(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
2006 年11 月9 日 (09.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/118328 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01)	*A61P 13/12* (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)	*A61P 15/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	*A61P 17/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)	*A61P 21/04* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)	*A61P 27/02* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)	*A61P 27/16* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)	*A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	*A61P 35/00* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)	*A61P 37/00* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)	*A61P 37/02* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)	*A61P 37/08* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)	*A61P 43/00* (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)	*C12Q 1/02* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)	*C12Q 1/68* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)	*G01N 33/15* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)	*G01N 33/50* (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)	*G01N 33/53* (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)	*C07K 14/705* (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)	

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/309212

(22) 国際出願日: 2006 年4 月27 日 (27.04.2006)

(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2005-133503 2005 年4 月28 日 (28.04.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大儀 和宏 (OGI, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台１０番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 菊川 裕介 (KIKUKAWA, Yusuke) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台１０番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林 浩，外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** DEGRANULATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 脱顆粒抑制剤

(57) **Abstract:** A method for screening a mast cell degranulation inhibitor which is characterized by using (a) a protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1 or a partial peptide thereof or a salt of the protein or partial peptide and (b) a ligand capable of binding specifically to the protein; a kit for the screening; a mast cell degranulation inhibitor given by the screening; and others.

(57) 要約: 本発明は、（a）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および（b）該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる肥満細胞の脱顆粒抑制剤などを提供する。

WO 2006/118328 A1

明細書

脱顆粒抑制剤

技術分野

本発明は、TGR12または肥満細胞と、TGR12のリガンドとを用いる脱顆粒抑制剤などのスクリーニング方法およびスクリーニング用キット、該スクリーニング方法またはキットによって得られうる脱顆粒抑制剤などに関する。

背景技術

肥満細胞は、抗体に感作された後、抗原刺激を受けると脱顆粒を起こし、ヒスタミン、ロイコトリエン、セロトニンなどのケミカルメディエーターを放出し、I型アレルギー反応に深く関与している。肥満細胞は抗原刺激後、種々のサイトカインを分泌し、T細胞や好酸球の機能に影響を与え、免疫調節細胞としても重要である。肥満細胞は末梢神経終末に近接して存在しており、サブスタンスP（substance P）、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）などの神経性因子の影響を直接的に受けて、脱顆粒反応を引き起こすと考えられている（Proc. Natl. Acad. Sci.、84巻、2975-2979頁、1987年; Arch. Dermatol. Res.、285巻、341-346頁、1993年）。さらに、近年、ストレスや神経性因子とアレルギー性疾患の発症および増悪には深い相関関係があると考えられている。例えば、ストレスをかけたマウスの皮膚において神経細胞の移入が起こり、肥満細胞の脱顆粒を引き起こすことが報告されている(Brain Behav. Immun.、19巻。252-262頁、2005年)。アトピー性皮膚炎患者において、局所ならびに血中におけるサブスタンスPおよび神経成長因子（NGF）量と、その病態の重症度に深い相関関係があることが報告されている(Br. h J. Dermatol.、147巻、71-79頁、2002年)。アトピー性皮膚炎患者において、病変部位における肥満細胞数が増大していることも知られている(Arch.

Dermatol. Res.、289巻、256-260頁、1997年）。サブスタンスPは、神経細胞だけでなく肥満細胞においても産生、放出されるので、オートクライン的にも作用すると考えられる(Arch. Dermatol. Res.、292巻、418-421頁、2000年)。肥満細胞はアレルギー性疾患に限らず、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、間質性膀胱炎などの病態に深く関与していると考えられており、神経性因子がこれらの疾患の発症および増悪に関与していると考えられる（Gastroenterology、126巻、693-702頁、2004年；Scand. J. Gastroentorl.、40巻、129-140頁、2005年；Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.、279巻、G1298-G1306頁、2000年；Am. J. Physiol. Renal Physiol.、283巻、F616-F629頁、2002年）。

G-タンパク質共役型受容体であるヒトTGR12（配列番号：１）は、MRGX2、GPCRx11、GPCR44などの別名が知られている。MRGX2は、コルチスタチン(cortistatin)、ソマトスタチン、BAM(bovine adrenal medulla peptide) 13-22、αメラニン細胞刺激ホルモン（αMSH）、neuropeptide FF、ダイノルフィンA（dynorphin A）およびサブスタンスPによって活性化されること、MRGX2のアゴニストまたはアンタゴニストが、睡眠障害、疼痛、脳梗塞、記憶障害、糖尿病、癌、肥満症、心疾患、鬱病、性機能障害、尿路・膀胱疾患、感染症治療、消化器疾患などの治療薬となりうることなどが報告されている（WO 03/073107号公報）。GPCRx11にangiopeptinが特異的に反応したことが報告されている（WO 01/98330号公報）。さらに、MRGX2に、PAMP-12（proadrenomedullin N-terminal 20 peptide の9-20位）がアゴニスト作用を示したこと、MRGX2が後根神経節（DRG）の C繊維に特異的に発現していることが報告されている（Biochem. Biophys. Res. Commun.、330巻、1146-1152頁、2005年）。また、MRGX2が、ヒト臍帯血由来肥満細胞において発現していること、IgEによって発現が変動することが報告されている（WO 2005/028667号公報）ものの、肥満細胞におけるMRGX2の発現量の定量的な値およびヒト肥満細胞株であるLAD 2における発現に関する報告はない。

ヒト肥満細胞がサブスタンスP に反応し、脱顆粒促進作用（Blood、97

巻、2045-2052頁、2001年)、エイコサノイド産生作用(Clin. Exp. Immunol.、124巻、150-156頁、2001年)およびIL-4、IL-8やTNFαなどのサイトカイン産生作用(Br. J. Dermatol.、131巻、348-353頁、1994年; Int. Arch. Allergy Immunol.、117巻、48-51頁、1994年; Exp. Dermatol.、10巻、312-320頁、2001年)を有することが知られているが、これらは受容体を介さない非特異的反応(M. Mousli et al., FEBS lett、259巻(2)、260-262頁、1990年1月; R. Saban et al., Am J Physiol Renal Physiol 283巻、F616-F629、2002年5月; A. H. Y. Lau et al., European Journal of Pharmacology 414巻、295-303頁、2001年; D. Lorenz et al., J. Gen. Physiol. 112巻、577-591頁、1998年11月)、あるいはサブスタンスP高親和性受容体、NK-1 受容体を介しているもの(S. Guhl et al., J. Neuroimmunology 163巻、92-101頁、2005年4月)と考えられてきた。

ラット腹腔肥満細胞またはヒト皮膚肥満細胞が、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)に反応し、脱顆粒促進作用(Inflamm. Res.、47巻、488-492頁、1998年; Ann. N. Y. Acad. Sci.、865巻、141-146頁、1998年)を、マウスにおいて皮膚炎惹起作用(Reglul. Pept.、82巻、65-69頁、1999年)を示すことが知られているが、肥満細胞におけるPACAP受容体の発現量に関する報告はない。

ヒト皮膚肥満細胞が、血管作動性腸管ペプチド(VIP)に反応し、脱顆粒促進作用(Br. J. Pharmacol.、95巻、121-130頁、1988年)を示すことが知られているが、肥満細胞におけるVIP受容体の発現量に関する報告はない。

発明の開示

優れた肥満細胞の脱顆粒抑制剤、さらには優れた免疫疾患、呼吸器疾患、泌尿器疾患または循環器疾患の予防・治療剤の開発が望まれていた。

本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、TGR12発現CHO細胞株に対して、サブスタンスP、コルチスタチン-17、PAMP-12、PACAP-27、PACAP-38および血管作動性腸管ペプチドが細胞内カ

ルシウム上昇作用を示すこと、ヒトTGR12がヒト肥満細胞において非常に多く発現しており、サブスタンスPに反応する高親和性受容体NK1受容体、サブスタンスPに反応する低親和性受容体NK2受容体ならびにNK3受容体、およびPACAPに反応するVIP1受容体、VIP2受容体ならびにPACAP受容体が、ヒト肥満細胞にほとんど発現していないこと、ヒトの肥満細胞株であるLAD 2をサブスタンスP、コルチスタチン-17、PAMP-12、PACAP-27、PACAP-38およびVIPで刺激することにより脱顆粒反応が促進すること、またLAD 2におけるサブスタンスP 依存的脱顆粒反応がNK1受容体アンタゴニストで阻害されないことを見出し、これらのことからヒト肥満細胞のサブスタンスPを含む神経ペプチド依存的脱顆粒には TGR12 が関与していることを見出した。これらの知見に基づいて、本発明者らは、TGR12アンタゴニストが肥満細胞の脱顆粒抑制剤となり、肥満細胞の脱顆粒抑制剤の簡便なスクリーニング法を提供することを見出し、鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

本発明は、

〔１〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法、

〔２〕 リガンドが、サブスタンスＰ、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（pituitary adenylate cyclase activating polypeptide；PACAP）、血管作動性腸管ペプチド(vasoactive intestinal peptide；VIP) または proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) である上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

〔２ａ〕 リガンドが、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドである上記〔２〕記載のスクリーニング方法、

〔３〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは

その塩を介した細胞刺激活性を測定し、指標とする上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

〔４〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、ヒト肥満細胞における脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる脱顆粒を抑制する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔５〕 (i) (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii) (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、および

(iii) 工程(i)と工程(ii)との間で、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を比較し、工程(i)における結合量よりも工程(ii)における結合量の方が低い場合に、前記試験化合物を肥満細胞の脱顆粒抑制剤として選択する工程を含む上記〔１〕記載のスクリーニング方法、

〔６〕 工程(ii)における結合量が工程(i)における結合量の５０％以下の場合に、前記試験化合物を肥満細胞の脱顆粒抑制剤として選択する、上記〔５〕記載のスクリーニング方法、

〔７〕 (i) (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガ

ンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii) (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(iii) 工程 (i) と工程 (ii) との間で、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を比較し、工程 (i) における結合量よりも工程 (ii) における結合量の方が低い場合の試験化合物を選択する工程、および

(iv) 前記 (iii) で得られた試験化合物を肥満細胞に接触させ、脱顆粒を抑制する試験化合物を選択する工程を含む上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔7a〕 リガンドが、サブスタンスP、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide; PACAP)、血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide; VIP) または proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) である上記〔4〕～〔7〕のいずれか記載のスクリーニング方法、

〔7b〕 リガンドが、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドである上記〔7a〕記載のスクリーニング方法、

〔8〕 肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔9〕 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および (b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニ

ング用キット、

〔１０〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔１１〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔１２〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の診断薬、

〔１３〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔１４〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の診断薬、

〔１５〕　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または(ii)該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対するｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡを含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

〔１６〕　肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である上記〔１０〕、〔.1１〕、

〔１３〕または〔１５〕記載の抑制剤、

〔１７〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性または該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドの活性を阻害することを特徴とする肥満細胞の脱顆粒抑制方法、

〔１８〕 肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法、

〔１９〕 (i) 肥満細胞と、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記肥満細胞に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii) 肥満細胞と、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記肥満細胞に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(iii) 工程(i)における結合量よりも工程(ii)における結合量の方が低い場合の試験化合物を選択する工程、および

(iv) 前記(iii)で得られた試験化合物を肥満細胞に接触させ、脱顆粒を抑制する試験化合物を選択する工程を含む上記〔１８〕記載のスクリーニング方法、

〔２０〕 肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット、

〔２１〕 哺乳動物に対して、(i) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、(ii) 該蛋

白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、または（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする肥満細胞の脱顆粒抑制方法、

〔２２〕 肥満細胞の脱顆粒抑制剤を製造するための、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、（ii）該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、または（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの使用などを提供する。

さらには、

〔２３〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（pituitary adenylate cyclase activating polypeptide；PACAP）を用いることを特徴とする、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドとの間の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔２４〕 (i) (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドの結合量を測定する工程、

(ii) (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは

その塩と、(b) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドの結合量を測定する工程、および

(iii) 工程(i)と工程(ii)との間で、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドの結合量を比較し、工程(i)における結合量から工程(ii)における結合量が変化している場合に、前記試験化合物を選択する工程を含む上記〔２３〕記載のスクリーニング方法、

〔２５〕 前記脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドが、ＰＡＣＡＰ－２７またはＰＡＣＡＰ－３８である上記〔２３〕または〔２４〕記載のスクリーニング方法、

〔２６〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドを含有することを特徴とする、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドとの間の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

〔２７〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、エイコサノイド(例、ロイコトリエン、プロスタグランジン) 産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）のスクリーニング方法、

〔２８〕 リガンドが、サブスタンスＰ、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸管ペプチドまたは proadrenomedullin N-terminal 20 peptideである上記〔2.7〕記載

のスクリーニング方法、

〔２９〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、指標とする上記〔２７〕記載のスクリーニング方法、

〔３０〕 抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である上記〔２７〕記載のスクリーニング方法、

〔３１〕 (a) 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）のスクリーニング用キット、

〔３２〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニストを含有してなるエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）、

〔３３〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）、

〔３４〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなるエイコサノイド(例、

ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）、

〔３５〕（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または（ii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対するｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡを含有してなるエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）、

〔３６〕 抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である上記〔３２〕、〔３３〕、〔３４〕または〔３５〕記載の抑制剤、

〔３７〕 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性または該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドの活性を阻害することを特徴とするエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制方法、サイトカイン産生抑制方法、肥満細胞増殖抑制方法または肥満細胞活性化抑制方法、

〔３８〕 肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）のスクリーニング方法、

〔３９〕 肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合

する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）のスクリーニング用キット、

〔４０〕 哺乳動物に対して、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、（ii）該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、または（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とするエイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制方法、サイトカイン産生抑制方法、肥満細胞増殖抑制方法または肥満細胞活性化抑制方法、

〔４１〕 エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジン）産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤または肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）を製造するための、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、（ii）該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、または（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドの使用などを提供する。

発明を実施するための最良の形態

以下、「配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩」を「本発明の受容体」と略記する場合がある。さらに、「本

発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンド」を「本発明のリガンド」と略記する場合がある。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例、MEL、M1、CTLL-2、HT-2、WEHI-3、HL-60、JOSK-1、K562、ML-1、MOLT-3、MOLT-4、MOLT-10、CCRF-CEM、TALL-1、Jurkat、CCRT-HSB-2、KE-37、SKW-3、HUT-78、HUT-102、H9、U937、THP-1、HEL、JK-1、CMK、KO-812、MEG-01、LAD 1、LAD 2など）に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：１で表される.アミノ酸

配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、細胞刺激活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、細胞刺激活性などの活性が同等（例、約０．０１～１００倍、好ましくは約０．５～２０倍、より好ましくは約０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、細胞刺激活性などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

また、本発明の蛋白質としては、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（例えば１～１００個程度、好ましくは１～５０個程度、好ましくは１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：１で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（例えば１～１００個程度、好ましくは１～５０個程度、好ましくは１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（iii）配列番号：１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（例えば１～１００個程度、好ましくは１～５０個程度、好ましくは１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、（iv）配列番号：１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（例えば１～１００個程度、好ましくは１～５０個程度、好ましくは１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、または（v）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本発明の受容体の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称す

る場合がある）としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよく、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性などを有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでもよい。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、より好ましくは１００個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、（i）上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失し、（ii）上記アミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加し、または（iii）上記アミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは１～５個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

具体例としては、配列番号：１で表される配列の第１～２７番目、第５１～６９番目、第９３～１０２番目、第１２６～１４４番目、第１６８～１８５番目、第２０９～２２３番目、第２４７～２５９番目および第２８３～３３０番目のアミノ酸配列を含む部分ペプチドなどが用いられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。Ｃ末端はカルボキシ（-COOH）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（-COOR）であってもよい。

ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピルもしくはｎ－ブチルなどのC_{1-6}アルキル、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキルもしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキルなどのC_{7-14}アラルキルのほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルなどが用いられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドがＣ末端以外にカルボキシ（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシがアミド化またはエステル化されているものも、本発明の受容体および本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したＣ末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の受容体および本発明の部分ペプチドには、Ｎ末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどのC_{1-6}アルカノイルなどのC_{1-6}アシルなど）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するＮ末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどのC_{1-6}アルカノイルなどのC_{1-6}アシルなど）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の受容体または本発明の部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例、塩酸、リン酸、臭

化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のリガンドとしては、本発明の受容体と特異的に結合するものであれば、何れの物であってもよい。例えば、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩との結合の解離定数が１０μＭ以下、好ましくは２μＭ以下、さらに好ましくは１μＭ以下、特に好ましくは２００ｎＭ以下、最も好ましくは１００ｎＭ以下である物などが挙げられる。

本発明のリガンドとしては、例えば、サブスタンスP、PACAP（例、PACAP-27、PACAP-38など）、VIP、コルチスタチン（例、コルチスタチン-14、コルチスタチン-17など））、PAMP（例、PAMP-12、PAMP-20など）、ソマトスタチン（例、ソマトスタチン3-14、ソマトスタチン3-10、ソマトスタチン-14、ソマトスタチン-28、ソマトスタチン7-14、D-Trp-ソマトスタチン、シクロソマトスタチン、ソマトスタチン2-9など）、BAM（例、BAM13-22、BAM-22など）、αメラニン細胞刺激ホルモン（例、HSO24-αMSH(3-11)amideなど）、neuropeptide FF、ダイノルフィンA、オキシトシン（例、(Ser4,Ile8)-オキシトシンなど）、バソプレッシン（例、[Arg8]-バソプレッシンなど）、angiopeptinなどが用いられる。好ましくは、サブスタンスP、PACAP（例、PACAP-27、PACAP-38など）、VIP、コルチスタチン（例、コルチスタチン-17など）、PAMP（例、PAMP-12、PAMP-20など）などが用いられる。

標識したリガンドも、本発明のリガンドに含まれる。

標識物質としては、放射性同位元素（例、〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{32}P〕、〔^{33}P〕、〔^{35}S〕など）、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）、ランタニド元素などがあげられる。中でも、放射性同位元素が好ましい。さらに〔^{125}I〕が好ましい。

標識したリガンドとして好ましくは、放射性同位元素〔^{125}I〕などで標識された[Tyr8]-サブスタンスP、[Tyr0]-コルチスタチン-14、PAMP、ソマトスタチン、BAM、αメラニン細胞刺激ホルモン、neuropeptide FF、ダイノルフィンA、オキシトシン、バソプレッシンなどが挙げられる。

リガンドの塩も、本発明のリガンドに含まれる。塩としては、例えば金属塩、アンモニウム塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。金属塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2，6－ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N，N′－ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p－トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

このうち、薬学的に許容し得る塩が好ましい。例えば、化合物内に酸性官能基を有する場合にはアルカリ金属塩（例、ナトリウム塩，カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（例、カルシウム塩，マグネシウム塩，バリウム塩など）などの無機塩、アンモニウム塩など、また、化合物内に塩基性官能基を有する場合には、例えば臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸など無機酸との塩、または酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p－ト

ルエンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。

本発明の受容体および本発明の部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするＤＮＡで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。例えば、Genomics、56巻、12-21頁、1999年、Biochim. Biophys. Acta、1446巻、57-70頁、1999年などに記載の方法またはこれに準じた方法により、製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩の合成には、通常、市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ＰＡＭ樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（２′，４′－ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（２′，４′－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃアミノエチル）フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、ＤＣＣ、Ｎ，Ｎ′－ジイソプロピルカルボジイミド、Ｎ－エチル－Ｎ′－（３－ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例、ＨＯＢｔ，ＨＯＯＢｔ）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはＨＯＢｔエステルあるいはＨＯＯＢｔエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Ｚ、Ｂｏｃ、ｔ－ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベ

ンジルオキシカルボニル、Ｃｌ－Ｚ、Ｂｒ－Ｚ、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ｔ－ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、２－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、４－ニトロベンジルエステル、４－メトキシベンジルエステル、４－クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ｔ－ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C_{1-6}）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ｔ－ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Ｂｚｌ、Cl_2－Ｂｚｌ、２－ニトロベンジル、Ｂｒ－Ｚ、ｔ－ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Ｔｏｓ、４－メトキシ－２，３，６－トリメチルベンゼンスルホニル、ＤＮＰ、ベンジルオキシメチル、Ｂｕｍ、Ｂｏｃ、Ｔｒｔ、Ｆｍｏｃなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロ

ロフェノール、２，４，５－トリクロロフェノール、２，４－ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、ＨＯＮＢ、Ｎ－ヒドロキシスクシミド、Ｎ－ヒドロキシフタルイミド、ＨＯＢｔ）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Ｐｄ－黒あるいはＰｄ－炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－２０℃～４０℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、１，４－ブタンジチオール、１，２－エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる２，４－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の１，２－エタンジチオール、１，４－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明の受容体または部分ペプチドを得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のＮ末端のα－アミノ基の保護基のみを除い

たポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明の受容体または部分ペプチドもしくはそれらの塩のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望の受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明の受容体または部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明受容体または部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の（i）～（v）に記載された方法があげられる。

（i）M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

（ii）SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

（iii）泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、 丸善(株) (1975年)

（iv）矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学IV、 205、(1977年)

（v）矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の受容体または部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる受容体または部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明の受容体または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明の受容体または部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。このうちＤＮＡが好ましく、該ＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明の受容体をコードするＤＮＡとしては、例えば配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするＤＮＡなどであれば何れのものでもよい。

配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表される塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、さらに好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配

列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０ｍＭ、好ましくは約１９～２０ｍＭで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９ｍＭで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有する受容体をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、本発明の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。具体的には、配列番号：２で表される塩基配列を有するＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡ、または配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する受容体をコードするＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２で表される塩基配列とハイブリダイズできるＤＮＡは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明の受容体.または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（

例、ＤＮＡ）は、自体公知の方法で標識化されていてもよい。標識物質としては、放射性同位元素、蛍光物質（例、フルオレセインなど）、発光物質、酵素、ビオチン、ランタニド元素などがあげられる。

本発明の受容体または部分ペプチドを完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明の受容体または部分ペプチドの部分塩基配列を有する合成ＤＮＡプライマーを用いて自体公知のＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明の受容体または部分ペプチドの一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された受容体をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の受容体または部分ペプチドの発現ベクターは、例えば、（a）本発明の受容体または部分ペプチドをコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（b）該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウィルス，ワクシニアウィルス，バキュロウィルスなどの動物ウィルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＨＩＶ・ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、ＣＭＶ（サイトメガロウィルス）プロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、λＰＬプロモーター、ｌｐｐプロモーター、Ｔ７プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４０ｏｒｉと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Ａｍｐ'と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ｎｅｏ'と略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等があげられる。特に、ｄｈｆ

ｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の受容体のＮ端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ＰｈｏＡ・シグナル配列、ＯｍｐＡ・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の受容体または部分ペプチドをコードするＤＮＡを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)〕，ＪＭ１０３〔Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)〕，ＪＡ２２１〔Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)〕，ＨＢ１０１〔Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)〕，Ｃ６００〔Genetics, 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔Gene, 24巻, 255(1983)〕，２０７－２１〔Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス　セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ⁻，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ，２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス　ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア　パストリス（

Pichia pastoris）ＫＭ７１などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウィルスがＡｃＮＰＶの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞（Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞）、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウィルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞（Bombyx mori N 細胞；ＢｍＮ細胞）などが用いられる。該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞（ATCC CRL1711）、Ｓｆ２１細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、In Vivo, 13, 213-217, (1977)）などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature, 315巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７（ＣＯＳ７），Ｖｅｒｏ，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記），ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ⁻）細胞と略記），マウスＬ細胞，マウスＡｔＴ－２０，マウスミエローマ細胞，ラットＧＨ３，ヒトＦＬ細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110 (1972)やGene, 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８　新細胞工学

実験プロトコール 263-267(1995)（秀潤社発行）、Virology,52巻,456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、受容体または部分ペプチドをコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics,431-433,Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,77巻,4505(1980)〕や０．５％カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,81巻,5330(1984)〕があげられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養

は通常約２０℃～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔Science, 122巻, 501 (1952)〕，ＤＭＥＭ培地〔Virology, 8巻, 396 (1959)〕，ＲＰＭＩ １６４０培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519 (1967)〕，１９９培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1 (1950)〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０℃～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明の受容体または部分ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の受容体または部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の受容体または部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンＸ－１００™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる受容体または部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる受容体または部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する受容体または部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンドは、市販されている場合には市販品をそのまま用いることもでき、自体公知の方法またはこれらに準じた方法に従って抽出または製造することもできる。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明の受容体に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明の受容体に対する抗体としては、受容体のシグナル伝達を不活性化する抗体、受容体のシグナル伝達を活性化する抗体などが挙げられる。

本発明の受容体に対する抗体は、本発明の受容体を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の受容体は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０、ＡＰ－１などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくはＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、２０～４０℃、好ましくは３０～３７℃で１～１０分間インキュベ

ートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ １６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（ｂ）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインＡあるいはプロテインＧ

などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の受容体に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約２～６週毎に１回ずつ、計約３～１０回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上

記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩をコードするポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド(例、ＤＮＡ）としては、該ポリヌクレオチドに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）であってもよい。

具体的には、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）（以下、これらのＤＮＡを本発明のＤＮＡと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスＤＮＡ（以下、これらのＤＮＡをアンチセンスＤＮＡと略記する場合がある）が挙げられ、本発明のＤＮＡに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該ＤＮＡの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスＤＮＡであってもよい。

本発明のＤＮＡに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のＤＮＡに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のＤＮＡの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のＤＮＡの相補鎖の全塩基配列うち、本発明の受容体のＮ末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアンチセンスＤＮＡが好適である。これらのアンチセンスＤＮＡは、公知のＤＮＡ合成装置などを用いて製造することができる。

具体的には、配列番号：２で表される塩基配列を有するＤＮＡの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。好ましくは例えば、配列番号：２で表される塩基配列を有するＤＮＡの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、１０～４０個程度、好ましくは１５～３０個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスＤＮＡを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基(ホスフェート)は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のＤＮＡ合成装置などを用いて製造することができる。

本発明に従えば、本発明の受容体遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいはアミノ酸が決定された蛋白質をコードするＤＮＡの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明の受容体遺伝子のＲＮＡとハイブリダイズすることができ、該ＲＮＡの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明の受容体関連ＲＮＡとの相互作用を介して本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明の受容体関連ＲＮＡの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明の受容体関連ＲＮＡと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明の受容体遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」

とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。蛋白質遺伝子の５′端ヘアピンループ、５’端６－ベースペア・リピート、５’端非翻訳領域、蛋白質翻訳終止コドン、蛋白質コード領域、ＯＲＦ翻訳終止コドン、３’端非翻訳領域、３’端パリンドローム領域、および３’端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有しているポリヌクレオチド、Ｄ－リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のＮ－グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはＤＮＡやＲＮＡ中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、さらにＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、１個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジン

など）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、αアノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、１個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、あるいは修飾された核酸（ＲＮＡ、ＤＮＡ）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンスヌクレオチドは次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンスヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修

飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3′端あるいは5′端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3′端あるいは5′端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、ＲＮａｓｅなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明の受容体の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以下に、（i）本発明の受容体、（ii）本発明の受容体をコードするポリヌクレオチド（本発明のポリヌクレオチド）、（iii）本発明の受容体に対する抗体（本発明の抗体）、（iv）本発明の受容体のアンチセンスポリヌクレオチド（例、本発明のアンチセンスＤＮＡ）、（v）本発明の受容体に特異的に結合する能力を有するリガンド（本発明のリガンド）などの用途を説明する。

〔1〕肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイ

トカイン産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用などを有する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のリガンドは、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド（例、ロイコトリエン、プロスタグランジンなど）産生促進作用、サイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化(促進)作用などを有する。

本発明のリガンドや本発明の受容体の機能・活性（例、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化促進作用など）を阻害する化合物またはその塩は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして有用であり、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、

急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などとして使用できる。

肥満細胞の脱顆粒抑制剤として、好ましくは、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患、循環器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

エイコサノイド産生抑制剤として、好ましくは、免疫疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

サイトカイン産生抑制剤として、好ましくは、免疫疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

肥満細胞増殖抑制剤として、好ましくは、泌尿器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）として、好ましくは、消化器疾患などの予防・治療剤が挙げられる。

本発明の受容体を用い、または組換え型本発明の受容体の発現系を用いたリガンドレセプターアッセイ系を用いることにより、本発明の受容体と、本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

該化合物またはその塩には、（i）本発明の受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP産生抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化

、pHの低下、GTPγS結合活性、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化、cGMP依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素（MAPキナーゼ）（例、ERK1/2（p42/44 MAP キナーゼ）、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5など）の活性化などを促進する活性など）を有する化合物（アゴニスト）、（ii）上記細胞刺激活性を有しない化合物（アンタゴニスト）、（iii）本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、（iv）本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物などが含まれる。

具体的には、（i）本発明の受容体に、本発明のリガンドを接触させた場合と（ii）本発明の受容体に、本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なう。比較は、例えば、本発明の受容体に対する本発明のリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して行う。

本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、

(a) 本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明のリガンドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(b) 本発明のリガンドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

(c) 本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記（b）記載のスクリーニング方法、

(d) 本発明のリガンドが、標識したリガンドである上記（a）～（c）のスクリーニング方法などのレセプター結合アッセイ系、

(e) 本発明のリガンドを本発明の受容体に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(f)本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

(g) 本発明の受容体が、本発明の受容体をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体である上記(f)のスクリーニング方法などの細胞刺激アッセイ系などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

本発明の受容体としては、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適に用いられる。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明の受容体の製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。製造方法は前述と同様である。

膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter－Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約１分～１０分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常３０分～２時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、１細胞当たり10^3～10^8分子であるのが好ましく、10^5～10^7分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

前記のレセプター結合アッセイ系や細胞刺激アッセイ系などのスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明の受容体画分と、本発明のリガンド（例、標識した本発明のリガンド）などが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、例えば、放射性同位元素（例、〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{32}P〕、.〔^{33}P〕、〔^{35}S〕など）、蛍光物質（例、フルオレセ

インなど）、発光物質（例、ルミノールなど）、酵素（例、ペルオキシダーゼなど）またはランタニド元素などで標識されたリガンドなどを用いることができる。

具体的には、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、ｐＨ４～１０（望ましくはｐＨ６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどのリガンドと受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、ＣＨＡＰＳ、Ｔｗｅｅｎ－８０™（花王－アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体の分解を抑える目的でＰＭＳＦ、ロイペプチン、Ｅ－６４（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。０．０１～１０ｍｌの該レセプター溶液に、一定量（5000～500000cpm）の標識した本発明のリガンドを添加し、同時に10^{-10}～10^{-7}Ｍの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（ＮＳＢ）を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は０℃～５０℃、望ましくは４℃～３７℃で２０分～２４時間、望ましくは３０分～３時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ－カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B_0）から非特異的結合量（ＮＳＢ）を引いたカウント（B_0－ＮＳＢ）を１００％とした時、特異的結合量（Ｂ－ＮＳＢ）が例えば５０％以下になる試験化合物を本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合性を低下させる化合物として選択することができる。

さらに、表面プラズモンセンサー技術を利用することによって、本発明の受容体に結合する化合物をスクリーニングすることもできる。

具体的には、ビアコア３０００（ビアコア社）のセンサーチップ表面に、本発明の受容体を固定化後、チップ表面にリン酸緩衝液（ＰＢＳ）などに溶解した試験化合物を流したときの表面プラズモンの変化を測定することにより、本発明の受容体に結合する試験籠物を選択る。例えば、表面プラズモンの変化の測定値が５レゾナンスユニット以上与える試験化合物を本発明の受容体に結合性を有する物質として選択する。

前記の細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca^{2+}遊離、細胞内ｃＡＭＰ生成、細胞内ｃＡＭＰ産生抑制、細胞内ｃＧＭＰ生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、ｃ－ｆｏｓの活性化、ｐＨの低下、ＧＴＰγＳ結合活性、ｃＡＭＰ依存性プロテインキナーゼの活性化、ｃＧＭＰ依存性プロテインキナーゼの活性化、リン脂質依存性プロテインキナーゼの活性化、マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素（ＭＡＰキナーゼ）の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）（例、ERK1/2 （p42/44 MAP キナーゼ）、p38 MAPK、JNK/SAPK、ERK5 など）を、自体公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、ｃＡＭＰ産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明

の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられる。

上記細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法について、さらに具体的に以下（１）～（１３）に記載する。

（１）受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のG蛋白質が活性化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTPγSを添加しておくと、GTPγSはGTPと同様にG蛋白質に結合するが、加水分解されずにG蛋白質を含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTPγSを用いると細胞膜に残存した標識されたGTPγSを測定することにより、受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。

この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

この方法は、本発明の受容体を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明の受容体膜画分へのGTPγS結合促進活性を示す物質はアゴニストである。

具体的には、標識したGTPγSの存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合と本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体細胞膜画分に接触させた場合における、本発明の受容体細胞膜画分へのGTPγS結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体細胞膜画分へのGTPγS結合促進活性を抑制する活性を示す試験化合物を、アンタゴ

ニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体細胞膜画分に接触させ、本発明の受容体細胞膜画分へのGTPγS結合促進活性を測定することにより、アゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

公知の方法に従って調製した本発明の受容体を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（50mM Tris、5mM $MgCl_2$、150mM NaCl、1μM GDP、0.1% BSA；pH7.4）で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon2053に0.2mlずつ分注し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200pMとなるように[^{35}S]GTPγSを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（50mM Tris, 5mM $MgCl_2$, 150mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS；pH7.4）1.5mlを加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した[^{35}S]GTPγSの放射活性を測定する。本発明のリガンドのみを加えた実験区の放射活性を100%、本発明のリガンドを加えなかった実験区の放射活性を0%とし、本発明のリガンドによるGTPγS結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTPγS結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（2）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細胞内cAMPの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスク

リーニングする。

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

本発明の受容体発現細胞内のcAMP産生量は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と〔^{125}I〕標識cAMP（ともに市販品）を使用することによるRIA系、または抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせたEIA系で測定することができる。また、抗cAMP抗体を、protein Aまたは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと〔^{125}I〕標識cAMPとを使用するSPA（Scintillation Proximity Assay）法による定量、化学増幅型ルミネッセンスプロキシミティーホモジニアスアッセイ系であるAlphaScreen（PerkinElmer社）を応用した競合法cAMP検出キット（PerkinElmer社）による定量も可能である。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、cAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞（例、CHO細胞などの動物細胞）を24穴プレートに5x10^{4}cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後、0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、20 μMの本発明のリガンドまたは20μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した2μM フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。100μlの20%過塩素

酸を加えて反応を停止させ、その後氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出する。抽出液中のcAMP量を、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテク）を用いて測定する。フォルスコリンの刺激によって産生されたcAMP量を100％とし、20 μMの本発明のリガンドの添加によって抑制されたcAMP量を0％として、本発明のリガンドによるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のリガンドの活性を阻害して、cAMP産生活性が例えば50％以上になる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

また、本発明のリガンドの刺激により、細胞内cAMP量が増加する性質を示す本発明の受容体発現細胞を使用する場合、本発明のリガンドを本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

本方法において、本発明のリガンドによる本発明の受容体発現細胞のcAMP産生促進活性を阻害する活性を示す試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させてcAMP産生促進活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

cAMP産生促進活性は、上記のスクリーニング法においてフォルスコリンを添加せずに本発明の受容体発現細胞（例、CHO細胞などの動物細胞）に本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加して産生されたcAMPを上記の方法で定量して測定する。

（３）CRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

CRE（cAMP response element）を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。CRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、cAMPの上昇を伴う刺激は、CREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のcAMP量の変動を検出することができる。

具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のリガンドを、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン　ベイシックベクター、ピッカジーン　エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。CREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性抑制を回復させる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のリガンドと同様な抑制を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

CRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに$5x10^3$cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、100 μMの本発明のリガンドまたは100 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した2μM フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンド単独を添加した場合と、100 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドは、フォルスコリン刺激に基づくルシフェラーゼによる発光量の増加を抑制する。該抑制を回復させる化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、β－ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay KiTを用いて、β－ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

（４）SRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

SRE（serum response element）を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、SRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。SRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、血清刺激によるMAPキナーゼ活性化などの増殖シグナルの活性化は、SREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内の増殖シグナルの活性化を検出することができる。

具体的には、本発明のリガンドを、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、SRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。SREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、SRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性化を抑制させる試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させて、本発明のリガンドと同様な発光量の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

SRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに$5x10^3$cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、100 μMの本発明のリガンドまたは100 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンド単独を添加した場合と、100 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドは、ルシフェラーゼによる発光量を増加させる。該増加を抑制させる化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、β－ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay KiTを用いて、β－ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

（５）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、ア

ラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

あらかじめ、標識したアラキドン酸を、本発明の受容体発現細胞に取り込ませておくことによって、アラキドン酸代謝物放出活性を、細胞外に放出された標識されたアラキドン酸代謝物を測定することによって測定することができる。

具体的には、本発明のリガンドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

また、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明の受容体発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を公知の方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに$5x10^4$cell/wellで播種し、24時間培養後、[^{3}H]アラキドン酸を0.25μCi/wellとなるよう添加し、16時間後、細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）（以下、反応用バッファーと略記する）で洗浄する。終濃度20μMの本発明のリガンドまたは終濃度20 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を含む反応用バッファー 500μlを、各wellに添加する。37℃で60分間インキュベートした後、反応液400μlをシンチレーターに加

え、反応液中に遊離した[^{3}H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

反応用バッファー 500μlのみを添加した場合(本発明のリガンド非添加・試験化合物非添加)の遊離[^{3}H]アラキドン酸代謝物の量を0%、20 μMの本発明のリガンドを含む反応用バッファーを添加した場合(試験化合物非添加)の遊離[^{3}H]アラキドン酸代謝物の量を100%として、試験化合物を添加した場合の遊離[^{3}H]アラキドン酸代謝物の量を算出する。

アラキドン酸代謝物放出活性が、例えば50%以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

(6)本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、細胞内のCa濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーグラス上に播き、2日後、培養液を、4mM Fura-2 AM(同仁化学研究所)を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベット.にカバー

グラスをセットし、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、励起波長340nmおよび380nmでの、505nmの蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

また、FLIPR（モレキュラーデバイス社製）を使って行ってもよい。本発明の受容体発現細胞縣濁液にFluo-3 AM（同仁化学研究所製）を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

さらに、本発明の受容体発現細胞に、細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子（例、aequorinなど）を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によって、該遺伝子蛋白質（例、aequorinなど）がCa結合型となり発光することを利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることもできる。

細胞内Caイオンの上昇によって発光するような蛋白質の遺伝子を共発現させた本発明の受容体発現細胞を、96穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

本発明のリガンドによる蛍光強度の上昇を、抑制する試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（7）受容体を発現する細胞に、受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。本発明のリガンドの、本発明の受容体発現細胞における細胞内イノシトール三リン酸産生活性を利用することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、標識したイノシトールの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、イ

ノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、イノシトール三リン酸産生活性を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、イノシトール三リン酸産生上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、1日間培養する。その後、myo-[2-^{3}H]inositol（2.5μCi/well）を添加した培地で1日間培養し、細胞を放射活性を有するイノシトールを無添加の培地でよく洗浄する。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加後、10％過塩素酸を加え、反応を止める。1.5M 水酸化カリウムおよび60mM HEPES溶液で中和し、0.5mlのAG1x8樹脂（Bio-Rad）を詰めたカラムに通し、5mM 四ホウ酸ナトリウム（$Na_2B_4O_7$）および60mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1M ギ酸アンモニウムおよび0.1M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のリガンドを添加しない場合の放射活性を0％、本発明のリガンドを添加した場合の放射活性を100％とし、試験化合物の、本発明のリガンドと本発明の受容体の結合に対する影響を算出する。

イノシトール三リン酸産生活性が、例えば50％以下になる試験化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（8）TRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

TRE（TPA response element）を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し，TRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。TRE-レポー

ター遺伝子ベクターを導入した本発明の受容体発現細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う刺激は、TREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（蛋白質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。

具体的には、本発明のリガンドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン　ベイシックベクター、ピッカジーン　エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。TREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のリガンドによるレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみをTRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な発光量の増加を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

TRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明の受容体発現細胞を、24穴プレートに$5x10^3$cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05％ BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄した後、100 μMの本発明のリガンドまたは100 μMの本発明の

リガンドおよび試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のリガンドを添加した場合と、100 μMの本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のリガンドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェラーゼによる発光量が増加する。この増加を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）、β－ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子蛋白質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay KiTを用いて、β－ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

（9）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、MAPキナーゼが活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本発明の受容体発現細胞の増殖は、例えば、MAPキナーゼ活性、チミジン取り込み活性、ATP量、細胞数などを測定すればよい。

具体例としては、MAPキナーゼ活性については、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に添加した後、細胞溶解液から抗ＭＡＰキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によりＭＡＰキナーゼ分画を得た後、公知の方法、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitおよびγ-[^{32}P]-ATPを使用してMAPキナーゼ活性を測定し、比較する。

チミジン取り込み活性については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した後、放射活性により標識したチミジン（例、[methyl-^{3}H]-チミジンなど）を加え、その後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較する。

ATP量の測定については、本発明の受容体発現細胞を96穴プレートに播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した後、例えばCellTiter-Glo (Promega) を用いて細胞内のATP量を測定し、比較する。

細胞数の測定については、本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を添加した後、MTT（3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide）を添加する。細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570nmの吸収によって測定し、比較する。

本方法において、本発明の受容体発現細胞の増殖を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞増殖活性を測定することによりアゴニストのス

クリーニングを行なうこともできる。

チミジン取り込み活性を利用するスクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに5000個/ウェル播き、1日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓状態にする。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を、細胞に添加して24時間培養した後、[methyl-^{3}H]-チミジンをウェル当たり0.015MBq添加し、6時間培養する。細胞をPBSで洗った後、メタノールを添加して10分間放置する。次に5%トリクロロ酢酸を添加して15分間放置後、固定された細胞を蒸留水で4回洗う。0.3N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

本発明のリガンドを添加した場合の放射活性の増加を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（１０）本発明の受容体発現細胞は、本発明のリガンドの刺激により、カリウムチャネルが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

Kイオンと同族元素であるRbイオン（ルビジウムイオン）は、Kイオンと区別無く、カリウムチャネルを通って細胞外に流出する。よって、本発明の受容体発現細胞に、放射活性同位体であるRb（[^{86}Rb]）を取り込ませておいた後、本発明のリガンドの刺激によって流出する^{86}Rbの流れ（流出活性）を測定することにより、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定する。

具体的には、^{86}Rbの存在下、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、^{86}Rbの流出活性を測

定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のリガンド刺激による^{86}Rbの流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な^{86}Ｒｂの流出活性の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞を24穴プレートに播き、2日間培養する。その後、1mCi/mlの^{86}RbClを含む培地中で2時間保温する。細胞を培地でよく洗浄し、外液中の^{86}RbClを完全に除く。本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を細胞に添加し、30分後外液を回収し、γカウンターで放射活性を測定し、比較する。

本発明のリガンド刺激による^{86}Rbの流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（１１）本発明の受容体発現細胞が本発明のリガンドに反応し、細胞外のpHが変化する。この反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体発現細胞に接触させた場合における、細胞外のｐＨ変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞外pH変化は、例えば、Cytosensor装置（モレキュラーデバイス社）を使用して測定する。

本方法において、本発明のリガンドによる細胞外pH変化を抑制する試

験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体発現細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞外ｐＨ変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明の受容体発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間、0.1％ BSAを含むRPMI1640培地(モレキュラーデバイス社製)を灌流させる。pHが安定した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させる。灌流によって生じた培地のpH変化を測定し、比較する。

本発明のリガンドによる細胞外ｐＨ変化を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（１２）酵母（Saccharomyces cerevisiae）のhaploid α-mating type (MATα）の性フェロモン受容体Ste2は、G蛋白質Gpa1と共役しており、性フェロモンα-mating factorに応答してMAPキナーゼを活性化し、これに引き続き、Far1（cell-cycle arrest）および転写活性化因子Ste12が活性化される。Ste12は、種々の蛋白質（例えば、接合に関与するFUS1）の発現を誘導する。一方、制御因子Sst2は上記の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニストの刺激により酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などを指標として用いる、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている（Trends in Biotechnology, 15巻, 487-494頁, 1997年）。上記の受容体遺伝子導入酵母の系を利用して、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体例を以下に示す。

MATα酵母のSte2およびGpa1をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明の受容体遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白質をコードする遺伝子

を導入する。Far1をコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、Sst2をコードする遺伝子を除去して本発明のリガンドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、FUS1にヒスチジン生合成遺伝子HIS3を結合したFUS1-HIS3遺伝子を導入する。この遺伝子組換え操作は、例えば、Molecular and Cellular Biology, 15巻, 6188-6195頁, 1995年に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ2（SSTR2）遺伝子を、本発明の受容体に置き換えて実施することができる。

このように構築された形質変換酵母は、本発明のリガンドに高感度で反応し、その結果、MAPキナーゼの活性化が起き、ヒスチジン生合成酵素が合成されるようになり、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。

従って、上記の本発明の受容体発現酵母（Ste2遺伝子およびGpa1遺伝子が除去され、本発明の受容体遺伝子およびGpa1-Gai2融合蛋白質コード遺伝子が導入され、Far遺伝子およびSst2遺伝子が除去され、FUS1-HIS3遺伝子が導入されたMATα酵母）を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

本方法において、該酵母の生育を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを上記の本発明の受容体発現酵母に接触させ、本発明のリガンドと同様な酵母の生育を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

上記の本発明の受容体発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、$2x10^4$cell/mlの濃度になるように加える。ついで、9x9cmの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物

をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、30℃で3日間培養する。試験化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を、本発明のリガンドのみをしみこませた滅菌濾紙を用いた場合と比較する。また、あらかじめ、ヒスチジンを除去した寒天培地に本発明のリガンドを添加しておき、滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて酵母を培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察してもよい。

酵母の生育を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

（１３）本発明の受容体遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のリガンドによって刺激すると細胞カルシウム濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これは、膜電位の変化としてとらえることができる(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様）。本発明のリガンドによって生じる本発明の受容体導入アフリカツメガエル卵母細胞における上記反応を利用して、本発明のリガンドの本発明の受容体発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のリガンドを、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することにより、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、細胞膜電位変化を抑制する試験化合物を、アンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のリガンドと同様な細胞膜電位変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液（88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM $CaCl_2$, 0.33mM $Ca(NO_3)_2$, 0.82mM $MgSO_4$, 2.4mM $NaHCO_3$, 10mM HEPES； pH7.4）に溶かしたコラーゲナーゼ（0.5mg/ml）で卵塊がほぐれるまで19℃、1～6時間、150rpmで処理する。外液をMBS液に置換することで3度洗浄し、マイクロマニピュレーターで本発明の受容体遺伝子poly A付加cRNA（50ng/50nl）を卵母細胞にマイクロインジェクションする。

本発明の受容体遺伝子mRNAは、組織や細胞から調製してもよく、プラスミドからin vitroで転写してもよい。本発明の受容体遺伝子mRNAをMBS液中で20℃で3日培養し、これをRinger液を流しているvoltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極および電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、（－）極は細胞外に置く。電位が安定したら、本発明のリガンドまたは本発明のリガンドおよび試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。試験化合物の影響は、本発明の受容体遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を、本発明のリガンドのみ含むRinger液を流した場合と比較することによって測定することができる。

細胞膜電位変化を抑制する化合物をアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

上記の系において、電位の変化量を増大させると、測定しやすくなるため、各種のG蛋白質遺伝子のpoly A付加RNAを導入してもよい。また、カルシウム存在下で発光を生じるような蛋白質（例、aequorinなど）の遺伝子のpoly A付加RNAを共インジェクションすることにより、膜電位変化ではなく発光量を測定することもできる。

さらに、哺乳動物由来の肥満細胞を使用したスクリーニング方法について、以下に述べる。

哺乳動物（好ましくはヒト、チンパンジー、サルなど）由来の肥満細胞（肥満細胞株も含む）、好ましくは皮膚、膀胱、胃、小腸、肺などの由来の肥満細胞を用いて以下の方法などにより、例えば肥満細胞の脱顆

粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイトカイン産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用などを有する化合物をスクリーニングすることができる。

(1) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、細胞からRNAを調製し、サイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）RNA量を（例、RT-PCR、Quantitative real-time-PCRなどにより）測定し、比較することにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(2) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、培養上清中のサイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）タンパク質量を（例、EIA、RIAなどにより）測定し、比較することにより、サイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(3) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、サイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）産生細胞数を（例、ELISPOT法により）測定し、比較することにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(4) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明の受容体をコードするポリヌクレオチドに対するsiRNAを含むsiRNAベクター（例、siRNAベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現ベクターなど）を多数作製し、siRNAライブラリーを作製後、肥満細胞にトランスフェクションし、本発明のリガンドと接触させ、細胞におけるサイトカイン（例、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13、TGF-βなど）の発現量（例、サイトカインRNA量、サイトカインタンパク質量など）を測定し、発現量の低下を誘導するsiRNAの塩基配列を調べることにより、サイトカイン産生抑制剤（サイトカイン産生抑制作用を有する

化合物など）をスクリーニングする。リガンドと接触させる際、例えば肥満細胞を能動または受動感作した場合は、抗IgE 抗体、抗体特異的抗原などを、その他の場合は、NGF、Stem Cell Factor(SCF)、サイトカイン、レクチンなどを用いて共刺激してもよい。

(5) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを、放射標識したアラキドン酸を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、エイコサノイド産生抑制作用（エイコサノイド産生抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。

(6a) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、培養上清中の顆粒含有物（例、ヒスタミン、セロトニン、β－ヘキソサミニダーゼ、β－グルクロニダーゼ、トリプターゼ、キマーゼ、カルボキシペプチダーゼなど）量を測定し、比較することにより、脱顆粒抑制作用（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）のある化合物をスクリーニングする。顆粒含有物の量は、公知の方法、例えばEIA、RIA、HPLC、 酵素活性測定等で定量できる。あるいは、肥満細胞を視覚化し（例、ビデオ装置など）、脱顆粒した細胞を数えてもよい。

(6b) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを、放射標識した顆粒含有物を取り込ませた肥満細胞に接触させ、培養上清中の放射活性を測定し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(6c) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、アネキシンVの肥満細胞への結合量を測定（例、FACSなど）し、比較することにより、脱顆粒抑制剤（脱顆粒抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(7) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞に接触させ、細胞溶解液をポリアクリルアミドゲルで分離し、フィルターに転写後、MAPキナーゼ特異的な抗体および化学発光試薬を用いてイメージアナライザー等で検出し、発光の強度を比較することにより、肥満

細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む、肥満細胞活性化抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

(8) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、放射性同位元素で標識されたチミジン（例、[methyl-^{3}H]-チミジンなど）を添加後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、チミジン取り込み活性を測定し、比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物など）をスクリーニングする。

(9) 試験化合物の存在下および非存在下、本発明のリガンドを肥満細胞（例、24穴プレートに播種後培養された肥満細胞）に接触させ、MTT（3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide）を添加後、細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570nmの吸収によって測定して比較することにより、肥満細胞増殖抑制剤（肥満細胞増殖抑制作用を有する化合物）をスクリーニングする。

本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体または本発明の受容体を含有する細胞もしくは細胞の膜画分、および本発明のリガンドを含有する。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1．スクリーニング用試薬

(i) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0．05％のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0．45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、または用時調製しても良い。

(ii) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたＣＨＯ細胞を、１２穴プレートに５×１０^{5}個／穴で継代し、３７℃、５％CO_2、９５％ａｉｒで２日間培養したもの。

（iii）標識リガンド

〔^{3}H〕、〔^{125}I〕、〔^{14}C〕、〔^{32}P〕、〔^{33}P〕、〔^{35}S〕などの放射性同位元素で標識した本発明のリガンドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを、４℃または－２０℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて１μＭに希釈する。

（iv）リガンド標準液

本発明のリガンドを０．１％ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むＰＢＳで１ｍＭとなるように溶解し、－２０℃で保存する。

２．測定法

（i）１２穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液１ｍｌで２回洗浄した後、４９０μｌの測定用緩衝液を各穴に加える。

（ii）１０$^{-3}$～１０$^{-10}$Ｍの試験化合物溶液を５μｌ加えた後、標識した本発明のリガンドを５μｌ加え、室温にて１時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに１０$^{-3}$Ｍの本発明のリガンドを５μｌ加えておく。

（iii）反応液を除去し、１ｍｌの洗浄用緩衝液で３回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のリガンドを０．２Ｎ ＮａＯＨ－１％ＳＤＳで溶解し、４ｍｌの液体シンチレーターＡ（和光純薬製）と混合する。

（iv）液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（ＰＭＢ）を次式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

ＰＭＢ：Percent Maximum Binding

Ｂ　　：検体を加えた時の値

ＮＳＢ：Non-specific Binding（非特異的結合量）

B_0　：最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合を変化させる化合物あるいは本発明の受容体の活性を促進または阻害する化合物であり、具体的には、(i) 本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(本発明の受容体アゴニスト)、(ii)該刺激活性を有しない化合物(本発明の受容体アンタゴニスト)、(iii)本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物、(iv) 本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物などである。該化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

上記本発明の受容体アゴニストであるか、またはアンタゴニストであるかの評価方法は、例えば、以下の i) または ii) に従えばよい。

i) 前記 (i) ～ (iii) のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のリガンドと本発明の受容体との結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニスト (アゴニスト) であり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニスト (アンタゴニスト) である。

ii) (a)試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

(b)本発明のリガンドを本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のリガンドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性

を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体または本発明のリガンドが有する生理活性（例、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化作用など）を抑制することができるので、低毒性で安全な優れた肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制作用剤などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵

臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などとして使用できる。

本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を阻害する化合物は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合力を促進する化合物は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

また、本発明は、本発明の受容体をコードする本発明のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法なども提供する。

具体的には、（i）本発明の受容体を産生する能力を有する細胞を培養した場合と（ii）本発明の受容体を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行い、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする。

上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合における、本発明の受容体の遺伝子の発現量（具体的には、本発明の受容体量または本発明の受容体をコードするｍＲＮＡ量など）を測定して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明ポリペプチドまたは本発明の受容体を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、ｐＨ約４～１０（望ましくは、ｐＨ約６～８）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明の受容体の活性を阻害しないバッファーであればいずれで

もよい。

本発明の受容体を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明の受容体をコードするＤＮＡを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）などが用いられる。宿主としては、例えば、ＣＨＯ細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明の受容体を細胞膜上に発現させた形質転換体などが好ましく用いられる。

本発明の受容体の蛋白質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明の抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記ポリペプチドまたは受容体を、ウェスタン解析、ＥＬＩＳＡ法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction（ＲＴ－ＰＣＲ）、リアルタイムＰＣＲ解析システム（ＡＢＩ社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記（ii）の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、上記（i）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上促進する試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記（ii）の場合における本発明の受容体の遺伝子の発現を、上記（i）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上阻害する試験化合物を本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

本発明の受容体の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、本発明の受容体アンタゴニストと同様に用いられる。

本発明の受容体の遺伝子の発現を促進（発現量を増加）する化合物またはその塩は、本発明の受容体アゴニストと同様に用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて

得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明の受容体と本発明のリガンドとの結合性を変化させる化合物、本発明の受容体の活性または機能を促進または阻害する化合物、本発明の受容体の遺伝子の発現を促進または阻害（発現量を増加または減少）する化合物などである。

該化合物の塩としては、前記した本発明の受容体の塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬（予防・治療剤など）として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。

該化合物またはその塩は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産

出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、該化合物またはその塩を、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はある。

例えば、間質性膀胱炎患者（体重６０ｋｇ当たり）に、一日につきアンタゴニストを約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ経口投与する。非経口的に投与する場合、例えば、アンタゴニストを注射剤の形で間質性膀胱炎患者（６０ｋｇ当たり）に投与する場合、一日につきアンタゴニストを約０．０１～３０ｍｇ、好ましくは約０．１～２０ｍｇ、より好ましくは約０．１～１０ｍｇを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場

合も、６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

〔２〕本発明の受容体の定量

本発明の受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明の受容体を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明の受容体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明の受容体の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の受容体の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明の受容体のＮ端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の受容体のＣ端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明の受容体に対するモノクローナル抗体を用いて本発明の受容体の定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のＦ（ａｂ′）$_2$、Ｆａｂ′、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明の受容体の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。

例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の受容体量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の受容体の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明の受容体の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の受容体のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっ

ては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の受容体の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明の受容体を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明の受容体の濃度を定量することによって、本発明の受容体の濃度の増加が検出された場合、例えば、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化作用などが亢進し、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸

球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などに将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の受容体を検出するために使用することができる。また、本発明の受容体を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の受容体の検出、被検細胞内における本発明の受容体の挙動の分析などのために使用することができる。

〔３〕遺伝子診断薬

本発明のポリヌクレオチド（ＤＮＡ）は、例えば、プローブとして使用することにより；ヒトや温血動物（例えば、ラット、マウス；モルモ

ット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明の受容体をコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやＰＣＲ－ＳＳＣＰ法（Genomics, 第5巻, 874～879頁, 1989年、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁, 1989年）などにより実施することができる。

例えば、本発明の受容体の遺伝子の発現過多が検出された場合は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイトカイン産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用が亢進し、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急

性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などに将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

〔４〕アンチセンスポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）を含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、ＤＮＡ）の発現を抑制することができるアンチセンスポリヌクレオチド（例、アンチセンスＤＮＡ）は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤､エイコサノイド産生抑制剤､サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ス

トレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

例えば、上記アンチセンスＤＮＡを用いる場合、該アンチセンスＤＮＡを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスＤＮＡは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスＤＮＡは、組織や細胞における本発明のＤＮＡの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明の受容体をコードするＲＮＡの一部を含有する二重鎖ＲＮＡ〔本発明の受容体に対するｓｉＲＮＡ(small (short) interfering RNA)、ｓｈＲＮＡ(small (short) hairpin RNA)、本発明の受容体をコードするＲＮＡの一部を含有するリボザイムなども、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができ、生体内における本発明の受容体または本発明のポリヌクレオチドの機能を抑制することができるので、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、

エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

二重鎖ＲＮＡは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造するこ

とができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明の受容体をコードするＲＮＡの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明の本発明の受容体をコードするＲＮＡの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のＲＮＡ上の切断部位に近接した部分（ＲＮＡ断片）が挙げられる。

上記の二重鎖ＲＮＡまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

〔５〕本発明の抗体を含有する医薬

本発明の受容体の抗体（例、本発明の受容体を中和する作用を有する抗体、シグナル伝達を不活性化する抗体など）は、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、·胃MALTリ

ンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などの低毒性で安全な医薬として有用である。

本発明の抗体を含有する上記医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトや温血動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の間質性膀胱炎患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を１回量として、通常０．０１～２０ｍｇ／ｋｇ体重程度、好ましくは０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重程度、さらに好ましくは０．１～５ｍｇ／ｋｇ体重程度を、１日１～５回程度、好ましくは１日１～３回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供さ

れる。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常５～５００ｍｇ、とりわけ注射剤では５～１００ｍｇ、その他の剤形では１０～２５０ｍｇの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

〔６〕ＤＮＡ転移動物

本発明は、外来性の本発明の受容体をコードするＤＮＡ（以下、本発明の外来性ＤＮＡと略記する）またはその変異ＤＮＡ（本発明の外来性変異ＤＮＡと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

（１）本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物、

（２）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（１）記載の動物、

（３）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記（２）記載の動物、および

（４）本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のＤＮＡ転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に８細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、ＤＥＡＥ－デキストラン法などにより目的とするＤＮＡを転移することによって作出することができる。また、該ＤＮＡ転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性ＤＮＡを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のＤＮＡ転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサ

ギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、Ｃ５７ＢＬ／６系統，ＤＢＡ２系統など、交雑系として、Ｂ６Ｃ３Ｆ$_1$系統，ＢＤＦ$_1$系統，Ｂ６Ｄ２Ｆ$_1$系統，ＢＡＬＢ／ｃ系統，ＩＣＲ系統など）またはラット（例えば、Ｗｉｓｔａｒ，ＳＤなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性ＤＮＡとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のＤＮＡではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のＤＮＡをいう。

本発明の変異ＤＮＡとしては、元の本発明のＤＮＡの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたＤＮＡなどが用いられ、また、異常ＤＮＡも含まれる。

該異常ＤＮＡとしては、異常な本発明の受容体を発現させるＤＮＡを意味し、例えば、正常な本発明の受容体の機能を抑制するポリペプチドを発現させるＤＮＡなどが用いられる。

本発明の外来性ＤＮＡは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のＤＮＡを対象動物に転移させるにあたっては、該ＤＮＡを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したＤＮＡコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトＤＮＡを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のＤＮＡを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のＤＮＡを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトＤＮＡを結合したＤＮＡコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本

発明のＤＮＡを高発現するＤＮＡ転移哺乳動物を作出することができる。

本発明の受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のＤＮＡ発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、（ｉ）ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、ＪＣウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するＤＮＡのプロモーター、（ｉｉ）各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンＩＩ、ウロプラキンＩＩ、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンＫ１，Ｋ１０およびＫ１４、コラーゲンＩ型およびＩＩ型、サイクリックＡＭＰ依存蛋白質キナーゼβＩサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にＴｉｅ２と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン３リン酸化酵素（Ｎａ，Ｋ－ＡＴＰａｓｅ）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインＩおよびＩＩＡ、メタロプロティナーゼ１組織インヒビター、ＭＨＣクラスＩ抗原（Ｈ－２Ｌ）、Ｈ－ｒａｓ、レニン、ドーパミンβ－水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（ＴＰＯ）、ポリペプチド鎖延長因子１α（ＥＦ－１α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖１および２、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Ｔｈｙ－１、免疫グロブリン、Ｈ鎖可変部（ＶＮＰ）、血清アミロイドＰコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンＣ、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンＡ、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。

なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウィルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子１α（ＥＦ－１α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、ＤＮＡ転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーＲＮＡの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各ＤＮＡの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのＳＶ４０ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性ＤＮＡをさらに高発現させる目的で各ＤＮＡのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核ＤＮＡのイントロンの一部などをプロモーター領域の５’上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の３’下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ＤＮＡおよび市販の各種ゲノムＤＮＡライブラリーよりゲノムＤＮＡの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ＲＮＡより公知の方法により調製された相補ＤＮＡを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常ＤＮＡは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるＤＮＡコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のＤＮＡ工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性ＤＮＡが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のす

べてに本発明の外来性ＤＮＡを保持することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性ＤＮＡを有する。

本発明の外来性正常ＤＮＡを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性ＤＮＡを安定に保持することを確認して、該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性ＤＮＡが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性ＤＮＡを過剰に有することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性ＤＮＡを過剰に有する。

導入ＤＮＡを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常ＤＮＡが高発現させられており、内在性の正常ＤＮＡの機能を促進することにより最終的に本発明の受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常ＤＮＡ転移動物を用いて、本発明の受容体の機能亢進症や、本発明の受容体が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常ＤＮＡを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、例えば、肥満細胞の脱顆粒促進動物、エイコサノイド産生促進動物、サイトカイン産生促進動物、肥満細胞増殖促進動物、肥満細胞活性化動物〔例、MAPK活性化（促進）動物なども含む〕などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、

慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性ＤＮＡを安定に保持することを確認して該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来ＤＮＡを前述のプラスミドに組み込んで原科として用いることができる。プロモーターとのＤＮＡコンストラクトは、通常のＤＮＡ工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の

異常ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常ＤＮＡが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常ＤＮＡを有することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常ＤＮＡを有する。導入ＤＮＡを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常ＤＮＡが高発現させられており、内在性の正常ＤＮＡの機能を阻害することにより最終的に本発明の受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常ＤＮＡ転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常ＤＮＡ高発現動物は、本発明の受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドまたは本発明の異常受容体による正常ポリペプチドまたは受容体の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常ＤＮＡを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明の受容体の増加症状を有することから、本発明の受容体の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のＤＮＡ転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

（ｉ）組織培養のための細胞源としての使用、

（ｉｉ）本発明のＤＮＡ転移動物の組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、またはＤＮＡにより発現されたポリペプチドまたは受容体組織を分析することによる、本発明の受容体により特異的に発現あるい

は活性化するポリペプチドまたは受容体との関連性についての解析、

（iii）ＤＮＡを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

（iv）上記（iii）記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v)本発明の変異ポリペプチドまたは受容体を単離精製およびその抗体作製

などが考えられる。

さらに、本発明のＤＮＡ転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症などを含む、本発明の受容体に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明の受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のＤＮＡ転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したＤＮＡ転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明の受容体産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明の受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のＤＮＡ転移動物を用いて、本発明の受容体の機能不活性型不応症を含む、本発明の受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のＤＮＡ転移動物または本発明の外来性ＤＮＡ発現ベクターを用いて、本発明の受容体が関連する疾患のＤＮＡ治療法を検討、開発することが可能である。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

ＤＮＡ	：デオキシリボ核酸
ｃＤＮＡ	：相補的デオキシリボ核酸
Ａ	：アデニン
Ｔ	：チミン
Ｇ	：グアニン
Ｃ	：シトシン
Ｉ	：イノシン
ＲＮＡ	：リボ核酸
ｍＲＮＡ	：メッセンジャーリボ核酸
ｄＡＴＰ	：デオキシアデノシン三リン酸
ｄＴＴＰ	：デオキシチミジン三リン酸
ｄＧＴＰ	：デオキシグアノシン三リン酸
ｄＣＴＰ	：デオキシシチジン三リン酸
ＡＴＰ	：アデノシン三リン酸
ＥＤＴＡ	：エチレンジアミン四酢酸
ＳＤＳ	：ドデシル硫酸ナトリウム
ＢＨＡ	：ベンズヒドリルアミン
ｐＭＢＨＡ	：ｐ－メチルベンズヒドリルアミン
Ｔｏｓ	：ｐ－トルエンスルフォニル
Ｂｚｌ	：ベンジル
Ｂｏｍ	：ベンジルオキシメチル
Ｂｏｃ	：ｔ－ブチルオキシカルボニル
ＤＣＭ	：ジクロロメタン
ＨＯＢｔ	：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＤＣＣ	：Ｎ,Ｎ′－ジシクロヘキシルカルボジイミド

ＴＦＡ　　：トリフルオロ酢酸
ＤＩＥＡ　　：ジイソプロピルエチルアミン
Ｇｌｙ又はＧ　：グリシン
Ａｌａ又はＡ　：アラニン
Ｖａｌ又はＶ　：バリン
Ｌｅｕ又はＬ　：ロイシン
Ｉｌｅ又はＩ　：イソロイシン
Ｓｅｒ又はＳ　：セリン
Ｔｈｒ又はＴ　：スレオニン
Ｃｙｓ又はＣ　：システイン
Ｍｅｔ又はＭ　：メチオニン
Ｇｌｕ又はＥ　：グルタミン酸
Ａｓｐ又はＤ　：アスパラギン酸
Ｌｙｓ又はＫ　：リジン
Ａｒｇ又はＲ　：アルギニン
Ｈｉｓ又はＨ　：ヒスチジン
Ｐｈｅ又はＦ　：フェニルアラニン
Ｔｙｒ又はＹ　：チロシン
Ｔｒｐ又はＷ　：トリプトファン
Ｐｒｏ又はＰ　：プロリン
Ａｓｎ又はＮ　：アスパラギン
Ｇｌｎ又はＱ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　　：ピログルタミン酸
Ｔｙｒ（Ｉ）　：３－ヨードチロシン
ＤＭＦ　　：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド
Ｆｍｏｃ　　：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
Ｔｒｔ　　：トリチル
Ｐｂｆ　　：２，２，４，６，７－ペンタメチルジヒドロベンゾ

フラン－５－スルホニル

Ｃｌｔ　：２－クロロトリチル

Ｂｕ^{t}　：ｔ－ブチル

Ｍｅｔ（Ｏ）　：メチオニンスルフォキシド

ＤＮＰ　：ジニトロフェノール

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：１〕

ヒトTGR12のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

配列番号：１で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：３〕

実施例におけるPCR反応で使用したTGR12用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４〕

実施例におけるPCR反応で使用したTGR12用プローブの塩基配列を示す。〔5′末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3′末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：５〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK1受容体用標準DNA（合成オリゴDNA）の塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK1受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：７〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK1受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：８〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK1受容体用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM (6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した〕

〔配列番号：９〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK2受容体用標準DNA(合成オリゴDNA)の塩基配列を示す。

〔配列番号：１０〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK2受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK2受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK2受容体用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM (6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した〕

〔配列番号：１３〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK3受容体用標準DNA(合成オリゴDNA)の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK3受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１５〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK3受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１６〕

実施例におけるPCR反応で使用したNK3受容体用プローブの塩基配列を

示す。〔5′末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3′末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：１７〕

実施例におけるPCR反応で使用したTGR12用標準DNA（二本鎖cDNA）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１８〕

実施例におけるPCR反応で使用したTGR12用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１９〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP1受容体用標準DNA（合成オリゴDNA）の塩基配列を示す。

〔配列番号：２０〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP1受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：２１〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP1受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：２２〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP1受容体用プローブの塩基配列を示す。〔5′末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3′末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：２３〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP2受容体用標準DNA（合成オリゴDNA）の塩基配列を示す。

〔配列番号：２４〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP2受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：２５〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP2受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：２６〕

実施例におけるPCR反応で使用したVIP2受容体用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：２７〕

実施例におけるPCR反応で使用したPACAP受容体用標準DNA(合成オリゴDNA）の塩基配列を示す。

〔配列番号：２８〕

実施例におけるPCR反応で使用したPACAP受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：２９〕

実施例におけるPCR反応で使用したPACAP受容体用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３０〕

実施例におけるPCR反応で使用したPACAP受容体用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：３１〕

ヒトTGR12とGFPの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：３２〕

pAKKO-111Hベクターに組み込んだヒトTGR12の塩基配列を示す。

〔配列番号：３３〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトTNF-α用プライマーの塩基配列

を示す。

〔配列番号：３４〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトTNF-α用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３５〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトTNF-α用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM (6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した〕

〔配列番号：３６〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトTNF-α用標準DNA(合成オリゴDNA)の塩基配列を示す。

〔配列番号：３７〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-5用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３８〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-5用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：３９〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-5用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM(6-carboxy-fluorescein)を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) を標識した〕

〔配列番号：４０〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-5用標準DNA(合成オリゴDNA)の塩基配列を示す。

〔配列番号：４１〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-2用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４２〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-2用プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４３〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-2用プローブの塩基配列を示す。〔5'末端にリポーター色素としてFAM（6-carboxy-fluorescein）を、3'末端にはクエンチャーとしてTAMRA（6-carboxy-tetramethyl-rhodamine）を標識した〕

〔配列番号：４４〕

実施例におけるPCR反応で使用したヒトCCL-2用標準DNA(合成オリゴDNA)の塩基配列を示す。

〔配列番号：４５〕

ヒトTGR12とGFPの融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例１

生理活性ペプチドによるTGR12依存的な細胞内カルシウム上昇作用

CHO/dhfr-細胞（以下、CHO）は、10％ウシ胎児血清を含むα-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。CHOに、TGR12をコードする塩基配列の終始コドンを除いた後に、GFP（和光純薬）をコードする塩基配列を繋いだ塩基配列〔以下、TGR12-GFP（配列番号：３１に表される塩基配列を有するDNA）と略する〕を組み込んだ動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H（Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド）を安定的に発現させることにより、TGR12-GFP発現CHO細胞株（以下、CHO-TGR12）を樹立した

。CHO-TGR12は、10％ウシ胎児透析血清を含む核酸不含α-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。

CHO-TGR12を30,000cells/wellの密度となるよう96穴プレートに播いて一晩培養後、培地を捨て4μMのFluo3-AM（同仁化学）を含むアッセイバッファー〔Hank's Balanced Salt Solution(インビトロジェン社),20mM HEPES(同仁化学)、2.5mM Probenecid（シグマ社）〕を1ウェルあたり100μL添加し、1時間、37℃で静置した。0.05%のCHAPSを含むアッセイバッファーで、下記に示す生理活性ペプチド（ペプチド研究所）またはカルシウムイオノフォアA23187(和光純薬)を希釈した。アッセイバッファーで細胞を洗浄後、FLIPR（モレキュラーデバイス社）を用いて、細胞内カルシウム変動に伴う蛍光の測定を行った。サンプルは、アッセイ開始10秒後に50μLを50μL/秒の速度で添加した。蛍光の測定は、最初の60秒間は1秒毎、次の120秒間は6秒間毎に行い、3分間の間で最も高い蛍光強度をその刺激条件における最大活性とし、3ウェルの平均で求めた。EC_{50}値の算出はGraphpad PRISM 4（Graphpad Software社）を用いて行った。

その結果、アッセイバッファー添加におけるカルシウム上昇作用の最大活性は363、1μMのA23187による刺激におけるカルシウム上昇作用の最大活性は27379であった。

サブスタンスP刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては194、3nMにおいては50、30nMにおいては206、300nMにおいては15610、3000nMにおいては23842であった。

コルチスタチン-17刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては67、3nMにおいては54、30nMにおいては94、300nMにおいては17914、3000nMにおいては23647であった。

PAMP-12刺激によるによるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては255、3nMにおいては1617、30nMにおいては22291、300nMにおいては24088、3000nMにおいては23743であった。

PACAP-27刺激によるによるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては48、3nMにおいては58、30nMにおいては939、300nMにおいては

23030、3000nMにおいては23728であった。

PACAP-38刺激によるによるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては287、3nMにおいては410、30nMにおいては195、300nMにおいては23043、3000nMにおいては23315であった。

VIP刺激によるによるカルシウム上昇作用の最大活性は、0.3nMにおいては56、3nMにおいては60、30nMにおいては16、300nMにおいては11153、3000nMにおいては24007であった。

また、CHO-TGR12に対するカルシウム上昇作用のEC_{50}値は、サブスタンス Pにおいて約237nM、コルチスタチン-17において約218nM、PAMP-12において約98nM、PACAP-27において約93nM、PACAP-38において約161nM、VIPにおいて約305nMであった。

これらの結果より、サブスタンス P、コルチスタチン-17およびPAMP-12が、TGR12のリガンドであることが示された。また、PACAP-27、PACAP-38およびVIPが、TGR12のリガンドであることが分かった。

実施例２

（１）ヒト肥満細胞株LAD 2でのTGR12、NK受容体、VIP受容体およびPACAP受容体遺伝子の発現量の定量

米国National Institutes of Healthから購入したヒト肥満細胞株LAD 2を、100ng/mLのstem cell factor（免疫生物研究所）を含むStemPro-34培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。LAD 2からRNeasyおよびDNase I kit（キアゲン社）を用いてtotal RNA画分を調製した。Total RNA 1μgを鋳型に、SuperScript II reversetranscriptase（インビトロジェン社）を用いて、添付のマニュアルにしたがってランダムプライマーを用いて逆転写を行い、cDNAを作製した。得られたtotal RNA 25ng相当の逆転写産物または後述の標準DNA、1 x Universsal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社）、後述のプライマー各200 nM、およびTaqManプローブ200 nMを含む反応混合液25μLについてABI PRISM 7700 Sequence Detector（アプライドバイオシステムズ社）を用いてPCRを行

なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、また標準DNAの初期濃度の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各部位のヒトTGR12、NK1受容体、NK2受容体、NK3受容体、VIP1受容体、VIP2受容体およびPACAP受容体遺伝子の発現量を求めた。

その結果、LAD 2において、TGR12（配列番号：１７で表される塩基配列を有するTGR12用標準DNA、配列番号：１８で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：３で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：４で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用）の発現量は、total RNA 25ngあたり687474コピーであった。

LAD 2において、NK1受容体（配列番号：５で表される塩基配列を有するNK1受容体用標準DNA、配列番号：６で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：７で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：８で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は50コピーであった。

LAD 2において、NK2受容体（配列番号：９で表される塩基配列を有するNK2受容体標準DNA、配列番号：１０で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：１１で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：１２で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は1コピーであった。

LAD 2において、NK3受容体（配列番号：１３で表される塩基配列を有するNK3受容体標準DNA、配列番号：１４で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：１５で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：１６で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用した）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は1コピーであった。

LAD 2において、VIP1受容体（配列番号：１９で表される塩基配列を有

する受容体用標準DNA、配列番号：２０で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：２１で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：２２で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は219コピー、VIP2受容体（配列番号：２３で表される塩基配列を有する受容体標準DNA、配列番号：２４で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：２５で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：２６で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は179コピーであった。

LAD 2において、PACAP受容体（配列番号：２７で表される塩基配列を有する受容体標準DNA、配列番号：２８で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：２９で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号：３０で表される塩基配列を有するTaqManプローブを使用した）のtotal RNA 25ngあたりの発現量は18コピーであった。

これにより、LAD 2において、TGR12が高発現していることが分かった。また、LAD 2において、NK1、NK2、NK3、VIP1、VIP2およびPACAP受容体が低発現であることが分かった。

実施例３

TGR12リガンド依存的なヒト肥満細胞の脱顆粒促進

ヒト肥満細胞株LAD 2は、100ng/mLのstem cell factor(免疫生物研究所)を含むStemPro-34培地(インビトロジェン社)を用いて培養した。LAD 2をタイロード緩衝液(126mM NaCl, 4.0mM KCl, 0.69mM KH_2PO4, 5.6mM Glucose, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0.1% BSA)で洗浄し、96穴プレートに1ウェルあたり150μLずつ、20000個のLAD 2を分注し、37℃で5分間インキュベートした。次いで、50μLの各種濃度のTGR12リガンド（ペプチド研究所）を含むタイロード緩衝液を加えて、さらに37℃で20分間インキュベートし、脱顆粒を誘導した。脱顆粒アッセイ上清中のβ-hexosaminidase活性を以下のように測定することにより、脱顆粒の程度を測定した。上清を96穴プレートに分注し、上清の5倍量の0.1M

Citrate(pH4.5)/1mM 4-methyl umbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside（和光純薬）を添加して、37℃で1時間インキュベートした。次いで、反応液の0.1倍量の0.2M Glycine/$NaCO_3$(pH10.7)を添加することにより反応を停止させ、Fusion-α(パーキンエルマー社)で測定を行った。β-hexosaminidase活性は、また、LAD 2を4回凍結融解し、遠心分離を行った後の上清中における活性をLAD 2中の全β-hexosaminidase活性とし、脱顆粒の程度は全β-hexosaminidase活性に対するLAD 2上清中のβ-hexosaminidase活性の割合で示した。

その結果、自発的脱顆粒は約1.5%であった。

サブスタンスP刺激による脱顆粒は、10nMにおいては1.8%、30nMにおいては8.7%、100nMにおいては39.2%、300nMにおいては58.1%、1μMにおいては66.8%、3μMにおいては71.0%であった。

コルチスタチン-17刺激による脱顆粒は、10nMにおいては1.6%、30nMにおいては2.8%、100nMにおいては26.5%、300nMにおいては52.8%、1μMにおいては62.2%、3μMにおいては58.9%であった。

PAMP-12刺激による脱顆粒は、3nMにおいては6.3%、10nMにおいては30.7%、30nMにおいては52.1%、100nMにおいては65.2%、300nMにおいては67.7%、1μMにおいては69.3%であった。

PACAP-27刺激による脱顆粒は、10nMにおいては2.6%、30nMにおいては19.6%、100nMにおいては59.4%、300nMにおいては71.1%、1μMにおいては75.1%、3μMにおいては69.1%であった。

PACAP-38刺激による脱顆粒は、10nMにおいては7.4%、30nMにおいては24.8%、100nMにおいては49.4%、300nMにおいては65.8%、1μMにおいては68.9%、3μMにおいては63.3%であった。

PACAP-38刺激による脱顆粒は、10nMにおいては7.4%、30nMにおいては24.8%、100nMにおいては49.4%、300nMにおいては65.8%、1μMにおいては68.9%、3μMにおいては63.3%であった。

VIP刺激による脱顆粒は、10nMにおいては1.5%、30nMにおいでは4.0%、

100nMにおいては36.7%、300nMにおいては63.9%、1μMにおいては71.7%、3μMにおいては76.1%であった。

LAD 2に対する脱顆粒反応のEC_{50}値は、サブスタンスPにおいて約91nM、コルチスタチン-17において約122nM、PAMP-12において約13nM、PACAP-27において約51nM、PACAP-38において約51nM、VIPにおいて約105nMであった。

これより、サブスタンスP、コルチスタチン-17、PAMP-12、PACAP-27、PACAP-38およびVIP依存的に、ヒト肥満細胞株LAD 2の脱顆粒が誘導されることが分かった。

実施例４

サブスタンス P依存的なヒト肥満細胞の脱顆粒促進に対するNK1受容体アンタゴニストの作用

ヒト肥満細胞株LAD 2は、100ng/mLのstem cell factor（免疫生物研究所）を含むStemPro-34培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。LAD 2をタイロード緩衝液（126mM NaCl, 4.0mM KCl, 0.69mM KH_2PO4, 5.6mM Glucose, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0.1% BSA）で洗浄し、96穴プレートに1ウェルあたり100μLずつ、20000個のLAD 2を分注し、37℃で5分間インキュベートした。次いで、50μLの各種濃度のNK1アンタゴニストGR-82334（シグマ社）またはL-703606（シグマ社）を含むタイロード緩衝液を加えて、37℃で5分間インキュベートした。次いで、50μLのサブスタンスP溶液（終濃度0.3μM;ペプチド研究所）またはカルシウムイオノフォアA23187溶液（終濃度0.3μM；和光純薬）を含むタイロード緩衝液を加えて、さらに37℃で20分間インキュベートし、脱顆粒を誘導した。脱顆粒アッセイ上清中のβ-hexosaminidase活性を以下のように測定することにより、脱顆粒の程度を測定した。上清を96穴プレートに分注し、上清の5倍量の0.1M Citrate(pH4.5)/1mM 4-methyl umbelliferyl-2-acetamido- 2-deoxy-beta-D-glucopyranoside（和光純薬）を添加して、37℃で1時間インキュベートした。次いで、反応液の0.1

倍量の0.2M Glycine/$NaCO_3$（pH10.7）を添加することにより反応を停止させ、Fusion-α（パーキンエルマー社）で測定を行った。LAD 2を4回凍結融解し、遠心分離を行った後の上清中における活性を、LAD 2中の全β-hexosaminidase活性とした。NK1受容体アンタゴニストによる阻害活性は、NK1受容体アンタゴニスト非添加におけるβ-Hexosaminidase活性に対する、各種濃度のNK1アンタゴニスト添加時におけるβ-hexosaminidase活性の割合（%）で示した。

その結果、サブスタンスP刺激における、NK1受容体ペプチド性アンタゴニストGR-82334（シグマ社）添加による脱顆粒は、GR-82334が100nMにおいて101.2%、300nMにおいて105.7%、1μMにおいて102.7%、3μMにおいて99.6%、10μMにおいて95.8%、30μMにおいて99.5%であった。

A23187刺激における、GR-82334添加による脱顆粒は、GR-82334が100nMにおいて101.1%、300nMにおいて102.0%、1μMにおいて102.0%、3μMにおいて102.8%、10μMにおいて103.2%、30μMにおいて102.4%であった。

サブスタンス P刺激における、NK1受容体低分子性アンタゴニストL-703606（シグマ社）添加による脱顆粒は、L-703606が100nMにおいて101.1%、300nMにおいて97.9%、1μMにおいて98.8%、3μMにおいて100.0%、10μMにおいて39.4%、30μMにおいて3.2%であった。

A23187刺激における、L-703606添加による脱顆粒は、L-703606が100nMにおいて98.4%、300nMにおいて97.2%、1μMにおいて97.4%、3μMにおいて91.5%、10μMにおいて37.1%、30μMにおいて2.4%であった。

これより、NK1受容体ペプチド性アンタゴニストGR-82334は、サブスタンスPおよびA23187刺激による脱顆粒を、0.1Mから30μMの濃度範囲で抑制しないことが分かった。また、NK1受容体低分子性アンタゴニストL-703606は、サブスタンス PおよびA23187刺激による脱顆粒を、0.1Mから3μMの濃度範囲で抑制せず、10μMから30μMの濃度範囲ではTGR12およびNK1受容体非特異的に抑制することが分かった。

サブスタンスP受容体として知られているNK1受容体のアンタゴニストが、サブスタンスPによるTGR12依存的な脱顆粒反応を阻害しなかったこ

とより、NK1受容体アンタゴニストではなく、TGR12のアンタゴニストが、サブスタンスPによる脱顆粒反応の抑制剤になりうると考える。

実施例５

サブスタンスPのヒトTGR12発現CHO細胞に対するMAPK活性化作用

CHO/dhfr-細胞（以下、CHO）は、10％ウシ胎児血清を含むα-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。CHOに、ヒトTGR12の開始コドンから終始コドンを含む塩基配列(配列番号:３２に表される塩基配列を有するDNA)を組み込んだ動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKKO-111H（Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド）を安定的に発現させることにより、ヒトTGR12発現CHO細胞株（以下、CHO-TGR12）を樹立した。CHO-TGR12は、10％ウシ胎児透析血清を含む核酸不含α-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。

細胞の調製は以下のように行った。CHO-TGR12を0.05% Trypsin-EDTA（GIBCO）で剥がし、培地（MEM-α（GIBCO），10% FBS(GIBCO)，ペニシリン/ストレプトマイシン(BIOWHITTAKER)）で懸濁して遠心分離後、沈殿した細胞を培地で2 x 10^5 cells/mlに懸濁して1mLずつ12wellの細胞培養用ディッシュに播いた。一晩CO_2インキュベーター内で培養後、培地をアスピレーションしPBSで洗浄後、無血清培地（MEM-α（GIBCO），ペニシリン/ストレプトマイシン(BIOWHITTAKER)）を1mL添加し、CO_2インキュベーター内で培養した。百日咳毒素（pertussis toxin；以下、PTX）は最終濃度が0.1μg/mL になるようにアッセイの4時間前に添加した。

細胞の活性化は以下のように行った。培地をアスピレーションしPBSで洗浄後、アッセイバッファー（HBSS(GIBCO)，10mM HEPES(同仁化学研究所)）を750μL添加し、15分間37℃でプレインキュベーションした。サブスタンスP溶液およびポジティブコントロールであるATP溶液を250μL添加し、37℃でインキュベーションした後、急冷により反応を停止させた。アッセイバッファーをアスピレーションしPBSで洗浄後、1×LDSサン

プルバッファー/DTTを細胞に添加して回収し、30秒間超音波処理後、70℃で10分間加熱し急冷させた。

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる検出は以下のように行った。10% Bis-Tris gel(Invitrogen)を用いて分離後、Immune-Blot PVDF Membrane(BIO-RAD)に転写させた。メンブレンをBlock Ace（大日本製薬）でブロッキングし、一次抗体(Phospho-p42/p44 MAP Kinase(Thr202/Thr204) Antibody(CST)またはp42/p44 MAP Kinase Antibody(CST))を用いて室温において1時間インキュベーションした後、二次抗体(Anti-rabbit IgG (CST))を用いて室温において1時間インキュベーションした。抗体反応後のメンブレンを、ECL PLUS（Amersham Biosciences）で化学発光させ、LAS1000（FUJI FILM）を用いて検出および画像解析を行った。

その結果、CHO-TGR12を、サブスタンスPで刺激すると、ERK1/2(p42/p44 MAP Kinase）のリン酸化が認められた。CHO-TGR12のサブスタンスPによるERK1/2（p42/p44 MAP Kinase）のリン酸化は、刺激後10分前後で最大反応を示し、刺激後30分においてもリン酸化は認められた。また、CHO-TGR12のサブスタンスPによるERK1/2（p42/p44 MAP Kinase）のリン酸化はPTXを前処理することにより減弱したが、ATPによるERK1/2（p42/p44 MAP Kinase）のリン酸化はPTXの前処理による減弱は認められなかった

実施例6

TGR12リガンドによるヒト肥満細胞のTNF-α、CCL-2、CCL-5の発現亢進作用

ヒト肥満細胞株LAD 2は、100ng/mLのstem cell factor(免疫生物研究所)を含むStemPro-34培地(インビトロジェン社)を用いて培養した。サブスタンスP刺激時における発現量の計時変化を解析した実験において、LAD 2を300×gで5分間遠心分離後、沈殿した細胞を計数し、培地で6.67×10^5cells/mLに懸濁して750μLずつ24well plateに播いて、37℃の

CO_2インキュベーターで30分間静置した。次いで、250μLの最終濃度1μMのサブスタンス P（ペプチド研究所）を含む培地あるいは培地のみを加えて、さらに37℃のCO_2インキュベーターで0.5、2、8、24時間インキュベートした。アッセイはそれぞれの反応条件についてn=3で行った。0.5、2、8、24時間後に、プレートを氷冷してLAD 2の活性化を停止させ、300×gで5分間遠心分離を行い、沈殿した細胞からRNeasy Mini Kit(キアゲン社)を用いて、添付のプロトコールに従ってtotal RNA を抽出した。また、種々のTGR12リガンド刺激時における発現量を解析した実験において、LAD 2を300×gで5分間遠心分離後、沈殿した細胞を計数し、培地で1.33×10^6cells/mLに懸濁して750μLずつ24well plateに播いて、37℃のCO_2インキュベーターで30分間静置した。次いで、250μLの最終濃度1μMのコルチスタチン-17、PAMP-12、PACAP-27、VIP（ペプチド研究所）を含む培地あるいは培地のみを加えて、さらに37℃のCO_2インキュベーターで2時間インキュベートした。アッセイはそれぞれの反応条件についてn=3で行った。2時間後に、プレートを氷冷してLAD 2の活性化を停止させ、300×gで5分間遠心分離を行い、沈殿した細胞からRNeasy Mini Kit(キアゲン社)を用いて、添付のプロトコールに従ってtotal RNA を抽出した。上記のように得られたtotal RNAを、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従って濃縮し、RNase-free H_2Oに溶解した。次に、total RNA 1μg分を用いて、SuperScript II Reversetranscriptase (インビトロジェン社)により、以下の方法で逆転写反応を行い、一本鎖cDNAを作成した。Total RNA溶液にRandom primer(インビトロジェン社) 0.1μg、10mM dNTP（インビトロジェン社） 1μLを加え、RNase-free H_2Oを加えて全量を12μLとした後，70℃で10分間インキュベーションし、1分間氷冷した。5×First-Strand Buffer (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付) 4μL、0.1M DTT (SuperScript II Reversetranscriptaseに添付) 2μL、RNaseOUT（インビトロジェン社） 1μLおよびSuperScript II Reversetranscriptase 1μLを加えて、42℃で50分間インキュベーション後、70℃で15分間インキュベーションし、5分間氷冷した。このようにし

て得られたcDNAを、Ethachinmateを用いて、添付のプロトコールに従って精製し、Tris-EDTA Buffer(フルカ社)に溶解した。

以下のTaqMan PCRにおいて、ヒトTNF-α定量用のプライマーとして、hTNFalpha-tF（配列番号：３３）およびhTNFalpha-tR（配列番号：３４）を、プローブとしてhTNFalpha-tP（配列番号：３５）を、スタンダードとしてhTNFalpha- standard（配列番号：３６）を用いた。ヒトCCL-5定量用のプライマーとして、hCCL5-tF（配列番号：３７）およびhCCL5-tR（配列番号：３８）を、プローブとしてhCCL5-tP（配列番号：３９）を、スタンダードとしてhCCL5 standard（配列番号：４０）を用いた。ヒトCCL-2定量用のプライマーとして、hCCL2-tF（配列番号：４１）およびhCCL2-tR（配列番号：４２）を、プローブとしてhCCL2-tP（配列番号：４３）を、スタンダードとしてhCCL2 standard（配列番号：４４）を用いた。

TaqMan PCRは、それぞれのサンプルについてn=2で行い、12.5ng total RNAを鋳型に用いて15μlの液量で行った。反応液の組成は、プライマー 900nM、プローブ 250nM、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社）1/2 volumeとした。反応および解析はABI PRISM 7900HT Seqence Detection System（アプライドバイオシステムズ社)により行った。反応サイクルは、50℃で2分間保温し、次に95℃で10分間保温した後，95℃・15秒間 60℃・1分間のサイクルを40回行った。遺伝子発現量は、検量線のCorrelation Coeff値が0.995以上になるように解析を行ない算出した。

発現解析の結果を以下に示す。発現量の値は標準DNAを元に算出したmRNAのコピー数として、n=3の平均値で示した。

サブスタンスP刺激時における発現量の計時変化を解析した実験結果を以下に示す。無刺激時において、LAD 2のTNF-αの発現量は10118コピーであった。サブスタンスP刺激時における、LAD 2のTNF-αの発現量は、刺激後0.5時間において56065コピー、刺激後2時間において1346293コピー、刺激後8時間において54313コピー、刺激後24時間において4332コピ

ーであった。一方、培地のみ添加時における、LAD 2のTNF-αの発現量は、刺激後0.5時間において9668コピー、刺激後2時間において6689コピー、刺激後8時間において6035コピー、刺激後24時間において4886コピーであった。また、無刺激時において、LAD 2のCCL-5の発現量は15721コピーであった。サブスタンスP刺激時における、LAD 2のCCL-5の発現量は、刺激後0.5時間において38107コピー、刺激後2時間において88872コピー、刺激後8時間において69921コピー、刺激後24時間において53605コピーであった。一方、培地のみ添加時における、LAD 2のCCL-5の発現量は、刺激後0.5時間において14585コピー、刺激後2時間において15625コピー、刺激後8時間において12538コピー、刺激後24時間において15003コピーであった。

種々のTGR12リガンド刺激時における発現量を解析した実験結果を以下に示す。無刺激時において、LAD 2のTNF-αの発現量は1731コピーであった。刺激2時間後のLAD 2のTNF-αの発現量は、培地のみ添加時において1331コピー、サブスタンスP刺激時において173462コピー、コルチスタチン-17刺激時において163551コピー、PAMP-12刺激時において8918コピー、PACAP-27刺激時において219597コピー、VIP刺激時において176630コピーであった。また、無刺激時において、LAD 2のCCL-5の発現量は30341コピーであった。刺激2時間後のLAD 2のCCL-5の発現量は、培地のみ添加時において23501コピー、サブスタンスP刺激時において47117コピー、コルチスタチン-17刺激時において47322コピー、PAMP-12刺激時において34566コピー、PACAP-27刺激時において48242コピー、VIP刺激時において45015コピーであった。また、無刺激時において、LAD 2のCCL-2の発現量は643224コピーであった。刺激2時間後のLAD 2のCCL-2の発現量は、培地のみ添加時において404112コピー、サブスタンスP刺激時において2694837コピー、コルチスタチン-17刺激時において2944622コピー、PAMP-12刺激時において1143248コピー、PACAP-27刺激時において3809873コピー、VIP刺激時において3630286コピーであった。

実施例７

TGR12リガンドによるTGR12に対する競合結合試験

競合結合試験に用いた[^{125}I]標識ラットコルチスタチン14(Tyr0)（以下、[^{125}I]-rCST14(Y0)）は、以下のように調製した。rCST14(Y0)（フナコシ社）3nmol/6μL、10μg/mL lactoperoxidase(in 0.1M HEPES(pH7,4)) 6μL、0.001% H_2O_2 6μL、37MBq NaI 6μL(cold runでは15mg/100mL NaI 6μLを用いた)を混合後、室温で20分間反応し、HPLCでモノヨード体を分取したところ、24min.前後の画分(cold runにおけるMS解析でrCST14(Y0)のモノヨード体と同じ分子量を持つことが確認されている)に放射活性が回収された。分画にはTSKgel ODS-80TMを使用し、A液として10% MeCN/0.1% TFA、B液として60% MeCN/0.1% TFAを用いて、gradientは0-25(2min.), 25-27.5(3min.), 27.5-35(60min.)と設定し、流速は1mL/min.とした。

CHO/dhfr-細胞（以下、CHO）は、10％ウシ胎児血清を含むα-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。CHOに、TGR12の塩基配列の終始コドンを除いた後にGFP(和光純薬)の塩基配列を繋いだ塩基配列(以下、TGR12-GFP（配列番号：４５に表される塩基配列を有するDNA））を組み込んだ動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H（Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド）を安定的に発現させることにより、TGR12-GFP発現CHO細胞株（以下、CHO-TGR12GFP）を樹立した。CHO-TGR12GFPは、10％ウシ胎児透析血清を含む核酸不含α-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。

CHO-TGR12GFPを用いた結合試験は以下のように行った。種々の生理活性ペプチドは、ペプチド研究所から購入した。CHO-TGR12GFPを24well plateに2×10^5cells/wellの細胞密度で播種して一晩培養後、氷冷したアッセイバッファー(MEM-α, 20mM HEPES(pH7.4), 0.05% BSA)で3回洗浄し、250μLのアッセイバッファーを添加した後、250μLのアッセイバッファーに懸濁した[^{125}I]-rCST14(Y0)/生理活性ペプチド溶液を添加([^{125}I]-rCST14(Y0)の最終濃度は200pM)し、4℃で2時間静置した。500μL

のアッセイバッファーで3回洗浄後、250μLの0.5N NaOHで細胞を溶解して回収し、放射活性の測定を行った。

これにより、非特異的結合活性を10μMのラットコルチスタチン14の活性として見積もり、Hillプロット解析からそれぞれのペプチドのIC_{50}値を解析した結果、サブスタンスPでは2886nM, ヒトコルチスタチン17では47nM, ヒトPAMP12では18nM, ヒトPACAP27では264nM, ヒトPACAP38では47nM, ヒトVIPでは2039nMであった

実施例8

TGR12リガンドによるヒトTGR12発現RBL-2H3細胞における細胞内カルシウム上昇作用と脱顆粒促進作用

RBL-2H3(以下、RBL2H3)は、10%ウシ胎児血清を含むα-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。RBL-2H3に、ヒトTGR12の開始コドンから終始コドンを含む塩基配列(配列番号:３２に表される塩基配列を有するDNA)を組み込んだ動物細胞発現用ベクタープラスミドpcDNA3.1を安定的に発現させることにより、ヒトTGR12発現RBL-2H3細胞株（以下、RBL2H3-TGR12）を樹立した。RBL2H3-TGR12は、10%ウシ胎児血清と200μg/mLのGeneticinを含むα-MEM培地（インビトロジェン社）を用いて培養した。

細胞内カルシウム上昇活性は以下のように測定した。RBL2H3およびRBL2H3-TGR12を40,000cells/wellの密度となるよう96穴プレートに播いて一晩培養後、培地を捨て4μMのFluo3-AM（同仁化学）を含むアッセイバッファー〔Hank's Balanced Salt Solution(インビトロジェン社), 20mM HEPES(同仁化学)、2.5mM Probenecid(シグマ社)〕を1ウェルあたり100μL添加し、1時間、37℃で静置した。0.05%のCHAPSを含むアッセイバッファーで、種々のTGR12（ペプチド研究所）またはカルシウムイオノフォアA23187(和光純薬)を希釈した。アッセイバッファーで細胞を洗浄後、FLIPR（モレキュラーデバイス社）を用いて、細胞内カルシウム変動に伴う蛍光の測定を行った。サンプルは、アッセイ開始10秒後に50μLを50μL/

秒の速度で添加した。蛍光の測定は、最初の60秒間は1秒毎、次の120秒間は6秒間毎に行い、3分間の間で最も高い蛍光強度をその刺激条件における最大活性とし、3ウェルの平均で求めた。EC_{50}値の算出はGraphpad PRISM 4（Graohpad Software社）を用いて行った。

脱顆粒促進作用は以下のように測定した。RBL2H3およびRBL2H3-TGR12を40,000cells/wellの密度となるよう96穴プレートに播いて一晩培養後、培地を捨ててタイロード緩衝液(126mM NaCl, 4.0mM KCl, 0.69mM KH_2PO4, 5.6mM Glucose, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0.1% BSA)で洗浄後、96穴プレートに1ウェルあたり150μLずつタイロード緩衝液添加し、37℃で5分間インキュベートした。次いで、50μLの各種濃度のサブスタンスP（ペプチド研究所）を含むタイロード緩衝液を加えて、さらに37℃で20分間インキュベートし、脱顆粒を誘導した。脱顆粒アッセイ上清中のβ-hexosaminidase活性を以下のように測定することにより、脱顆粒の程度を測定した。上清を96穴プレートに分注し、上清の5倍量の0.1M Citrate(pH4.5)/1mM 4-methyl umbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside（和光純薬）を添加して、37℃で1時間インキュベートした。次いで、反応液の0.1倍量の0.2M Glycine/$NaCO_3$(pH10.7)を添加することにより反応を停止させ、Fusion-α(パーキンエルマー社)で測定を行った。β-hexosaminidase活性は、また、同じくプレートに播いたRBL2H3およびRBL2H3-TGR12GFPをTrypsin/EDTAで剥がした後、4回凍結融解し、遠心分離を行った後の上清中における活性をLAD2中の全β-hexosaminidase活性とし、脱顆粒の程度は全β-hexosaminidase活性に対するLAD2上清中のβ-hexosaminidase活性の割合で示した。

RBL2H3における、細胞内カルシウム上昇活性を測定した結果、アッセイバッファー添加におけるカルシウム上昇作用の最大活性は51、1μMのA23187による刺激におけるカルシウム上昇作用の最大活性は25338であった。サブスタンスP刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては44、10nMにおいては51、100nMにおいては50、1μMにおいては

95、10μMにおいては41であった。コルチスタチン17刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては67、10nMにおいては78、100nMにおいては54、1μMにおいては49、10μMにおいては52であった。PAMP12刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては52、10nMにおいては52、100nMにおいては35、1μMにおいては44、10μMにおいては43であった。PACAP27刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては47、10nMにおいては37、100nMにおいては63、1μMにおいては59、10μMにおいては45であった。

RBL2H3-TGR12における、細胞内カルシウム上昇活性を測定した結果、アッセイバッファー添加におけるカルシウム上昇作用の最大活性は-2、1μMのA23187による刺激におけるカルシウム上昇作用の最大活性は25624であった。サブスタンスP刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては4、10nMにおいては13、100nMにおいては1702、1μMにおいては10005、10μMにおいては12649であった。コルチスタチン17刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては-2、10nMにおいては33、100nMにおいては1574、1μMにおいては11193、10μMにおいては12762であった。PAMP12刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては41、10nMにおいては2088、100nMにおいては11110、1μMにおいては12039、10μMにおいては12331であった。PACAP27刺激によるカルシウム上昇作用の最大活性は、1nMにおいては40、10nMにおいては29、100nMにおいては5300、1μMにおいては11494、10μMにおいては12667であった。

RBL2H3における脱顆粒促進作用を解析した結果、自発的脱顆粒は9.4%であった。 サブスタンスP刺激による脱顆粒は、10nMにおいては8.8%、30nMにおいては8.9%、100nMにおいては8.9%、300nMにおいては8.5%、1μMにおいては8.4%、3μMにおいては7.9%であった。

RBL2H3-TGR12における脱顆粒促進作用を解析した結果、自発的脱顆粒は10.5%であった。 サブスタンスP刺激による脱顆粒は、10nMにおいては9.7%、30nMにおいては10.8%、100nMにおいては16.7%、300nMにおいては

27%、1μMにおいては36.3%、3μMにおいては42.0%であった。

産業上の利用可能性

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩（本発明の受容体）または本発明の受容体と特異的に結合する能力を有するリガンド（本発明のリガンド）の活性・機能を阻害する化合物（例、本発明の受容体アンタゴニスト）、本発明の受容体に対する抗体、本発明の受容体に対するアンチセンスポリヌクレオチドなどは、本発明の受容体または本発明のリガンドが有する生理活性（例、肥満細胞の脱顆粒促進作用、エイコサノイド産生促進作用、サイトカイン産生促進作用、肥満細胞増殖促進作用、肥満細胞活性化作用など）を抑制することができるので、低毒性で安全な優れた肥満細胞の脱顆粒抑制剤、エイコサノイド産生抑制剤、サイトカイン産生抑制剤、肥満細胞増殖抑制剤、肥満細胞活性化抑制剤（例、MAPK活性化抑制剤なども含む）などとして、例えば、免疫疾患〔例、炎症性疾患（下垂体膿瘍、甲状腺炎、腹膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、結節性紅斑、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、アレルギー（例、アレルギー性結膜炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、金属アレルギーなど）、喘息、滲出性中耳炎、メニエール病、接触皮膚炎、アナフィラキシー、蕁麻疹、重症筋無力症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、バセドー病、インスリン抵抗性糖尿病、アトピー性皮膚炎、白血球異常など〕、泌尿器疾患（例、腎尿細管間質障害（繊維化）、間質性膀胱炎、アレルギー性膀胱炎など）、消化器疾患〔例、過敏性腸症候群、慢性肝疾患、食物アレルギー、アレルギー性腸炎、牛乳タンパク誘発性直腸炎、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、手術後ストレスによる胃酸過多および潰瘍など〕、呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、

肺気腫）、びまん性汎細気管支炎、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、突発性間質性肺炎、肺線維症など〕、循環器疾患（例、動脈硬化症、急性冠状動脈症候群、粥状硬化性大動脈瘤、心臓アナフィラキシー、心不全、心筋梗塞、狭心症、不整脈、深部静脈血栓症、ＰＴＣＡ後再狭窄など）、眼科疾患（例、翼状片、春期カタル、ドライアイなど）、癌（例、甲状腺乳頭癌、非小細胞性肺癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、カポジ肉腫、肥満細胞種など）、脳梗塞、高脂血症、急性腎不全、糖尿病、肥満症、浮腫、肉芽種、アトピー性脊髄炎、神経線維腫、鼻粘膜過敏症、ホジキン病、子宮内膜増殖症などの予防・治療剤などとして有用である。

また、本発明の受容体または肥満細胞と本発明のリガンドとを用いるスクリーニング方法またはスクリーニング用キットにより、例えば、肥満細胞の脱顆粒抑制作用、エイコサノイド産生抑制作用、サイトカイン産生抑制作用、肥満細胞増殖抑制作用、肥満細胞活性化抑制作用などを有する化合物またはその塩が効率よく取得できる。

請求の範囲

1．(a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法。

2．リガンドが、サブスタンスP、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸管ペプチドまたはproadrenomedullin N-terminal 20 peptideである請求項1記載のスクリーニング方法。

3．配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、指標とする請求項1記載のスクリーニング方法。

4．(a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いことを特徴とする、ヒト肥満細胞における脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる脱顆粒を抑制する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5．(i) (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii) (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、(b) 該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを

、試験化合物の存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、および

(iii)工程(i)と工程(ii)との間で、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を比較し、工程(i)における結合量よりも工程(ii)における結合量の方が低い場合に、前記試験化合物を肥満細胞の脱顆粒抑制剤として選択する工程を含む請求項１記載のスクリーニング方法。

６.工程(ii)における結合量が工程(i)における結合量の５０％以下の場合に、前記試験化合物を肥満細胞の脱顆粒抑制剤として選択する、請求項５記載のスクリーニング方法。

７．(i)（a）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、（b）該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii)（a）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、（b）該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(iii)工程(i)と工程(ii)との間で、前記蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する前記リガンドの結合量を比較し、工程(i)における結合量よりも工程(ii)における結合量の方が低い場合の試験化合物を選択する工程、および

(iv)前記(iii)で得られた試験化合物を肥満細胞に接触させ、脱顆粒を抑制する試験化合物を選択する工程を含む請求項１記載のスクリーニング方法。

８．肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である請求項１記載のスクリーニング方

法。

９．（a）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および（b）該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット。

１０．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

１１．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

１２．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の診断薬。

１３．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のアゴニストに対する抗体を含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

１４．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の診断薬。

１５．（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または（ii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対するｓｉＲＮＡまたはｓｈ

ＲＮＡを含有してなる肥満細胞の脱顆粒抑制剤。

１６．肥満細胞の脱顆粒抑制剤が、免疫疾患、泌尿器疾患、消化器疾患または呼吸器疾患の予防・治療剤である請求項１０、１１、１３または１５記載の抑制剤。

１７．配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性、または該蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドの活性を阻害することを特徴とする肥満細胞の脱顆粒抑制方法。

１８．肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを用いることを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング方法。

１９．(i) 肥満細胞と、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の非存在下接触させ、前記肥満細胞に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(ii) 肥満細胞と、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドとを、試験化合物の存在下接触させ、前記肥満細胞に対する前記リガンドの結合量を測定する工程、

(iii) 工程(i)における結合量よりも工程(ii)における結合量の方が低い場合の試験化合物を選択する工程、および

(iv) 前記(iii)で得られた試験化合物を肥満細胞に接触させ、脱顆粒を抑制する試験化合物を選択する工程を含む請求項１８記載のスクリーニング方法。

２０．肥満細胞および配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質と特異的に結合する能力を有するリガンドを含有することを特徴とする、肥満細胞の脱顆粒抑制剤のスクリーニング用キット。

２１．哺乳動物に対して、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、（ii）該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的なまたは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または（iv）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対するｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡの有効量を投与することを特徴とする肥満細胞の脱顆粒抑制方法。

２２．肥満細胞の脱顆粒抑制剤を製造するための、（i）配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するアンタゴニスト、（ii）該蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、（iii）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、または（iv）該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対するｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡの使用。

Sequence Listing

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Degranulation Inhibitor

<130> PCT06-0009

<150> JP2005-133503
<151> 2005-04-28

<160> 45

<210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Asp Pro Thr Thr Pro Ala Trp Gly Thr Glu Ser Thr Thr Val Asn
                  5                  10                  15
Gly Asn Asp Gln Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Leu Ile
             20                  25                  30
Pro Val Phe Leu Ile Leu Phe Ile Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Asn
         35                  40                  45
Gly Phe Val Leu Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met Arg Arg Asn Ala Phe
     50                  55                  60
Ser Val Tyr Val Leu Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Phe Leu Cys
 65                  70                  75                  80
Phe Gln Ile Ile Asn Cys Leu Val Tyr Leu Ser Asn Phe Phe Cys Ser
                 85                  90                  95
Ile Ser Ile Asn Phe Pro Ser Phe Phe Thr Thr Val Met Thr Cys Ala
            100                 105                 110
Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Met Leu Ser Thr Val Ser Thr Glu Arg Cys
        115                 120                 125
Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Arg His
    130                 135                 140
Leu Ser Ala Val Val Cys Val Leu Leu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu
145                 150                 155                 160
Ser Ile Leu Glu Gly Lys Phe Cys Gly Phe Leu Phe Ser Asp Gly Asp
                165                 170                 175
Ser Gly Trp Cys Gln Thr Phe Asp Phe Ile Thr Ala Ala Trp Leu Ile
            180                 185                 190
Phe Leu Phe Met Val Leu Cys Gly Ser Ser Leu Ala Leu Leu Val Arg
        195                 200                 205
Ile Leu Cys Gly Ser Arg Gly Leu Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Leu Thr
    210                 215                 220
```

Ile Leu Leu Thr Val Leu Val Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly
225 230 235 240
Ile Gln Trp Phe Leu Ile Leu Trp Ile Trp Lys Asp Ser Asp Val Leu
245 250 255
Phe Cys His Ile His Pro Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Asn Ser
260 265 270
Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Lys Gln
275 280 285
Trp Arg Leu Gln Gln Pro Ile Leu Lys Leu Ala Leu Gln Arg Ala Leu
290 295 300
Gln Asp Ile Ala Glu Val Asp His Ser Glu Gly Cys Phe Arg Gln Gly
305 310 315 320
Thr Pro Glu Met Ser Arg Ser Ser Leu Val
325 330

<210> 2
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atggatccaa ccaccccggc ctggggaaca gaaagtacaa cagtgaatgg aaatgaccaa 60
gcccttcttc tgctttgtgg caaggagacc ctgatcccgg tcttcctgat ccttttcatt 120
gccctggtcg ggctggtagg aaacgggttt gtgctctggc tcctgggctt ccgcatgcgc 180
aggaacgcct tctctgtcta cgtcctcagc ctggccgggg ccgacttcct cttcctctgc 240
ttccagatta taaattgcct ggtgtacctc agtaacttct tctgttccat ctccatcaat 300
ttccctagct tcttcaccac tgtgatgacc tgtgcctacc ttgcaggcct gagcatgctg 360
agcaccgtca gcaccgagcg ctgcctgtcc gtcctgtggc ccatctggta tcgctgccgc 420
cgccccagac acctgtcagc ggtcgtgtgt gtcctgctct gggccctgtc cctactgctg 480
agcatcttgg aagggaagtt ctgtggcttc ttatttagtg atggtgactc tggttggtgt 540
cagacatttg atttcatcac tgcagcgtgg ctgatttttt tattcatggt tctctgtggg 600
tccagtctgg ccctgctggt caggatcctc tgtggctcca ggggtctgcc actgaccagg 660
ctgtacctga ccatcctgct cacagtgctg gtgttcctcc tctgcggcct gccctttggc 720
attcagtggt tcctaatatt atggatctgg aaggattctg atgtcttatt ttgtcatatt 780
catccagttt cagttgtcct gtcatctctt aacagcagtg ccaaccccat catttacttc 840
ttcgtgggct cttttaggaa gcagtggcgg ctgcagcagc cgatcctcaa gctggctctc 900
cagagggctc tgcaggacat tgctgaggtg gatcacagtg aaggatgctt ccgtcagggc 960
accccggaga tgtcgagaag cagtctggtg 990

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 3
aggctgagga cgtagacaga gaa 23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 4
tgtgctctgg ctcctgggct tcc 23

<210> 5
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 5
ctctgaccgc taccacgagc aagtctctgc caagcgcaag gtggtcaaaa tgatgattgt 60
cgtggtgtgc accttcg 77

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
accgctacca cgagcaagtc t 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
gtgcacacca cgacaatcat c 21

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 8
ttgaccacct tgcgcttggc aga 23

<210> 9
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 9
acctgtgaca ttgtgactga agccaatatc tcatctggcc ctgagagcaa caccacgggc 60
atcacagcct tctccatgcc cagctggcag ctggcactgt 100

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 10
tgtgacattg tgactgaagc ca 22

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 11
ggcatggaga aggctgtgat 20

<210> 12

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 12
catctggccc tgagagcaac acca 24

<210> 13
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 13
actgccgctt ccagaacttc tttcctatca cagctgtgtt cgccagcatc tactccatga 60
cggccattgc ggtggacagg tatatggct 89

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 14
cgcttccaga acttctttcc tatc 24

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 15
tatacctgtc caccgcaatg g 21

<210> 16
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 16
cagctgtgtt cgccagcatc tactccat 28

<210> 17
<211> 993
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
atggatccaa ccaccccggc ctggggaaca gaaagtacaa cagtgaatgg aaatgaccaa 60
gcccttcttc tgctttgtgg caaggagacc ctgatcccgg tcttcctgat ccttttcatt 120
gccctggtcg ggctggtagg aaacgggttt gtgctctggc tcctgggctt ccgcatgcgc 180
aggaacgcct tctctgtcta cgtcctcagc ctggccgggg ccgacttcct cttcctctgc 240
ttccagatta taaattgcct ggtgtacctc agtaacttct tctgttccat ctccatcaat 300
ttccctagct tcttcaccac tgtgatgacc tgtgcctacc ttgcaggcct gagcatgctg 360
agcaccgtca gcaccgagcg ctgcctgtcc gtcctgtggc ccatctggta tcgctgccgc 420
cgccccagac acctgtcagc ggtcgtgtgt gtcctgctct gggccctgtc cctactgctg 480
agcatcttgg aagggaagtt ctgtggcttc ttatttagtg atggtgactc tggttggtgt 540
cagacatttg atttcatcac tgcagcgtgg ctgatttttt tattcatggt tctctgtggg 600
tccagtctgg ccctgctggt caggatcctc tgtggctcca ggggtctgcc actgaccagg 660
ctgtacctga ccatcctgct cacagtgctg gtgttcctcc tctgcggcct gccctttggc 720
attcagtggt tcctaatatt atggatctgg aaggattctg atgtcttatt ttgtcatatt 780
catccagttt cagttgtcct gtcatctctt aacagcagtg ccaaccccat catttacttc 840
ttcgtgggct cttttaggaa gcagtggcgg ctgcagcagc cgatcctcaa gctggctctc 900
cagagggctc tgcaggacat tgctgaggtg gatcacagtg aaggatgctt ccgtcagggc 960
accccggaga tgtcgagaag cagtctggtg tag 993

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 18
ggtcgggctg gtaggaaac 19

<210> 19
<211> 155
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic olig DNA

<400> 19
ggtttggatg acaaggcagc gagtttggat gagcagcaga ccatgttcta cggttctgtg 60
aagaccggct acaccattgg ctacggcctg tccctcgcca cccttctggt cgccacagct 120
atcctgagcc tgttcaggaa gctccactgc acgcg 155

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 20
ggatgacaag gcagcgagtt 20

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 21
gcagtggagc ttcctgaaca g 21

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 22
ccacccttct ggtcgccaca gctat 25

<210> 23
<211> 129
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 23
tcggcggcaa cgaccagtct cagtacaaga ggctggccaa gtccacgctc ctgcttatcc 60
cgctgttcgg cgtccactac atggtgtttg ccgtgtttcc catcagcatc tcctccaaat 120
accagatac 129

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 24
ggcaacgacc agtctcagta ca 22

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 25
tggtatttgg aggagatgct gat 23

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 26
ctggccaagt ccacgctcct gcttat 26

<210> 27
<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligo DNA

<400> 27
actgcacacg caacttcatc cacatgaacc tgtttgtgtc gttcatgctg agggcgatct 60
ccgtcttcat caaagactgg attctgtatg cggagcagga ca 102

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 28
acacgcaact tcatccacat g 21

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 29
tgctccgcat acagaatcca 20

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 30
acggagatcg ccctcagcat gaac 24

<210> 31
<211> 1791
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> base sequence encoding a fusion protein

<400> 31

atggatccaa ccacccggc ctggggaaca gaaagtacaa cagtgaatgg aaatgaccaa 60
gcccttcttc tgctttgtgg caaggagacc ctgatcccgg tcttcctgat cctttcatt 120
gccctggtcg ggctggtagg aaacgggttt gtgctctggc tcctgggctt ccgcatgcgc 180
aggaacgcct tctctgtcta cgtcctcagc ctggccgggg ccgacttcct cttcctctgc 240
ttccagatta taaattgcct ggtgtacctc agtaacttct tctgttccat ctccatcaat 300
ttcccctagct tcttcaccac tgtgatgacc tgtgcctacc ttgcaggcct gagcatgctg 360
agcaccgtca gcaccgagcg ctgcctgtcc gtcctgtggc ccatctggta tcgctgccgc 420
cgccccagac acctgtcagc ggtcgtgtgt gtcctgctct gggccctgtc cctactgctg 480
agcatcttgg aagggaagtt ctgtggcttc ttatttagtg atggtgactc tggttggtgt 540
cagacatttg atttcatcac tgcagcgtgg ctgatttttt tattcatggt tctctgtggg 600
tccagtctgg ccctgctggt caggatcctc tgtggctcca ggggtctgcc actgaccagg 660
ctgtacctga ccatcctgct cacagtgctg gtgttcctcc tctgcggcct gccctttggc 720
attcagtggt tcctaatatt atggatctgg aaggattctg atgtcttatt ttgtcatatt 780
catccagttt cagttgtcct gtcatctctt aacagcagtg ccaaccccat catttacttc 840
ttcgtgggct cttttaggaa gcagtggcgg ctgcagcagc cgatcctcaa gctggctctc 900
cagagggctc tgcaggacat tgctgaggtg gatcacagtg aaggatgctt ccgtcagggc 960
accccggaga tgtcgagaag cagtctggtg gctagcaaag gagaagaact cttcactgga 1020
gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt gatgttaacg gccacaagtt ctctgtcagt 1080
ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga aaacttaccc tgaagttcat ctgcactact 1140
ggcaaactgc ctgttccatg gccaacacta gtcactactc tctctcatgg tgttcaatgc 1200
ttttcaagat acccggatca tatgaaacgg catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa 1260
ggttatgtac aggaaaggac catcttcttc aaagatgacg gcaactacaa gacacgtgct 1320
gaagtcaagt ttgaaggtga tacccttgtt aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt 1380
aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa ttggaataca actataactc acacaatgta 1440
tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga atcaaagcga acttcaagat ccgccacaac 1500
attgaagatg gaagcgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc aattggcgat 1560
ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat 1620
cccaacgaaa agagagacca catggtcctt cttgagtttg taacagctgc tgggattaca 1680
catggcatgg atgaactgta caacatcgat ggaggcggag gtggagggcc cggttaccgg 1740
taccggatcc agatatctgg gcggccgctc agcaagcttc gcgaattctg a 1791

<210> 32
<211> 993
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32

atggatccaa ccaccccggc ctggggaaca gaaagtacaa cagtgaatgg aaatgaccaa 60
gcccttcttc tgctttgtgg caaggagacc ctgatcccgg tcttcctgat cctttcatt 120
gccctggtcg ggctggtagg aaacgggttt gtgctctggc tcctgggctt ccgcatgcgc 180
aggaacgcct tctctgtcta cgtcctcagc ctggccgggg ccgacttcct cttcctctgc 240
ttccagatta taaattgcct ggtgtacctc agtaacttct tctgttccat ctccatcaat 300
ttcccctagct tcttcaccac tgtgatgacc tgtgcctacc ttgcaggcct gagcatgctg 360
agcaccgtca gcaccgagcg ctgcctgtcc gtcctgtggc ccatctggta tcgctgccgc 420
cgccccagac acctgtcagc ggtcgtgtgt gtcctgctct gggccctgtc cctactgctg 480
agcatcttgg aagggaagtt ctgtggcttc ttatttagtg atggtgactc tggttggtgt 540

cagacatttg atttcatcac tgcagcgtgg ctgatttttt tattcatggt tctctgtggg 600
tccagtctgg ccctgctggt caggatcctc tgtggctcca ggggtctgcc actgaccagg 660
ctgtacctga ccatcctgct cacagtgctg gtgttcctcc tctgcggcct gccctttggc 720
attcagtggt tcctaatatt atggatctgg aaggattctg atgtcttatt ttgtcatatt 780
catccagttt cagttgtcct gtcatctctt aacagcagtg ccaaccccat catttacttc 840
ttcgtgggct cttttaggaa gcagtggcgg ctgcagcagc cgatcctcaa gctggctctc 900
cagagggctc tgcaggacat tgctgaggtg gatcacagtg aaggatgctt ccgtcagggc 960
accccggaga tgtcgagaag cagtctggtg tag 993

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 33
ggagaagggt gaccgactca 20

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 34
tgcccagact cggcaaag 18

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 35
cgctgagatc aatcggcccg actat 25

<210> 36
<211> 79

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 36
cagctggaga agggtgaccg actcagcgct gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt 60
gccgagtctg ggcaggtct 79

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 37
acccagcagt cgtctttgtc ac 22

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 38
cccgaaccca tttcttctct g 21

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 39
cgaaagaacc gccaagtgtg tgccaa 26

<210> 40
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 40
ctccaaccca gcagtcgtct ttgtcacccg aaagaaccgc caagtgtgtg ccaacccaga 60
gaagaaatgg gttcgggagt ac 82

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 41
ctcgcgagct atagaagaat cacc 24

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 42
tccttggcca caatggtctt g 21

<210> 43
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 43
cagcaagtgt cccaaagaag ctgtgatct 29

<210> 44
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic oligo DNA

<400> 44
agaggctcgc gagctataga agaatcacca gcagcaagtg tcccaaagaa gctgtgatct 60
tcaagaccat tgtggccaag gagatct 87

<210> 45
<211> 1791
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> base sequence encoding a fusion protein

<400> 45
atggatccaa ccacccggc ctggggaaca gaaagtacaa cagtgaatgg aaatgaccaa 60
gcccttcttc tgctttgtgg caaggagacc ctgatcccgg tcttcctgat ccttttcatt 120
gccctggtcg ggctggtagg aaacgggttt gtgctctggc tcctgggctt ccgcatgcgc 180
aggaacgcct tctctgtcta cgtcctcagc ctggccgggg ccgacttcct cttcctctgc 240
ttccagatta taaattgcct ggtgtacctc agtaacttct tctgttccat ctccatcaat 300
ttccctagct tcttcaccac tgtgatgacc tgtgcctacc ttgcaggcct gagcatgctg 360
agcaccgtca gcaccgagcg ctgcctgtcc gtcctgtggc ccatctggta tcgctgccgc 420
cgccccagac acctgtcagc ggtcgtgtgt gtcctgctct gggccctgtc cctactgctg 480
agcatcttgg aagggaagtt ctgtggcttc ttatttagtg atggtgactc tggttggtgt 540
cagacatttg atttcatcac tgcagcgtgg ctgatttttt tattcatggt tctctgtggg 600
tccagtctgg ccctgctggt caggatcctc tgtggctcca ggggtctgcc actgaccagg 660
ctgtacctga ccatcctgct cacagtgctg gtgttcctcc tctgcggcct gccctttggc 720
attcagtggt tcctaatatt atggatctgg aaggattctg atgtcttatt ttgtcatatt 780
catccagttt cagttgtcct gtcatctctt aacagcagtg ccaaccccat catttacttc 840
ttcgtgggct cttttaggaa gcagtggcgg ctgcagcagc cgatcctcaa gctggctctc 900
cagagggctc tgcaggacat tgctgaggtg gatcacagtg aaggatgctt ccgtcagggc 960
accccggaga tgtcgagaag cagtctggtg gctagcaaag gagaagaact cttcactgga 1020
gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt gatgttaacg gccacaagtt ctctgtcagt 1080
ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga aaacttaccc tgaagttcat ctgcactact 1140
ggcaaactgc ctgttccatg gccaacacta gtcactactc tctctcatgg tgttcaatgc 1200
ttttcaagat acccggatca tatgaaacgg catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa 1260
ggttatgtac aggaaaggac catcttcttc aaagatgacg gcaactacaa gacacgtgct 1320
gaagtcaagt ttgaaggtga taccctgtt aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt 1380

aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa ttggaataca actataactc acacaatgta 1440
tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga atcaaagcga acttcaagat ccgccacaac 1500
attgaagatg gaagcgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc aattggcgat 1560
ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat 1620
cccaacgaaa agagagacca catggtcctt cttgagtttg taacagctgc tgggattaca 1680
catggcatgg atgaactgta caacatcgat ggaggcggag gtggagggcc cggttaccgg 1740
taccggatcc agatatctgg gcggccgctc agcaagcttc gcgaattctg a 1791

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
See extra sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/028667 A1 (The Institute of Physical and Chemical Research et al.), 31 March, 2005 (31.03.05), Particularly, page 3 (Family: none)	1-9,18-20
Y	JP 2004-33211 A (Pfizer Inc.), 05 February, 2004 (05.02.04), & AU 2003206014 A1 & EP 1340979 A2 & US 2003/171293 A1 & WO 03/073107 A2	1-9,18-20
Y	Ødum L. et al., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells, Inflammation Research, 1998, Vol.47, No.12, pages 488 to 492	4

☒ 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	Date of mailing of the international search report
01 August, 2006 (01.08.06)	08 August, 2006 (08.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309212

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	KAMOHARA, M. et al., Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides., Biochemical and Biophysical Research Communications, May 2005, Vol.330, No.4, pages 1146 to 1152.	1-9,18-20
P,A	JP 2005-304438 A (Astellas Pharma Inc.), 04 November, 2005 (04.11.05), (Family: none)	1-9,18-20
A	JP 2002-355052 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 December, 2002 (10.12.02), & AU 6946301 A & US 2006/057663 A1 & WO 02/04641 A1	1-9,18-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309212

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 17 and 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inhibition of the degranulation of a mast cell *in vivo* relates to a method for treatment of the human body, and therefore the inventions of claims 17 and 21 relate to a subject matter which this international searching authority is not required to search.

2. [X] Claims Nos.: 10-16 and 22
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Since the scopes of claims 10-16 and 22 are not clearly defined or are not fully supported by the description, and are not clearly and fully disclosed in the description, the international search was not made on these claims. For more detailed comments, see the extra annex sheet.

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet

With respect to the "antagonist" in claims 10 and 22, although it is shown in the section "Examples" that L-703606 which is an antagonist of NK1 receptor inhibits the degranulation caused by substance P, it is unclear whether or not this compound is an antagonist of a protein having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1 or the like and it is not stated specifically and unclear what types of substances other than this compound are included in the category "the antagonist". Thus, these claims are not supported by or disclosed in the description. Even though the common technical knowledge at the time of the filing of the present application is taken into the consideration, it is quite unclear what types of compounds are specifically included or what types of compounds are not included, and therefore these claims are claimed quite unclearly. Thus, a meaningful international search cannot be made on these claims. Similar comments apply to claim 16 which refers to claims 10.

Similarly, with respect to the "agonist" in claims 13 and 22, it is not specifically stated and unclear what types of compounds are included in the category "the agonist". Thus, these claims are not supported by or disclosed in the description. Even though the common technical knowledge at the time of the filing of the present application is taken into the consideration, it is quite unclear what types of compounds are specifically included or what types of compounds are not included, and therefore these claims are claimed quite unclearly. Thus, a meaningful international search cannot be made on these claims. Similar comments apply to claim 16 which refers to claims 13.

With respect to the antibodies in claims 11-13 and 22, it is not shown in the description that an antibody directed against a protein having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1 or an antibody directed against an agonist is prepared actually and the antibody can inhibit the degranulation and that the antibody can be used in the diagnosis of various diseases such as immune diseases and urinary organ diseases, and therefore the antibodies are not regarded to be supported by the description.

With respect to the diagnosis agent comprising the polynucleotide of claim 14, 15 or 22 and a degranulation inhibitor comprising siRNA or shRNA for the polynucleotide, it is not shown in the description that the polynucleotide can be actually used in the diagnosis of various diseases and that the siRNA or shRNA is actually prepared and it can inhibit the degranulation, and the diagnosis agent and the degranulation inhibitor are not regarded to be supported by the description.

Similar comments apply to claim 16 which refers to these claims.

Annex:

With respect to the "ligand" in claim 1, although various examples of the ligand are mentioned in the description, those compounds which are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5 are only limited to substance P, cortistatin, hypophysis adenylate cyclase activating polypeptide, vasoactive intestinal peptide and PAM-12 and it is unclear what types of substances other than these compounds can actually serve as the ligand.

Same comments apply to the similar parts of claims 4, 5, 7, 9 and 18-20 and to claims 3, 6 and 8 which refer to these claims.

Thus, the search was only made on the parts which are supported by and disclosed in the description, namely the above-mentioned compounds.

Complete search was made on claim 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309212

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C*12N15/09*(2006.01)i, *A61K31/7052*(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P1/00*(2006.01)i, *A61P1/04*(2006.01)i, *A61P1/16*(2006.01)i, *A61P3/04*(2006.01)i, *A61P3/06*(2006.01)i, *A61P3/10*(2006.01)i, *A61P9/04*(2006.01)i, *A61P9/06*(2006.01)i, *A61P9/10*(2006.01)i, *A61P11/00*(2006.01)i, *A61P11/06*(2006.01)i, *A61P11/08*(2006.01)i, *A61P13/00*(2006.01)i, *A61P13/10*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P15/00*(2006.01)i, *A61P17/00*(2006.01)i, *A61P21/04*(2006.01)i, *A61P27/02*(2006.01)i, *A61P27/16*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P37/00*(2006.01)i, *A61P37/02*(2006.01)i, *A61P37/08*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12Q1/02*(2006.01)i, *C12Q1/68*(2006.01)i, *G01N33/15*(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *C07K14/705*(2006.01)n

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

C12N15/09, A61K31/7052, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/00, A61P1/04, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/06, A61P11/08, A61P13/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P15/00, A61P17/00, A61P21/04, A61P27/02, A61P27/16, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P43/00, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07K14/705

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０９２１２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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））

Int.Cl.　特別ページ参照

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	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求の範囲の番号
Y	WO 2005/028667 A1（理化学研究所他）　2005.03.31 特に第３頁 ファミリー無し	1-9,18-20
Y	JP 2004-33211 A（ファイザー・インク）2004.02.05 & AU 2003206014 A1　& EP 1340979 A2　& US 2003/171293 A1 & WO 03/073107 A2	1-9,18-20

☑　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矛盾するものではなく、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 ０１．０８．２００６	国際調査報告の発送日 ０８．０８．２００６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９７３５ 六笠　紀子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求の範囲の番号
Y	Ødum L et al, Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells, Inflammation Research , 1998, Vol. 47, No. 12 , p. 488 - 492	4
P,A	Kamohara, M et al, Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides., Biochemical and Biophysical Research Communications, MAY 2005, Vol. 330, No. 4, p. 1146-1152.	1-9,18-20
P,A	JP 2005-304438 A （アステラス製薬株式会社） 2005.11.04 ファミリー無し	1-9,18-20
A	JP 2002-355052 A （武田薬品工業株式会社） 2002.12.10 & AU 6946301 A & US 2006/057663 A1 & WO 02/04641 A1	1-9,18-20

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０９２１２

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求の範囲17,21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
インビボにおいて肥満細胞の脱顆粒を抑制することはヒトを治療する方法に係る発明であって、国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☑ 請求の範囲10-16,22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲10乃至16及び22は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。詳細は別紙参照。

３．☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

別紙

請求の範囲１の「リガンド」について、明細書中に種々例示はされているものの、PCT６条の意味において明細書に裏付けられ、また、ＰＣＴ５条の意味において開示されているのは、サブスタンスP、コルチスタチン、脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド、血管作動性腸管ペプチド、PAMP-12のみであり、他にどのようなものがリガンドとして実際に機能するかは不明である。

請求の範囲４、５、７、９、１８乃至２０の同様の記載、及びこれらの請求の範囲を引用する請求の範囲３、６、８についても同様である。

よって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち上記化合物についてのみ行った。

また、請求の範囲２については完全な調査を行った。

第Ⅱ欄　2.について

請求の範囲１０及び２２の「アンタゴニスト」について、実施例においてNK1受容体のアンタゴニストであるL-703606がサブスタンスＰによる脱顆粒を阻害したことが示されているものの、該化合物が配列番号１のアミノ酸配列で示される蛋白質他のアンタゴニストであるかは不明であり、その他にアンタゴニストに何が含まれるのか具体的に記載されておらず不明である。よって、前記請求の範囲は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって請求の範囲の記載は著しく不明確であり、有意義な調査をすることができない。請求の範囲１０を引用する請求の範囲１６についても同様である。

同様に、請求の範囲１３の及び２２の「アゴニスト」について、アゴニストに何が含まれるのか具体的に記載されておらず不明である。よって、前記請求の範囲は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって請求の範囲の記載は著しく不明確であり、有意義な調査をすることができない。請求の範囲１３を引用する請求の範囲１６についても同様である。

請求の範囲１１乃至１３、２２の抗体について、明細書において配列番号１で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に対する抗体あるいはアゴニストに対する抗体を実際に作製し、それが脱顆粒を抑制したこと、免疫疾患、泌尿器疾患等種々の疾患の診断に使用できたことは示されていないので明細書に裏付けられているとはいえない。

請求の範囲１４、１５、２２のポリヌクレオチドを含有する診断薬、ポリヌクレオチドに対するsiRNAまたはshRNAを含有する脱顆粒抑制剤について、ポリヌクレオチドが実際に種々の疾患の診断に使用できたこと、siRNAまたはshRNAを実際に調製し、脱顆粒を抑制できたことは明細書に記載されていないので、明細書に裏付けられているとはいえない。

これらの請求の範囲を引用する請求の範囲１６についても同様である。

発明の属する分野の分類
C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7052(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i,
A61P1/16(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P9/04(2006.01)i, A61P9/06(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i,
A61P11/06(2006.01)i, A61P11/08(2006.01)i, A61P13/00(2006.01)i, A61P13/10(2006.01)i,
A61P13/12(2006.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P21/04(2006.01)i,
A61P27/02(2006.01)i, A61P27/16(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P37/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)n

調査を行った最小限資料
C12N15/09, A61K31/7052, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/00, A61P1/04, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/10, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/06, A61P11/08, A61P13/00, A61P13/10, A61P13/12, A61P15/00, A61P17/00, A61P21/04, A61P27/02, A61P27/16, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/02, A61P37/08, A61P43/00, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07K14/705