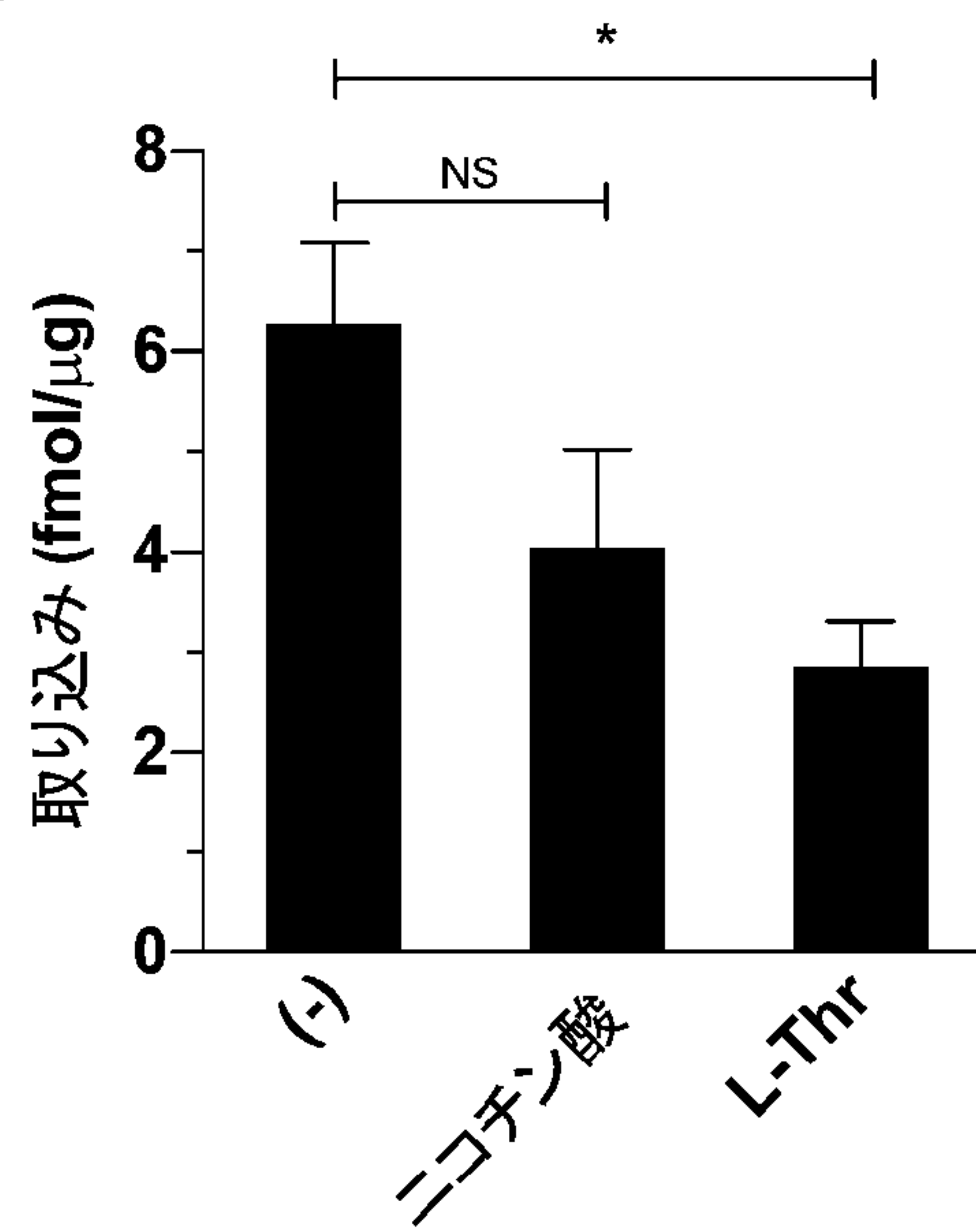
- [請求項26] 前記Dーセリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのDーセリンの輸送を阻害する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の上昇に関連する疾患を治療又は予防する物質をスクリーニングする、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項27] 前記Dーセリン量の上昇に関連する疾患が、腎臓病である、請求項26に記載の方法。
- [請求項28] 前記Dーセリン輸送体タンパク質に作用することによって細胞へのDーセリンの輸送を促進する物質を選択し、細胞内、組織内、器官内又は体液中のDーセリン量の低下に関連する疾患を治療又は予防する物質をスクリーニングする、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項29] 前記Dーセリン量の低下に関連する疾患が、腎臓病である、請求項28に記載の方法。
- [請求項30] 細胞へのDーセリンの輸送を指標とする、Dーセリン輸送体タンパク質のスクリーニング方法。
- [請求項31] Dーセリンの添加によって生じる細胞毒性の発現を、前記細胞へのDーセリンの輸送の指標とする、請求項30に記載の方法。
- [請求項32] 前記細胞が、候補輸送体タンパク質を発現させた細胞である、請求項30又は31に記載の方法。
- [請求項33] 前記細胞が、前記候補輸送体タンパク質を発現するベクターを導入することによって得られた細胞である、請求項32に記載の方法。
- [請求項34] 前記ベクターが、プラスミドベクター、コスミドベクター、フォスミドベクター、人工染色体ベクター、及びウイルスベクターからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

[図1]



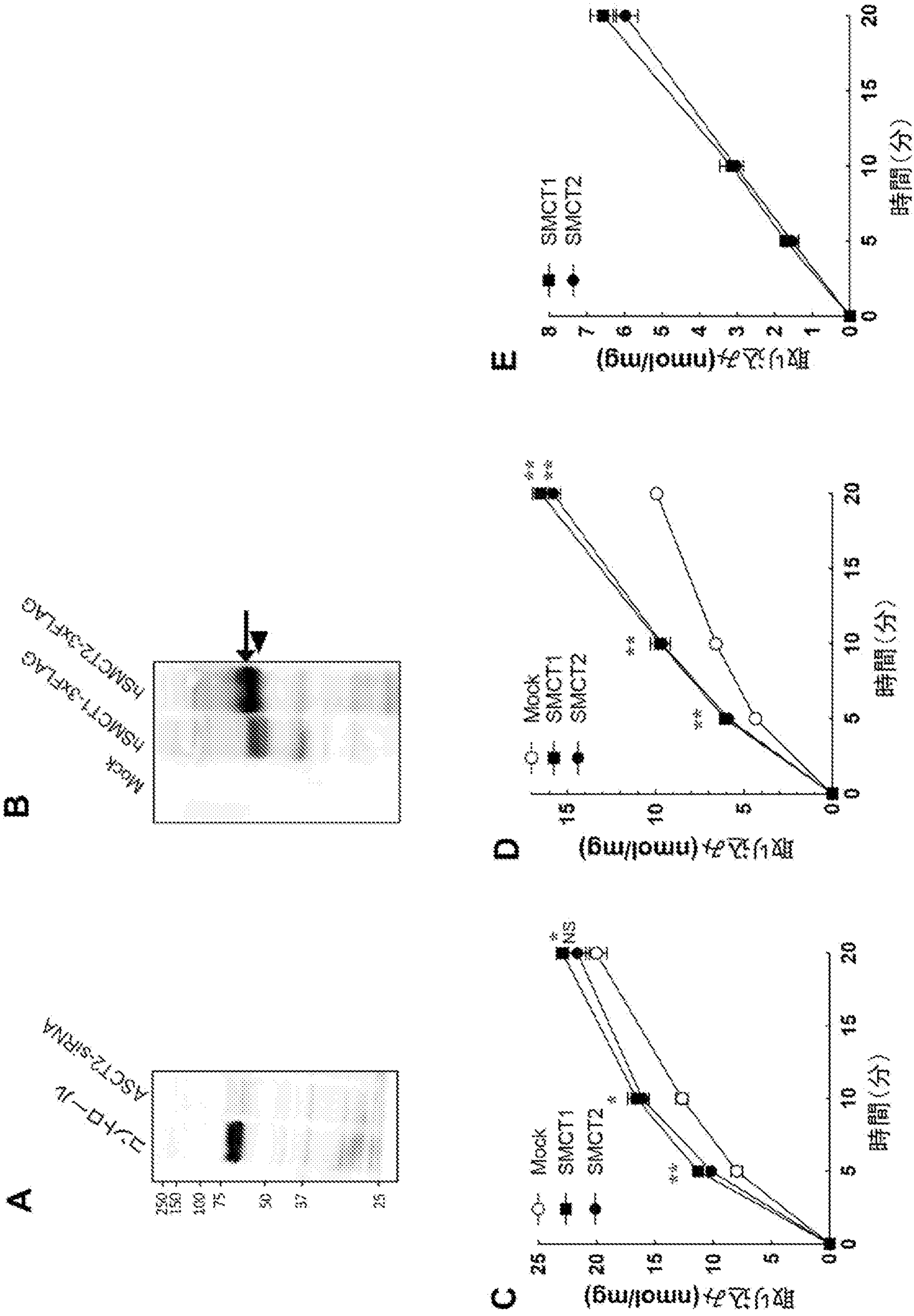
[図2]

図2



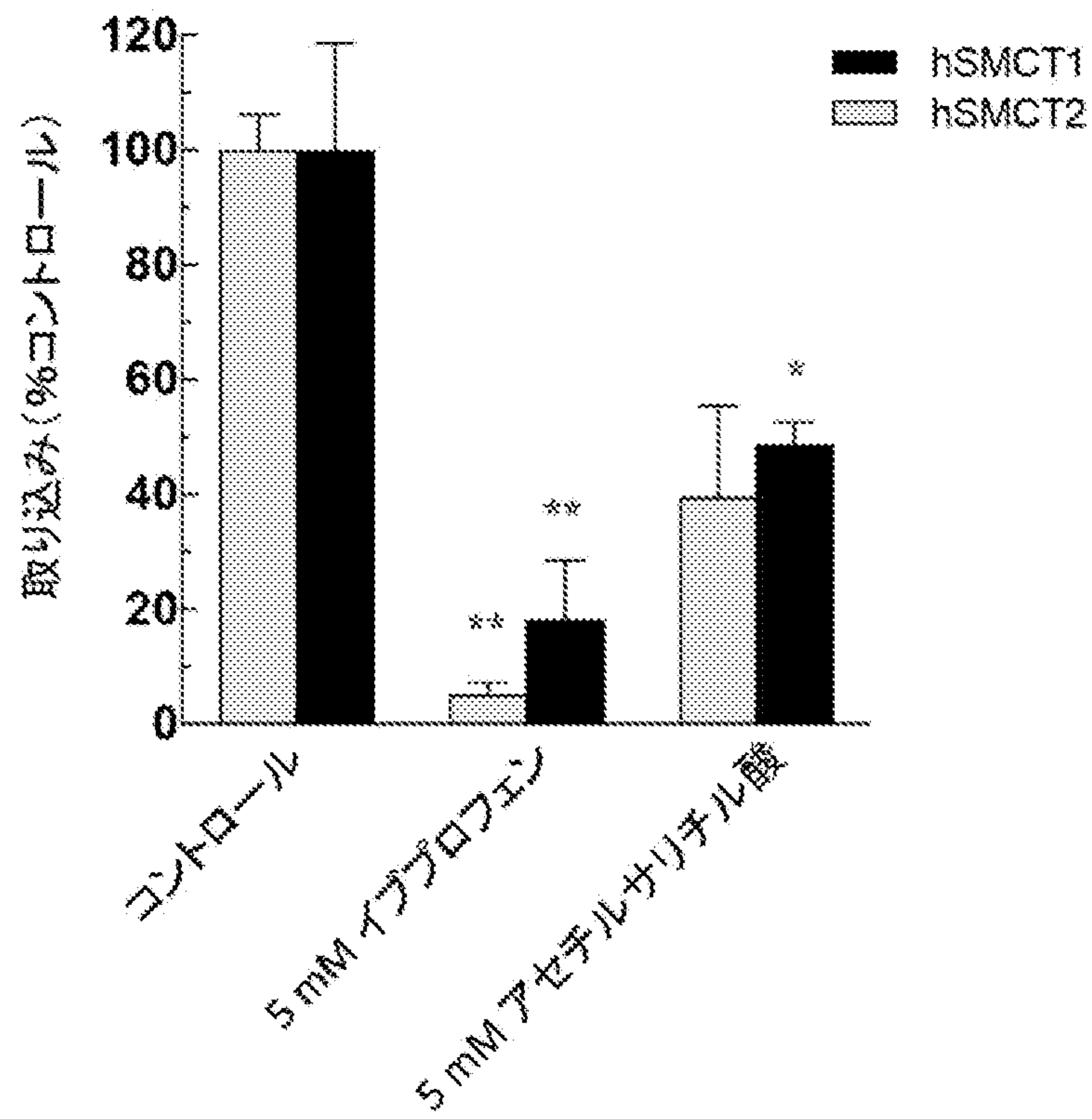
[図3]

図3



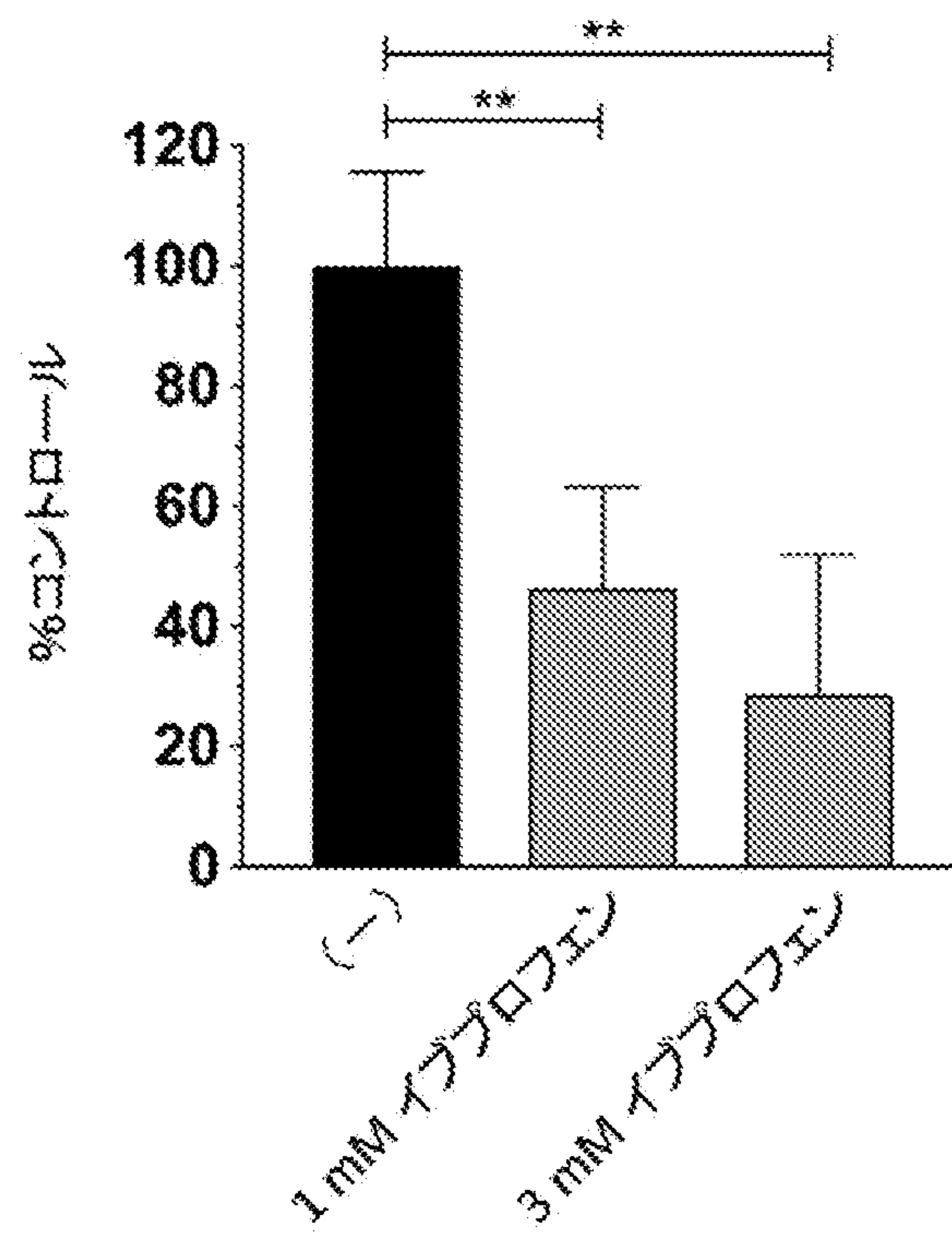
[図4]

図4



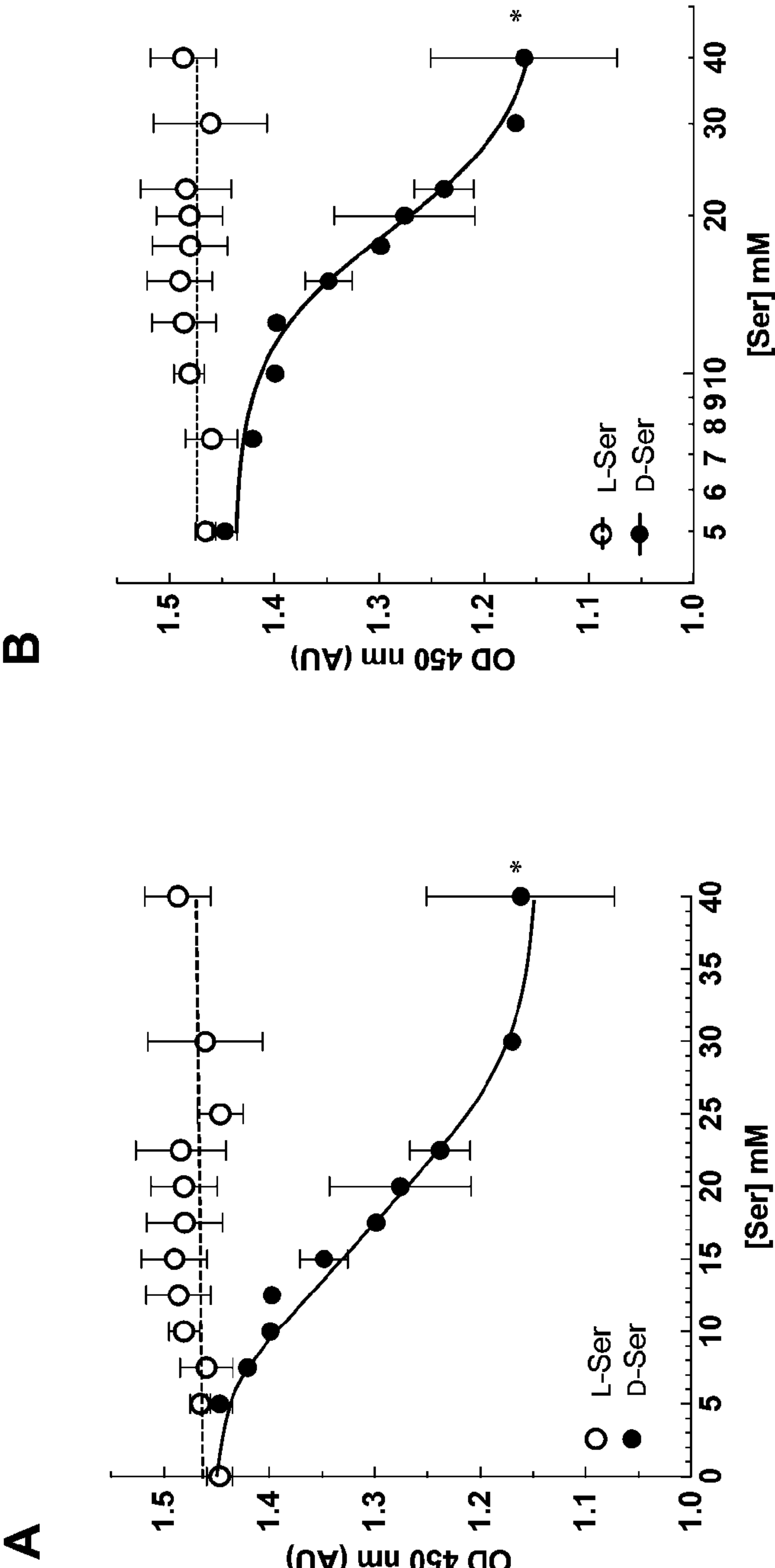
[図5]

図5

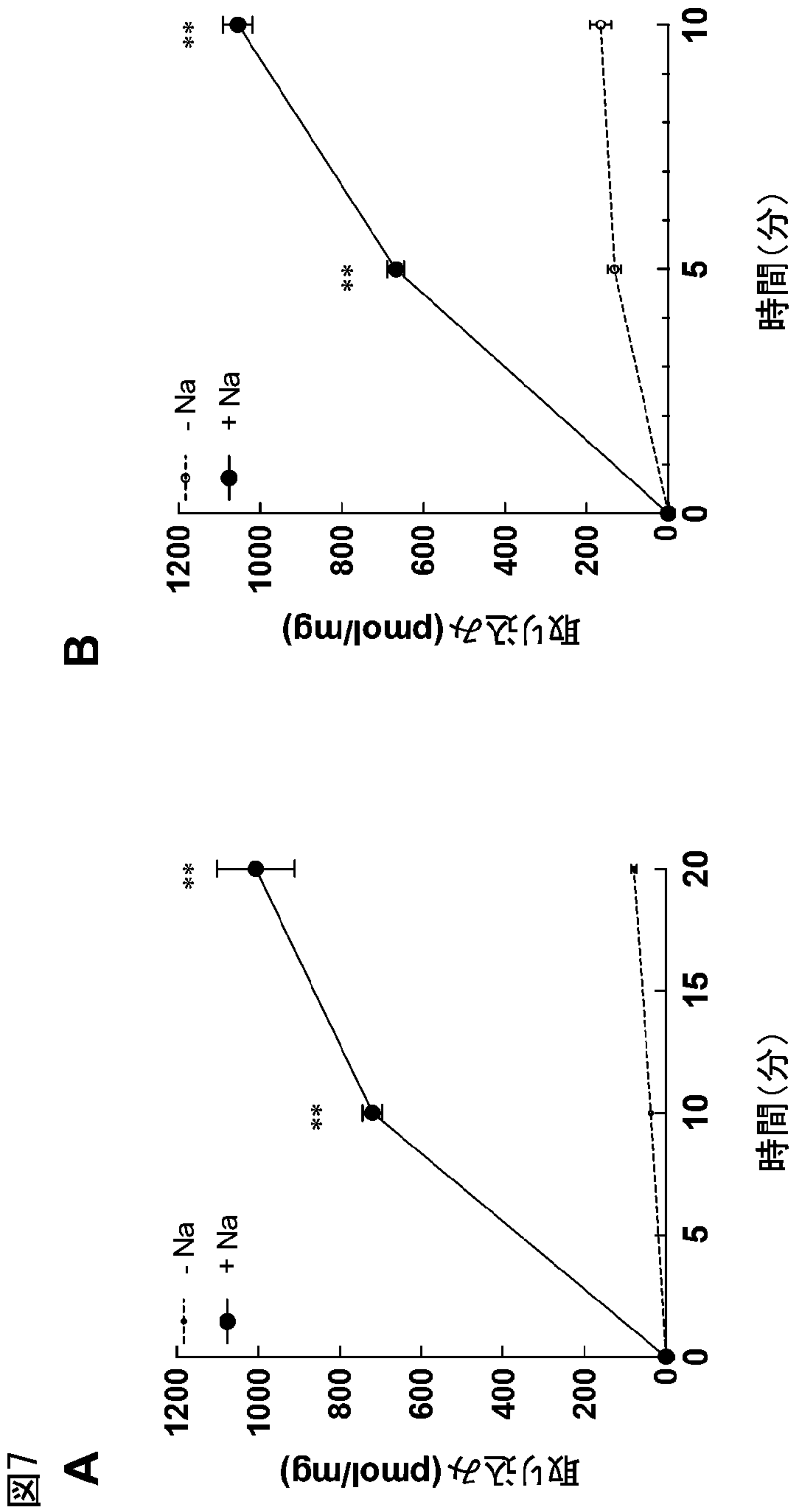


[図6]

図6

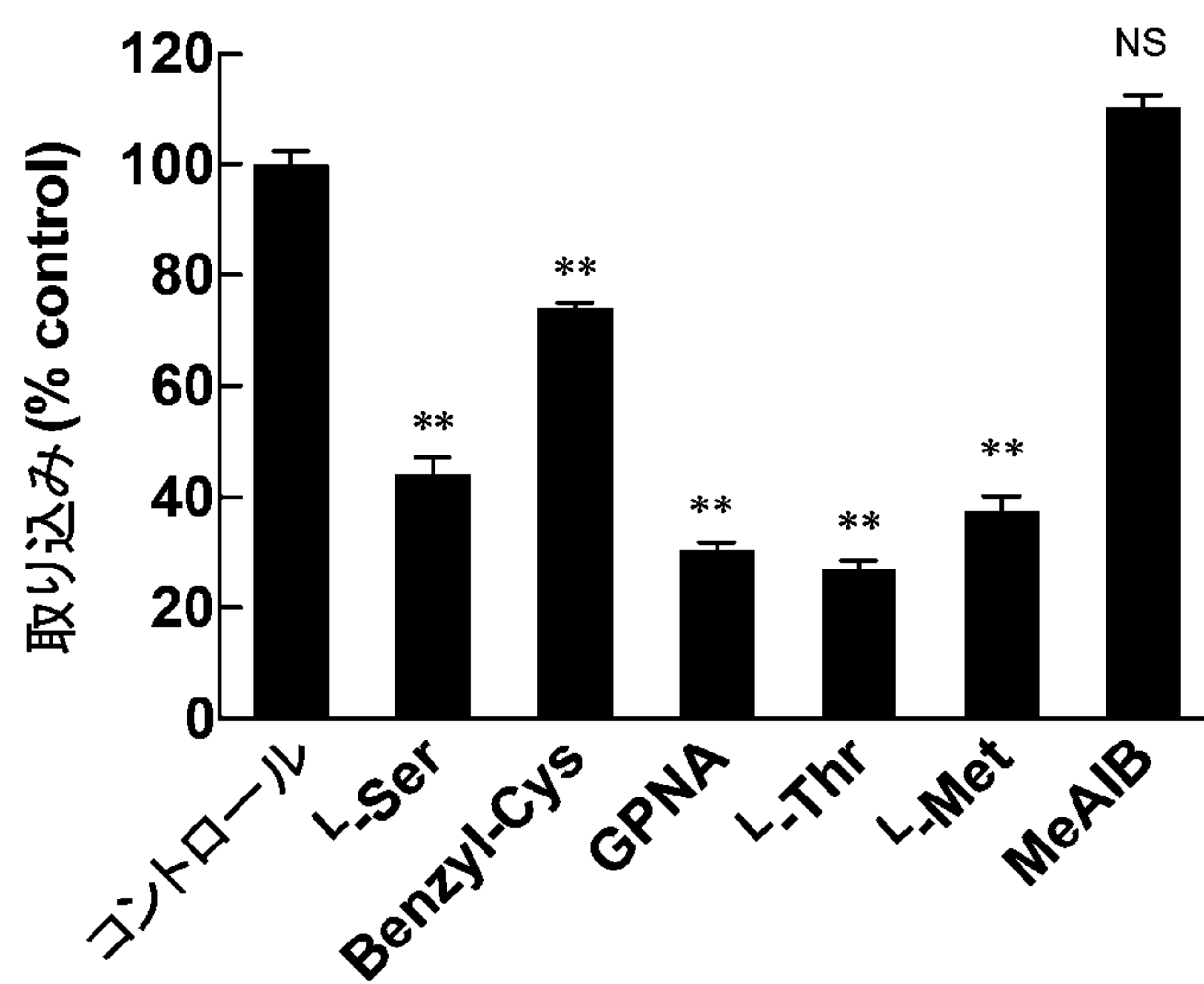


[図7]

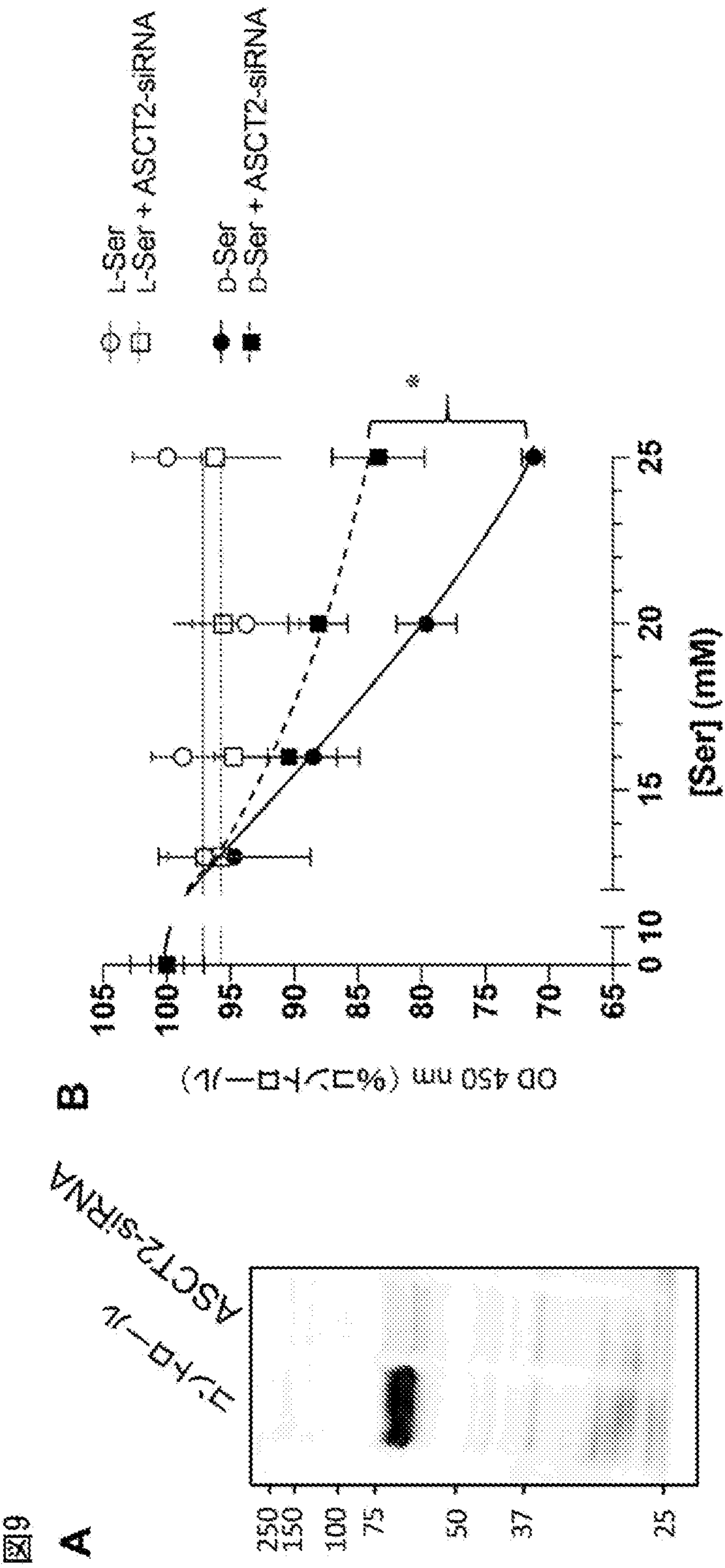


[図8]

図8



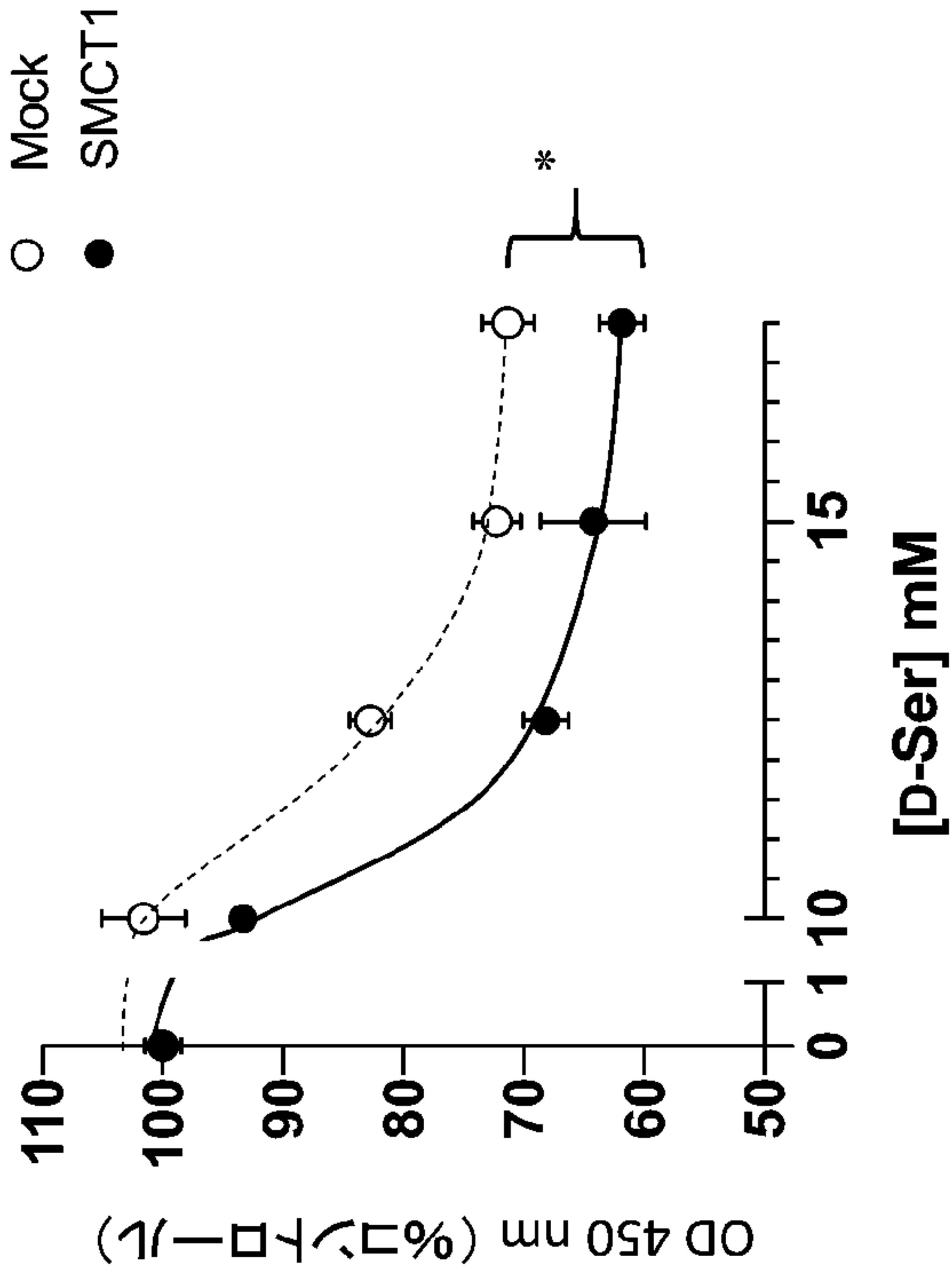
[図9]



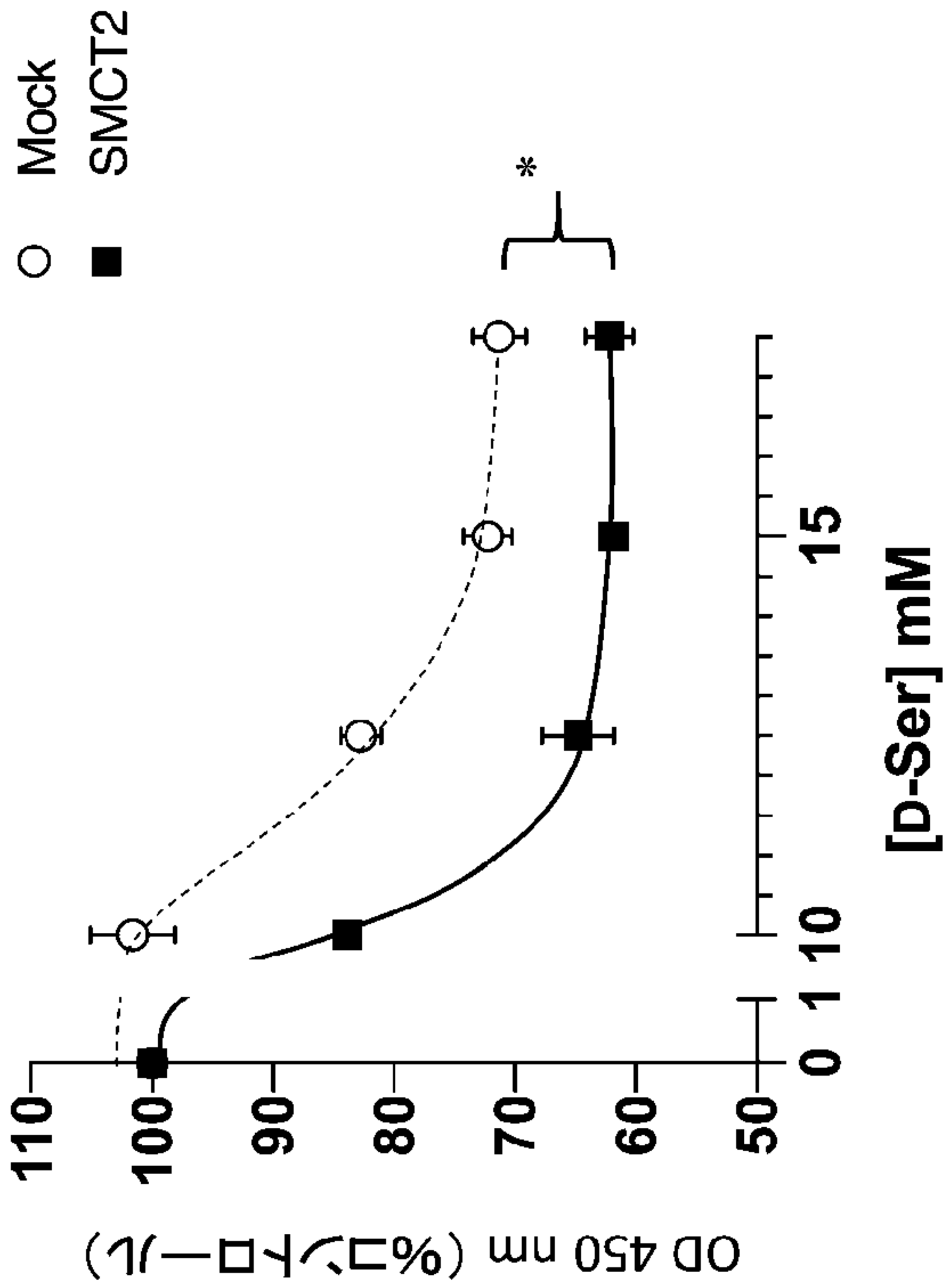
[図10]

図10

A



B



[図11-1]

図11-1

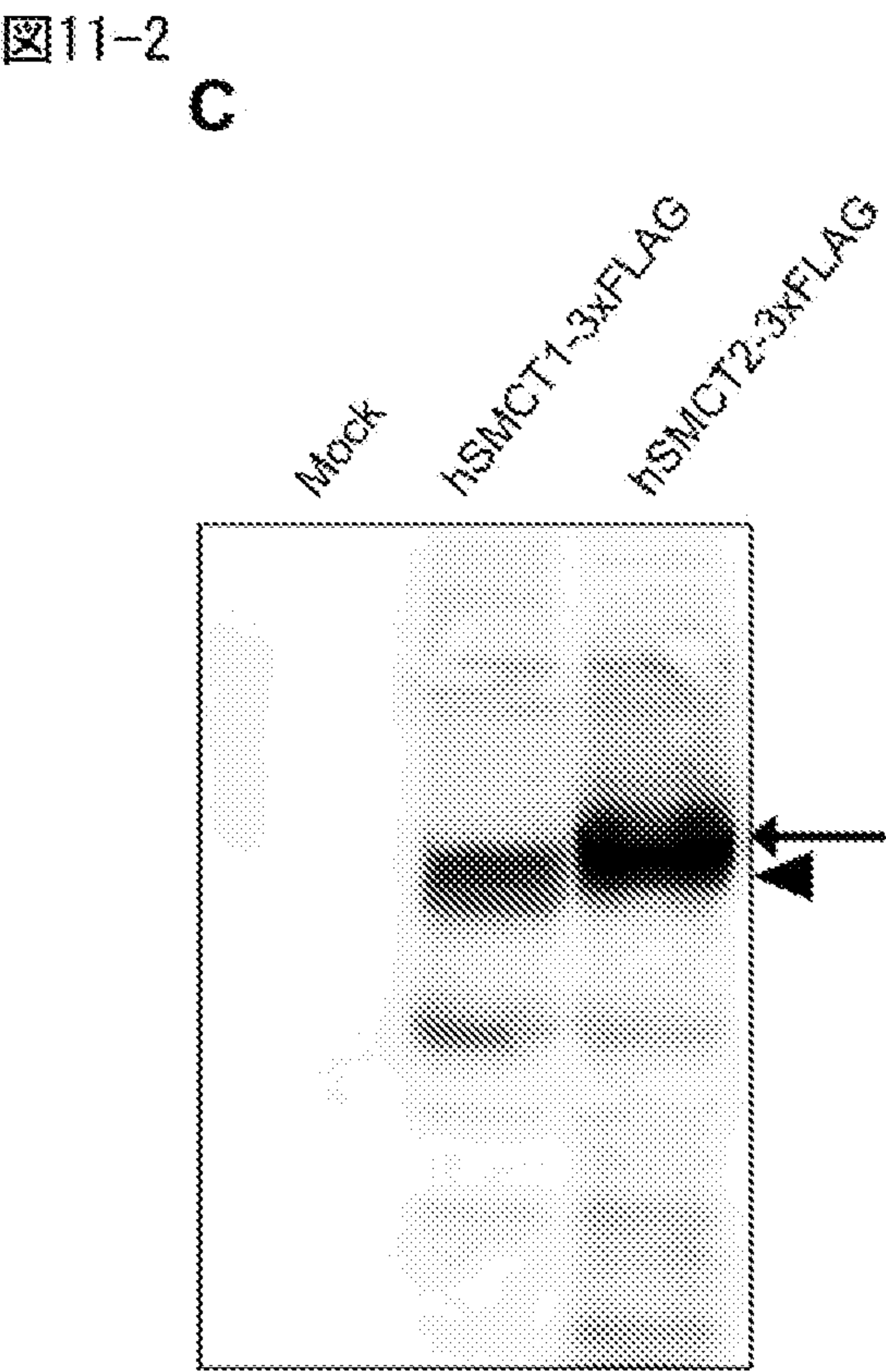
A



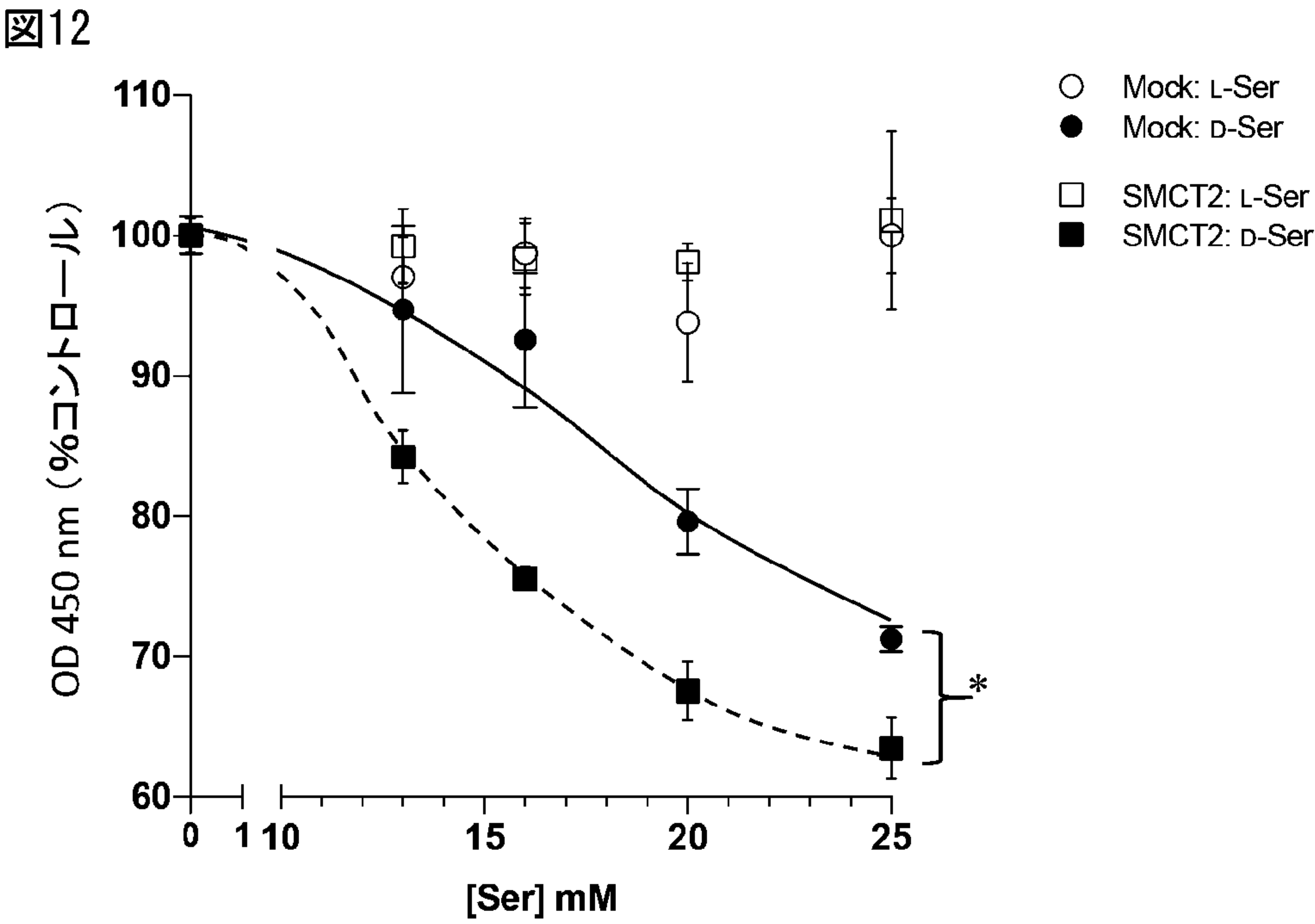
B



[図11-2]

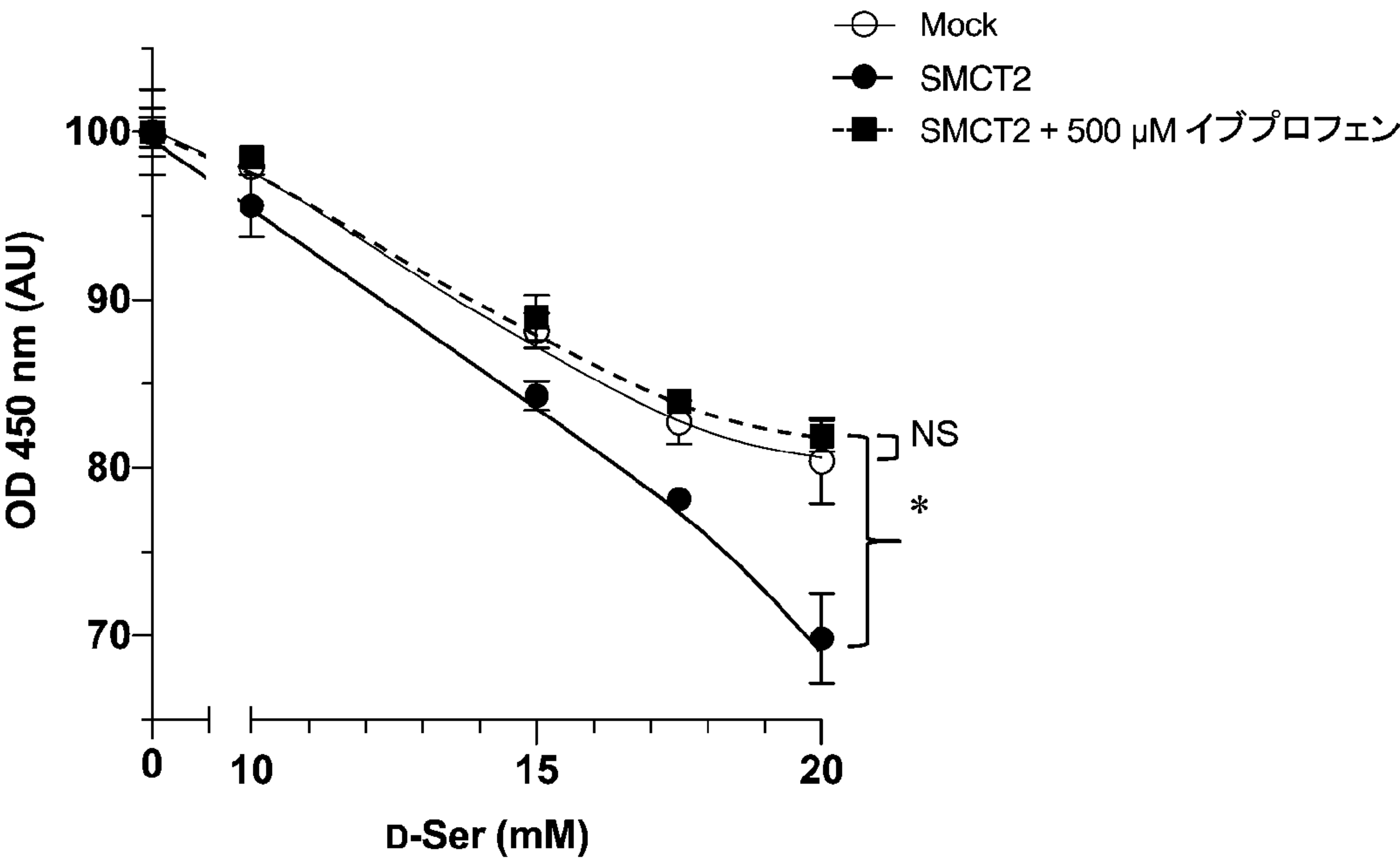


[図12]



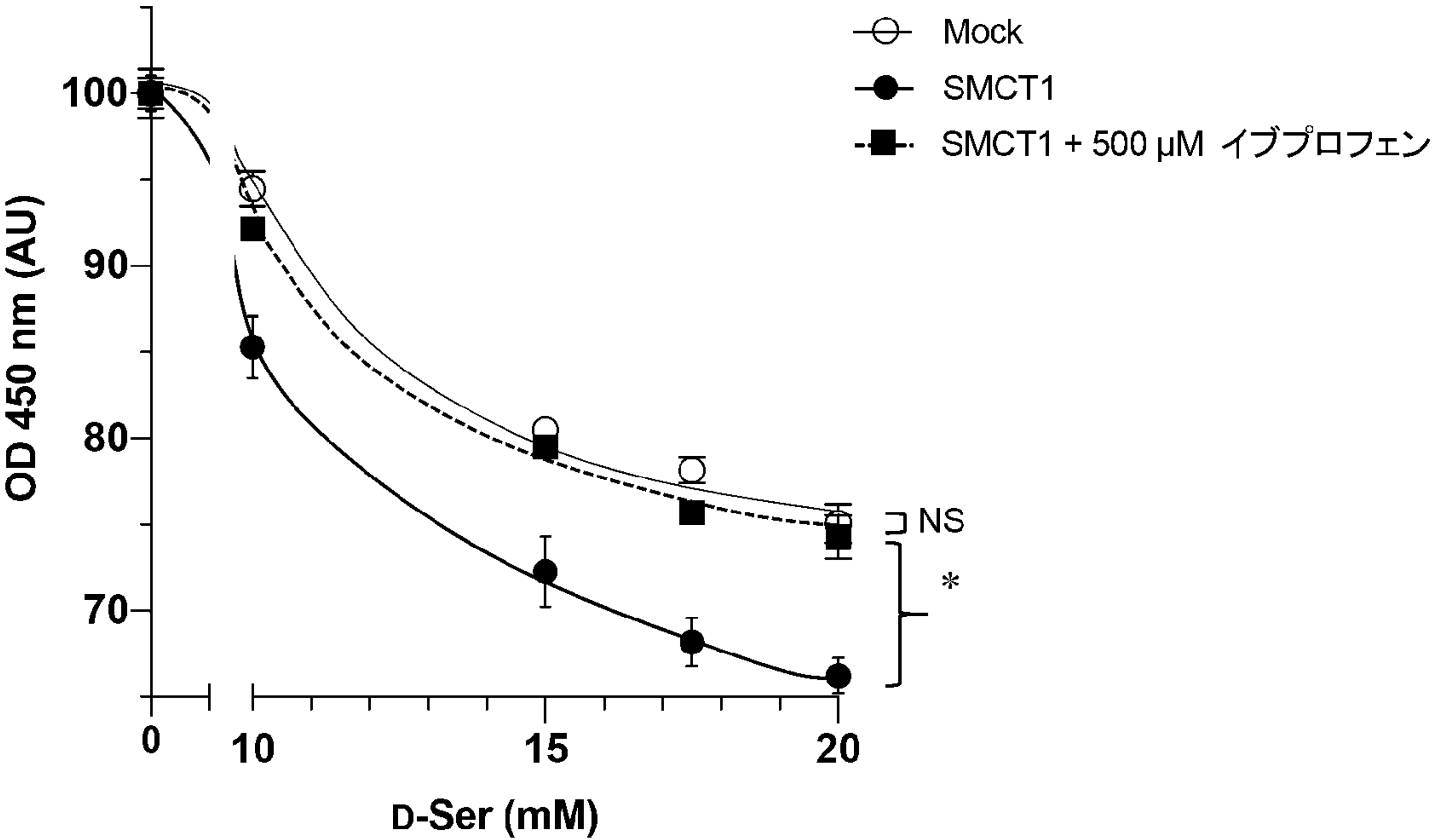
[図13]

図13



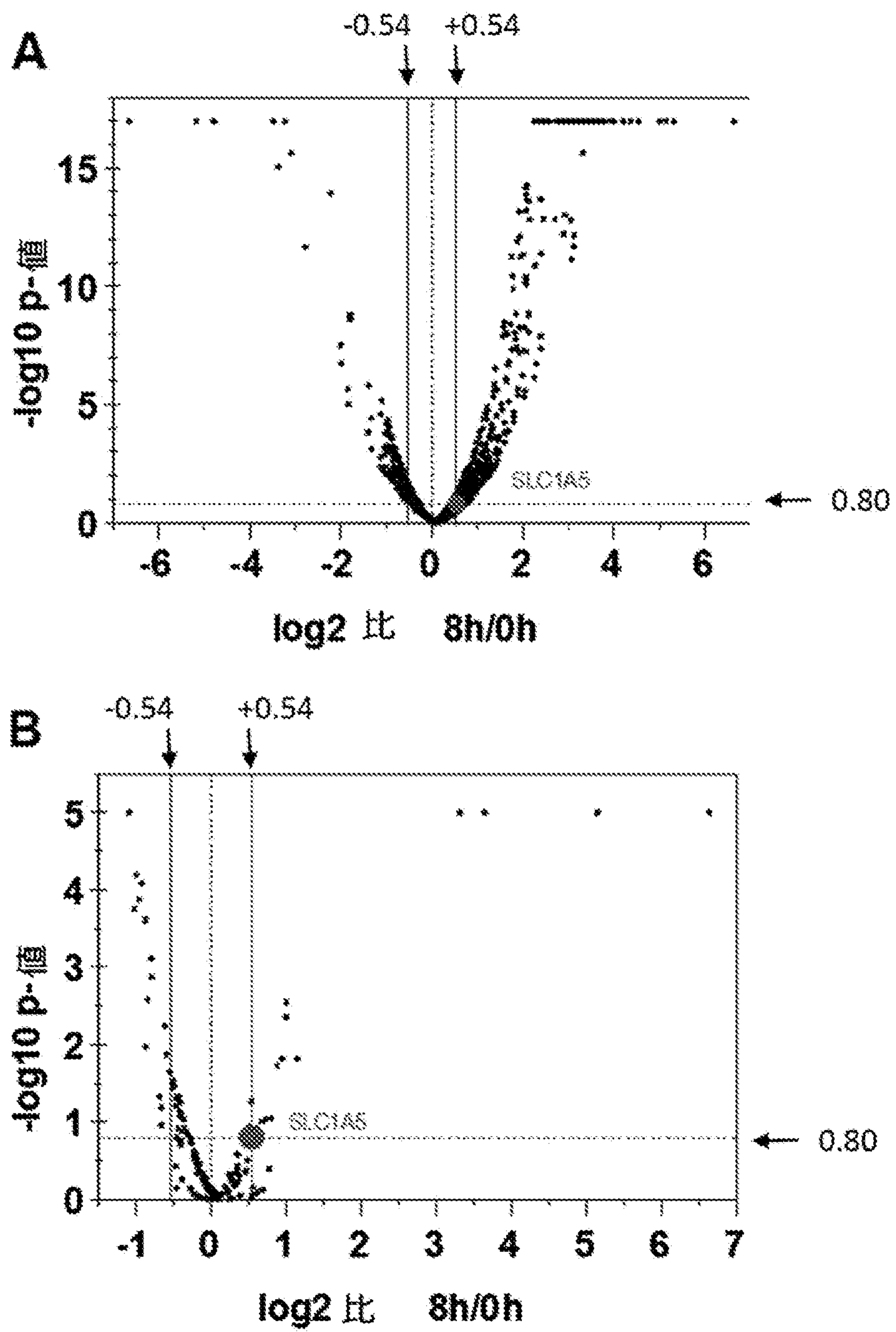
[図14]

図14



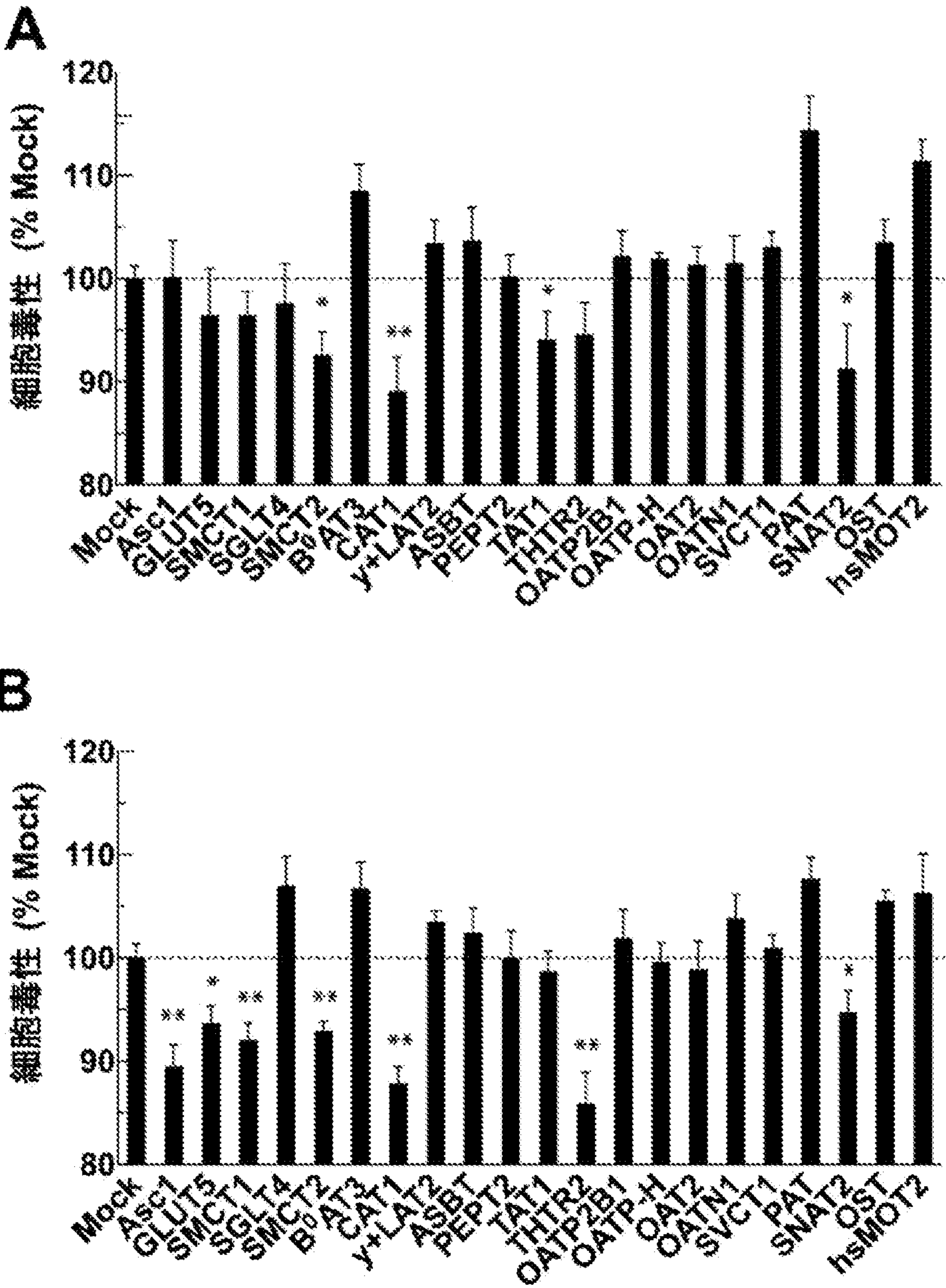
[図15]

図15



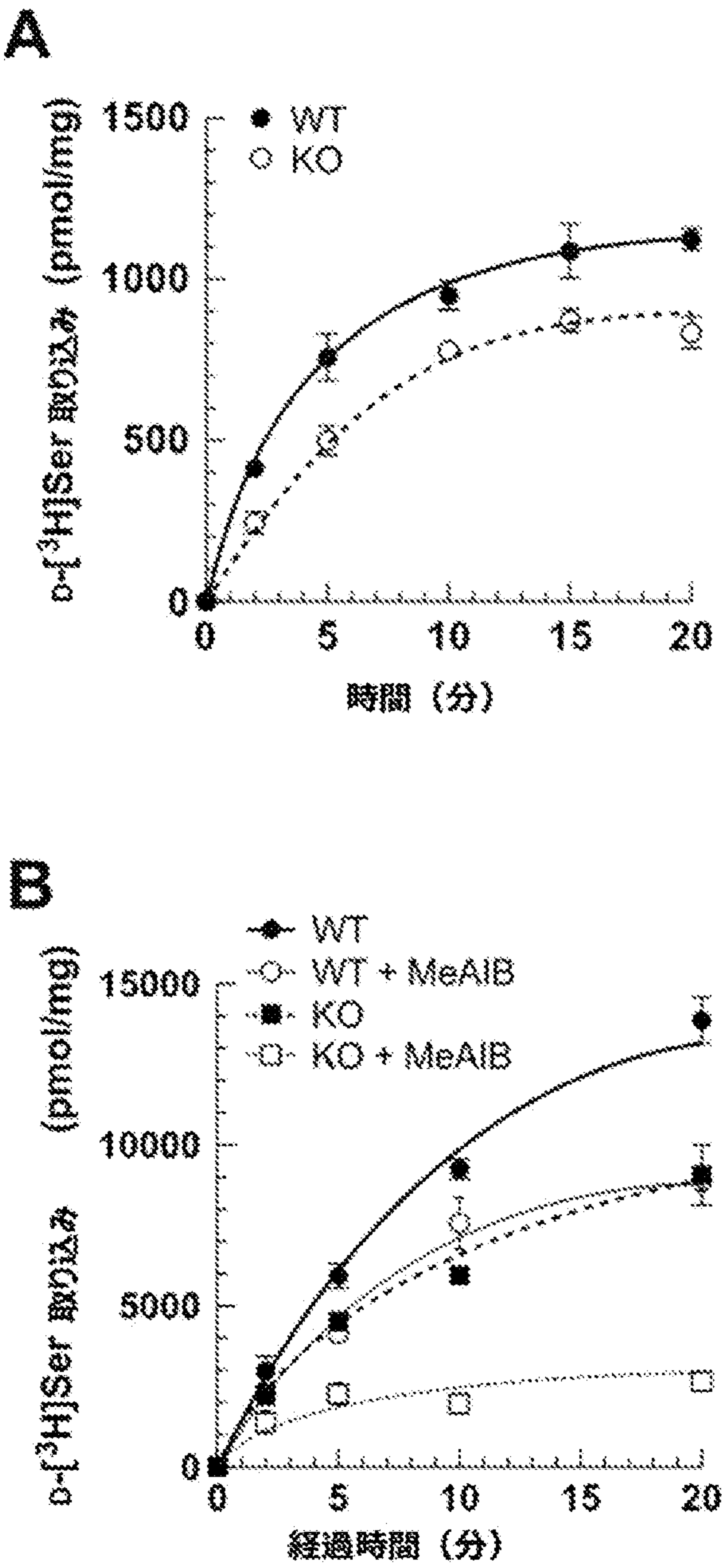
[図16]

図16

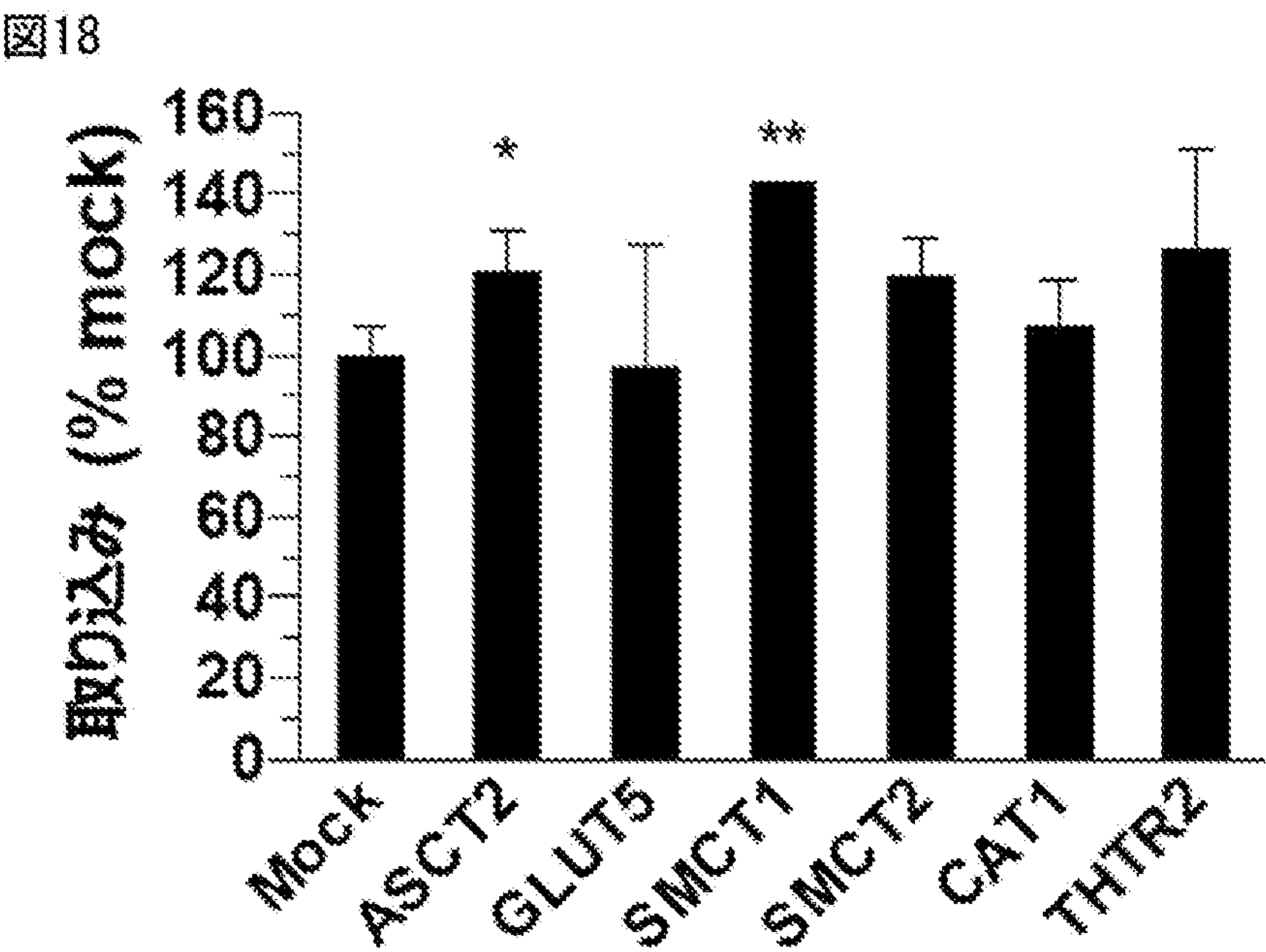


[図17]

図17

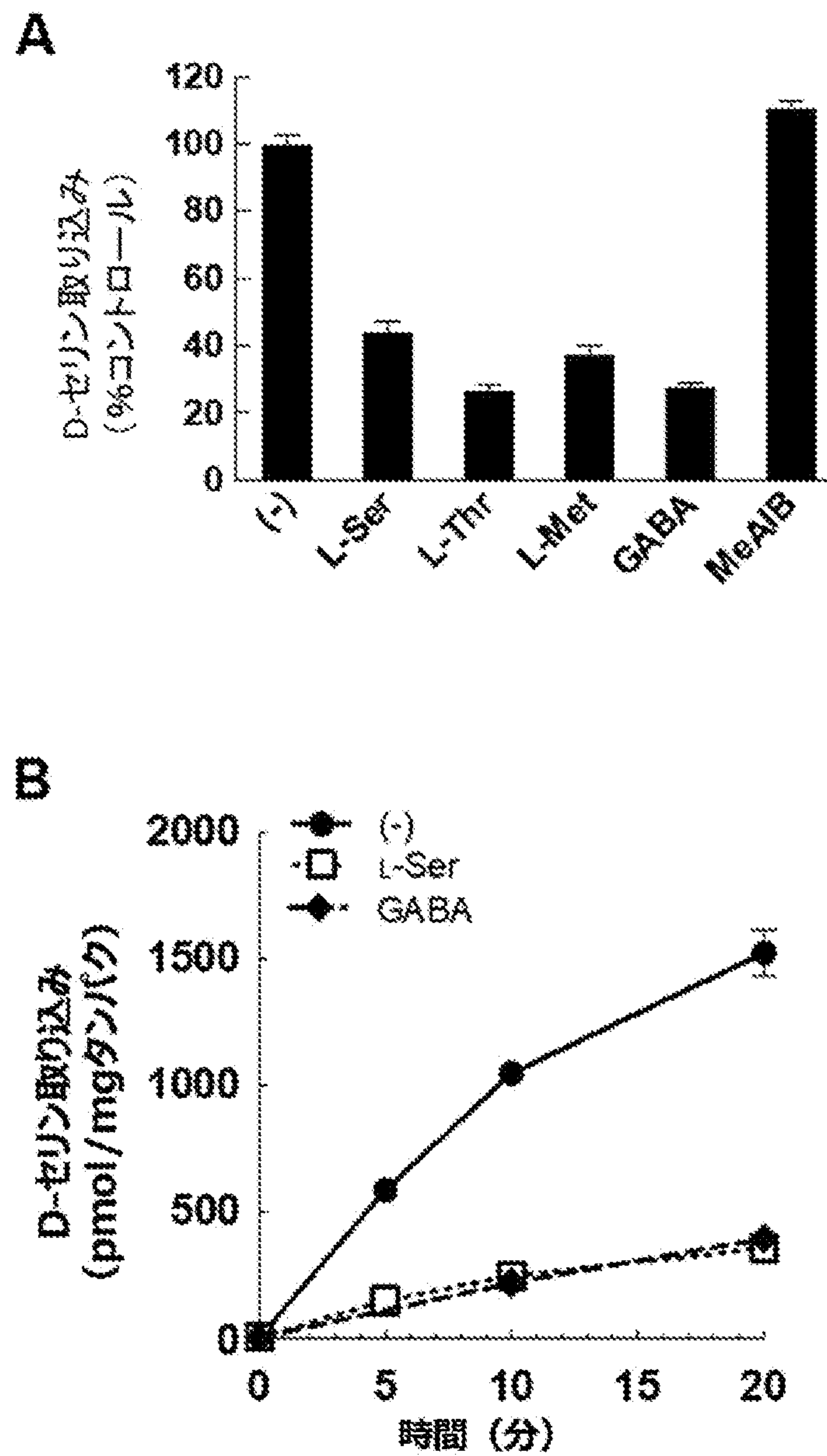


[図18]



[図19]

図19



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/049031

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 31/197(2006.01)i; A61K 31/198(2006.01)i; A61K 31/455(2006.01)i; A61K 31/616(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P13/12(2006.01)i; A61P43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i

FI: A61K45/00; A61K31/192; A61K31/197; A61K31/198; A61K31/455;  
A61K31/616; A61K38/17; A61P13/12; A61P43/00 111; C12N15/113 140Z;  
C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z ZNA

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61K31/192; A61K31/197; A61K31/198; A61K31/455; A61K31/616;  
A61K38/17; A61P13/12; A61P43/00; C12N15/113; C12Q1/02; G01N33/15;  
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| Published examined utility model applications of Japan   | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2021 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2021 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2021 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                     | Relevant to claim No.          |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| X         | JP 2005-527525 A (H. LUNDBECK A/S) 15 September 2005 (2005-09-15) claims 1, 8, 11, paragraphs [0013], [0017], examples | 1, 4-11, 13, 15-16, 18, 20, 30 |
| Y         |                                                                                                                        | 12, 14, 19, 21-29, 31-34       |
| A         |                                                                                                                        | 2-3, 17                        |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 February 2021 (25.02.2021)

Date of mailing of the international search report  
09 March 2021 (09.03.2021)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/049031

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No.    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Y         | SASABE, J. et al., "Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers", PLoS One, 2014, vol. 9, no. 1, article number e86504, pp. 1-9 page 1, right column, paragraph [0002], page 7, right column, paragraph [0001] | 12, 14, 19, 21-29, 31-34 |
| Y         | HASEGAWA, H. et al., "Pharmacokinetics and toxicokinetics of d-serine in rats", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, vol. 162, pp. 264-271 abstract, page 267, right column, section 3.2. "Toxicokinetics of D-serine"                                                                                                       | 12, 14, 19, 21-29, 31-34 |
| A         | CHEN, Z. et al., "Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2", Journal of Physiology, 2003, vol. 546(Pt 2), pp. 349-361 abstract                                                                                                                     | 2-3, 17                  |
| A         | JP 2004-529642 A (MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC.) 30 September 2004 (2004-09-30) claims, fig. 11                                                                                                                                                                                                                            | 2-3, 17                  |
| A         | UNGPRASERT, P. et al., "Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies", European Journal of Internal Medicine, 2015, vol. 26, no. 4, pp. 285-291 abstract, fig. 2, 3                                                                          | 2-3, 17                  |
| P, X      | BODNER, O. et al., "D-serine signaling and NMDAR-mediated synaptic plasticity are regulated by system A-type of glutamine/D-serine dual transporters", Journal of Neuroscience, 19 August 2020, vol. 40, no. 34, pp. 6489-6502 abstract, fig. 4                                                                                                  | 1-11, 13, 15-18, 20, 30  |
| P, Y      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 12, 14, 19, 21-29, 31-34 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2020/049031

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family                                                                                                               | Publication Date |
|-----------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| JP 2005-527525 A                        | 15 Sep. 2005     | US 2005/0176826 A1<br>claims 1, 8, 11,<br>paragraphs [0020],<br>[0026], experimentals<br>WO 2003/077998 A1<br>EP 1487542 A1 |                  |
| JP 2004-529642 A                        | 30 Sep. 2004     | US 2004/0142317 A1<br>claims, fig. 11<br>WO 2002/083060 A2<br>EP 1384081 A2                                                 |                  |

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61K 31/197(2006.01)i; A61K 31/198(2006.01)i;  
A61K 31/455(2006.01)i; A61K 31/616(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i;  
A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i;  
G01N 33/50(2006.01)i  
FI: A61K45/00; A61K31/192; A61K31/197; A61K31/198; A61K31/455; A61K31/616; A61K38/17; A61P13/12;  
A61P43/00 111; C12N15/113 140Z; C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

A61K45/00; A61K31/192; A61K31/197; A61K31/198; A61K31/455; A61K31/616; A61K38/17; A61P13/12;  
A61P43/00; C12N15/113; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922 - 1996年

日本国公開実用新案公報

1971 - 2021年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2021年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2021年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                 | 関連する<br>請求項の番号                     |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| X               | JP 2005-527525 A（ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカベット）15.09.2005<br>(2005 - 09 - 15)<br>請求項1、8、11、[0013]、[0017]、実施例                                                                                                                                                                                              | 1, 4-11, 13, 15-<br>16, 18, 20, 30 |
| Y               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 12, 14, 19,<br>21-29, 31-34        |
| A               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 2-3, 17                            |
| Y               | SASABE, J. et al., Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of<br>serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal<br>dysfunction using the ratio of serine enantiomers, PLoS One, 2014, Vol. 9,<br>No. 1, article number e86504, pp. 1-9<br>第1頁右欄第2段落、第7ページ右欄第1段落 | 12, 14, 19,<br>21-29, 31-34        |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に  
公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し  
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を  
付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の  
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵  
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引  
用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性  
又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献  
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな  
いと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.02.2021

国際調査報告の発送日

09.03.2021

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)  
〒100-8915  
日本国  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

原口 美和 4U 3844

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2015年1月）

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                 |                             |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                               | 関連する<br>請求項の番号              |
| Y               | HASEGAWA, H. et al., Pharmacokinetics and toxicokinetics of d-serine in rats, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, Vol. 162, pp. 264-271<br>要約、第 2 6 7 ページ右欄 3.2. Toxicokinetics of D-serine の項                                             | 12, 14, 19,<br>21-29, 31-34 |
| A               | CHEN, Z. et al., Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2, Journal of Physiology, 2003, Vol. 546(Pt 2), pp. 349-361<br>要約                                         | 2-3, 17                     |
| A               | JP 2004-529642 A (メディカル カレッジ オブ ジョージア リサーチ インスティ<br>チュート インコーポレーテッド) 30.09.2004 (2004 - 09 - 30)<br>特許請求の範囲、図 1 1                                                                                                                                               | 2-3, 17                     |
| A               | UNGPRASERT, P. et al., Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies, European Journal of Internal Medicine, 2015, Vol. 26, No. 4, pp. 285-291<br>要約、図 2、図 3 | 2-3, 17                     |
| P, X            | BODNER, O. et al., D-serine signaling and NMDAR-mediated synaptic plasticity are regulated by system A-type of glutamine/D-serine dual transporters, Journal of Neuroscience, 2020.08.19, Vol. 40, No. 34, pp. 6489-6502<br>要約、図 4                              | 1-11, 13,<br>15-18, 20, 30  |
| P, Y            |                                                                                                                                                                                                                                                                 | 12, 14, 19,<br>21-29, 31-34 |

| 引用文献  |             |   | 公表日        | パテントファミリー文献                                    |              |    | 公表日 |
|-------|-------------|---|------------|------------------------------------------------|--------------|----|-----|
| JP    | 2005-527525 | A | 15.09.2005 | US                                             | 2005/0176826 | A1 |     |
|       |             |   |            | claims 1, 8, 11, [0020], [0026], Experimentals |              |    |     |
|       |             |   |            | WO                                             | 2003/077998  | A1 |     |
|       |             |   |            | EP                                             | 1487542      | A1 |     |
| <hr/> |             |   |            |                                                |              |    |     |
| JP    | 2004-529642 | A | 30.09.2004 | US                                             | 2004/0142317 | A1 |     |
|       |             |   |            | Claims, Fig. 11                                |              |    |     |
|       |             |   |            | WO                                             | 2002/083060  | A2 |     |
|       |             |   |            | EP                                             | 1384081      | A2 |     |
| <hr/> |             |   |            |                                                |              |    |     |