

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7099717号  
(P7099717)

(45)発行日 令和4年7月12日(2022.7.12)

(24)登録日 令和4年7月4日(2022.7.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15

Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 14/705

請求項の数 5 (全18頁)

(21)出願番号 特願2019-179597(P2019-179597)

(22)出願日 令和1年9月30日(2019.9.30)

(65)公開番号 特開2021-52674(P2021-52674A)

(43)公開日 令和3年4月8日(2021.4.8)

審査請求日 令和4年5月17日(2022.5.17)

早期審査対象出願

(73)特許権者 519353330

株式会社理研バイオ

東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2

0 5

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100102255

弁理士 小澤 誠次

(74)代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100188352

弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100113860

弁理士 松橋 泰典

(74)代理人 100131093

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ソマトスタチン受容体

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験化合物から、ソマトスタチン受容体サブタイプ1とソマトスタチン受容体サブタイプ4のヘテロダイマーと相互作用する化合物を選択する、前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物のスクリーニング方法であって、

前記化合物のスクリーニング方法が、アミロイドタンパク質の蓄積に起因する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法、あるいはネプリライシンの活性を向上させる化合物のスクリーニング方法であり、

前記化合物が、前記ヘテロダイマーのアゴニスト又はアロステリックモジュレーターであり、

ソマトスタチン受容体サブタイプ1をコードするDNA及びソマトスタチン受容体サブタイプ4をコードするDNAが導入され、ソマトスタチン受容体サブタイプ1とソマトスタチン受容体サブタイプ4のヘテロダイマーを発現した形質転換体又は前記形質転換体から単離されたヘテロダイマーを用いてスクリーニングを行う、

前記化合物のスクリーニング方法。

## 【請求項2】

以下の工程(a)、(b)及び(c)を含むことを特徴とする請求項1記載のスクリーニング方法。

(a)ソマトスタチン受容体サブタイプ1とソマトスタチン受容体サブタイプ4のヘテロダイマーに被験化合物を接触させる工程、

(b) 前記ヘテロダイマーと前記被験化合物との相互作用を測定する工程、及び  
 (c) 上記(b)の測定結果に基づいて、前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物を選択する工程

【請求項3】

以下の工程(d)、(e)及び(f)を、工程(c)の後に含むことを特徴とする請求項2記載のスクリーニング方法。

(d) (c)で選択された被験化合物を、ソマトスタチン受容体サブタイプ1のホモダイマー及び/又はソマトスタチン受容体サブタイプ4のホモダイマーに接触させる工程、

(e) 前記被験化合物と前記ホモダイマーとの相互作用を測定する工程、及び

(f) 上記(e)の測定結果に基づいて、(b)で測定された相互作用よりも相互作用が弱い化合物を選択する工程

10

【請求項4】

ソマトスタチン受容体サブタイプ1とソマトスタチン受容体サブタイプ4のヘテロダイマーの発現を、それぞれ異なる標識がされたソマトスタチン受容体サブタイプ1及びソマトスタチン受容体サブタイプ4を形質転換体に発現させ、近接ライゲージアッセイ法により前記異なる標識の間の近接度を判定することにより確認することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項5】

ソマトスタチン受容体サブタイプ1をコードするDNA及びソマトスタチン受容体サブタイプ4をコードするDNAが、ソマトスタチン受容体サブタイプ1をコードするDNAを含むベクター及びソマトスタチン受容体サブタイプ4をコードするDNAを含むベクターとして共導入されたことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のスクリーニング方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ソマトスタチン受容体サブタイプ1及び4のヘテロダイマーを発現する形質転換体、単離された前記ヘテロダイマー及び前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

アミロイド (A) は、アルツハイマー病等の神経疾患患者の脳神経細胞や血管に沈着し、認知機能低下をはじめとする様々な症状を引き起こす原因物質とされている。A は、正常脳でも恒常的に産生される生理的なタンパク質であるが、凝集・沈着を生じやすく、アルツハイマー病、ダウン症、及び高齢者の脳にみられる老人斑の主成分でもある。A は、膜貫通前駆体タンパク質 (APP) に由来する39～43アミノ酸からなり、APPの細胞質での正常な代謝過程で生じると言われている。アルツハイマー病患者の脳におけるAの蓄積は、A分解系の欠陥または産生機序の異常による過剰発現に起因すると考えられることから、A分解に関与する物質は、アルツハイマー病等の神経疾患の治療及び予防に有用であると考えられている。

40

【0003】

近年、中性エンドペプチダーゼの一種であるネプリライシンが、脳内におけるAの分解酵素として機能することが明らかになり(非特許文献1)、ネプリライシンを欠損させたアルツハイマー病モデルマウスにおいて、脳内Aオリゴマーの早期蓄積と認知機能障害が現われることが報告された(非特許文献2)。その後、ヒトの脳における加齢によるAの蓄積や、アルツハイマー病の進行とネプリライシンレベルの低下を関連づける報告がされている(非特許文献3及び4)。

【0004】

さらに、最近、成長ホルモン分泌抑制因子として発見されたソマトスタチン(SST)というペプチドホルモンが、ネプリライシンの活性化に関与することが明らかにされてきて

50

いる（非特許文献3）。SSTは、脳の視床下部、膵臓のランゲルハンス島D細胞、消化管の内分泌細胞（D細胞）等で生産され、成長ホルモン分泌抑制、インスリンやグルカゴンの分泌抑制、セクレチンや胃酸の分泌抑制などの機能を有する他、神経伝達物質としても知られている。SSTは、生合成された後、翻訳後プロセッシングにより膵臓と視床下部では14ペプチドからなるSST-14に、消化管では28ペプチドからなるSST-28に変換され、G蛋白質結合受容体ファミリーであるソマトスタチン受容体（SSTR）を介して、その効果を発揮することが知られている。

#### 【0005】

SSTRには、1から5までのサブタイプ（SSTR1～SSTR5）が存在しており、各サブタイプは、体内の様々な組織において異なる分布を示すことが知られている。特に、SSTR4は、記憶の中枢である海馬や、高度な脳活動を行う大脳皮質において高レベルで発現することが明らかにされており、また、最近のノックアウトマウスを用いた研究により、SSTR1及び/又はSSTR4がアルツハイマー病の予防/治療薬を開発するための標的になり得ることが示されている（非特許文献3）。SSTR1～SSTR5は、細胞膜上でホモダイマー及び/又はヘテロダイマーを形成することによって多様なシグナル伝達経路を調節していると考えられている。そして、蛍光共鳴エネルギー転移法、免疫組織化学法、ウエスタンブロット法、及び免疫沈降法を用いた詳細な実験結果から、ヒトSSTR4及びヒトSSTR5はヘテロダイマーを形成するが、ヒトSSTR1及びヒトSSTR4からなるヘテロダイマーは存在しないと報告されていた（非特許文献5）。これに対して、2019年には、SSTR1及びSSTR4を過剰発現させたヒト乳癌細胞株を用い、免疫沈降-ウエスタンブロット（IP-ウエスタン）法によってSSTR1及びSSTR4がダイマーを形成する可能性が報告されている（非特許文献6）。しかし、非特許文献6で用いられたIP-ウエスタン法は特異性や定量性の低い手法であり、また、ウエスタンブロット解析においては必要な分子量マーカーが含まれていない等、非特許文献6の実験結果は信頼性が乏しいものと考えられる。また、非特許文献6では、特定のSSTアナログの存在する場合にSSTR1及びSSTR4のヘテロダイマー形成がさらに促進されると記載されている。以上のように、SSTR1及びSSTR4がヘテロダイマーを形成するか否かについては矛盾した報告がなされており、いまだ一致した見解が得られていない。

#### 【0006】

また、上述の通り、SSTはSSTRを介してネプリライシンを活性化し、A $\beta$ を分解すると考えられている。しかし、SSTの生物学的半減期は非常に短いため、SST自体を医薬品として使用することは現実的ではない。そこで、非ペプチド性SSTRアゴニストとして、SSTR4に親和性を有するチオウレア誘導体（特許文献1及び2）や、ピロリジン誘導体（特許文献3）が開示されている。また、特許文献4には、SSTR4の選択的なアゴニスト活性を有する新規シクロアルカン誘導体や、該シクロアルカン誘導体をアルツハイマー病などのA $\beta$ 関連神経変性疾患の治療剤及び/又は予防剤として使用することが記載されている。さらに、特許文献5には、スルホニルアミノ-RFアミド化合物がSSTR1及び特にSSTR4に結合することが明らかにされており、該スルホニルアミノ-RFアミド化合物がアルツハイマー病を含む神経変異性病の予防又は治療に有用であることが記載されている。

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

#### 【0007】

【文献】国際公開第1997/043278号

国際公開第2011/047165号

国際公開第2010/059922号

特開2015-54844号

特表2007-507472号

##### 【非特許文献】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

【文献】Iwata N et al., Nature Med. 6:143-151 (2000)

Iwata N et al., Science. 292:1550-1552(2001)

西道隆臣著、「アルツハイマー病は治せる、予防できる」株式会社集英社 2016年

Nordberg et al., Neurobiology of Aging. 29:210-221 (2008)

Somvanshi et al., Cellular Signalling.21: 1396-1414 (2009)。

Zou et al., Oncology Letters. 17: 1723-1731(2019)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の課題は、SSTR1とSSTR4とのヘテロダイマーの存在を証明し、さらに、かかるヘテロダイマーに結合する因子のスクリーニング方法や、前記スクリーニング方法に使用できる前記ヘテロダイマーを提供することによって、アルツハイマー病等のA 沈着に起因する疾患の予防及び/又は治療薬の探索を可能にすることにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 1 0 】

本発明者らは、SSTR1及びSSTR4タンパク質を共発現させたCHO細胞を作製し、近接ライゲーションアッセイというタンパク質間相互作用を正確に検出可能な最新手法を用いて、上記細胞膜上でSSTR1及びSSTR4タンパク質がヘテロダイマーを形成することを証明し、本発明を完成するに至った。

## 【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、(1)SSTR1をコードするDNA及びSSTR4をコードするDNAが導入された、SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーを発現する形質転換体や、(2)SSTR1をコードするDNAを含むベクター及びSSTR4をコードするDNAを含むベクターとして共導入されたことを特徴とする上記(1)記載の形質転換体や、(3)SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーの発現を、それぞれ異なる標識がされたSSTR1及びSSTR4を形質転換体に発現させ、近接ライゲーションアッセイ法により前記異なる標識の間の近接度を判定することにより確認することを特徴とする上記(1)又は(2)記載の形質転換体や、(4)SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーが関与するシグナル伝達系を解明するための、上記(1)~(3)のいずれか記載の形質転換体や、(5)単離されたSSTR1とSSTR4のヘテロダイマーに関する。

## 【 0 0 1 2 】

また、本発明は、(6)被験化合物から、SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーと相互作用する化合物を選択する、前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物のスクリーニング方法や、(7)(a)SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーに被験化合物を接触させる工程；(b)前記ヘテロダイマーと前記被験化合物との相互作用を測定する工程；及び(c)上記(b)の測定結果に基づいて、前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物を選択する工程；の工程(a)、(b)及び(c)を含むことを特徴とする上記(6)記載のスクリーニング方法や、(8)(d)上記(c)で選択された被験化合物を、SSTR1のホモダイマー及び/又はSSTR4のホモダイマーに接触させる工程；(e)前記被験化合物と前記ホモダイマーとの相互作用を測定する工程；及び(f)上記(e)の測定結果に基づいて、上記(b)で測定された相互作用よりも相互作用が弱い化合物を選択する工程；の工程(d)、(e)及び(f)を、工程(c)の後に含むことを特徴とする上記(7)記載のスクリーニング方法や、(9)化合物が、SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーのアゴニスト、アロステリックモジュレーターであることを特徴とする上記(6)~(8)のいずれか記載のスクリーニング方法や、(10)化合物が、SSTR1とSSTR4のヘテロダイマーを発現する臓器、組織又は細胞を同定するために使用される化合物であることを特徴とする上記(6)~(8)のいずれか記載のスクリーニング方法や、(11)Aタンパク質の蓄積に起因する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法である上記(6)~(8)のいずれか記載のスクリーニング方法

10

20

30

40

50

に関する。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、SSTR1及びSSTR4のヘテロダイマーと相互作用して、ネプリライシンの活性化を誘導し得る化合物をスクリーニングすることが可能となる。かかる化合物は、ネプリライシンの活性化を介してAの分解を促進する可能性があることから、Aの蓄積に起因する疾患の治療及び/又は予防薬として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】以下の実施例における実験手順を示す図である。

10

【図2】SSTR1遺伝子及びSSTR4遺伝子が導入されたCHO細胞における、SSTR1タンパク質及びSSTR4タンパク質の発現を免疫染色により調べた結果を示す図である。

【図3】SSTR1遺伝子及びSSTR4遺伝子が導入されたCHO細胞における、SSTR1タンパク質及びSSTR4タンパク質の相互作用を近接ライゲーシオンアッセイにより調べた結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の形質転換体としては、SSTR1タンパク質をコードするDNA及びSSTR4タンパク質をコードするDNAが導入されており、SSTR1タンパク質とSSTR4タンパク質のヘテロダイマーを発現する形質転換体であれば特に制限されない(以下、「SSTR1タンパク質をコードするDNA」及び「SSTR4タンパク質をコードするDNA」をそれぞれ「SSTR1遺伝子」及び「SSTR4遺伝子」と称する場合があります、これらの2つのDNAを総称して「SSTR1/4遺伝子」と称する場合があります。また、以下、「SSTR1タンパク質とSSTR4タンパク質のヘテロダイマー」を「SSTR1/4ヘテロダイマー」と称する場合があります)。本発明において「SSTR1タンパク質」及び「SSTR4タンパク質」とは、Olias et al. (Journal of Neurochemistry, 2004, 89, 1057-1091) や Moller et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1616, 1-84) 等に記載の公知のGタンパク質共役型受容体を意味するものであり、本発明において「SSTR1/4ヘテロダイマー」とは、これらの2つの異なるサブタイプの受容体タンパク質が会合して形成されるダイマーを意味する。また、上記本発明の形質転換体は、導入された外来のSSTR1/4遺伝子に由来するSSTR1タンパク質及びSSTR4タンパク質が発現しており、それらを含むSSTR1/4ヘテロダイマーが細胞内又は細胞表面に発現していることを特徴とする。

20

30

【0016】

上記「SSTR1遺伝子」としては上記SSTR1タンパク質をコードする塩基配列を含むDNAであればどのようなものであってもよく、また、上記「SSTR4遺伝子」としては上記SSTR4タンパク質をコードする塩基配列を含むDNAであればどのようなものであってもよいが、これらの遺伝子はともに、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ等の哺乳動物由来であることが好ましく、ヒトに由来するものであることが更に好ましい。具体的には、上記「SSTR1遺伝子」としては、配列番号1のポジション#1~1173に示される塩基配列を、上記「SSTR4遺伝子」としては配列番号2のポジション#1~1164に示される塩基配列をそれぞれ好適に挙げることができる。また、上記SSTR1/4遺伝子は、タンパク質の精製や検出・定量のためのマーカータンパク質及び/又はペプチドタグをコードする塩基配列をさらに含むものであってもよい。上記「マーカータンパク質」としては、特に制限されないが、例えば、アルカリホスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFP等の従来知られているマーカータンパク質を好適に挙げることができ、また、上記「ペプチドタグ」としては、Mycタグ、FLAGタグ、Hisタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを好適に挙げることができる。

40

【0017】

50

本発明の形質転換体は、上記 SSTR1/4 遺伝子を宿主細胞に導入することによって作製することができる。上記 SSTR1/4 遺伝子は、宿主細胞内で発現させることができるベクターに組み込まれていてもよく、両遺伝子が1つのベクターに組み込まれていてもよく、それぞれが別のベクターに組み込まれていてもよく、かかる「ベクター」としては、染色体、エピソード及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを好適に挙げるることができる。また、これらベクターは、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。具体的には、例えば、pcDNA3.1、pcDNA6.2、pUC18、p3XFLAG-CMV10、AcNPV等の公知のプラスミドを好適に挙げるることができる。

10

## 【0018】

また、上記「宿主細胞」は、上記 SSTR1/4 ヘテロダイマーを発現し得る細胞であればどのような細胞であってもよいが、例えば、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫由来の細胞株や、CHO細胞、N1E-115細胞、SH-SY5Y細胞、HeLa細胞、L細胞、COS細胞、C127細胞、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞等の哺乳動物由来の細胞株を好適に挙げるができるが、中でも、CHO細胞であることが好ましい。また、上記「宿主細胞」は、昆虫や哺乳動物から採取した初代培養神経細胞であってもよい。かかる「初代培養神経細胞」は、脳の各部位（例えば、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質、嗅球、扁頭核、大脳基底核等）から公知の方法（Culturing Nerve Cells (The MIT press, 1991)）等に記載の方法等）を用いて採取することができ、中でも、海馬又は大脳皮質から採取した初代培養神経細胞であることが好ましい。

20

## 【0019】

宿主細胞への遺伝子導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及び Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）等の多くの標準的な実験マニュアルに記載される方法、例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション（transvection）、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレパローディング（scrape loading）、弾丸導入（ballistic introduction）、感染等により行うことができる。

30

## 【0020】

また、遺伝子導入後の宿主細胞において、SSTR1タンパク質及びSSTR4タンパク質が発現していることを確認する方法としては、公知のタンパク質工学的な方法であれば特に制限されないが、SSTR1タンパク質及び/又はSSTR4タンパク質を特異的に認識する抗体、又は上記SSTR1/4遺伝子に含まれるマーカートンパク質若しくはペプチドタグを特異的に認識する抗体を用いた免疫染色法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、ELISA法等を挙げるることができる。また、本発明の形質転換体の細胞表面又は細胞内で、SSTR1/4ヘテロダイマーが形成されていることを確認する方法としては、公知のタンパク質工学的な方法であれば特に制限されないが、具体的には、例えば、近接ライゲーションアッセイ法、蛍光共鳴エネルギー転移法（FRET）、免疫組織化学法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）、アフィニティークロマトグラフィー、生体分子蛍光補完、シンチレーション近接アッセイ（SPA）等を好適に挙げるることができるが、中でも、本発明の形質転換体において、それぞれ異

40

50

なる標識がされた S S T R 1 タンパク質及び S S T R 4 タンパク質を発現させ、近接ライゲーションアッセイ法により前記異なる標識の間の近接度を判定することにより確認する方法を特に好適に挙げるることができる。近接ライゲーションアッセイ法は、D u o l i n k (登録商標) (Sigma-Aldrich社製)等の市販品を用いて行うことができ、また、近接ライゲーションアッセイ法により得られるシグナルは標準的な蛍光顕微鏡および画像分析ソフトウェアプログラムを用いて検出及び分析することができる。

#### 【0021】

本発明の形質転換体は、S S T R 1 / 4 ヘテロダイマーが関与するシグナル伝達系の解明のために使用することができる。上記「シグナル伝達系」とは、S S T R 1 / 4 ヘテロダイマーを介して特異的に活性化される細胞内シグナル伝達系であればどのようなものであってもよいが、ネプリライシンの活性化に関与する細胞内シグナル伝達系であることが好ましい。上記「ネプリライシン」とは、Saido (A METABOLISM AND ALZHEIMER'S DISEASE, 2003, ISBN: 1-58706-230-5)等に記載された公知の中性エンドペプチダーゼの一種であり、動物の各種の組織に存在しており、A 分解活性を有することが知られている。すなわち、本発明の形質転換体は、「S S T R 1 / 4 ヘテロダイマーを介した、ネプリライシンの活性に関与するシグナル伝達系の解明」という用途に限定されたものであってもよい。また、かかる用途に用いる本発明の形質転換体は、S S T R 1 / 4 遺伝子に加えて、ネプリライシンをコードするDNAがさらに導入されたものであってもよい。上記「ネプリライシンをコードするDNA」としては、ネプリライシンタンパク質をコードする塩基配列を含むDNAであればどのようなものであってもよいが、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ等の哺乳動物由来であることが好ましい(以下、「ネプリライシンをコードするDNA」を「ネプリライシン遺伝子」と称する)。ネプリライシン遺伝子の導入は、上記S S T R 1 / 4 遺伝子を宿主細胞に導入する方法と同様に行うことができる。

#### 【0022】

本発明の形質転換体を用いて「S S T R 1 / 4 ヘテロダイマーを介した、ネプリライシンの活性に関与するシグナル伝達系の解明」をする方法としては、例えば、S S T R 1 / 4 ヘテロダイマーと相互作用し得る化合物(ソマトスタチン、公知のソマトスタチン類似体、任意の被験化合物等)と、本発明の形質転換体とを共にインキュベートした後に、かかる形質転換体を固定するか、又は、かかる形質転換体から細胞抽出液若しくはネプリライシン抽出液を調製し、特開2002-34596、特開2004-151079等に記載の公知の方法に従ってネプリライシンの活性を測定する方法を挙げるることができる。

#### 【0023】

具体的には、上記「ネプリライシンの活性」は、ネプリライシンの基質を用いて、該基質の分解量を測定することにより算出することができる。上記「ネプリライシンの基質」としては、特に制限されないが、例えば、ベンジルオキシカルボニル-アラニル-アラニル-ロイシル-パラニトロアニリド、ベンジルオキシカルボニル-アラニル-アラニル-フェニルアラニル-パラニトロアニリド、ベンジルオキシカルボニル-グリシル-グリシル-ロイシル-パラニトロアニリド、ベンジルオキシカルボニル-グリシル-グリシル-フェニルアラニル-パラニトロアニリド、グルタリル-アラニル-アラニル-フェニルアラニル-4-メトキシ-2-ナフチルアミド、グルタリル-アラニル-アラニル-フェニルアラニル-2-ナフチルアミド、サクシニル-アラニル-アラニル-フェニルアラニン-4-メチルクマリン-7-アミド等の合成化合物や、エンケファリン、サブスタンスP、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、ガストリン放出ペプチド(GRP)、エンドセリン等のペプチドを好適に挙げるることができる。また、上記「インキュベート」の条件は、使用する基質に応じて当業者が適宜選択できる。例えば、基質の濃度は、用いる基質により異なるが、0.1~1000 µg/mlとして反応を行えばよい。基質の濃度は反応系において、1~100 µg/mlであることが好ましく、3~30 µg/mlであるのが更に好ましい。反応温度は、20~45 が好ましく、20~40 が更に好ましい。反応時間は使用する基質および濃度等の反応系の条件により異なるが、例えば、5

10

20

30

40

50

分～24時間の間で適宜選択すればよく、迅速性という点からは、5分～60分という短時間で測定できるような反応系を設定することが好ましい。反応は中性のpH、すなわちpH6～9で行うことが好ましく、pH7～8で行うことが更に好ましい。

**【0024】**

さらに、上記「ネプリライシンの基質の分解量」は、分解により生成される化合物（以下、「分解生成物」と称する場合がある）の濃度を測定することにより算出することができる。具体的には、例えば、分解生成物が蛍光を発する、若しくは分解生成物と試薬が反応して蛍光を発する場合、その蛍光強度を測定することでネプリライシンの基質の分解量を測定することができる。また、他の態様として、薄層クロマトグラフィー、HPLC等により分解生成物及び/又はネプリライシン基質の量を分析することもできる。このとき、阻害剤（例えば、チオルファン）を加えた測定値により分解量を補正してもよい。また、ネプリライシンの活性は、単位細胞量あたりの基質の分解量としてもよい。このようにして得られた「ネプリライシンの活性」のデータは、SSTR1/4ヘテロダイマーを介してネプリライシンを活性化させる細胞内シグナル伝達系を解明するために使用することができる。

10

**【0025】**

さらに、上記本発明の形質転換体は、本発明の「単離されたSSTR1/4ヘテロダイマー」を作製するためにも用いることができる。例えば、本発明の形質転換体を培養した培養物から、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー等の公知の方法によって、SSTR1/4ヘテロダイマーを回収し精製し、上記「単離されたSSTR1/4ヘテロダイマー」を得ることができる。また、上記アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗SSTR1モノクローナル抗体又は抗SSTR4モノクローナル抗体を結合させたカラムや、上記SSTR1/4ヘテロダイマーに付加されているマーカートンパク質やペプチドタグに親和性のある物質を結合させたカラムを用いることができる。

20

**【0026】**

本発明のスクリーニング方法としては、(a) SSTR1/4ヘテロダイマーに被験化合物を接触させる工程；(b) 前記ヘテロダイマーと前記被験化合物との相互作用を測定する工程；及び(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、前記ヘテロダイマーと相互作用する化合物を選択する工程；の工程(a)、(b)及び(c)を含むものであれば特に制限されない（以下、上記工程(a)～(c)を「第1工程」と称する場合がある）。また、本発明のスクリーニング方法は、さらに、(d') SSTR1のホモダイマー及び/又はSSTR4のホモダイマーに被験化合物を、接触させる工程、(e) 前記被験化合物と前記ホモダイマーとの相互作用を測定する工程；及び(f) 上記(e)の測定結果に基づいて、上記(b)で測定された相互作用よりも相互作用が弱い化合物を選択する工程；の工程(d')、(e)及び(f)を含んでもよい（以下、上記工程(d')～(f)を「第2工程」と称する場合がある）。上記第1工程及び第2工程は、第1工程に続いて第2工程という順に行ってもよいし、第2工程に続いて第1工程という順に行ってもよいし、同時に行ってもよいが、第1工程に続いて第2工程という順で行うことが好ましい。すなわち、本発明のスクリーニング方法としては、第1工程に続いて、(d) 上記(c)で選択された被験化合物を、SSTR1のホモダイマー及び/又はSSTR4のホモダイマーに接触させる工程、(e) 前記被験化合物と前記ホモダイマーとの相互作用を測定する工程；及び(f) 上記(e)の測定結果に基づいて、第1工程の(b)で測定された相互作用よりも相互作用が弱い化合物を選択する工程；の工程(d)、(e)及び(f)を含むことがより好ましい。

30

40

**【0027】**

本発明のスクリーニング方法の工程(a)で用いられる「SSTR1/4ヘテロダイマー」とは、細胞表面上に発現しているSSTR1/4ヘテロダイマーであっても、単離され

50

たものであってもよい。例えば、上記工程(a)では、「SSTR1/4ヘテロダイマー」として、本発明の形質転換体をそのまま用いてもよいし、かかる形質転換体由来する「SSTR1/4ヘテロダイマー」を含む細胞抽出液や膜分画を用いてもよいし、上記本発明の単離されたSSTR1/4ヘテロダイマーを用いてもよい。また同様に、上記工程(d')又は(d)で用いられる「SSTR1のホモダイマー」及び「SSTR4のホモダイマー」とは、細胞表面上に発現しているSSTR1又はSSTR4のホモダイマーであっても、単離されたものであってもよい。例えば、上記本発明の形質転換体を作製するのと同様の手法により、SSTR1遺伝子及びSSTR4遺伝子それぞれ単独で導入した形質転換体を作製し、上記「SSTR1のホモダイマー」又は「SSTR4のホモダイマー」として、かかる形質転換体をそのまま用いてもよいし、かかる形質転換体由来するSSTR1又はSSTR4のホモダイマーを含む細胞抽出液や膜分画を用いてもよい。さらに、本発明の単離されたSSTR1/4ヘテロダイマーを作製するのと同様の手法により「単離されたSSTR1ホモダイマー又はSSTR4ホモダイマー」を作製し、上記「SSTR1のホモダイマー」又は「SSTR4のホモダイマー」として用いることもできる。

【0028】

上記スクリーニング方法における「被験化合物」としては、SSTR1/4ヘテロダイマーと結合し得る化合物であれば特に制限されず、公知の化合物であっても新規の化合物であってもよい。例えば、上記「被験化合物」としては、タンパク質(抗体を含む)、ペプチド、非ペプチド性化合物(ヌクレオチド、アミン、糖質、脂質等)、有機低分子化合物、無機低分子化合物、醗酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等を挙げる  
ことができる他、天然化合物ライブラリ、アロステリック化合物ライブラリ、ペプチドライブラリ、抗体断片ライブラリ、合成化合物ライブラリ、断片ベースのライブラリ、フェージディスプレイライブラリ等公知の化合物ライブラリやペプチドライブラリも好適に挙  
げることができる。また、上記「被験化合物」は、公知のソマトスタチンのペプチド類似  
物(例えば、米国特許第4,485,101号、同第5,409,894号、又は国際特許公開第97/47317号)、公知の非ペプチド性SSTRアゴニスト(国際特許公開第97/03054号、米国特許第6,221,870号、米国特許第6,329,389号、同第6,352,982号)であってもよい。これらの被験化合物の形態としては、特に限定はなく、固体、液体、基剤との混合物、懸濁液又は溶液等を挙げる  
ことができる。懸濁液若しくは溶液とする場合、水、pH緩衝液、メチルセルロース溶液、生理食塩  
水、有機溶媒水溶液等を用いることができる。

【0029】

上記工程(a)、(d')、及び(d)では、通常の方法によってSSTR1/4ヘテロダイマーと被験化合物とを接触させることができる。かかる工程で用いる被験化合物の量濃度、接触回数、及び接触時間は、SSTR1/4ヘテロダイマーの構造に重篤な影響を及ぼさない範囲内で当業者が適切に選択することができる。例えば、上記工程(a)、(d')、又は(d)において形質転換体をそのまま用いる場合には、かかる形質転換体を含む培養液・寒天培地等の中に、被験化合物を0.001~100µM程度の濃度となるように添加することにより、SSTR1/4ヘテロダイマーと被験化合物とを接触させることができる。

【0030】

上記工程(b)及び(e)において、被験化合物と上記ヘテロダイマー又は上記ホモダイマーとの相互作用を測定する方法としては、ELISA法、表面プラズモン共鳴法、フェージディスプレイ等の本技術分野で一般的な方法を用いることができる(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001))。これらの方法により、被験化合物と上記ヘテロダイマー又は上記ホモダイマーとの相互作用の有無又は相互作用の強度を測定し、その結果に基づいて、上記工程(c)では、上記ヘテロダイマーとの相互作用が認められた被験化合物を「SSTR1/4ヘテロダイマーと相互作用する化合物」として選択することができる。また、上記工程(f)では、上記(b)の測定結果と上記(e)の測定結果とを

比較して、上記ホモダイマーに対する相互作用の強度が、上記ヘテロダイマーに対する相互作用の強度よりも弱い被験化合物を「SSTR1/4ヘテロダイマーと相互作用する化合物」として選択することができる。すなわち、上記工程(f)により、SSTR1/4ヘテロダイマーに特異的に結合し、SSTR1のホモダイマー又はSSTR4のホモダイマーには結合しない(若しくは低い親和性しか示さない)化合物を選択することができる。

#### 【0031】

また、本発明のスクリーニング方法は、インシリコ(in silico)スクリーニングにより、SSTR1/4ヘテロダイマーと相互作用する可能性のある被験化合物を選択する工程(a')を、さらに含むものであってもよい。ここで、工程(a')は、工程(a)の前に行うことが効率的な観点から好ましい。上記インシリコスクリーニングは、X線構造解析やクライオ顕微鏡解析等により得られるSSTR1/4ヘテロダイマーの立体構造情報に基づき、DOCK、FlexX、AutoDock、GOLD、Glide、Ph4Dock等の公知のドッキングソフトウェアを用いて、当業者に公知の任意の方法によって行うことができる。また、上記工程(a')は、ChEMBL(<http://www.ebi.ac.uk/chembl/>)、DrugBank(<http://www.drugbank.ca/>)、CTD(<http://ctd.mdibl.org/>)、PubChemBioAssay(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay>)等の公知の化合物データベースを用いて被験化合物を選択する工程であってよい。

#### 【0032】

上記本発明のスクリーニング方法によって選択される「化合物」は、好ましくは、SSTR1/4ヘテロダイマーのアゴニスト又はアロステリックモジュレーターである。ここで、「アゴニスト」とは、受容体のオルソステリック部位に結合し、該受容体のシグナル伝達活性を増加させるリガンドを意味し、最大受容体刺激ができる完全アゴニストと、飽和濃度であっても完全活性を誘発できない部分アゴニストとを含む。本発明における「化合物」は、完全アゴニストと部分アゴニストのどちらであってもよいが、部分アゴニストであることが好ましい。また、「アロステリックモジュレーター」とは、Gタンパク質共役受容体のアロステリック部位(すなわち、物理的にタンパク質の活性部位と異なる調節性部位)に結合して、該受容体のシグナル伝達活性を調節する物質を意味する。オルソステリックリガンドと対照的に、アロステリックモジュレーターは、内在性リガンドも結合している場合でも、異なる部位で受容体と結合して受容体機能を修飾し、かかる内因性リガンドの受容体への親和性を変更することによって、該受容体の活性化または非活性化の強さを制御することが知られている。アロステリックモジュレーターには、受容体の活性を高めるポジティブ・アロステリックモジュレーターと、受容体の活性を抑制するネガティブ・アロステリックモジュレーターとが知られているが、本発明における「化合物」は、ポジティブ・アロステリックモジュレーターであることが好ましい。

#### 【0033】

上記「化合物」は、SSTR1/4ヘテロダイマーを発現する臓器、組織又は細胞を同定するために使用することができる。例えば、上記化合物を<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>99m</sup>Tc(Tc-<sup>99m</sup>)、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I等のラジオアイソトープにより標識し、ヒト又は非ヒト動物に投与した後に、シンチグラフィーを行うことにより、生体内においてSSTR1/4ヘテロダイマーを発現する組織や細胞を同定することができる。また、上記「化合物」が抗体である場合には、FITC(フルオレセインイソシアネート)又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識化抗体を作製し、生体から採取した組織や細胞におけるSSTR1/4ヘテロダイマーの発現をRIA法、ELISA法、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法により同定することができる。

#### 【0034】

本発明のスクリーニング方法によって選択された「化合物」は、SSTR1/4ヘテロダイマーを介してネプリライシンを活性化し、Aレベルの分解を促進する可能性がある。

したがって、本発明のスクリーニング方法は、ネプリライシンの活性を向上させる化合物のスクリーニング方法として利用でき、また、本発明のスクリーニング方法は、A タンパク質の蓄積に起因する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法としても利用できる。具体的には、(1)本発明のスクリーニング方法によって、SSTR1/4ヘテロダイマー特異的なアゴニスト又はアロステリック作動薬を同定した後に、(2)かかるアゴニスト又はアロステリック作動薬に対して、特異性や脳血管関門透過性を向上させるような化学修飾を行い、(3)次世代アルツハイマー病モデルマウス(Saito et al., Nat Neurosci17(5):661-663, 2014. doi: 10.1038/nn.3697.)を用いてA蓄積抑性作用及び安全性を確認することにより、(4)臨床試験に応用可能な、Aタンパク質の蓄積に起因する疾患の治療及び/又は予防剤を探索することが可能となる。

本発明において「Aタンパク質の蓄積に起因する疾患」とは、生体内におけるAレベルと疾患との因果関係が示唆される疾患又は状態を意味し、Aの脳実質部分への蓄積(老人斑と呼ばれる)や脳血管内への蓄積が認められる、アルツハイマー病、脳血管アミロイドアンギオパチー、脳血管性痴呆症、その他の認知症、脳梗塞等を含む。上記化合物は、上記「Aタンパク質の蓄積に起因する疾患」を発症する前の患者に対する予防効果(Aタンパク質レベルの上昇を抑制する効果)や、上記「Aタンパク質の蓄積に起因する疾患」を発症していると診断された患者に対する治療効果(既に蓄積されたAタンパク質の分解による症状の改善や進行の遅延効果)が期待できる。本発明の形質転換体は、ネプリライシンの活性を向上させる化合物のスクリーニング方法という用途のために使用でき、また、Aタンパク質の蓄積に起因する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法という用途のために使用できる。

10

20

## 【0035】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0036】

## (1) SSTR1及びSSTR4発現CHO細胞の作製

## (1-1) CHO細胞の培養

細胞培養用24ウェルプレート(Thermo社製)にカバーガラス(松浪硝子工業社製)を入れて、ポリ-L-リジン(PLL; Sigma社製)によるコーティング処理を行い、培養用プレートを作製した。次に、培養液(10% FBS(Nichirei Bioscience社製)、ペニシリン、及びストレプトマイシン(ナカライテスク社製)を含むDMEM; Gibco社製)にCHO細胞を懸濁し、上記培養用プレート2枚に $2.7 \times 10^4 / 500 \mu\text{L}$ /ウェルとなるように播種した。2枚のプレートはそれぞれ免疫染色用及び近接ライゲーションアッセイ用として用意した。

30

## 【0037】

## (1-2) トランスフェクション用混合液の調製

以下のヒトSSTR1をコードするDNA配列(配列番号1)又はヒトSSTR4をコードするDNA配列(配列番号2)をpcDNA(Thermo社製)に挿入して、ヒトSSTR1及びヒトSSTR4の発現ベクターを作製した(以下、かかる発現ベクターをそれぞれ「pcDNA-SSTR1」及び「pcDNA-SSTR4」と記載する)。

40

## 【0038】

ヒトSSTR1(なお、下線部はFlag-tag配列を示す):

A T G T T C C C C A A T G G C A C C G C C T C C T C T C C T T C C T C C T C T C  
 C T A G C C C C A G C C C G G G C A G C T G C G G C G A A G G C G G C G G C A G  
 C A G G G G C C C C G G G G C C G G C G C T G C G G A C G G C A T G G A G G A G  
 C C A G G G C G A A A T G C G T C C C A G A A C G G G A C C T T G A G C G A G G  
 G C C A G G G C A G C G C C A T C C T G A T C T C T T T C A T C T A C T C C G T  
 G G T G T G C C T G G T G G G G C T G T G T G G G A A C T C T A T G G T C A T C  
 T A C G T G A T C C T G C G C T A T G C C A A G A T G A A G A C G G C C A C C A

50

A C A T C T A C A T C C T A A A T C T G G C C A T T G C T G A T G A G C T G C T  
 C A T G C T C A G C G T G C C C T T C C T A G T C A C C T C C A C G T T G T T G  
 C G C C A C T G G C C C T T C G G T G C G C T G C T C T G C C G C C T C G T G C  
 T C A G C G T G G A C G C G G T C A A C A T G T T C A C C A G C A T C T A C T G  
 T C T G A C T G T G C T C A G C G T G G A C C G C T A C G T G G C C G T G G T G  
 C A T C C C A T C A A G G C G G C C C G C T A C C G C C G G C C C A C C G T G G  
 C C A A G G T A G T A A A C C T G G G C G T G T G G G T G C T A T C G C T G C T  
 C G T C A T C C T G C C C A T C G T G G T C T T C T C T C G C A C C G C G G C C  
 A A C A G C G A C G G C A C G G T G G C T T G C A A C A T G C T C A T G C C A G  
 A G C C C G C T C A A C G C T G G C T G G T G G G C T T C G T G T T G T A C A C  
 A T T T C T C A T G G G C T T C C T G C T G C C C G T G G G G G C T A T C T G C  
 C T G T G C T A C G T G C T C A T C A T T G C T A A G A T G C G C A T G G T G G  
 C C C T C A A G G C C G G C T G G C A G C A G C G C A A G C G C T C G G A G C G  
 C A A G A T C A C C T T A A T G G T G A T G A T G G T G G T G A T G G T G T T T  
 G T C A T C T G C T G G A T G C C T T T C T A C G T G G T G C A G C T G G T C A  
 A C G T G T T T G C T G A G C A G G A C G A C G C C A C G G T G A G T C A G C T  
 G T C G G T C A T C C T C G G C T A T G C C A A C A G C T G C G C C A A C C C C  
 A T C C T C T A T G G C T T T C T C T C A G A C A A C T T C A A G C G C T C T T  
 T C C A A C G C A T C C T A T G C C T C A G C T G G A T G G A C A A C G C C G C  
 G G A G G A G C C G G T T G A C T A T T A C G C C A C C G C G C T C A A G A G C  
 C G T G C C T A C A G T G T G G A A G A C T T C C A A C C T G A G A A C C T G G  
 A G T C C G G C G G C G T C T T C C G T A A T G G C A C C T G C A C G T C C C G  
 G A T C A C G A C G C T C G A T T A C A A G G A C G A C G A C G A T A A G T G A  
 【 0 0 3 9 】

10

20

ヒトSSTR4 (なお、下線部はMyc - tag配列を示す) :

A T G A G C G C C C C C T C G A C G C T G C C C C C G G G G G C G A G G A A G  
 G G C T G G G G A C G G C C T G G C C C T C T G C A G C C A A T G C C A G T A G  
 C G C T C C G G C G G A G G C G G A G G A G G C G G T G G C G G G G C C C G G G  
 G A C G C G C G G G C G G C G G G C A T G G T C G C T A T C C A G T G C A T C T  
 A C G C G C T G G T G T G C C T G G T G G G G C T G G T G G G C A A C G C C C T  
 G G T C A T C T T C G T G A T C C T T C G C T A C G C C A A G A T G A A G A C G  
 G C T A C C A A C A T C T A C C T G C T C A A C C T G G C C G T A G C C G A C G  
 A G C T C T T C A T G C T G A G C G T G C C C T T C G T G G C C T C G T C G G C  
 C G C C C T G C G C C A C T G G C C C T T C G G C T C C G T G C T G T G C C G C  
 G C G G T G C T C A G C G T C G A C G G C C T C A A C A T G T T C A C C A G C G  
 T C T T C T G T C T C A C C G T G C T C A G C G T G G A C C G C T A C G T G G C  
 C G T G G T G C A C C C T C T G C G C G C G G C G A C C T A C C G G C G G C C C  
 A G C G T G G C C A A G C T C A T C A A C C T G G G C G T G T G G C T G G C A T  
 C C C T G T T G G T C A C T C T C C C A T C G C C A T C T T C G C A G A C A C  
 C A G A C C G G C T C G C G G C G G C C A G G C C G T G G C C T G C A A C C T G  
 C A G T G G C C A C A C C C G G C C T G G T C G G C A G T C T T C G T G G T C T  
 A C A C T T T C C T G C T G G G C T T C C T G C T G C C C G T G C T G G C C A T  
 T G G C C T G T G C T A C C T G C T C A T C G T G G G C A A G A T G C G C G C C  
 G T G G C C C T G C G C G C T G G C T G G C A G C A G C G C A G G C G C T C G G  
 A G A A G A A A A T C A C C A G G C T G G T G C T G A T G G T C G T G G T C G T  
 C T T T G T G C T C T G C T G G A T G C C T T T C T A C G T G G T G C A G C T G  
 C T G A A C C T C T T C G T G A C C A G C C T T G A T G C C A C C G T C A A C C  
 A C G T G T C C C T T A T C C T T A G C T A T G C C A A C A G C T G C G C C A A  
 C C C C A T T C T C T A T G G C T T C C T C T C C G A C A A C T T C G C C G A  
 T T C T T C C A G C G G G T T C T C T G C C T G C G C T G C T G C C T C C T G G

30

40

50

A A G G T G C T G G A G G T G C T G A G G A G G A G C C C C T G G A C T A C T A  
 T G C C A C T G C T C T C A A G A G C A A A G G T G G G G C A G G G T G C A T G  
 T G C C C C C A C T C C C C T G C C A G C A G G A A G C C C T G C A A C C A G  
 A A C C C G G C C G C A A G C G C A T C C C C C T C A C C A G G A C C A C C A C  
 C T T C G A A C A A A A A C T A A T A T C A G A A G A A G A C C T A T G A

【0040】

次に、p c D N A - S S T R 1 及び p c D N A - S S T R 4 のそれぞれが終濃度 1 m g / m l となるようにプラスミド混合液を調製した。そして、チューブに O p t i - M E M ( G i b c o 社製) 及び上記プラスミド混合液を加えてボルテックスミキサーにより攪拌し、さらに、F u G E N E - H D ( P r o m e g a 社製) を加えて 15 回のピペッティング又はボルテックスミキサーにより混合し、トランスフェクション用混合液を調製した。ここで使用した各溶液の量は以下の通りである。

プラスミド混合液 17  $\mu$  L  
 O p t i - M E M 1034  $\mu$  L  
 F u G E N E - H D 66  $\mu$  L

【0041】

(1-3) CHO 細胞へのトランスフェクション

上記(1-2)で調製したトランスフェクション用混合液を室温で 5 ~ 10 分間インキュベートした後に、上記(1-1)で作製した 2 枚のプレートに添加して(25  $\mu$  L / ウェル)、ゆっくりと混合し、さらに 24 時間培養した。また、各プレートにおいて、20 ウェルはトランスフェクション処理を行い、4 ウェルは未処理のコントロール群とした。

【実施例 2】

【0042】

(2) 細胞の固定及び透過処理

(2-1) 細胞の固定処理

上記(1-3)で得られた細胞から培養液を除去した後に、3.7%のパラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(PFA-リン酸緩衝液)を加え(300  $\mu$  L / ウェル)、室温で 15 分間インキュベートして固定処理を行った。インキュベート後に、PFA-リン酸緩衝液を除去し、さらに、PBS を加えて 10 分間インキュベートする操作を 3 回繰り返し、細胞を洗浄した。

【0043】

(2-2) 細胞の透過処理

次に、上記(2-1)で得られた細胞に、0.1%又は0.5%のT r i t o n X 100 (ナカライテスク社製)を含むPBS (T r i t o n - P B S) を添加して(25  $\mu$  L / ウェル)、室温で 5 分間インキュベートし、透過処理を行った。インキュベート後に、T r i t o n - P B S を除去し、さらに、PBS を加えて 10 分間インキュベートする操作を 3 回繰り返し、細胞を洗浄した。図 1 に示すように、これらの細胞を、免疫染色(実施例 3)及び近接ライゲーションアッセイ(実施例 4)に供した。また、これらの実験においては、以下の表 1 に示すように 4 つの実験区を設け、それぞれ異なる濃度の T r i t o n X 100 - P B S 及び一次抗体の組合せを使用した。

【0044】

10

20

30

40

50

【表 1】

	実験区A	実験区B	実験区C	実験区D
Triton (透過処理)	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%
抗FLAG抗体 (一次抗体)	1000倍希釈	200倍希釈	1000倍希釈	200倍希釈
抗Myc抗体 (一次抗体)	8000倍希釈	1000倍希釈	8000倍希釈	1000倍希釈

10

## 【実施例 3】

## 【0045】

## (3) 免疫染色

## (3-1) ブロッキング

上記(2-2)で得られた細胞に、10%正常ヤギ血清を含むPBS(10%NGS-PBS)を添加して室温で30分間インキュベートし、ブロッキング処理を行った。インキュベート後に10%NGS-PBSを除去し、さらに、PBSを加えて5分間インキュベートして細胞を洗浄した。

## 【0046】

## (3-2) 一次抗体

5%正常ヤギ血清を含むPBS(5%NGS-PBS)を用いて、抗FLAG抗体(DYKDDDDK Tag(D6W5B)ウサギモノクローナル抗体; CST#14793; Cell Signaling社製)、及び抗Myc抗体(Myc-Tag(9B11)マウスモノクローナル抗体; CST#2276; Cell Signaling社製)を希釈し、免疫染色用一次抗体混合液を調製した。それぞれの抗体の希釈率は表1に示す通りである。上記(3-1)で得られた細胞に、免疫染色用一次抗体混合液を添加して、4で一晩インキュベートした。インキュベート後、免疫染色用一次抗体混合液を除去して、PBSを加えて5分間インキュベートする操作を3回繰り返す、細胞を洗浄した。

20

## 【0047】

## (3-3) 二次抗体

PBSを用いて、Alexa Fluor Plus 555 標識抗ウサギ抗体(Thermo社製)、及びAlexa Fluor Plus 488 標識抗マウス抗体(Thermo社製)を1000倍希釈し、免疫染色用二次抗体混合液を調製した。上記(3-2)で得られた細胞に、免疫染色用二次抗体混合液を添加して、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後に、免疫染色用二次抗体混合液を除去し、さらに、PBSを加えて10分間インキュベートする操作を3回繰り返す、細胞を洗浄した。

30

## 【0048】

## (3-4) 封入

上記(3-3)で染色した細胞を、Prolong Gold antifade reagent(Thermo社製)を用いて封入し、観察まで4で1日間保存した。

40

## 【0049】

## (3-5) 観察

図2に示すように、共焦点顕微鏡(FLUOVIEW FV10i; オリンパス社製)による観察の結果、実施例1で作製した細胞において、SSTR1及びSSTR4タンパク質が共発現していることが明らかとなった。また、SSTR1及びSSTR4タンパク質の局在は一致していたことから、SSTR1及びSSTR4タンパク質が細胞膜上でヘテロダイマーを形成している可能性が示唆された。

## 【実施例 4】

## 【0050】

## (4) 近接ライゲーションアッセイ

50

## (4-1) ブロッキング

Duolink PLAキット (Sigma-Aldrich社製) を用いて、近接ライゲーションアッセイを行った。まず、上記(2-2) で得られた細胞に、Duolinkブロッキング溶液を添加して、37 °C で60分間インキュベートし、ブロッキング処理を行った。インキュベート後にDuolinkブロッキング溶液を除去し、さらに、PBSを加えて5分間インキュベートし、細胞を洗浄した。

## 【0051】

## (4-2) 一次抗体

Duolink抗体希釈液を用いて、表1に示す通りに抗FLAG抗体及び抗Myc抗体を希釈し、Duolink用一次抗体混合液を調製した。上記(4-1) で得られた細胞に、Duolink用一次抗体混合液を添加して、4 °C で一晩インキュベートした。インキュベート後にDuolink用一次抗体混合液を除去し、さらに、PBSを加えて5分間インキュベートする操作を2回繰り返し、細胞を洗浄した。

10

## 【0052】

## (4-3) PLAプローブ

10 µLのPLAプローブ抗ウサギ(+)、10 µLのPLAプローブ抗マウス(-)、及び30 µLのPBSを混合し、50 µLのPLAプローブ溶液を調製した。上記(4-2) で得られた細胞に、PLAプローブ溶液を添加して、37 °C の恒湿チャンバー内で1時間インキュベートした。インキュベート後にPLAプローブ溶液を除去し、さらに、洗浄バッファーA (0.01 M Tris、0.15 M NaCl、0.05 % Tween 20) を加えて5分間インキュベートする操作を2回繰り返し、細胞を洗浄した。

20

## 【0053】

## (4-4) ライゲーション

10 µLの5X ligation stock (Sigma社製)、1.25 µLのDNAリガーゼ (Sigma社製)、及び38.75 µLの水を混合し、50 µLのリガーゼ溶液を調製した。上記(4-3) で得られた細胞に、リガーゼ溶液を添加して、37 °C の恒湿チャンバー内で30分間インキュベートした。インキュベート後にリガーゼ溶液を除去し、さらに、洗浄バッファーAを加えて5分間インキュベートする操作を2回繰り返し、細胞を洗浄した。

## 【0054】

## (4-5) 伸長反応

10 µLの5X増幅バッファー (Sigma社製)、0.625 µLのDNAポリメラーゼ (Sigma社製)、及び39.4 µLの水を混合し、50 µLの増幅溶液を調製した。上記(4-4) で得られた細胞に、増幅溶液を添加して、37 °C の恒湿チャンバー内で100分間インキュベートした。インキュベート後に増幅溶液を除去し、さらに、洗浄バッファーB (0.2 M Tris、0.1 M NaCl) を加えて10分間インキュベートする操作を2回繰り返し、細胞を洗浄した。

30

## 【0055】

## (4-6) 封入

上記(4-4) で得られた細胞を、Prolong Gold antifade reagent (Thermo社製) を用いて封入し、検出まで4 °C で1日間保存した。

40

## 【0056】

## (4-7) 検出

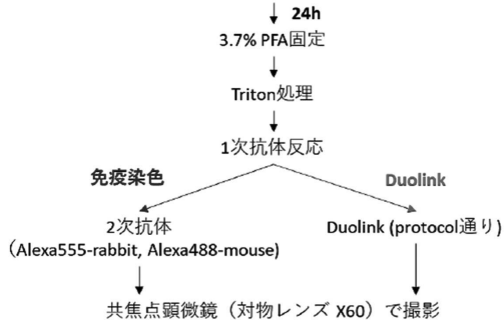
図3に示すように、共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; オリンパス社製) によるイメージングの結果、実施例1で作製した細胞において、PLAシグナルの蛍光スポットが確認された。この結果は、SSTR1タンパク質とSSTR4タンパク質との相互作用を裏付けるものである。上記実施例3及び4の結果から、SSTR1及びSSTR4タンパク質が細胞膜上でヘテロダイマーを形成していることが確認された。

50

【 図面 】

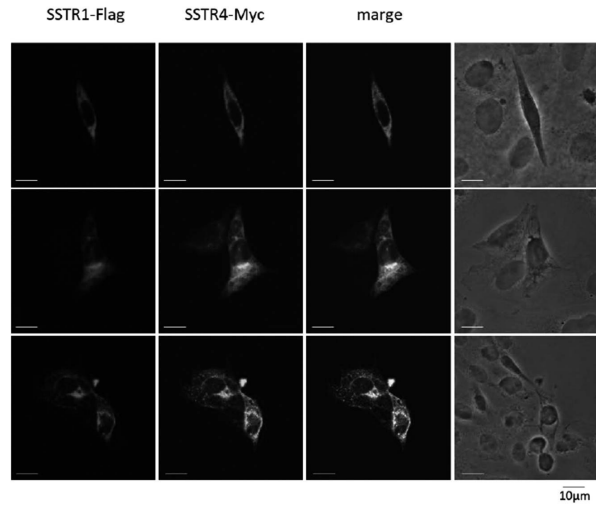
【 図 1 】

CHO cellsにpcDNA/sstr1-flag とpcDNA/sstr4-mycをトランスフェクション



【 図 2 】

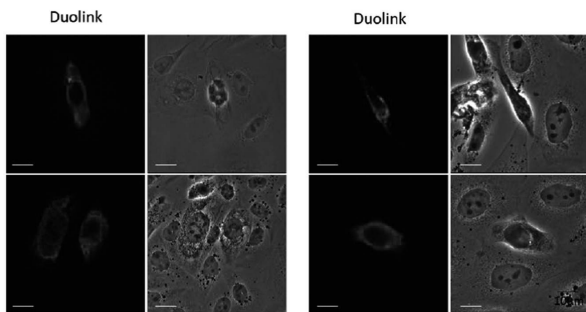
図2: Flag/Myc免疫組織化学



10

【 図 3 】

図3. Duolink: Flag-Myc



20

【 配列表 】

0007099717000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

- 弁理士 堀内 真  
 (74)代理人 100150902  
 弁理士 山内 正子  
 (74)代理人 100141391  
 弁理士 園元 修一  
 (74)代理人 100198074  
 弁理士 山村 昭裕  
 (74)代理人 100096013  
 富田 博行  
 (72)発明者 西道 隆臣  
 東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2 0 5 株式会社理研バイオ - アルツハイマー病の発症前診断と予防的治療のために内  
 (72)発明者 斉藤 貴志  
 東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2 0 5 株式会社理研バイオ - アルツハイマー病の発症前診断と予防的治療のために内  
 (72)発明者 松葉 翔子  
 東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2 0 5 株式会社理研バイオ - アルツハイマー病の発症前診断と予防的治療のために内  
 (72)発明者 津吹 聡  
 東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2 0 5 株式会社理研バイオ - アルツハイマー病の発症前診断と予防的治療のために内  
 (72)発明者 松葉 由紀夫  
 東京都豊島区東池袋 2 - 3 8 - 4 2 2 0 5 株式会社理研バイオ - アルツハイマー病の発症前診断と予防的治療のために内  
 (72)発明者 新井 弘貴  
 埼玉県和光市広沢 2 - 1 国立研究開発法人理化学研究所内  
 (72)発明者 三平 尚美  
 埼玉県和光市広沢 2 - 1 国立研究開発法人理化学研究所内  
 (72)発明者 高村 理沙  
 埼玉県和光市広沢 2 - 1 国立研究開発法人理化学研究所内  
 審査官 鈴木 崇之  
 (56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 2 5 8 8 1 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 2 - 5 2 3 4 6 5 ( J P , A )  
 Yi, Zou, et al. , Expression and selective activation of somatostatin receptor subtypes induces cell cycle arrest in cancer cells , ONCOLOGY LETTERS , 2018年11月28日 , Vol. 17 , pp. 1723-1731  
 BORROTO-ESCUELA D. O. and FUXE K. , On the G Protein-Coupled Receptor Neuromodulation of the Claustrum , NEUROCHEMICAL RESEARCH , 2019年06月06日 , Vol. 45 , pp. 5-15  
 岩淵 英里奈, 他 , 近接ライゲーシオンアッセイ法を用いた乳癌培養細胞におけるPLA法を用いたエストロゲンレセプターダイマーの検出 , 第 5 4 回日本組織細胞化学会総会プログラムおよび抄録集 , 2013年 , p. 88 , P-28  
 アルツハイマー治療薬開発が進まない理由, 理化学研究所神経蛋白制御研究 チームシニア・チームリーダーの西道隆臣氏に聞く, 日経メディカルオンライン , 2017年06月23日 , URL <https://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/mem/pub/opinion/orgnl/201706/551762.html> , [ 検索日:2020-11-20]  
 渡辺 紀子, 他 , 神経芽腫群腫瘍におけるソマトスタチン受容体各サブタイプの発現 , 第 5 4 回日本組織細胞化学会総会プログラムおよび抄録集 , 2013年 , p. 64 , O2-02  
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12N 1/00 - 7/08

G01N 33/15

G01N 33/50

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed