

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4261766号
(P4261766)

(45) 発行日 平成21年4月30日 (2009. 4. 30)

(24) 登録日 平成21年2月20日 (2009. 2. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00

B

G O 1 N 33/15 (2006. 01)

G O 1 N 33/15

Z

G O 1 N 33/50 (2006. 01)

G O 1 N 33/50

Z

請求項の数 14 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-505277 (P2000-505277)
 (86) (22) 出願日 平成10年7月30日 (1998. 7. 30)
 (65) 公表番号 特表2001-512664 (P2001-512664A)
 (43) 公表日 平成13年8月28日 (2001. 8. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/015877
 (87) 国際公開番号 WO1999/006535
 (87) 国際公開日 平成11年2月11日 (1999. 2. 11)
 審査請求日 平成17年7月22日 (2005. 7. 22)
 (31) 優先権主張番号 08/903, 977
 (32) 優先日 平成9年7月31日 (1997. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594061492
 ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 O 2 1 1 4 マサチューセッ
 ツ州ボストン、フルート・ストリート (番
 地なし)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者 ブリンガースト, エフ. リチャード
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 O 8 1, ワルポール, タウンサイド
 レーン 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質結合レセプターアゴニストおよびアンタゴニストについてのスクリーニングアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的の化合物が G q タンパク質に結合するレセプターのアゴニストであるかどうかを決定する方法であって、

(a) 該化合物を、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-P A) を発現しかつ該レセプターを発現する培養細胞と接触させる工程であって、該レセプターは、通常は該細胞により発現されないものであり、該細胞は、u-P A 活性の G s シグナル伝達を阻害している、工程；および

(b) 工程 (a) における培養細胞の上清の u-P A 活性を測定する工程、を包含し、

該上清における該 u-P A 活性が、該化合物とは接触していない該培養細胞の上清の u-P A 活性と比較して増加することは、該化合物が該レセプターのアゴニストであることを示す、

方法。

【請求項 2】

前記 G q タンパク質に結合可能なレセプターが、さらに、G s タンパク質にも結合可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞株が L L C - P K 1 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記レセプターが、ヒト P T H R である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記レセプターが、ヒト P T H R である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

目的の化合物が G q タンパク質に結合するレセプターのアンタゴニストであるかどうかを決定する方法であって、

(a) 該レセプターの既知アゴニストおよび該化合物を、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (u-P A) を発現しかつ該レセプターを発現する培養細胞と接触させる工程であって、該レセプターは、通常は該細胞により発現されないものであり、該細胞は、u-P A 活性の G s シグナル伝達を阻害している、工程；ならびに

(b) 工程 (a) における培養細胞の上清の u-P A 活性を測定する工程、を包含し、

該上清における該 u-P A 活性が、該アゴニストと接触したが該化合物とは接触していない該培養細胞の上清の u-P A 活性と比較して減少することは、該化合物が該レセプターのアンタゴニストであることを示す、方法。

【請求項 7】

前記 G q タンパク質に結合可能なレセプターが、さらに、G s タンパク質にも結合可能である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞株が L L C - P K 1 である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記レセプターが、ヒト P T H R である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記レセプターが、ヒト P T H R である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

目的の化合物が、G q タンパク質に結合するが G s タンパク質には結合しないレセプターのアゴニストであるかどうかを決定する方法であって、

(a) 該化合物を、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (u-P A) を発現しかつ該レセプターを発現する培養細胞と接触させる工程であって、該レセプターは、通常は該細胞により発現されないものである、工程；ならびに

(b) 工程 (a) における培養細胞の上清の u-P A 活性を測定する工程、を包含し、

該上清における該 u-P A 活性が、該化合物とは接触していない培養細胞の上清の u-P A 活性と比較して増加することは、該化合物が該レセプターのアゴニストであることを示す、方法。

【請求項 12】

前記細胞株が L L C - P K 1 である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

目的の化合物が、G q タンパク質に結合するが G s タンパク質には結合しないレセプターのアンタゴニストであるかどうかを決定する方法であって、

(a) 該レセプターの既知アゴニストおよび該化合物を、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (u-P A) を発現しかつ該レセプターを発現する培養細胞と接触させる工程であって、該レセプターは、通常は該細胞により発現されないものであり、該細胞は、u-P A 活性の G s シグナル伝達を阻害している、工程；ならびに

(b) 工程 (a) における培養細胞の上清の u-P A 活性を測定する工程、を包含し、

該上清における該 u-P A 活性が、該アゴニストと接触したが該化合物とは接触していない培養細胞の上清の u-P A 活性と比較して減少することは、該化合物が該レセプター

10

20

30

40

50

のアンタゴニストであることを示す、
方法。

【請求項 14】

前記細胞株が LLC-PK1 である、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

(合衆国支援の研究開発のもとで行われた発明の権利についての陳述)

本発明の開発中に行われた研究の一部は、米国政府資金を利用した。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

10

【0002】

(発明の分野)

本発明は、Gタンパク質結合レセプターに関する。より詳細には、GsおよびGqタンパク質結合レセプターアゴニストおよびアンタゴニストについてのスクリーニングアッセイが提供される。安定にトランスフェクトされた細胞株も提供される。

【0003】

(関連技術)

副甲状腺ホルモン (PTH) は、骨代謝回転の主要な全身性レギュレーターであり、そして成人および胎児組織で広く発現される密接に関連するペプチド、PTHrPは、特に発育中の軟骨および骨において重要なパラクリン作用を及ぼすと考えられる (Dempster, D. W. ら, Endocrine Rev 14:690-709 (1993); Lanske, B. ら, Science 273:663-666 (1996); Lee, K. ら, Endocrinology 137:5109-5118 (1996); Rixon, R. H. ら, J Bone Miner Res 9:1179-1189 (1994))。外因性の投与されたPTHは、インビボで骨量における著しい効果を及ぼし、その性質は、PTHの用量および循環ペプチドの濃度の得られる一時的プロファイルに非常に依存する (Dempster, D. W. ら, Endocrine Rev 14:690-709 (1993))。したがって、高いPTH濃度への連続的曝露は、正味の骨吸収および骨減少症を導くが、低用量の間欠的投与は、正味の骨形成の増加を導く—これは、骨量を増加させるためおよび骨粗鬆症を含む代謝的骨疾患を予防または処置するためのアナボリック薬剤としての、PTHまたはPTHアナログの潜在的な使用において大いに興味をたきつける所見である (Dempster, D. W. ら, Endocrine Rev 14:690-709 (1993)、Whirfield, J. F. および Morley, P., Trends Pharmacol Sci 16:382-386 (1995))。

20

30

【0004】

PTHおよびPTHrPの両方とも、単一のレセプター、PTH/PTHrプレセプター (PTHR) を活性化し得、これは、ラット、フクロネズミ、マウス、ブタ、およびヒトを含むいくつかの種からクローニングされており、そして骨の細胞で発現されることが示されている (Abou-Samra, A. B. ら, Proc Natl Acad Sci USA 89:2732-2736 (1992); Juppner, H. ら, Science 254:1024-1026 (1991); Schneider, H., Eur J Pharmacol 246:149-155 (1993); Bringhurst, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993); Pines, M. ら, Endocrinology 135:1713-1716 (1994))。骨芽細胞におけるPTHRの活性化は、アデニリルシクラーゼ (AC)、ホスホリパーゼC (PLC)、および細胞質ゾルの遊離カルシウムトランジェントの活性化を含む、複数の平行シグナル伝達事象を引き起こす (Abou-Samra, A. B. ら, Proc Natl Acad Sci USA 89:2732-2736 (1992)、Juppner, H. ら, Science 254:1024-1026 (

40

50

1991)、Br inghurst, F. R. ら, Endocrinology 132 : 2090-2098 (1993)、Dunlay, R. およびHruska, K. , Am J Physiol 258 : F223-231 (1990) ; Fujimori, A. ら, Endocrinology 128 : 3032-3039 (1991) ; Yamaguchi, D. T. ら, J Biol Chem 262 : 7711-7718 (1987))。これらの個々のシグナル伝達事象のそれぞれと、全体の骨量の変化のようなPTHに対する最終的に統合した組織応答との間の連結は、非常に不確定のままである。ACを選択的に活性化するようであるPTHアナログが、インビボでの間欠的投与後に骨に対する完全なアナボリック効果(anabolic effect)を生じ得ることが報告されている(Rixon, R. H. ら, J Bone Miner Res 9 : 1179-1189 (1994)、Whitfield, J. F. およびMorley, P. , Trends Pharmacol Sci 16 : 382-386 (1995)、Whitfield, J. F. ら, Calcif Tissue Int 58 : 81-87 (1996))。このような観察は、個々のPTH第2メッセンジャーが、特定の組織応答に実際に連結され得、したがってPTHシグナル伝達事象のパターン、ならびにその強度が、骨における応答の定性および定量局面の両方を示し得ることを示唆している。この結果は、骨において、成熟破骨細胞がPTHを発現しないと考えられ、したがって、これらのレセプターを発現する骨芽細胞または骨髄間質細胞のような隣接細胞によって生成される応答によって、間接的にのみPTHのこれらの影響を経験しなければならないという事実によって悪化する(Dempster, D. W. ら, Endocrine Rev 14 : 690-709 (1993)、McSheehy, P. およびChambers, T. , Endocrinology 118 : 824-828 (1986))。このような骨芽または間質PTH標的細胞が、破骨細胞系統の近隣細胞に、一時的に微細な差を反映する複雑な情報およびPTH曝露の濃度プロファイルを伝達し得る方法は、不明瞭なままである。

【0005】

PTHの著しい脱感作およびダウンレギュレーションは、高濃度のリガンドへの曝露後に記載されており(Fujimori, A. ら, Endocrinology 128 : 3032-3039 (1991)、Abou-Samra, A-Bら, Endocrinology 129 : 2547-2554 (1991) ; Mitochell, J. およびGoltzman, D. , Endocrinology 126 : 2650-2660 (1990) ; Fukuyama, S. ら, Endocrinology 131 : 1757-1769 (1992))、そして最近、ラットPTHによって生成されるシグナル伝達事象のパターンが、細胞表面におけるその発現のレベルによって強く影響されることが報告された(Guo, J. ら, Endocrinology 136 : 3884-3891 (1995))。詳細には、PLC応答の程度が、最大AC応答に影響を及ぼさない発現の範囲(細胞当たり40,000~300,000レセプター)にわたる安定にトランスフェクトしたLLC-PK1細胞の表面上の利用可能なPTHの密度に直接的に関連することが見いだされている(Guo, J. ら, Endocrinology 136 : 3884-3891 (1995))。

【0006】

ヒトPTHは、培養した細胞でこれまでに発現されているが(Pines, M. ら, Endocrinology 135 : 1713-1716 (1994)、Schneider, H. ら, FEBS Lett 351 : 281-285 (1994)、Pines, M. ら, Bone 18 : 381-389 (1996))、そのシグナル伝達特性は、まだ十分に解明されていない。特に、シグナル伝達応答の特徴に対するヒトPTH発現の変化の効果は、組織的に分析されていない。PTH(3-34)、PTH(7-34)、およびPTH(1-31)のような特定のミノまたはカルボキシル末端短縮型PTHアナログは、通常のPTH第2メッセンジャーのサブセットのみの選択的活性化を示すことがこれまでに見いだされている(Rixon, R. H. ら, J Bone Mine

r Res 9:1179-1189 (1994)、Whitfield, J. F. およ
びMorley, P., Trends Pharmacol Sci 16:382-3
86 (1995)、Fujimori, A. ら, Endocrinology 128:
3082-3039 (1991)、Abou-Samra, A. B. ら, Endocri
nology 135:2588-2594 (1994); Azarani, A. ら, J
Biol Chem 271:14931-14936 (1996); Chakrav
arth, B. R. ら, Biochem Biophys Res Commun
171:1105-1110 (1990); Fujimori, A. ら, Endocri
nology 130:29-36 (1992); Jouishomme, H. ら, En
docrinology 130:53-60 (1992); Janulis, M. ら, 10
Endocrinology 133:713-719 (1993)。hPTH (1-
31) アナログは、PKCではなくACを活性化し、さらに卵巣摘出したラットにおいて
著しいアナボリック効果を保持することが報告された(Rixon, R. H. ら, J B
one Miner Res 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, J Bone Miner Res 9:943-949 (1994))
。ヒトPTHrPによるこのような選択的シグナル伝達の確認は、臨床使用のためのこれら
のシグナル特異的PTHペプチドの開発のための重要な追加の理論を提供する。したがっ
て、PTHrPによって媒介される応答の特徴づけについて、当該技術分野で必要性がある
。

【0007】

(発明の要旨)

本発明者らは、安定にトランスフェクトしたヒトPTHrPの広い範囲を集合的に発現する
十分に特徴づけられた腎臓上皮LLC-PK1細胞株の多くのサブクローンを単離しそし
て特徴づけた。ラットPTHrPについて、ヒトレセプターが、PLC活性化について必要
とされるよりもかなり低いレセプター発現のレベルでACを最大に活性化することを見い
だした。さらに、これらの細胞におけるPLC活性化の一時的パターンおよび程度は、最
大AC活性化を誘起することを越える発現の範囲にわたる細胞表面ヒトPTHrPの密度に
強く依存する。驚くべきことに、hPTH (1-31) およびhPTH (1-34)
が、ヒトPTHrPによってPLCおよび細胞質ゾルの遊離カルシウムトランジェントを等
価に活性化し、そしてさらにhPTH (1-31) が、cAMP非依存的シグナル伝達経路に依
存するこれらの細胞におけるPTHに対する他のより遅延した生物学的応答を完全
に誘導することも見いだした。これらの所見は、骨または腎臓のような組織における統合
された細胞応答を形作ることにおけるPTHrP調節および示差シグナル伝達の潜在的な生
理学的役割を指摘し、そしてこれらは、ヒトPTHrPのリガンド選択性が、PTHrPの他
の種のリガンド選択性とは異なり得ることを示す。

【0008】

本発明者らはまた、これらの細胞においてヒトPTHrPによってACまたはPLCのい
ずれかの活性化に対して応答する便利および感度のある分光光度的バイオアッセイを開発し
、そしてラット細胞においてシグナル感受性アゴニストであることが既に見いだされてい
るPTH (3-34) およびPTH (1-31) のようなアナログが、ヒトPTHrPによる生物学的活性の異なるスペクトルを示し得ることを示すために、他の測定とともに、こ
れを用いている。

【0009】

したがって、本発明は、PTHrPを発現するLLC-PK1細胞を含む安定にトランスフ
ェクトされた細胞株を提供する。

【0010】

本発明はまた、目的の化合物が、GsまたはGqタンパク質結合レセプターのアゴニ
ストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定するための方法を提供し、上記方法は

(a) ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター(u-PA)を発現する細胞
株を提供する工程;

10

20

30

40

50

(b) G s または G q タンパク質結合レセプターをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する工程であって、このレセプターが、工程 (a) のこの細胞株で通常では発現されない、工程；

(c) この細胞株にこの発現ベクターを導入し、それによって安定にトランスフェクトした細胞を提供する工程；

(d) この安定にトランスフェクトした細胞をこの目的の化合物と接触させる工程；および

(e) 工程 (d) のこの細胞の細胞培養上清の u - P A 活性を測定する工程、を包含する。

【0011】

本発明は、さらに、上記の方法において L L C - P K 1 細胞を使用して、目的の化合物が G s または G q カップリングレセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法を包含する。本発明は、さらに、上記の方法を使用して、目的の化合物がヒト P T H R のアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法を提供する。

【0012】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本発明者らは、ヒト P T H R を発現する L L C - P K 1 細胞株を開発した。安定にトランスフェクトしたヒト P T H R の発現の広い範囲に集散的に及ぶクローン L L C - P K 1 細胞株の本研究は、ホルモンに対する細胞応答の特徴ならびに程度を調節することにおけるヒトレセプター発現の調節について重要な役割を示す、h P T H シグナル伝達と生物学的活性とのレセプター密度依存的な差を証明した。

【0013】

本発明の1つの実施態様では、ヒト P T H R を発現する L L C - P K 1 細胞を含む安定にトランスフェクトした細胞株が提供される。細胞株は、培養物中で不確定に生存し得る同じ型の細胞の集団である。「安定にトランスフェクトした細胞株」とは、細胞株が、通常では発現しないポリペプチドを発現するためのいくつかの方法で変化されていることを意味する。「発現する」とは、構造遺伝子が、m R N A に転写され、そしてこのような m R N A がポリペプチドを産生するように翻訳されることを意味する。L L C - P K 1 細胞は、カルシトニンおよびバゾプレシンレセプターを発現するが、通常では P T H R を発現しない、ブタ腎臓上皮細胞であり、そしてアメリカンタイプカルチャーコレクション、A T C C No. C L - 1 0 1 から入手可能である。ヒト P T H R は、ヒト P T H およびヒト P T H r P の両方に結合するレセプターである。ヒト P T H R は、既にクローニングされている (S c h n e i d e r ら, E u r. J. P h a r m a c o l. 2 4 6 : 1 4 9 - 1 5 5 (1993) ; A d a m s ら, B i o c h e m. 3 4 : 1 0 5 5 3 - 1 0 5 5 9 (1995)) 。したがって、ヒト P T H R を発現する L L C - P K 1 細胞は、「安定にトランスフェクトされた」といわれる。

【0014】

u - P A が、カルシトニンによる P K A および P K C 経路の両方の活性化に対する応答において L L C - P K 1 細胞によって分泌されることが、既に示されている (J a n s, D. A. および H e m m i n g s, B. A., F E B S L e t t 2 0 5 : 1 2 7 - 1 3 1 (1986)) 。本発明者らは、L L C - P K 1 細胞において、P K A および P K C 経路の両方とも、u - P A 産生に連結することを再確認した。本発明者らは、これらの細胞における u - P A 産生、およびこのような P K A または P K C 活性化を測定する分光光学的バイオアッセイを開発した。G s および G q タンパク質は、P K C 経路を活性化し、それによって L L C - P K 1 細胞における u - P A 産生を増加させる。G s または G q タンパク質結合レセプターのアゴニストは、u - P A を発現する細胞における u - P A 産生を増加させる。G s または G q タンパク質結合レセプターのアゴニストの活性を阻害し、それによって単独で投与されたアゴニストに対して u - P A を発現する細胞において u - P A 産生を減少させる。

【0015】

LLC-PK1以外の細胞株は、u-PAを発現する。これらの細胞株は、化合物が、本発明の方法を使用してGsまたはGqタンパク質結合レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定するために使用され得る。u-PAを発現する細胞株の例には、HE-LU (Rifkin) (ATCC No. CRL-7717) ; LLC-MK2 (ATCC No. CCL-7) ; NMU (ATCC No. CRL 1743) ; LLC-RK1 (ATCC No. CCL-106) ; およびMIA PaCa-2 (CRL-1420) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0016】

したがって、本発明のさらなる実施態様は、目的の化合物が、GsまたはGqタンパク質カップリングレセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法を包含し、(a) ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター (u-PA) を発現する細胞株を提供する工程 ; (b) GsまたはGqタンパク質結合レセプターをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する工程であって、このレセプターが、工程(a)のこの細胞株で通常では発現されない、工程 ; (c) この細胞株に該発現ベクターを導入し、それによって安定にトランスフェクトした細胞を提供する工程 ; (d) この安定にトランスフェクトした細胞をこの目的の化合物と接触させる工程 ; および(e) 工程(d)のこの細胞の細胞培養上清のu-PA活性を測定する工程、を包含する。本発明の好ましい実施態様は、上記の方法を使用して、目的の化合物が、Gsタンパク質結合レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法である。本発明の他の好ましい実施態様は、上記の方法を使用して、目的の化合物が、Gqタンパク質結合レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法である。本発明の特に好ましい実施態様は、上記の方法においてLLC-PK1細胞を使用して、目的の化合物が、GsまたはGqタンパク質結合レセプターアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法である。本発明の他の特に好ましい実施態様は、上記の方法を使用して、目的の化合物が、ヒトPTHrPのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する方法である。

【0017】

「目的の化合物」は、ペプチド、ポリペプチド、ポリペプチドのフラグメント、有機天然分子、または合成分子であり得る。GsまたはGqタンパク質結合レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであり得る化合物の例は、ホルモン、ホルモンアナログ、および抗体である。

【0018】

「GsまたはGqタンパク質結合レセプターのアゴニスト」は、GsまたはGqタンパク質結合レセプターと相互作用しそしてGsまたはGqタンパク質結合レセプターを活性化する化合物である。「GsまたはGqタンパク質結合レセプターのアンタゴニスト」は、GsまたはGqタンパク質結合レセプターのアゴニスト誘導した活性化を阻害する化合物である。

【0019】

「GsまたはGqタンパク質結合レセプター」は、適切なリガンドに結合した場合、GsまたはGqタンパク質を活性化するレセプターである。いくつかのレセプターは、GsおよびGqタンパク質の両方を活性化し得るが、いくつかは、GsまたはGqタンパク質のいずれかのみを活性化する。好ましくは、本発明で使用されるGsまたはGqタンパク質結合レセプターは、本発明の方法で使用される細胞のGsまたはGqタンパク質を活性化し得るべきである。Gsタンパク質結合レセプターの例には、 β -アドレナリン作用性、グルカゴン、ADH、FSH、LH、およびVIPレセプターが挙げられるが、これらに限定されない。Gqタンパク質結合レセプターの例には、TRH、トロニン、およびPGF₂ α レセプターが挙げられるが、これらに限定されない。GsおよびGqタンパク質の両方を活性化するレセプターの1つの例は、カルシトニンレセプターである。

【0020】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」は、発現ベクターが適切な宿主細胞に安定にトランスフェクトされる場合、構造遺伝子が発現され得るように、発現制御配列に作動可能に連結された構造遺伝子を含むベクターである。2つのDNA配列は、2つの核酸分子間の連結の性質が、(1)フレームシフト変異の導入を生じないか、(2)プロモーター領域配列が所望の配列の転写を指示する能力を妨害しないか、または(3)所望の配列がプロモーター領域配列によって転写される能力を妨害しない場合に、「作動可能に連結される」という。したがって、プロモーター領域は、プロモーターが、核酸配列の転写をもたらし得た場合、所望の核酸配列に作動可能に連結される。好ましいプロモーターには、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター(Hamer, D. ら, J. Mol. Appl. Gen. 1: 273-288 (1982))、HSVチミジンキナーゼプロモーター(McKnight, S. Cell 31: 355-365 (1982))、またはSV40初期プロモーター(Benoist, C. ら, Nature 290: 304-310 (1981))が挙げられる。

10

【0021】

細胞におけるGsまたはGqタンパク質結合レセプターの発現は、発現ベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加し得る。エンハンサーは、プロモーターの転写活性を増加させるように作用する、一般に約10~300bpのサイズの、DNAのシス作用エレメントである。エンハンサーの代表的例には、bp100~270に複製起点の後期部位に位置するSV40エンハンサー；サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー；複製起点の後期部位におけるポリオーマエンハンサー；およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0022】

発現ベクターは、核酸配列の誘導性発現を提供し得る。このようなベクターの中で好ましいものは、温度および栄養添加物のような、操作することが容易になる環境因子によって誘導可能である発現について提供するベクターである。

【0023】

発現ベクターはまた、安定にトランスフェクトした細胞における増殖についての選択マーカーを含み得る。選択マーカーの代表的例には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、ハイグロマイシンまたはネオマイシン耐性が挙げられる。

【0024】

発現ベクターは、市販で提供され得るか、または当該技術分野で周知のクローニングの任意の方法によって構築され得る。好ましい発現ベクターには、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG；Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL；ならびにInvitrogenから入手可能なpcDNA1neoが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

30

【0025】

発現ベクターは、感染、形質導入、トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、エレクトロポレーション、および形質転換を含む、任意の適切な方法によって、宿主細胞に導入され得る。このような方法は、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986)のような、多くの標準の実験室マニュアルに記載される。

40

【0026】

「細胞株で通常では発現しない」とは、GsまたはGqタンパク質結合レセプターが、本発明の方法で使用される細胞株において検出可能レベルで発現されないことを意味する。

【0027】

「安定にトランスフェクトした細胞を目的の化合物と接触させる」とは、目的の化合物が、任意の適切な方法によって安定にトランスフェクトした細胞に投与されることを意味する。これは、化合物をインビトロまたはインビボで外因的に投与する工程、またはさらに

50

化合物を発現させるために細胞をトランスフェクトする工程を包含し得る。化合物を外因的に投与する場合、キャリアが使用され得る。キャリアは、細胞生存性と適合性であるべきである。キャリアの例には、DMSO、MeOH/EtOH、水、Tris、およびHEPESが挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

目的の化合物は、高度に精製されるか、部分精製されるか、または未精製であり得る。目的の化合物は、単独または組み合わせて安定にトランスフェクトした細胞に投与され得る。組み合わせて化合物を投与することによって、GsまたはGqタンパク質結合レセプターにおける相乗効果が決定され得る。

【0029】

「u-PA活性を測定すること」とは、直接的（すなわち、絶対u-PA活性を決定または評価することによって）または相対的（すなわち、目的の化合物と接触していないコントロールの安定にトランスフェクトした細胞株に対して、目的の化合物と接触している安定にトランスフェクトした細胞株のu-PA活性を比較することによって）のいずれかで、u-PA活性のレベルを定性的または定量的に測定または評価することを意図する。好ましくは、目的の化合物と接触している安定にトランスフェクトした細胞株におけるu-PA活性は、目的の化合物と接触されていない安定にトランスフェクトした細胞株または目的の同じ化合物と接触されているトランスフェクトしていない細胞株のいずれか、あるいは両方のu-PA活性に対して比較される。

【0030】

u-PA活性を測定する1つの好ましい方法を、以下の実施例3に記載する。簡単にいえば、安定にトランスフェクトした細胞からの上清のアリコートをし、クリーンなマイクロプレートに移す。「上清」は、細胞から取り出された液体培地である。u-PA活性をアッセイするための緩衝液を添加する。マイクロプレートを適切な量の時間インキュベートし、そして反応を、終結緩衝液で停止する。比色産物の吸光度を測定する。

【0031】

好ましくは、目的の化合物がアゴニストであるかどうかを決定する場合、化合物を、安定にトランスフェクトした細胞に投与し、そしてu-PA活性のレベルを測定または評価し、そして目的の化合物と接触していない安定にトランスフェクトした細胞におけるu-PA活性のレベルと比較する。

【0032】

目的の化合物がアンタゴニストであるかどうかを決定する場合、目的の化合物と公知のアゴニストの両方が、安定にトランスフェクトした細胞に投与されるべきである。アゴニストおよび潜在的アンタゴニストは、任意の順で（すなわち、最初にアゴニスト、次いで潜在的アンタゴニストを、または最初に潜在的アンタゴニスト、次いでアゴニストを）、ならびに同時に投与され得る。細胞をアゴニストおよび目的の化合物の両方と接触させた後、安定にトランスフェクトした細胞におけるu-PA活性のレベルを測定または評価し、そしてアゴニスト単独と接触している安定にトランスフェクトした細胞におけるu-PA活性のレベルに対して比較する。

【0033】

本発明の一般的に記載したので、本発明が以下の実施例を参照してより容易に理解される。実施例は、例示のみによって提供され、そして本発明の限定を意図するものではない。

【0034】

【実施例】

（実施例1）プラスミドトランスフェクションおよびクローンの単離

クローン化されたブタ腎臓由来細胞株、LLC-PK1（Bringham, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993)）およびヒトPTH/PTHrPレセプターcDNAでの安定なトランスフェクション後に単離されたサブクローンを、空气中5%CO₂下で、1000ug/ml G418を含むまたは含まない7%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM（

10

20

30

40

50

すべてGIBCO-BRL, Grand Island, NYから) 中で維持した。ヒトPTH/PTHrPレセプターを安定に発現する細胞株を調製するために、細胞のコンフルエント単層を、哺乳動物発現ベクターpcDNA1neo (Invitrogen, San Diego, Ca) 中に構築した全長ヒトPTH/PTHrPレセプターcDNAでトランスフェクトした (Schipani, E. ら, Science 268: 98-100 (1995))。いくつかの場合には、細胞を、レセプターcDNAおよび優勢ネガティブPKA調節サブユニット変異体「REV AB」をコードするプラスミドで同時トランスフェクトした (Clegg, C. H. ら, J Biol Chem 262: 13111-13119 (1987))。トランスフェクションを、既述のようにリン酸カルシウム沈降技法を使用して行った (Bringham, F. R. ら, Endocrinology 132: 2090-2098 (1993))。

10

【0035】

11のクローン細胞株を、広範囲のレセプター発現を提供するために100以上の独立したサブクロンの合計の中から選択した (表1)。

【0036】

表1。クローンLLC-PK1細胞におけるヒトPTH/PTHrPレセプター発現およびシグナル伝達

hPTHrP cDNAで安定にトランスフェクトしたLLC-PK1細胞のサブクロンを、競合放射性リガンド (スキッチャード) 結合分析によって、およびhPTH (1-34) (1000 nM) に対する最大シグナル伝達応答 (基準の倍数またはパーセントの平均±SD) について分析した。すべての値を、3つ組で行った少なくとも2または3実験から得た。コントロールにおけるサイクリックAMP蓄積およびIP₃形成は、それぞれ3~10 pmol/ウェルおよび1,000~1,500 cpm/ウェルの範囲であった。

20

【0037】

【表1】

サブクローン	レセプター数 /細胞 ($\times 10^3$)	見かけの Kd (nM)	cAMP 蓄積	IP ₃ 形成 (基準の%)
<u>ヒトレセプター</u>				
HKRK B64	90	1.3	13 ± 2	116 ± 18
HKRK C53	120	1.2	58 ± 16	112 ± 4
HKRK B28	280	1.8	103 ± 17	107 ± 1
HKRK C101	330	1.6	94 ± 1	114 ± 11
HKRK C27	340	2.2	64 ± 8	113 ± 10
HKRK C30	600	2.8	—	192 ± 44
HKRK B5	840	3.9	—	462 ± 47
HKRK B57	900	5.6	—	243 ± 31
HKRK B7	950	4.5	99 ± 10	298 ± 21
HKRK B54	1020	6.4	—	287 ± 19
HKRH C58	1030	3.6	—	642 ± 106
<u>ラットレセプター</u>				
EW29	190	2.5	148 ± 16	289 ± 16
EW5	320	2.3	130 ± 6	480 ± 14

【0038】

(実施例2) 放射性リガンド

PTH/PTHrprレセプターに対する特異的結合を、いくつかの改変とともに既述 (Bringinghurst, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993)) のように測定した。簡単にいえば、細胞を、 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、そして研究前にさらに2日間培養した。細胞層を、氷冷緩衝液A [50mM Tris-HCl (pH 7.7)、100mM NaCl、2mM CaCl₂、5mM KCl、0.5% FBS、および5%熱非働化ウマ血清] でリンスし、次いで0.5mlの緩衝液A中、非標識ペプチドを含むまたは含まない、¹²⁵I 標識した [Nle^{8,18}, Tyr³⁴] ウシ (b) PTH (1-34) (1×10^5 cpm/ウェル) と、冷室温 (2~8℃) で6時間インキュベートした。結合反応を、インキュベーション混合物を吸引することによって終結し、その後、細胞を0.5mlの氷冷緩衝液Aで2回洗浄した。0.5mlの溶解緩衝液 (0.5N NaOH+0.1% Triton X-100) で細胞を可溶化した後、放射活性およびタンパク質の測定を、既述のように、スキャッチャード分析によって細胞当たりのレセプター数を算出して行った (Bringinghurst, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993))。他に記載がなければ、すべての試薬を、Sigma (St. Louis, MO) から得、そしてすべての同位体をDupont-New England Nuclear (Boston, MA) から購入した。[Nle^{8,18}, Tyr³⁴] bPTH (1-34) を、クロロミンT方法によって放射性ヨウ素化 (radioiodinate) し、そして既述のように精製した (Bringinghurst, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993))。

【0039】

それぞれ細胞当たり950, 000および280, 000hPTHrを発現する2つの代

10

20

30

40

50

表的細胞株HKRKB7およびHKRKB28についての放射性リガンド競合アッセイおよびスキッチャード分析を、図1に示す。選択された細胞株のすべてのスキッチャード分析は、1~7nMの見かけの K_d を有する、細胞当たり90,000~1,000,000部位からのPTHrP発現の範囲を示した(表1)。それぞれの場合、スキッチャード分析は、高親和性結合部位の単一のクラスに一致して直線であった。以下の記載のその後の実施例を、2つの細胞株で行い、これを、それぞれ高(HKRKB7)および低(HKRKB28)密度のhPTHrPを発現するものの代表として選択した。

【0040】

(実施例3) LLC-PK1細胞におけるヒトPTHrPシグナル伝達

(方法)

(ペプチドおよび他の試薬)

他に指示がなければ、すべての試薬を、Sigma (St. Louis, MO) から得、そしてすべての同位体をDuPont-New England Nuclear (Boston, MA) から購入した。[Nle^{8,18}, Tyr³⁴] bPTH(1-34)、[Tyr³⁴] hPTH(1-34)、hPTH(1-31)、hPTH(3-34)、hPTH(7-34)、およびhPTHrp(1-36)を、カルボキシ末端アミド基で合成した。[Nle^{8,18}, Tyr³⁴] bPTH(1-34)を、クロラミンT方法によって放射性ヨウ素化し、そして既述のように精製した(Bringhurst, F. R. ら, Endocrinology 132:2090-2098 (1993))。

【0041】

(細胞性cAMP蓄積)

細胞を、 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、そして研究の前にさらに2日間培養した。細胞を、1mMイソブチルメチルキサンチン(IBMx)を補充した0.5mlの氷冷緩衝液B[10mM HEPES (pH 7.4)、130mM NaCl、5mM KCl、1.2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、1.2mM Na₂HPO₄、5mMグルコース、および0.1%熱非働化BSA]で1回リンスし、氷上においた。処理を、IBMxを補充した緩衝液Bの0.25ml中で各ウェルに添加し、その後プレートを37℃にて15分間インキュベートした。次いで、緩衝液を迅速に吸引し、プレートを液体窒素上に迅速に移し、そしてその後凍結した単層を0.5mlの50mM HCl中に直接的に融解した。次いで、抽出したcAMPを、市販のRIAキット(DuPont-New England Nuclear, Boston, MA)を使用して測定した。結果を、基準の倍数として表し、ここでベースのレベルは、38~128pmol/mgタンパク質/15分の範囲であった。天然のままのLLC-PK1細胞におけるcAMP蓄積のベースのレベルは、野生型PTH/PTHrpレセプターを発現するサブクローンにおいて一貫して変化しなかった。

【0042】

(イノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)産生)

細胞を、 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、そして研究前にさらに2日間培養した。細胞を、アッセイ培地(0.1%BSAを補充した無血清およびイノシトールを含まないDMEM(GIBCO-BRL, Grand Island, NY)中で3uCi/mlの[³H]myo-イノシトールでアッセイ前に16時間37℃にて標識した。30mM LiClを含む予め温めたアッセイ培地で細胞を洗浄した後、30mM LiClおよび刺激剤(またはビヒクル)を含む0.25mlのアッセイ培地とともに37℃にて種々の間隔(1~30分)でインキュベートした。IP₃形成を、吸引および0.5mlの氷冷5%TCAの直接添加によって停止した。次いで、酸抽出物を、2容量の水飽和したエーテルで2回抽出し、そして既述のように(Guo, J. ら, Endocrinology 136:3884-3891 (1995))、AG1X8陰イオン交換カラム(Bio-Rad, Richmond, CA)でのクロマトグラフィーの前に濃縮NaOHおよびTris塩(最終濃度=10mM)でpH 7.4に調整した。他の画分(遊離の[³H]myo-イノシトール、グリセロホスフェートイノシ

10

20

30

40

50

トール、 IP_1 、および IP_2)を溶出した後に、 IP_3 画分を収集し、そして放射活性のその含量を、液体シンチレーション分光測定法(Beckman, モデルLS 6000 IC)によって決定した。

【0043】

(細胞質ゾルの遊離カルシウムの測定)

細胞質ゾルの遊離カルシウムを、 Ca^{2+} 感受性細胞内プローブfura-2を加えた細胞における二重蛍光によって測定した。細胞を、 $40,000 \sim 600,000/cm^2$ の密度でガラスカバースリップ上に播種し、そして上記のように2日間インキュベートした。カバースリップを、室温($22^\circ C$)にて30分間4 μM のfura-2/AM(Molecular Probes, Eugene, OR)を含むリン酸を含まない緩衝液B中に加える前にPBSで2回洗浄した。fura-2を含まない緩衝液Bで2回洗浄した後、カバースリップを、 $37^\circ C$ にて2 mlのリン酸を含まない緩衝液Bを含むキュベットに載せ、そして340および380 nmでの交互の励起に対する510 nmでの発光を、2 nmの励起および発光バンド幅で比測定(ratiometric)PTI Delta scan蛍光スペクトロメーターを使用してモニターした。安定なベースラインを得た後、アゴニストを、2 mlの新しい緩衝液への交換によって導入し、それに10~20 μl の濃縮したアゴニストストック(またはビヒクル単独)を添加した。ペプチドストックを、0.1%トリフルオロ酢酸中で調製し、イオノマイシンおよびホルボールエステルを、ジメチルスルホキシドに溶解し、そして他の添加物を、水中で調製した。最大および最小蛍光シグナルを、それぞれカルシウムの名目上の不在下で1 μM イオノマイシン+20 mMカルシウムまたは2 mM EGTAを含む改変した緩衝液への曝露によって得、そして自己蛍光をイオノマイシン+2.5 mM $MnCl_2$ の存在下で得たシグナルから見積もった。次いで、細胞質ゾルの遊離カルシウムを、既述のように決定した(Bringhurst, F. R. ら、Endocrinology 132:2090-2098 (1993))。

【0044】

(ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター(u-PA))

細胞を、 6×10^4 細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、そして翌日使用した。細胞を、0.2 mlで1回洗浄し、次いで0.05% BSAを含む0.1 mlの予め温めたDMEMを再供給した。各刺激剤を添加した後、プレートを、 $37^\circ C$ にて16時間インキュベーター中に戻した。次いで、馴化培地(5 μl)を、各ウェルからクリーンなマイクロプレートへ移した。反応を、50 μl のu-PAアッセイ緩衝液[90 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.45% Triton X-100、14 $\mu g/ml$ ヒトプラスミノゲン(Calbiochem, San Diego, CA)、および0.4 mg/ml S-2251 プラスミン基質(D-Val-Leu-L-Lys-NH-Np)(Sigma, St. Louis, MO)]の添加によって開始した。プレートを、最初は $37^\circ C$ にて15分間、次いで室温($22^\circ C$)にて30分間インキュベートした。反応を、10 μl の氷冷25%酢酸の添加によって停止した。比色産物の吸光度を、1時間以内に405 nmで測定した。活性を、標準として精製したヒトウロキナーゼ(Calbiochem)を使用して、Ploug単位/ウェルで表した。

【0045】

(細胞リン酸取り込み)

細胞を、 2.5×10^5 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、そして研究前にさらに2日間培養した。アッセイの24時間前、細胞に、0.1% BSAを含む0.5 mlのDMEMに再供給した。翌日、細胞に、薬物またはペプチドを含む無血清培地(DMEM+0.1% BSA)を再供給し、そしてインキュベーションを、空气中5% CO_2 下で $37^\circ C$ にてさらに6時間続けた。次いで、細胞を、BSAおよび Na_2HPO_4 を含まない予め温めた緩衝液Bで洗浄し、次いで $[^{32}P]$ オルトリン酸(4 $\mu Ci/ml$)および0.1 mM Na_2HPO_4 を含む0.25 mlの同じ緩衝液で $37^\circ C$ にて5分間インキュベートした。リン酸取り込みを、1 mlの氷冷ナトリウムを含まない「停止緩衝液」

[10 mM HEPES (pH 7.4)、140 mM 塩化コリン、および5 mM ヒ酸ナトリウム]を添加することによって停止し、次いで同じ緩衝液でさらに2回洗浄した。次いで、排出した細胞層を、0.5 mlの溶解緩衝液で可溶化し、そして細胞関連放射活性を、既述のように、Cerenkov カウンティングによって決定した (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。

【0046】

(結果)

LLC-PK1細胞で安定に発現したヒトPTH Rの特性の研究は、2つの重要な観察をもたらした。第1は、ヒトPTH Rの細胞表面密度が、リガンド濃度に関係なく、PTH に対する個々のシグナル伝達応答の程度の重要な決定基であり、そしてこれらの変化が、全く異なる、本質的に重複しない、レセプター密度の範囲にわたって生じるという所見である。これらの研究の過程において、PLC 応答の一時的プロファイルにおけるhPTH R密度依存的な差もまた観察し、そしてこれらの細胞においてPTHによって誘起された最初の細胞質ゾルカルシウムシグナルを持続することにおけるPKAの役割の証拠を検出した。第2の主要な所見は、PLC 活性化能力が、ラットPTH Rを発現する細胞において幾分減少したとしても、推定シグナル選択的PTHアナログhPTH (1-31)が、ヒトPTH Rを有する細胞において必ずしもシグナル選択的ではないことである。これらの結果は、PTH Rのヒトと他の種との間のリガンド-レセプター相互作用における微細な差を指摘し、そしてラットモデルに由来する結果が、ヒトPTH Rを発現する系へ注意して外挿すべきであることを示唆する。

【0047】

(発現したhPTH Rのシグナル伝達特性における細胞表面密度の影響)

最大PTH依存的cAMP蓄積を、hPTH (1-34)の高濃度(1000 nM)との15分間のインキュベーション後、ヒトPTH RトランスフェクトしたLLC-PK1サブクローンでアッセイした(表1)。ラットPTH Rを安定に発現したLLC-PK1細胞について既に報告されたように (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))、最大アデニルシクラーゼ応答は、(PLC 活性化について必要とされる閾値に対して以下を参照のこと)比較的低い閾値以上のヒトPTH Rの表面密度とは比較的独立していた。しかし、ヒトPTH Rの場合、最大AC 活性化の飽和についてのこの閾値は、120,000と280,000との間にあるようであり(表1)、これは、ラットPTH Rについてこれまでに観察されたものよりも少なくとも6~10倍高い (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。予測のとおり、hPTH Rを発現するLLC-PK1細胞におけるhPTH (1-34)によるACの活性化は、濃度依存的であり、そして図2Aに示すように、EC50 (約1 nM) および最大応答は、細胞株HKRKB28およびHKRKB7において同一であった。

【0048】

LLC-PK1細胞におけるラットPTH Rの発現を含むこれまでの研究において、30分で放出された総IP₃として測定される、PTHによる最大PLC 活性化を、最大AC 活性化の飽和に必要なとされるレセプター密度の閾値を明らかに超える広範囲の発現(すなわち、20,000~400,000レセプター/細胞)にわたるラットPTH Rの密度に密接に関連することが見いだされた (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。同様に、図3および表1に示すように、最大PLC 活性化は、ヒトPTH Rを発現するLLC-PK1サブクローン中のPTH R密度に強く既存的であった。AC 活性化の場合のように、ヒトPTH Rがこれらの細胞においてPLC 結合相対効率は、ラットレセプターよりも約3~5倍低かった。すなわち、ラットレセプターよりもほぼ3~5倍以上のヒトレセプターを、PLCの等価活性化に必要とした。

【0049】

PTH Rのより低い数を発現するいくつかのPTH 応答性細胞株-すなわち、UMR 1

10

20

30

40

50

06細胞（約70,000レセプター／細胞）において、非常に迅速であるが一時的なPLC活性化のパターンが記載されている（Yamaguchi, D. T. ら, J Biol Chem 262:7711-7718 (1987)）。このような一時的パターンが400,000より少ないヒトPTHrPを発現するLLC-PK1細胞において持続したPLC活性化の不在の基準となり得るかどうかを決定しようとして、予備研究を行い、HKRKB28、HKRKB64およびHKRKB7細胞（それぞれ、120,000、280,000、および330,000 PTHrP／細胞）においてより早い時間（4分）に増加したIP₃を示したが、HKRKB64細胞（90,000部位／細胞）では示さなかった（データを示さず）。次いで、PLC活性化の時間経過を、HKRKB28細胞においてより詳細に研究し、そしてHKRKB7細胞と比較した。図4Aに示すように、一時的にPTH刺激したIP₃形成を、PTH曝露の最初の数分以内にHKRKB28細胞で観察した。この応答は4分でピークとなり、次いで10分までに基準レベルまでの迅速な低下が起こった。逆に、300,000ラットPTHrP／細胞を発現するLLC-PK1細胞について既に報告されたように（Guo, J. ら, Endocrinology 136:3884-3891 (1995)）、HKRKB7細胞におけるIP₃形成は、10分と30分との間増加し続けたが、より迅速な開始期もまた、これらの細胞で明らかであった。

【0050】

HKRKB28およびHKRKB7細胞で観察されたPTH誘導したPLC活性化の種々の一時的パターンは、より広範な脱感作を含むいくつかの可能性を示唆し、これは、HKRKB28細胞におけるより弱いPLC応答、または、より高いレセプター発現による、HKRKB7細胞におけるIP₃形成のより弱くカップリングするが異なるメカニズムの可能性のある補充を、より迅速に失わせ得る。これらを区別するための努力において、他の系において報告されたように（Menniti, F. ら, Mol Pharmacol 40:727-733 (1991)）、濃度依存性が、それぞれHKRKB28およびHKRKB7細胞における迅速（すなわち、4分）対持続性（すなわち、30分）PLC応答について異なり得るかどうかを評価した。しかし、図4Bに示すように、HKRKB28において4分でおおよそHKRKB7において30分での最大応答の程度は非常に異なるが、2つの応答のEC₅₀は、これらの細胞においてラットPTHrPについて既に報告されたものと同じ（約20~30 nM）および類似であった（Guo, J. ら, Endocrinology 136:3884-3891 (1995)）。さらに、表2に示すように、2つの応答のリガンド特異性も類似であり、その点で、hPTH（1-34）およびhPTHrP（1-36）によるPLC活性化は、各細胞株内で等価であり、そしてhPTH（3-34）もhPTH（7-34）もそれぞれの場合においてなんら一貫した検出可能な活性を示さなかった。全体で、これらの結果は、HKRKB28における一時的PLC応答とHKRKB7における持続した応答との間のリガンド-レセプターカップリングまたは選択性の重要な差を示唆しなかった。

【0051】

表2。HKRKB7およびHKRKB28細胞におけるPTHまたはPTHrPペプチドによるホスホリパーゼCの活性化。

【0052】

[³H] myo-イノシトールで既に負荷をかけた、HKRKB7細胞およびHKRKB28細胞を、それぞれ30分または4分間各ペプチド（1000 nM）とともにインキュベートした。IP₃の形成を、ビヒクル処理コントロールにおいて測定した量のパーセントとして表す。示した値は、3つ組の決定の平均±SEMである。

【0053】

【表2】

ペプチド ^a	HKRK B7	HKRK B28
(1000 nM)	(30分刺激)	(4分刺激)
コントロール	100 ± 5	100 ± 3
hPTH (1-34)	298 ± 24	172 ± 9
hPTH (1-31)	275 ± 21	170 ± 14
hPTH (3-34)	103 ± 1	85 ± 9
hPTH (7-34)	122 ± 7	92 ± 10
hPTHrP (1-36)	93 ± 6	160 ± 9

【0054】

LLC-PK1細胞におけるヒトPTHrRを介するPLC活性化の予測された結果は、とりわけ細胞内貯蔵からの隔離されたカルシウムの放出である (Bringhamst, F. R. ら, *Endocrinology* 132:2090-20098 (1993)、Dunlay, R. およびHruska, K., *Am J Physiol* 258:F223-231 (1990)、Yamaguchi, D. T. ら, *J Biol Chem* 262:7711-7718 (1987)、Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389 (1996))。したがって、細胞質ゾルの遊離カルシウムを、hPTH (1-34) への曝露後のHKRK B28およびHKRK B7細胞において測定した。図5に示すように、Fura 2AM負荷をかけた細胞の単層へのhPTH (1-34) (100 nM) の添加は、20秒以内に400~600 nMでピークになりそしてその後ゆっくり減少する細胞質ゾルの遊離カルシウムの迅速な上昇を引き起こした。この応答において、程度または時間経過の有意な差は、HKRK B7細胞におけるより大きなIP₃応答 (図4A) にもかかわらず、HKRK B7とHKRK B28との間で観察されなかった (図5Aおよび5Cを参照のこと)。

【0055】

cAMP経路の活性化が、これらの細胞においてPTHに対する細胞質ゾルの遊離カルシウム応答の原因であり得る可能性を試験するために、AB45細胞を研究し、この細胞においてヒトPTHrR (370, 000/細胞) を、基準およびホルモン刺激したプロテインキナーゼA (PKA) の両方の優勢なネガティブインヒビターであるREV ABとともに同時発現させた (Clegg, C. H. ら, *J Biol Chem* 262:13111-13119 (1987)、Fukayama, S. ら, *Endocrinology* 134:1851-1858 (1994))。図5Dに示すように、hPTH (1-34) に対する強い細胞質ゾルカルシウム応答をまだ、これらのcAMP耐性細胞において観察し、そしてhPTHrRの類似の数を発現するcAMP応答性HKRK B28細胞において観察されるものに匹敵する程度であった。したがって、これらの細胞におけるhPTHの活性化によって引き起こされる細胞質ゾルの遊離カルシウムにおける迅速な増加は、明らかに、cAMPによって媒介されない。しかし、興味深いことに、HKRK B28細胞におけるよりもcAMP耐性AB45細胞においてより迅速に減少したカルシウム移動が、ほんの2~3分以内に基準レベルに近づくことを観察した (図5D)。これは、AB45細胞におけるIP₃形成の程度および一時的パターンが、HKRK B28細胞におけるものとほぼ同一であるという事実にもかかわらず生じた (データを示さず)。8Br cAMP (1 mM) も活性なホルボールエステルTPA (100 nM) も、迅速なカルシウム応答を引き起こさなかった (示さず)。これらの結果は、最初の細胞質ゾル

の遊離カルシウム応答の程度がP L C活性化に最も密接に関連するが、応答の期間が、おそらく細胞外カルシウム侵入の増強によるP K A経路の活性化によって優勢に影響を及ぼし得ることを意味した(Yamaguchi, D. T. ら, J Biol Chem 262:7711-7718 (1987))。

【0056】

(PTHによる生物学的応答の調節)

L L C-P K 1細胞におけるヒトP T H R発現の種々のレベルで観察されたシグナル伝達効率および選択性の変化が、P T Hに対する完全な遠位の生物学的応答の変化を生じ得るかどうかを決定するために、これらの細胞における2つの十分に特徴づけられたホルモン応答(u-P Aの分泌および無機リン酸のナトリウム依存的能動輸送)を研究した。

10

【0057】

L L C-P K 1細胞によるウロキナーゼ型のプラスミノゲン活性化因子(u-P A)の分泌は、カルシトニンによってP K AおよびP K C経路の両方の活性化に応じるものがすでに報告されている(Jans, D. A. およびHemmings, B. A., FEBS Lett 205:127-131 (1986))。このアッセイを、これらの細胞においてヒトP T H RによるA CまたはP L Cの活性化を報告する従来の分光光度バイオアッセイを提供するように適合した。図6に示すように、h P T H (1-34)との16時間のインキュベーションは、H K R K B 7およびH K R K B 28細胞の両方からのu-P A分泌における用量依存的増加を誘起した。8 B r c A M PおよびT P Aの両方の細胞株において、P K AおよびP K Cの薬理学的アクチベーターはまた、それぞれこの活性を著しく誘導し、P K AおよびP K C経路の両方ともu-P A産生に連結することを確認した。h P T H (1-34)に応じたH K R K B 7によるu-P Aの最大産生は、絶対量で、およびカルシトニンまたは8 B r c A M Pのような他のアゴニストとの相対量での両方で、H K R K B 28におけるものよりも大きかった(図6)。

20

【0058】

これらの2つの細胞株におけるP T Hへのc A M P応答の感度および程度が同一であったので、H K R K B 7対H K R K B 28細胞で観察されるP T Hへのより大きい最大u-P A応答が、H K R K B 7細胞においてのみ見られるP L Cの持続活性化を反映し得る可能性があるようであった。さらに、h P T H (1-34)によるu-P A産生の刺激についてのE C₅₀(10~20 nM)は、特にH K R K B 7細胞において、c A M P蓄積(1 nM)についてよりもI P₃形成の活性化(20~30 nM)についてより類似していた。また、P T Hに対する最大u-P A応答は、これらの細胞におけるより豊富なh P T H Rによる、さらなるP K A非依存的メカニズムの活性化に一致して、H K R K B 7における(しかし、H K R K B 28細胞においては)8 B r c A M Pの応答よりも高かった。これらの細胞においてP T H誘導したu-P A分泌のc A M P非依存的(おそらくP K C依存的)メカニズムの関連についてのさらなる証拠を、c A M P耐性A B 45細胞を使用して得た(図7)。予測したとおり、8 B r c A M Pに対するu-P A応答は、これらの細胞においてほぼなくなったが、ホルボールエステルに対する応答は十分に維持した。カルシトニンと同様にP T H応答は、劇的に減弱したが、8 B r c A M Pの最大濃度で達成したよりも顕著に大きく保持した。この結果は、これらの細胞においてP T H刺激したu-P A分泌を媒介することにおけるP K Aとは独立したメカニズムの役割をさらに支持する。

30

40

【0059】

L L C-P K 1細胞におけるラットP T H Rの活性化後のナトリウム依存的リン酸取り込みの刺激が、主としてP L C/P K C経路によって媒介されることは既に報告された(Guo, J. ら, Endocrinology 136:3884-3891 (1995))。類似の検査は、C H O細胞において他者によって報告されている(Kaufmann, M., Mol Cell Endocrinol 104:21-27 (1994))。したがって、ヒトP T H Rを発現するH K R K B 7およびH K R K B 28細胞におけるP T Hによるこの応答の調節を試験した。図8に示すように、リン酸取り込みを、こ

50

これらの細胞においてhPTH(1-34)によって顕著に刺激した。PTH(1-34)のこのPKC依存的な作用を、HKRK B28およびHKRK B7細胞の両方において観察し、これは、HKRK B28細胞で観察した一時的PLC応答が、このより持続した生物学的応答を誘導するために十分であることを示唆した。この結果は、リン酸取り込みも、cAMP耐性AB45細胞においてPTH(1-34)によって2倍以上刺激し(データを示さず)、ここで、上記のように、唯一の測定可能なPTHrPシグナルが、PLCの一時的刺激でありそして細胞質ゾルの遊離カルシウムにおける増加が伴ったという観察によって、さらに支持された。

【0060】

ACおよびPLCエフェクターのリガンド依存的活性化におけるPTHrP密度の変化の効果は、インビトロで非相同モデル系を使用して得たが、重要な生理学的関連を有し得たことを観察した。特に骨芽または骨髄間質細胞において、PTHrP活性化によって生成した細胞内第2メッセンジャーシグナルの特定のパターンおよび相対強度の差は、最終的に骨における大いに異なる効果を有し得る循環するPTHの種々の一時的パターンおよび濃度プロファイルについての破骨細胞系情報の直近の標的細胞および近隣細胞の両方に伝達することに重要であり得る(Dempster, D. W. ら, *Endocrine Rev* 14:690-709(1993))。したがって、このような示差シグナル伝達の潜在的メカニズムへの洞察は、インビボで骨におけるPTHのアナボリックおよびカタボリック効果にあるに違いない別個のメカニズムを理解するために重要であり得る。PTHrPの「シグナル伝達表現型」におけるレセプター発現の影響はまた、発育中の骨においてPTHrPの高い局所濃度に対する軟骨細胞の応答を調節することに重要であり得た(Lanske, B. ら, *Science* 273:663-666(1996)、Lee, K. ら, *Endocrinology* 137:5109-5118(1996))。

【0061】

細胞外リガンド濃度の変化に単に基づく、このような示差シグナル伝達についての1つのメカニズムは、PTHに対するACおよびPLC応答のリガンド感度(EC_{50})の実質的な差が、PTHに対する未刺激(naive)の細胞の最初の曝露で観察されているこれまでの研究から明らかである(Schneider, H., *Eur J Pharmacol* 246:149-155(1993)、Pines, M. ら, *Endocrinology* 135:1713-1716(1994)、Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891(1995)、Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389(1996)、Kaufmann, M., *Mol Cell Endocrinol* 104:21-27(1994))。本発明者らは、hPTHrPを発現するLLC-PK1細胞におけるPTHに対するACおよびPLC応答の感度の同様に顕著な差を報告し—すなわち、ACの活性について観察された EC_{50} は、PLC刺激についてのものより10~100倍低かった。

【0062】

示差シグナル伝達のもう1つのメカニズムは、次のリガンドへの曝露前の異なるGタンパク質へのPTHrPカップリングの不均一化脱感作に関連し得る。PTHrPシグナル伝達の脱感作は、広く記載されており(Mitchell, J. およびGoltzman, D., *Endocrinology* 126:2650-2660(1990)、Abou-Samra, A. B. ら, *Endocrinology* 135:2588-2594(1994)、Fukayama, S. ら, *Endocrinology* 134:1851-1858(1994)、Yamamoto, I. ら, *Endocrinology* 122:1208-1217(1988)、Freyaldenhoven, A. M. ら, *Am J Physiol* 262:E87-E95(1992))、そしてこれらの脱感作事象の一時的パターンおよび程度に関しての種々の伝達経路の中に認められる差も、各経路に沿ったその後のシグナル伝達の相対強度を調節し得た。

【0063】

示差シグナル伝達を生じるための第3のメカニズムは、最大ACおよびPLCシグナルの

10

20

30

40

50

相対程度が、細胞表面上で発現したラット PTHR の数に依存して、顕著に異なるというこれまでの所見によって示唆された (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。したがって、任意の所定の細胞外リガンド濃度について、細胞表面 r PTHR の数の変動は、所定の細胞内シグナルの程度のみならず、他のシグナルに対するその強度にも影響を及ぼし、それによってリガンド濃度の変化とは独立して細胞内シグナル伝達のパターンを変更した。本研究は、AC 対 PLC シグナル伝達効率におけるレセプター発現のこの示差影響が、ヒト PTHR にさらに適用し得、そして個々の応答の EC₅₀ においてなんら変化なく生じ得ることを示す。類似の結果は、ヒト PTHR の異なる数を発現する HEK-293 ヒト腎臓細胞における AC および細胞質ゾルの遊離カルシウムシグナル伝達の比較について、最近報告された (Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389 (1996))。G タンパク質および／またはエフェクターカップリングの効率の変化からのリガンド感度の変化のこの解離は、アゴニスト認識および活性化に関連する PTHR の構造決定基が、G タンパク質／エフェクター相互作用に関連するものとは比較的独立して操作し得ることを示唆する。これらの観察の生理学的関連は、骨の細胞であるいはインビトロまたはインビボでの繰り返した PTH 曝露中に生じることが公知の PTHR の発現の実質的变化によって支持される (Mitchell, J. および Goltzman, D., *Endocrinology* 126:2650-2660 (1990)、Abou-Samra, A. B. ら, *Endocrinology* 135:2588-2594 (1994)、Fukayama, S. ら, *Endocrinology* 134:1851-1858 (1994)、Yamamoto, I. ら, *Endocrinology* 122:1208-1217 (1988); Freyaldenhoven, A. M. ら, *Am J Physiol* 262:E87-E95 (1992); Forte, L. ら, *Am J Physiol* 242:E154-E163 (1982); Bellorin, F. E. ら, *Kidney Int* 47:38-44 (1995))。さらに、LLC-PK1 細胞で研究された範囲内の内因性 PTHR 発現の変動は、内因性 PTHR 遺伝子が発現される他の細胞系で記載されている (Yamamoto, I. ら, *Endocrinology* 122:1208-1217 (1988)、Shukunami, C. ら, *J Cell Biol* 133:457-468 (1996))。

【0064】

ここで観察された h PTHR のシグナル伝達特性のいくつかの追加の局面は、コメントする価値がある。第 1 に、ヒト PTHR が LLC-PK1 細胞において AC および PLC 応答にカップリングする効率が、ラット PTHR を発現する細胞における対応する応答について比較した場合、実質的および同等に減少したことは、興味深い。これは、図 3 で非常に明らかであり、例えば、ラットよりもほぼ 3~5 倍多いヒト PTHR は、PLC の匹敵する最大活性化を達成するために必要とされた。AC カップリングの効率の類似の差は、これらの細胞においてラット PTHR について既に報告された結果と、表 1 における h PTHR についてのデータとを比較することによって示唆される (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。全体のシグナル伝達効率とレセプター密度との間の関連のこの「右側シフト」は、ヒト PTHR の本質的特性、あるいは、ヒトレセプターとここで使用されるブタ細胞によって発現される細胞内シグナルトランスデューサーとの間の相対的種不適合性を反映し得る。PLC または細胞質ゾルカルシウムシグナル伝達に対するトランスフェクトしたヒト PTHR のより効率的なカップリングは、霊長類またはヒト起源の細胞で観察されている (Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389 (1996)、Schipani, E. ら, *Science* 268:98-100 (1995))。より広範な種に由来する細胞におけるトランスフェクトしたラットおよびヒト PTHR の機能の直接比較は、この問題を明らかにするために必要とされる。

【0065】

第 2 に、IP₃ 応答 (リガンドの最大濃度で) の程度だけでなく一時的プロファイルが、

レセプター密度に関連することを見いだした。詳細には、PTH_R発現のより低いレベルでのPLC応答は、一時的であり、10分未満持続するが、より高い密度のPTH_Rで引き起こされる応答は、かなり永く持続した。この差についての説明は、直ちには明らかではない。多くのレセプター応答の代表である、HKRKB28細胞で観察された、測定したIP₃のピークからの迅速な低下のメカニズム (Berridge, M. および Irvine, R., *Nature* 341:197-205 (1989)) は、おそらく複雑であり、そして (a) 最初の刺激の終結 (レセプター脱感作またはインターナリゼーションを介する)、(b) PTH_Rに接近可能な膜ホスファチジルイノシトール4, 5-ビスホスフェート基質の限定されたプールの枯渇 (特に、リチウムの存在下で (Nahorski, S. R. ら, *Trends Pharmacol Sci* 12:297-303 (1991)))、または (c) PKCの活性化によって一部媒介され得る、イノシトールポリリン酸-顕著にはイノシトール1, 4, 5-三リン酸-5-ホスファターゼを代謝する酵素の迅速な誘導 (Nahorski, S. R. ら, *Trends Pharmacol Sci* 12:297-303 (1991)、Shears, S. B., *Biochem J* 260:313-324 (1989)) を含み得る。基質枯渇は、4分での基質加水分解およびIP₃形成のピーク速度が、より長期の応答を有するHKRKB7細胞で実際により大きいので、この系においてありそうにない説明のようである。しかし、発現したPTH_Rの分布が、研究されたhPTH_R発現のすべてのレベルでこれらの極性化した上皮細胞の膜全体を通して均一であるかどうかは、まだ公知ではない。例えば、PTH_R分布が、レセプター合成のより低い速度でより制限され得、これが、このような細胞においてレセプターに利用可能な基質プールのサイズを限定し、そして「局所」基質枯渇させ得ることが可能である。HKRKB7細胞におけるより長期のPLC応答が、IP₃を代謝することに関連したホスファターゼをほぼ飽和するために十分である、これらの細胞において活性な立体配置で保持される占有されたレセプターの非常に大きな数により持続される、酵素のより激しくかつ延長した活性化のみによるものであり得ると考えられた (Shears, S. B., *Biochem J* 260:313-324 (1989))。差が4分対30分で測定した応答のEC₅₀で検出され得ず、また2つの異なるメカニズムに指摘され得たリガンド選択性で検出される明らかな差がなかったので、結果は、この可能性に最も一致するようである。PLC応答におけるこれらの差とは逆に、PTHによるACの活性化は、両方の細胞株において最初の15分にわたって同一に行われたようである。さらに、示していない実験では、1000nM hPTH (1-34) の添加後24時間までの間隔で酵素活性の直接測定によって、これが、さらにこれらの細胞においてより持続したPKA応答に当てはまることも確認した。

【0066】

これらの細胞におけるhPTH_Rシグナル伝達の第3の興味深い特徴は、観察された細胞質ゾルカルシウム応答に参与する。HKRKB28とHKRKB7細胞との間のPLC活性化プロファイルにおける上記の差があれば、IP₃が、Gタンパク質結合レセプターの活性化中の細胞内貯蔵からのカルシウム放出の主要な決定基であるという広く受け入れられた見解 (Berridge, M. J., *Nature* 361:315-325 (1993))、およびヒトPTH_Rを発現する浸透可能なHEK-293細胞において、PTHおよびIP₃が、カルシウムの同じ細胞内プールからの放出に競合するようであるという最近の証明 (Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389 (1996))、これらの2つの細胞株においてPTHによって引き起こされる細胞質ゾルの遊離カルシウム移動が、時間および程度の両方において実質的に同一であることは、おそらく驚くべきことである。cAMP耐性AB45細胞での結果は、細胞質ゾルの遊離カルシウム上昇の持続した期が、おそらく細胞外カルシウムの侵入を促進することによって、PKAの活性化に関連し得る (Yamaguchi, D. T. ら, *J Biol Chem* 262:7711-7718 (1987)) が、カルシウム応答の最初の期が、PKAに非依存のようであることを示唆した。さらに、フォルスコリン、8-ブromo-cAMPおよびホルボールエステルもまたカルシウム応答を誘起できない他の実験は、この応答を誘起

することにおけるPKAまたはPKCの直接的関連についての証拠を提供しなかった。PTHへの迅速な細胞質ゾルカルシウム応答が、これらの細胞における IP_3 の最初の増加に最も密接に関連し、そしてさらに、HKRKB28細胞で急に生成した IP_3 の量（ただし、HKRKB7細胞で産生したより少ない IP_3 の量で）が、 IP_3 感受性細胞内プールからのカルシウムの最大放出を達成するために十分あるに違いないと、結論づけた。

【0067】

（hPTHアナログのシグナル伝達および生物学的活性）

いくつかのPTHアナログは、非ヒト起源のPTH応答性細胞におけるシグナル選択性を示すことが報告された。これらには、PKCおよび／または細胞質ゾルカルシウム移動を選択的に活性化することがいくつかの系で示されているPTH（3-34）およびPTH（7-34）（Fujimori, A. ら, *Endocrinology* 128:3032-3039（1991）、Abou-Samra, A. B. ら, *Endocrinology* 135:2588-2594（1994）；Azarani, A. ら, *J Biol Chem* 271:14931-14936（1996）；Chakravarthy, B. R. ら, *Biochem Biophys Res Commun* 171:1105-1110（1990）；Fujimori, A. ら, *Endocrinology* 130:29-36（1992）；Jouishomme, H. ら, *Endocrinology* 130:53-60（1992）；Janulis, M. ら, *Endocrinology* 133:713-719（1993））、ならびにラット骨肉腫細胞および初代ラット脾臓細胞においてACを活性化するがPKCを活性化しないことが報告されているPTH（1-31）（Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189（1994）、Whitfield, J. F. およびMorley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16:382-386（1995）、Jouishomme, H. ら, *Endocrinology* 130:53-60（1992））が挙げられる。このようなフラグメントが、臨床使用のための候補と考えられているので（Dempster, D. W. ら, *Endocrine Rev* 14:690-709（1993）、Whitfield, J. F. およびMorley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16:382-386（1995））、これらのアナログが、ヒトPTHrPによる予測されたシグナル選択性を提示するかどうかを決定した。

【0068】

図2Bに示すように、HKRKB28細胞におけるACの活性化は、10nM以上の濃度でのhPTH（3-34）によって顕著に刺激されたが、このペプチドの1000nMに対する応答は、hPTH（1-34）に対する最大応答の16%のみであった。ヒトPTH（7-34）は、テストしたすべての濃度でACを活性できなかったが、hPTHrP（1-36）およびhPTH（1-31）に対する応答は、hPTH（1-34）に対する応答とは区別不可能であった。同様の結果を、HKRKB7細胞での実験で得た（データを示さず）。

【0069】

1000nMの濃度でテストした場合、hPTH（3-34）もhPTH（7-34）も、細胞当たりほぼ百万レセプターを発現したHKRKB7細胞においてさえ、PLCを顕著に活性化しなかった（表2）。逆に、hPTHrP（1-36）および予期せぬことにhPTH（1-31）の両方とも、HKRKB28（4分）およびHKRKB7（30分）の両方においてhPTH（1-34）と等価にPLCを刺激した。ヒトPTH（1-31）（100nM）はまたHKRKB7細胞において細胞質ゾルの遊離カルシウムトランジェントを十分に活性化したが（図5B）、hPTH（3-34）もhPTH（7-34）（100nM）のいずれも、この応答を誘導しなかった（示さず）。

【0070】

PKA活性化に主として依存的であるがまたPKA非依存的シグナル伝達を反映するu-

PA バイオアッセイにおいて (上記のように)、hPTH (3-34)、hPTH (7-34) および hPTH (1-31) の活性は、それらのシグナル伝達特性と調和した。したがって、hPTH (3-34) は、部分的に活性であったが (hPTH (1-34) に対する最大応答の 50~60%)、hPTH (7-34) は不活性であり、そして hPTH (1-31) は十分に活性であった (表 3、図 9)。顕著なことに、hPTH (1-31) による u-PA 分泌の最大活性化は、HKRK B7 細胞においてでさえ、hPTH (1-34) の活性化と同一であり (図 9、表 3)、ここで、最大 PTH 活性は、8 Br cAMP で、および AB45 細胞で、PKA の最大薬理学的活性化で達成された活性を超え (図 7)、ここで、PKA (および 8 Br cAMP の作用) は、ほとんど完全にブロックされ、そして PTH の残りの活性は、おそらく、PKA 非依存的シグナルによってほぼ完全に媒介される。同様に、HKRK B28 および HKRK B7 細胞の両方において、hPTH (1-31) および hPTH (1-34) (ならびに hPTHrP (1-36)) は、リン酸取り込みのかなりの最大活性化を示し、これは、これらの細胞において PKC 依存的であるが (Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))、hPTH (3-34) および hPTH (7-34) は、予測されたように不活性であった (図 8)。

【0071】

表 3. HKRK B7 細胞および HKRK B28 細胞における hPTH/PTHrP ペプチドによる u-PA 分泌の刺激

細胞を、培地中に存在する分泌された u-PA の測定前に 16 時間所定のペプチド (1000 nM) とインキュベートし、これをビヒクル処理コントロールで測定した活性のパーセントとして表した。示される値は、3 つ組の実験の平均 $\pm$ SEM である。

【0072】

【表 3】

ペプチド ^a	HKRK B7	HKRK B28
(1000 nM)		
hPTH (1-34)	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 8
hPTH (1-31)	101 $\pm$ 9	101 $\pm$ 6
hPTH (3-34)	57 $\pm$ 3	50 $\pm$ 1
hPTH (7-34)	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 2
hPTHrP (1-36)	88 $\pm$ 5	97 $\pm$ 9

【0073】

これらの LLC-PK1 細胞においてトランスフェクトされたヒト PTHrP によって観察された hPTH (1-31) および hPTH (1-34) のシグナル伝達および生物学的特性の完全な等価物は、このアナログが、ラット系において AC の刺激に関しての完全な効力にもかかわらず、PKC 活性化の細胞バイオアッセイにおいて活性が欠如していることが報告されているので (Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, *Endocrinology* 130:53-60 (1992)、Neugebauer, W. ら, *Biochemistry* 34:8835-8842 (1995))、全く予測できなかった。本発明者らの所見とこれまでの報告との間の見かけの不一致が、レセプター種における差に関連し得るかどうかを決定した。したがって、ラット PTHrP を発現する LLC-PK1 細胞 (EW5) における hPTH (1-34) および hPTH (1-31) の効果を比較した。両方のペプチドとも、EW5 細胞において AC を等価に活性化した (図 1

0)。表4に示すように、EW5細胞において（および3つの他のrPTHrR発現細胞株において）ラットPTHrRを介するhPTH（1-31）による最大IP₃生成は、hPTH（1-34）による生成の約70%の大きさであるが、16時間でのu-PAの生成は、100nMのいずれかのペプチドに対する応答において同一であった。2つのペプチドによるリン酸取り込みの刺激も同一であった。したがって、hPTH（1-31）がPLCを活性化する能力およびPTHrRを介する他のcAMP非依存的応答は、ヒトレセプターに対して制限されなかったが、組換えラットPTHrRを発現するLLC-PK1細胞でも見られた。hPTH（1-31）に対するPLC応答は、ラットPTHrRを介してhPTH（1-34）に対して中程度に損なわれたが、ヒトレセプターは、これらの2つのリガンド間を識別できないようである。

10

【0074】

表4。ラットPTHrRを発現するLLC-PK1細胞におけるhPTH（1-34）およびhPTH（1-31）の比較。

【0075】

hPTH（1-34）またはhPTH（1-31）に対する応答を、1細胞当たり320,000のラットPTHrRを発現するEW5細胞で測定した。各値は、3つ組で行った代表的実験の平均±SEMである。同様の結果を、少なくとも3つの個々の実験で得た。hPTH（1-34）に対するhPTH（1-31）で観察されたIP₃形成における中程度の減少を、ラットPTHrRを発現する3つの他のLLC-PK1細胞株（すなわち、EW29、AR-C38、およびAR-B44、これらは、それぞれ190,000、630,000、および800,000のPTHrR/細胞を発現する）で確認し、ここで、hPTH（1-31）後の最大IP₃形成は（hPTH（1-34）効果の%として）、それぞれ75%、77%、および64%であった。

20

【0076】

【表4】

ペプチド ^a (1000 nM)	IP ₃ 形成 ^b (基準の%)	リン酸取り込み ^c (基準の%)	u-PA 活性 ^d (単位/ウェル)
コントロール	100 ± 5	100 ± 2	0.8 ± 0.3
hPTH (1-34)	444 ± 31	130 ± 2	43.5 ± 1.8
hPTH (1-31)	316 ± 35	134 ± 3	41.2 ± 1.2

30

【0077】

特定のPTHrR生成した第2のメッセンジャーシグナルと、骨または腎臓のようなホルモンのある生物学的作用との間の広く仮定された連結を考慮して（Dempster, D. W. ら, *Endocrine Rev* 14:690-709 (1993)、Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Whitfield, J. F. およびMorley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16:382-386 (1995)、Dunlay, R. およびHruska, K., *Am J. Physiol* 258:F223-231 (1990)、Janulis, M. ら, *Endocrinology* 133:713-719 (1993))、ヒトPTHrRを発現する細胞においていくつかの短縮型hPTH（1-34）アナログの特性を検査することは、非常に興味深かった。

40

【0078】

hPTH（3-34）によるAC（およびu-PA分泌）の弱いが顕著な活性化を観察したが、PLCまたは細胞質ゾルカルシウム刺激活性はなかった。これらの結果は、主として齧歯類モデルに基づく他の報告とは反対であり、ここで、PTH（3-34）ペプチド

50

は、一般に、PLC／PKCまたはカルシウム刺激活性の相対的保存でのAC活性化の損失を示した(Fujimori, A. ら, *Endocrinology* 128:3032-3039 (1991)、Abou-Samra, A. B. ら, *Endocrinology* 135:2588-2594 (1994); Azarani, A. ら, *J Biol Chem* 271:14931-14936 (1996); Chakravarty, B. R. ら, *Biochem Biophys Res Commun* 171:1105-1110 (1990); Fujimori, A. ら, *Endocrinology* 130:29-36 (1992); Jouishomme, H. ら, *Endocrinology* 130:53-60 (1992); Janulis, M. ら, *Endocrinology* 133:713-719 (1993)、Azarani, A. ら, *J Biol Chem* 270:23166-23172 (1995))。1細胞当たり400,000のヒトPTHrPを発現するトランスフェクトしたHEK 293細胞において、Pinesらは、10nM [Nle^{8,18}, Tyr³⁴] bPTH (3-34) アミドに応じてACおよび細胞質ゾルの遊離カルシウムの両方においてわずかであるが顕著な増加を観察したが(Pines, M. ら, *Bone* 18:381-389 (1996))、100nMでのhPTH (3-34) アミドに対するPLCまたはカルシウム応答は観察されなかった。一方、他者はまた、ラットおよび他の非ヒト細胞系においてPTH (3-34) ペプチドの活性化を検出できなかった(Reid, I. ら, *Am J Physiol* 252:E45-E51 (1987); Civitelli, R. ら, *Endocrinology* 125:1204-1210 (1989); Tamura, T. ら, *Biochem Biophys Res Commun* 159:1352-1358 (1989))。したがって、これらの不均一が、実験系の差、あるいは関連のPTHrPまたは用いられる特定のPTH (3-34) ペプチドの種および構造の差によるものであり得るようである。

【0079】

hPTH (1-31) が、AC、PLC、細胞質ゾルカルシウム移動の活性化、hPTHrPを発現するLLC-PK1細胞におけるu-PA分泌およびリン酸取り込みに関して、hPTH (1-34) と完全に等価であるという所見は、より驚くことであった。これまで、hPTH (1-31) は、AC活性を保持するが、PKC刺激活性が欠如することが報告されている(Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994)、Neugebauer, W. ら, *Biochemistry* 34:8835-8842 (1995))。これらの観察は、領域hPTH (Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994); Schipani, E. ら, *Science* 268:98-100 (1995); Clegg, C. H. ら, *J Biol Chem* 262:13111-13119 (1987); Menniti, F. ら, *Mol Pharmacol* 40:727-733 (1991); Fukayama, S. ら, *Endocrinology* 134:1851-1858 (1994)) が、PTHrPを介するPKCの活性化のためのコアダメインを含むという提案の基準を形成した(Whitfield, J. F. およびMorley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16:382-386 (1995)、Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994))。したがって、hPTH (1-31) の毎日の注射を受けた卵巣摘出したラットが、hPTH (1-34) で見られるものに匹敵する骨量の増加を示す実験は、骨におけるPTHのアナボリック効果におけるcAMP／PKAカスケードについての一時的役割の証拠として広く解釈されている(Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Whitfield, J. F. ら, *Calcif Tissue Int* 58:81-87 (1996))。PKCは、cAMPアナログによって模倣され得ないhPTH (1-31) に対する細胞質ゾルカルシウム応答、およびさらにリン酸取り込みの

激しい刺激の両方を直接的に測定しないが、これらの細胞におけるPKCの活性化に主として連結されることがこれまでに示された生物学的応答が観察された(Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。したがって、hPTHrPを介するhPTH(1-31)によるPLC活性化の直接的証明は顕著であり、そしてヒトPTHrPのリガンド選択性が、ラットPTHrPの選択性とは実質的に異なり得る重要な可能性を上昇する(すべてのこれまでの研究がラット系で行われているならば)。このような結果は、ラットにおけるバイオアッセイの基準において臨床的に有用なシグナル選択的PTHアナログを開発することをねらった努力についての重要な関連を有する(Whitfield, J. F. およびMorley, P., *Trends Pharmacol Sci* 16:382-386 (1995))。

10

【0080】

この問題をさらに検討するために、ラットPTHrPを発現するLLC-PK1細胞におけるhPTH(1-34)およびhPTH(1-31)の活性を比較した。驚くべきことに、2つのペプチドの活性が、この系でさらにほぼ認識不可能であるが、hPTH(1-31)による最大PLC活性化が、hPTH(1-34)に対する最大応答の60%まで、顕著に減少することを見いだした。これらの所見は、ラット細胞におけるcAMP選択的アナログとしてのhPTH(1-31)のこれまでの特徴づけと一致せず、そしてLLC-PK1細胞においてPTHrPを介して観察されたhPTH(1-31)のcAMP非依存的活性の全範囲が、ヒトPTHrPに全体的には独特ではないことを示す。したがって、PTHrP種それぞれ自体の差は、HKR細胞における本所見とラット細胞を使用する他者によってこれまでに報告された所見(Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994)、Neugebauer, W. ら, *Biochemistry* 34:8835-8842 (1995))との不均一を説明しないようである。

20

【0081】

本所見とhPTH(1-31)ペプチドのこれまでの研究からの所見との間の見かけの差についていくつかの可能性のある説明がある。第1に、異なる応答が測定されている。LLC-PK1細胞におけるPLC/PKC活性化に連結することが公知のPLC、細胞質ゾルの遊離カルシウム、およびある遠位生物学的効果が測定されるが、Jouishommeらは、抽出されていない膜においてPKCを測定したが、PLCまたは細胞質ゾルの遊離カルシウムでは測定しなかった(Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994))。PKCが、PLC以外の上流のエフェクターによって調節され得ることが公知である(Exton, J., *J Biol Chem* 265:1-4 (1990))。第2に、これまでの研究は、ROS 17/2骨肉腫細胞、またはトランスフェクトされたよりむしろ内因性のラットPTHレセプター遺伝子を発現するラット脾臓リンパ球の初代培養を使用して行った(Rixon, R. H. ら, *J Bone Miner Res* 9:1179-1189 (1994)、Jouishomme, H. ら, *J Bone Miner Res* 9:943-949 (1994))。ROS 17/2細胞は、rPTHrP cDNAがもともとクローニングされ、次いで実験で使用したrPTHrPを発現するLLC-PK1細胞を生成するために使用されるROS 17/2.8サブクローンの供給源であるので、ほとんど確実にここで研究されたものと同じrPTHrPを発現する(Abou-Samra, A. B. ら, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2732-2736 (1992)、Bringham, F. R. ら, *Endocrinology* 132:2090-2098 (1993)、Guo, J. ら, *Endocrinology* 136:3884-3891 (1995))。一方、ROS 17/2細胞および脾臓細胞が、これらの細胞においてhPTH(1-31)に対する応答に影響を与え得るPTHについてのレセプターの代替の種を発現することの可能性は高い。例えば、見か

30

40

50

けのC末端特異性を有するが未だ十分に特徴づけられていないPTHレセプターは、ROS 17/2.8細胞において記載されている(Inomata, N. ら, Endocrinology 136:4732-4740)。第3に、ROS 17/2およびラット脾臓細胞系は、研究されたrPTHrPトランスフェクトしたLLC-PK1細胞とは他の方法で異なる：(a) PTHrPの表面発現は、LLC-PK1細胞で使用されるものより低いことが公知であるかまたはおそらく低く、(b) rPTHrPは、ブタGタンパク質よりもむしろラットにカップリングされ、そして(c) 発現されたGタンパク質およびエフェクター酵素の種々のサブタイプの相対量が非常に異なり得た。より低いPTHrP発現の問題は、特に重要であり得る。データは、ラットPTHrPを介するPLC/PKC活性化のためのhPTH(1-31)ペプチドの効力が、hPTH(1-34)に対して中程度減少する(40%)ことを示唆する。PLCシグナル伝達においてレセプター密度の重要な影響が記載されたならば、hPTH(1-34)とhPTH(1-31)との間のPLCについての効力におけるこの差が、ここで使用されるLLC-PK1細胞よりも少ないrPTHrPを発現する細胞において増幅され得たことが可能なようである。一方、hPTH(1-31)に対してヒトPTHrPを介するPLCを刺激する効力の損失は、ヒトPTHrP表面密度がこのシグナルを検出するために必要とされる最小に近づく細胞(HKRRK B28)においてでさえも見いだされなかった。

10

【0082】

本明細書に記載のすべての参考文献は、開示において参考として援用される。明確さおよび理解の目的のための例示および実施例によって本発明を現在完全に記載すると、一定の変化および改変が開示された実施態様で行われ得、そしてこのような改変が本発明の範囲内にあることを意図することが、当業者に明らかである。実施例として、好ましい実施態様は、本発明を行うことの1つの形態のみを構成する。

20

【図面の簡単な説明】

【図1A】 LLC-PK1細胞において安定に発現されるヒトPTH/PTHrpレセプターへの競合放射性リガンド結合。950,000レセプター/細胞(HKRRK B7)(図1A)または280,000レセプター/細胞(HKRRK B28)(図1B)を安定に発現するLLC-PK1細胞を、漸増濃度の非放射性リガンドの存在または不在下で、結合緩衝液中で ^{125}I -[Nle^{8,18}Tyr³⁴]bPTH(1-34)とともに15℃にて6時間インキュベートした。スキッチャードプロットを、挿入図に示す。各点は、3つ組の決定の平均±SEMを示す。結合した総放射性リガンドは、15,000~30,000cpm/ウェルの範囲であり、そして非特異的結合は、総結合の2~5%であった。

30

【図1B】 LLC-PK1細胞において安定に発現されるヒトPTH/PTHrpレセプターへの競合放射性リガンド結合。950,000レセプター/細胞(HKRRK B7)(図1A)または280,000レセプター/細胞(HKRRK B28)(図1B)を安定に発現するLLC-PK1細胞を、漸増濃度の非放射性リガンドの存在または不在下で、結合緩衝液中で ^{125}I -[Nle^{8,18}Tyr³⁴]bPTH(1-34)とともに15℃にて6時間インキュベートした。スキッチャードプロットを、挿入図に示す。各点は、3つ組の決定の平均±SEMを示す。結合した総放射性リガンドは、15,000~30,000cpm/ウェルの範囲であり、そして非特異的結合は、総結合の2~5%であった。

40

【図2】 図2A~2B。ヒトPTH/PTHrpレセプターを発現するLLC-PK1細胞におけるcAMP蓄積の刺激。サイクリックAMPを、所定のペプチドの添加および37℃にて20時間のインキュベーションの後に調製された細胞の酸抽出物中で測定した。図2Aは、HKRRKB7細胞(黒丸;細胞当たり950,000レセプター)およびHKRRKB28細胞(白丸;細胞当たり280,000レセプター)において、所定の濃度でのhPTH(1-34)に対する応答を示す。図2Bは、hPTH(1-34)(白丸)、hPTH(1-31)(白三角)、hPTH(3-34)(黒三角)、hPTH(7-34)(白四角)、hPTHrp(1-36)(黒菱形)、およびsCT(白三角)

50

に対するHKRK B28細胞における応答を示す。結果を、基準の倍数 (fold basal) として表した。各点は、3つ組の決定の平均±SEMを表す。

【図3】 ヒトレセプターを発現するLLC-PK1細胞においてPTHによるPLCの最大活性化におけるPTH/PTHrPレセプター密度の影響。基準のパーセントとして表した、IP₃産生に対する最大増加は、ヒト (黒四角) およびラット (白四角) PTH/PTHrPレセプターの異なる密度を発現するLLC-PK1細胞について示される。細胞を、この応答の最大活性を誘起する、1000nMの濃度でhPTH (1-34) で30分間刺激した (図4Bを参照のこと)。各点は、3つ組で行った3実験の平均±SEMを示す。PLC活性とレセプター発現との間の関連は、ラット (左) およびヒト (右) レセプターについて破線によって図示される。

10

【図4】 図4A~4B。HKRK B7とHKRK B28細胞との間のIP₃産生の時間および用量依存性の比較。図4Aは、所定の時間についてhPTH (1-34) (1000nM) で刺激されたHKRK B7細胞 (黒丸) およびHKRK B28細胞 (白丸) を示す。図4Bは、30分 (HKRK B7) または4分 (HKRK B28) について所定の濃度でhPTH (1-34) で刺激した細胞を示す。結果は、基準のパーセントとして表され、そして各点は、3つ組で行われる3実験の平均±SEMである。

【図5】 図5A~5D。ヒトPTH/PTHrPレセプターを発現するLLC-PK1細胞におけるhPTHに対する細胞質ゾルの遊離カルシウム応答。細胞質ゾルの遊離カルシウムを、細胞のfura-2AMロードしたコンフルエント単層で測定した。応答を、hPTH (1-34) (図5A) またはhPTH (1-31) (図5B) の添加後のHKRK B7細胞において; hPTH (1-34) 後のHKRK B28細胞 (図5C) において; ならびにhPTH (1-34) 後のAB45細胞 (図5D) において測定した。基準の細胞質ゾルの遊離カルシウム濃度およびこれらの細胞株におけるsCTの添加後の濃度は、実質的には同一すなわち、それぞれ20~50nMおよび400~500nMであった。示されたこれらの結果は、各細胞株での少なくとも5つの独立した実験の代表例である。

20

【図6】 図6A~6B。LLC-PK1細胞によるウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター (u-PA) 分泌の刺激。ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーター活性を、HKRK B7細胞 (図6A) またはHKRK B28細胞 (図6B) の馴化培地中で、以下のようなアゴニストの添加の16時間後に測定した: hPTH (1-34) (nMで示される濃度)、8Br cAMP (1mM)、TPA (100nM)、またはsCT (1000nM)。結果は、標準として精製したヒトウロキナーゼを使用するPloug単位/ウェルで表される。各バーは、3つ組みで行われた代表的実験の平均±SEMを示す。同様の結果を、10以上の個々の実験で得た。

30

【図7】 プロテインキナーゼAの優勢なネガティブ阻害を発現するLLC-PK1細胞におけるu-PA活性の刺激。u-PAの分泌を、ヒトPTHrPおよびREV AB (PKAの優勢なネガティブインヒビター) を同時発現する、AB45細胞へのアゴニストの添加の16時間後に測定した。結果は、標準として精製したヒトウロキナーゼを使用するPloug単位/ウェルで表される。各点は、3つ組みで行われた代表的実験の平均±SEMを示す。同様の結果を、少なくとも5実験から得た。

40

【図8】 HKRK B7およびHKRK B28細胞におけるPTHによるリン酸取り込みの調節。リン酸取り込みを、ビヒクル、hPTH/PTHrPペプチド (1000nM)、8Br cAMP (1mM)、TPA (100nM)、またはsCT (1000nM) を含む無血清培地中での6時間のインキュベーション後にHKRK B7細胞 (黒棒) およびHKRK B28細胞 (白棒) で測定した。予備実験 (示さず) は、1000nM以上の濃度でのhPTH/PTHrPペプチドに対する最大応答を示した。結果は、基準のパーセントとして表され、そして各棒は、3つ組みで行われた代表的実験の平均±SEMを示す。同様の結果を、少なくとも5つの個々の実験から得た。

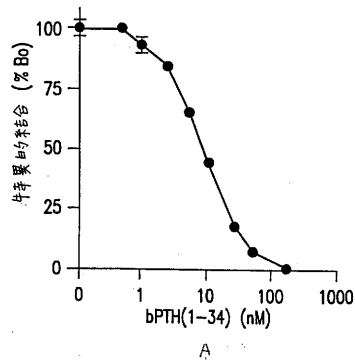
【図9】 HKRK B7細胞におけるhPTH (1-31) およびhPTH (1-34) によるu-PA分泌の刺激。ウロキナーゼ型のPA活性を、所定の濃度でのhPTH (

50

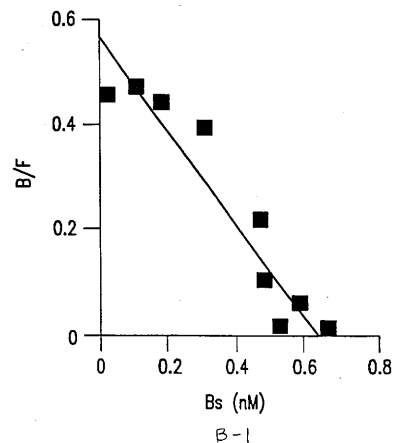
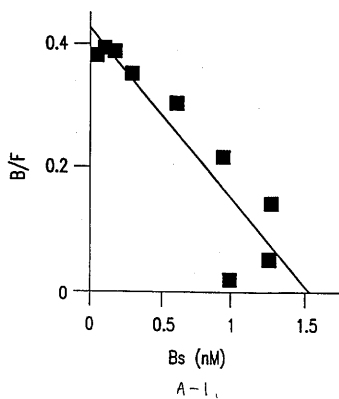
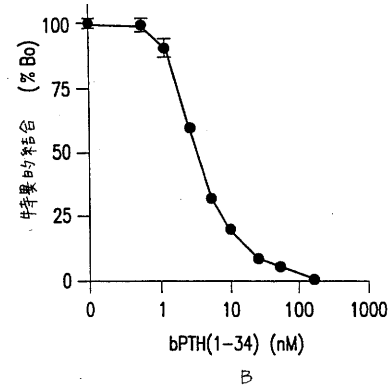
1-34) (黒丸) または hPTH (1-31) (白三角) の添加の 16 時間後に測定し、そして、標準として、精製したヒトウロキナーゼを使用する P l o u g 単位/ウェルで表した。各点は、3 つ組みで行われた代表的実験の平均 $\pm$ S E M である。同様の結果を、少なくとも 6 つの個々の実験で得た。

【図 10】 ラット PTHrP を発現する LLC-PK1 細胞における hPTH (1-31) および hPTH (1-34) によるサイクリック AMP 蓄積の刺激。サイクリック AMP 蓄積を、細胞当たり 320,000 ラット PTHrP を発現する EW5 細胞における hPTH (1-34) (黒丸) または hPTH (1-31) (白三角) に対する応答で測定した。結果は、基準の倍数として表される。

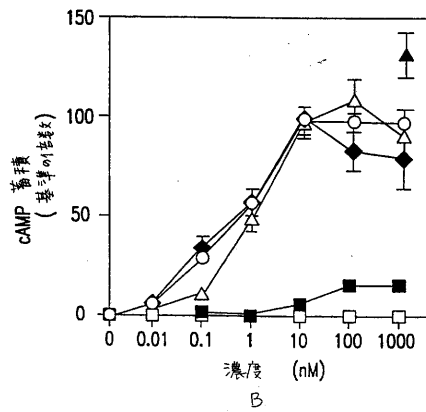
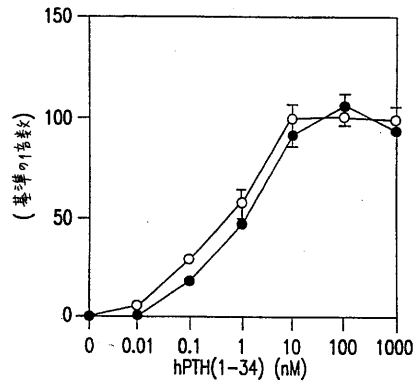
【図 1 A】



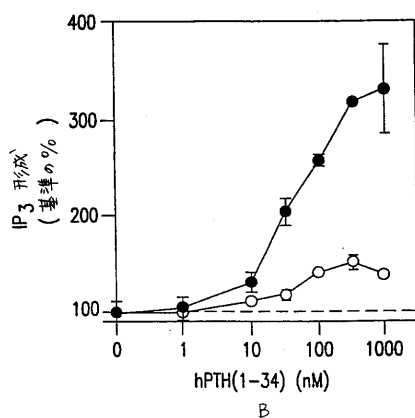
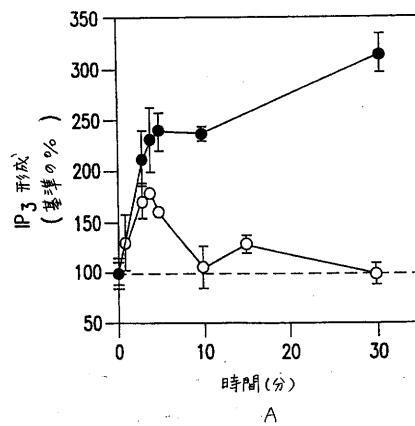
【図 1 B】



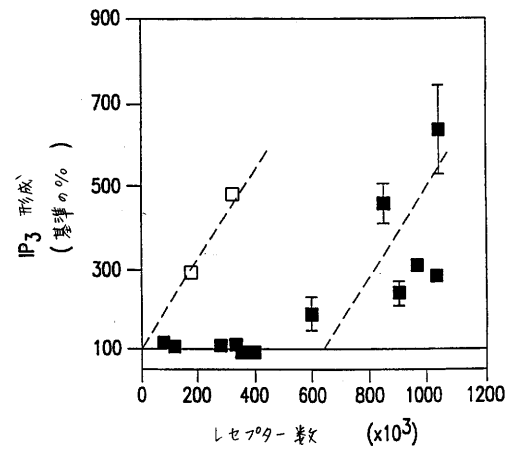
【図 2】



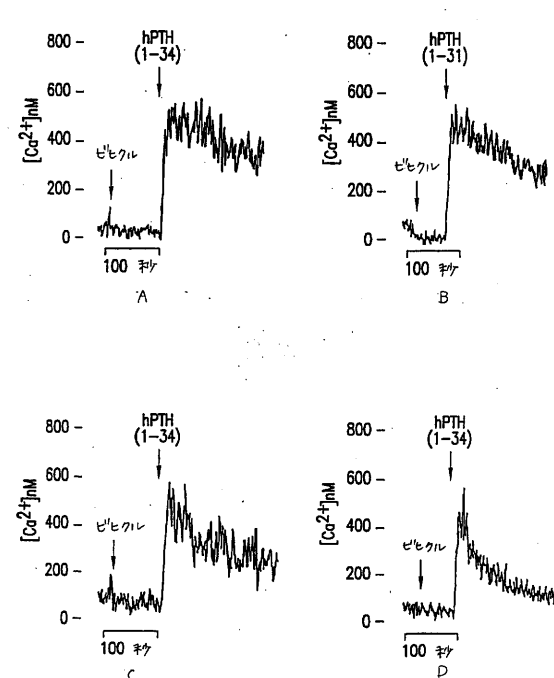
【図 4】



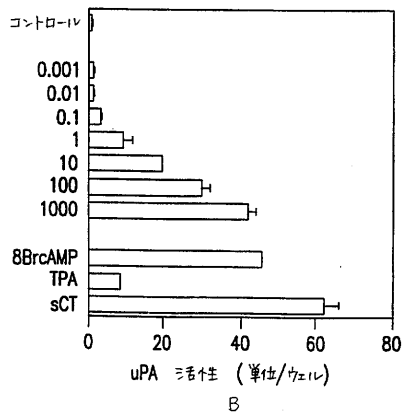
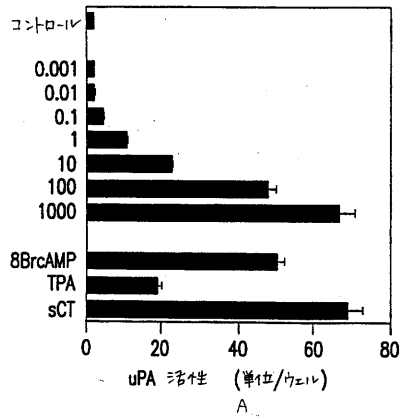
【図 3】



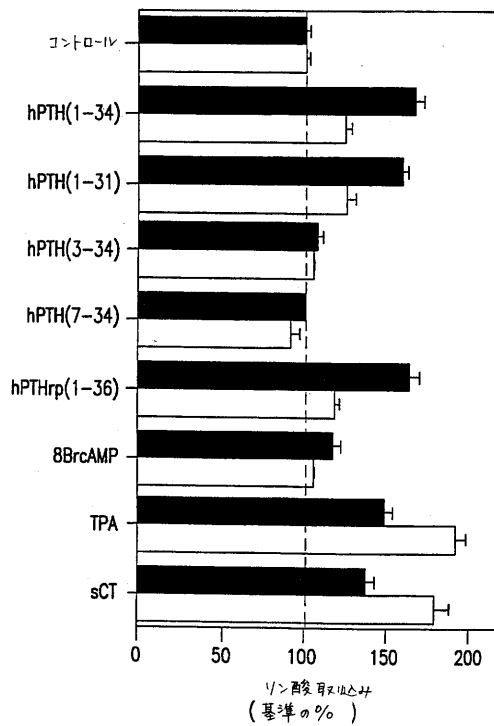
【図 5】



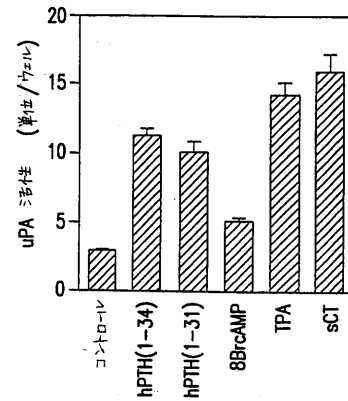
【図 6】



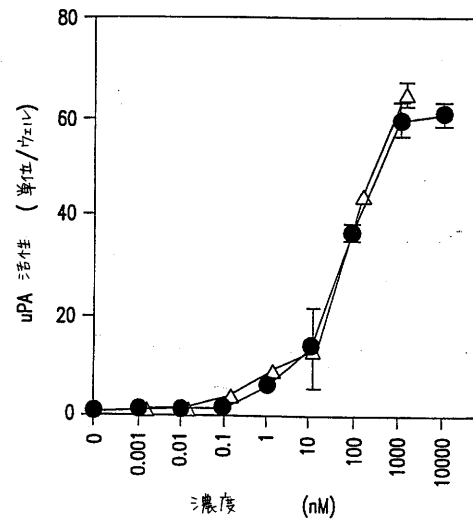
【図 8】



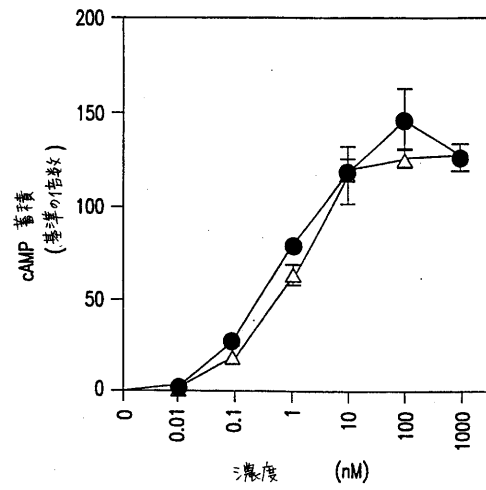
【図 7】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/566

(72)発明者 高須 尚
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 9 5 0, アpartment 3 1 7

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 Endocrinology, vol.132, pp.2090-2098 (1993)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol.91, pp.5051-5055 (1994)
Biotechniques, vol.15, pp.474-479 (1993)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)