

(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
2010 年 3 月 25 日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/032816 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/02 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/066348

(22) 国際出願日: 2009 年 9 月 18 日(18.09.2009)

(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 2008-240917 2008 年 9 月 19 日(19.09.2008) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 小野薬品工業株式会社(ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418526 大阪府大阪市中央区道修町二丁目 1 番 5 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): 杉山 哲也(SUGIYAMA tetsuya) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 大上 志穂(OHGAMI shiho) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 中山大介(NAKAYAMA daisuke) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 林 昭夫(HAYASHI akio) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP). 藤木

顕(FUJIKI akira) [JP/JP]; 〒3004247 茨城県つくば市和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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(条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: NOVEL LYSOPHOSPHATIDYLSERINE RECEPTOR

(54) 発明の名称: 新規リゾホスファチジルセリン受容体

(57) Abstract: The object aims to identify a ligand for H963, which is known as an orphan receptor, to thereby provide a method for screening for an antagonist of H963 and also provide use applications of the antagonist. It is found that H963 is a LysoPS receptor. Based on this finding, a method for screening for an antagonist of H963 is provided. Further, based on the measurement of LysoPS regioisomers in the blood, there is found the relationship between a specific isomer of LysoPS and sepsis. An H963 receptor antagonist can be used as an agent for preventing the onset of sepsis, septic shock or the like and/or treating sepsis, septic shock or the like.

(57) 要約: 本発明の課題は、オーファン受容体であった H963 のリガンドを同定して、その拮抗剤のスクリーニング方法を提供し、さらにその拮抗剤の用途を提供することにある。本発明は、H963 が LysoPS 受容体であることの発見を通じて、その拮抗剤のスクリーニング方法を提供し、ならびに血中 LysoPS 位置異性体の測定に基づき、特定の異性体と敗血症との関連性を見出すことにより、その受容体拮抗剤が敗血症および敗血症性ショックなどの発症予防および/または治療剤になり得ることを提供する。



WO 2010/032816 A1

明 細 書

発明の名称：新規リゾホスファチジルセリン受容体

技術分野

[0001] 本発明は、H 9 6 3 のリゾホスファチジルセリン（以下、L y s o P S と略す。）受容体としての使用方法に関する。

背景技術

[0002] H 9 6 3 は、そのリガンドや機能、さらには関連する疾患が全く解明されていない、いわゆるオーファン受容体であり、その解析が希求されている G 蛋白質共役型受容体（以下、G P C R と略す。）の一つであった（特許文献 1）。

[0003] 一方、L y s o P S は、ホスファチジルセリンがホスホリパーゼ A 1 あるいは A 2 によって加水分解されて生成するリゾリン脂質であり、脂肪酸の位置、炭素鎖数および飽和度によって様々な種類が存在する。その生理作用としては、コンカナバリン A や I g E 受容体を介した抗原刺激、神経成長因子による脱顆粒誘導反応を増強することが示されており、肥満細胞の活性化作用を介した、いわゆる I 型（即時型）アレルギー反応において重要な働きをもつことが報告されている（非特許文献 1、2 および 3）。

[0004] これまで、L y s o P S 受容体として、G P C R である G P R 3 4 が報告されているが（特許文献 2、3 および非特許文献 4）、H 9 6 3 が L y s o P S 受容体として機能することは全く報告されていない。また、その拮抗剤が敗血症や敗血症性ショックなどの治療に適用できることの報告もない。

[0005] 一方、L y s o P S の位置異性体、特に、1-アシル体と 2-アシル体による生理機能が異なることが示唆されている（非特許文献 5）。そのような生理機能の解析を進める上で、上記位置異性体の血中量の測定は不可欠である。しかしながら、アシル転移反応による異性化により、それら異性体の血中量の正確な測定は困難であった。これまでに唯一、リゾホスファチジルコリンでの測定例が報告されているのみであり（非特許文献 6）、L y s o P

Sについての報告はない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第98／07859号パンフレット

特許文献2：特開第2004－89176号公報

特許文献3：国際公開第2006／088246号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nature，1979年，第279巻、p. 250－252
頁

非特許文献2：FEBS Letter，1979年，第105巻，58－62
頁

非特許文献3：FEBS Letter，1982年，第138巻，p. 190－192

非特許文献4：Biochemical and Biophysical Research Communications，2006年，第341巻，p. 1078－1087

非特許文献5：Biochimica et Biophysica Acta，2002年，第1582巻，p. 26－32

非特許文献6：JAOCs，2001年，第78巻，第10号，p. 1007－1011

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、オーファン受容体であったH963のリガンドを同定して、その拮抗剤のスクリーニング方法を提供し、さらにその拮抗剤の用途を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、かかる課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、H9

63のリガンドとしてLys o P Sを同定することにより、その拮抗剤のスクリーニング方法を開発した。

[0010] さらに、本発明者らは、血中Lys o P Sの位置異性体の測定により、特定の異性体と敗血症との関連性を見出して、その受容体拮抗剤が敗血症や敗血症性ショックなどの発症予防および／または治療に適用できることを新たに見出して、本発明を完成させた。

[0011] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] Lys o P S受容体としてのH963の使用。

[2] Lys o P Sが、C18:1-Lys o P S、C18:2-Lys o P S、C20:4-Lys o P S、C22:5-Lys o P SおよびC22:6-Lys o P Sから選択される一以上である上記[1]記載のH963の使用。

[3] Lys o P S受容体拮抗剤のスクリーニングにおける上記[2]記載のH963の使用。

[4] Lys o P S受容体拮抗剤のスクリーニングが、以下の工程からなる上記[3]記載のH963の使用；

(A) H963発現細胞と被験物質を接触させる工程、

(B) さらに、最終濃度が約10~40 μ MとなるようLys o P Sを添加する工程および

(C) 前記被験物質存在下におけるH963活性化シグナルと、被験物質非存在下における同シグナルを比較し、Lys o P S添加によるH963の活性化を抑制する被験物質を選択する工程。

[5] H963活性化シグナルが、ERKのリン酸化の亢進である上記[4]記載のH963の使用。

[6] H963発現細胞が、さらにG α 16を発現する細胞である上記[4]記載のH963の使用。

[7] H963活性化シグナルが、細胞内Ca²⁺濃度の増加である上記[6]記載のH963の使用。

[8] L y s o P S 受容体拮抗剤が、敗血症または敗血症性ショックの発症予防および／または治療剤である上記 [3] 記載の H 9 6 3 の使用。

発明の効果

[0012] 本発明は、敗血症や敗血症性ショックなどの発症予防および／または治療に使用し得る H 9 6 3 拮抗剤を提供することを可能とする。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] L y s o P S 刺激による E R K のリン酸化の亢進を表わす。

[図2] L y s o P S 刺激による細胞内 $C a^{2+}$ 濃度の増加を表わす。

[図3] L P S 刺激敗血症動物モデルにおいて、L P S 刺激による 2 - アシル体 L y s o P S の血中量の変動を表わす。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0015] 本発明において H 9 6 3 は公知であり、例えば、G e n B a n k アクセション番号 A A L 4 7 7 6 3 . 1 で特定されるタンパク質またはその部分タンパク質である。ここで、H 9 6 3 の部分タンパク質とは、リガンド結合強度、特異性および／またはそのリガンド結合に伴い誘導される細胞内シグナルの程度と種類が、前記 A A L 4 7 7 6 3 . 1 で特定される H 9 6 3 と同等あるいは同じであるものに限られる。

[0016] 本発明において $G \alpha 16$ は公知であり、例えば、G e n B a n k アクセション番号 A A A 3 5 8 6 0 . 1 で特定されるタンパク質またはその部分タンパク質である。ここで、 $G \alpha 16$ の部分タンパク質は、少なくとも H 9 6 3 と相互作用し、グアノシン三リン酸 (G T P) と結合する領域を持ち、さらに、エフェクターであるホスホリパーゼ β (P L C β) と相互作用する領域を含むものであればいずれのものでもよい。

[0017] 本発明において、H 9 6 3 もしくは $G \alpha 16$ またはそれらの部分タンパク質は、他のタンパク質またはペプチドとの融合タンパク質として発現させてもよい。融合する他のタンパク質部分またはペプチド部分は、H 9 6 3 もしくは $G \alpha 16$ との融合タンパク質の発現の確認または発現細胞の精製・単離

のためのタグとして利用することができる。例えば、myc、免疫グロブリンFc部分、ヒスチジンタンデム（6xHis）などを利用することができる。

[0018] 本発明にかかるH963やGα16の各々をコードするcDNAは、種々の公知の方法または実施例記載の方法によって得ることができる。例えば、Maniatisら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", ColdSpring Harbor Laboratory, NY, 1982年などに従って、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用いて、PCR法やハイブリダイゼーションによるクローニングにより、各々を発現する適当なライブラリーから単離することができる。

[0019] 発現ベクターは、公知の方法または実施例記載の方法で、クローニングされた各々のcDNAを動物細胞で機能するプロモーター下に挿入して調製することができる。ここで、発現ベクターとして、例えば、商用のものを利用することができる。

[0020] 本発明においてH963発現細胞としては、例えば、天然にH963を発現する哺乳動物細胞あるいはH963発現ベクターにより一過的あるいは恒常的に形質転換され、H963を発現する哺乳動物細胞が挙げられる。天然にH963を発現する哺乳動物細胞としては、例えば、マスト細胞（例えば、臍帯血由来培養ヒト肥満細胞（CBMC））などが挙げられる。

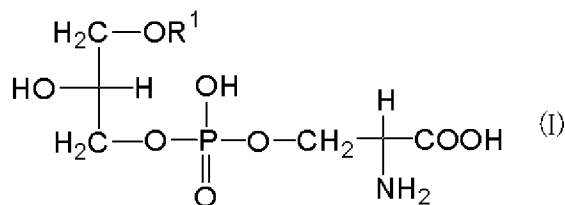
[0021] 本発明においてH963およびGα16共発現細胞としては、例えば、H963発現ベクターおよびGα16発現ベクターにより一過的あるいは恒常的に形質転換され、H963およびGα16を発現する哺乳動物細胞が挙げられる。

[0022] ここで、H963発現ベクターおよび／またはGα16発現ベクターにより形質転換され、H963および／またはGα16を発現する哺乳動物細胞の宿主としては、例えば、COS-7細胞、COS-1細胞、Verocell細胞、CHO細胞、CHO-K1細胞、マウスL細胞およびヒトHEK293細胞などが挙げられる。

[0023] H 9 6 3 発現細胞は、その発現ベクターが公知の方法または実施例記載の方法で宿主細胞に導入され、必要により、安定的に形質転換した細胞を選別することによって作製することができる。また、H 9 6 3 および G α 1 6 共発現細胞も、公知の方法、例えば、特開 2 0 0 3 - 2 5 0 5 5 1 に記載の方法または実施例記載の方法で作製できる。

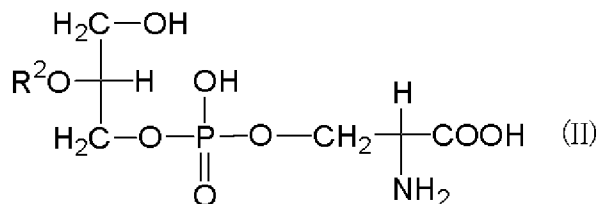
[0024] 本発明における L y s o P S は、一般式 (I)

[0025] [化1]



[0026] (式中、R¹は、C 1 2 ~ 2 6 のアルキルカルボニル基またはC 1 2 ~ 2 6 のアルケニルカルボニル基を表わす。) または一般式 (I I)

[0027] [化2]



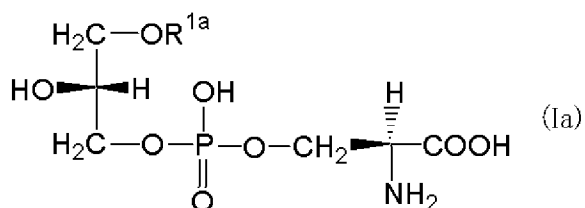
[0028] (式中、R²はR¹と同じ意味を表わす。) で示されるリゾリン脂質である。
ここで、

「C 1 2 ~ 2 6 のアルキルカルボニル基」中の「アルキル」としては、例えば、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシルまたはペンタコシルなどの直鎖状のC 1 1 ~ 2 5 のアルキル基が挙げられる。また、「C 1 2 ~ 2 6 のアルケニルカルボニル基」中の「アルケニル」としては、例えば、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、ペンタデセニル、ヘキサデセニル、ヘプタデセニル、オクタデセニル、ノナデセニル、イコセニル、ヘニコセニル、ドコセニル、トリコセニルまたはテトラコセニル基などの直鎖状のC 1 1 ~

25のアルケニル基が挙げられる。一方、本明細中、 R^1 または R^2 がそれぞれ表わすC12～26のアルキルカルボニル基またはC12～26のアルケニルカルボニル基の炭素鎖の炭素数と二重結合数とを用いて、例えば、炭素数が18であり、二重結合数が1である本発明のLys o P SをC18 : 1-Lys o P Sと、その R^1 または R^2 をC18 : 1-アルケニルカルボニル基というように表記することもある。また、本明細書中、一般式(I)で示されるLys o P Sを、1-アシル Lys o P S、一般式(II)で示されるLys o P Sを、2-アシル Lys o P Sと表記することもある。

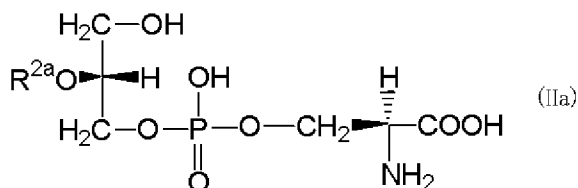
[0029] 本発明におけるLys o P Sとして好ましくは、一般式(Ia)

[0030] [化3]



[0031] (式中、 R^{1a} は R^1 と同じ意味を表わす。) または一般式(IIa)

[0032] [化4]



[0033] (式中、 R^{2a} は R^2 と同じ意味を表わす。) で示されるものであり、より好ましくは、 R^{1a} または R^{2a} がそれぞれC18 : 1、C18 : 2、C18 : 3、C20 : 1、C20 : 2、C20 : 3、C20 : 4、C20 : 5、C22 : 1、C22 : 2、C22 : 3、C22 : 4、C22 : 5もしくはC22 : 6-アルケニルカルボニル基で表わされる上記式(Ia)または(IIa)のLys o P Sが挙げられ、さらに好ましくは、 R^{1a} または R^{2a} がそれぞれC18 : 1、C18 : 2、C20 : 4、C22 : 5もしくはC22 : 6-アルケニルカルボニル基で表わされる上記式(Ia)または(IIa)のLys o P Sが挙げられる。

[0034] 本発明にかかる一般式 (I a) または (I I a) で表わされる L y s o P S の R¹ または R² でそれぞれ表わされる C 1 2 ~ 2 6 のアルケニルカルボニル基における炭素原子間の二重結合の位置は特に限定されない。

[0035] 本発明における L y s o P S には標識したものも含まれる。標識物質としては、例えば、放射性同位元素（例えば、³H、¹²⁵I、¹⁴C、³²P、³⁵S など）、蛍光物質（例えば、フルオレセインなど）、発光物質（例えば、ルミノールなど）、酵素（例えば、ペルオキシダーゼなど）、ランタニド元素などが挙げられる。ここで、標識された L y s o P S として好ましくは、放射性同位元素で標識された L y s o P S であり、さらに好ましくは ³H で標識された L y s o P S が挙げられる。

[0036] また、本発明における L y s o P S には、その公知の誘導体も含まれる。

[0037] なお、本明細書中、記号

[0038] [化5]

[0039] は当業者にとって明らかなように、β 配置を表わし、記号

[0040] [化6]

[0041] は、α 配置を表わし、記号

[0042] [化7]

[0043] はα 配置と β 配置との任意の割合の混合物であることを表わす。

[0044] 本発明の「L y s o P S 受容体拮抗剤のスクリーニング」は、公知の方法、例えば、G T P γ S 結合アッセイ、G T P a s e 活性測定法または各種機能アッセイ（特開 2 0 0 4 - 0 8 9 1 7 6）で実施できる。特に、各種機能アッセイとしては、例えば、L y s o P S と被験物質を H 9 6 3 発現細胞に接触させ、H 9 6 3 を介した細胞の応答、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 C a ²⁺ 遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 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

、pHの低下、細胞増殖活性、またはレポーター遺伝子の発現量などを測定することにより実施できる。なお、本明細書中、H963を介した細胞の応答をH963活性化シグナルと表記することもある。

[0045] 本発明において、細胞内 Ca^{2+} 遊離を検出する機能アッセイ（以下、 Ca^{2+} アッセイとする。）は、H963および $\text{G}\alpha 16$ 共発現細胞を LysoPS 刺激したときに遊離される細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を直接的あるいは間接的に検出することによって行うことができる。ここで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、例えば、カルシウム結合性蛍光試薬（例えば、 fura-2 AM または Fluo-3 AM など）を用いて直接的に検出することもできるし、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子（例えば、ルシフェラーゼの遺伝子上流にTRE応答配列を挿入した遺伝子）の転写活性を分析することにより間接的に検出することもできる。

[0046] Ca^{2+} アッセイにおいて、被験物質がH963拮抗物質であるか否かの判定は、前記細胞と被験物質とを一定濃度の LysoPS の共存下において接触させた場合に、 LysoPS 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が、前記被験物質により阻害あるいは抑制されるか否か、さらには有意に阻害あるいは抑制されるか否かで判定できる。なお、前記細胞と LysoPS とを被験物質の非存在下において接触させた場合の LysoPS による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加をコントロールとして選択する。

[0047] 本発明において、細胞内蛋白質（例えば、ERKなど）のリン酸化を検出する機能アッセイ（以下、リン酸化アッセイとする。）は、例えば、H963発現細胞を LysoPS 刺激したときに誘導される細胞内蛋白質のリン酸化を検出することによって行うことができる。例えば、ERKのリン酸化は、公知の方法または実施例記載の方法、例えば、ELISAまたはEIAなどにより検出できる。ERKのリン酸化アッセイにおいて、被験物質がH963拮抗物質であるか否かの判定は、上記の Ca^{2+} アッセイの例による。

[0048] 各種機能アッセイにおいて、H963発現細胞あるいはH963および $\text{G}\alpha 16$ 共発現細胞に添加される LysoPS の最終濃度は、各種機能アッセ

イで検出されるシグナルが最大レベルとなる最小濃度、例えば、約 $10 \sim 40 \mu\text{M}$ が好ましく、特に、 Ca^{2+} アッセイでは約 $10 \sim 20 \mu\text{M}$ がより好ましい。

[0049] また、H963 結合物質を結合アッセイでスクリーニングし、その中から上記方法により、H963 拮抗物質を選択することもできる。結合アッセイは、放射性同位元素などで標識した LysoPS と、H963 発現細胞の膜画分を用いて、公知の方法、例えば、特開 2001-245666 に開示された方法で実施できる。

[0050] 被験物質としては、例えば、合成化合物、ペプチド、タンパク質、抗体、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

[0051] 本発明における LysoPS 受容体拮抗剤、すなわち H963 拮抗剤は、 LysoPS が関与することが既に知られている疾患、例えば、アレルギー性疾患の予防および／または治療剤となり得る。さらに、本発明における LysoPS 、特に、2-アシル LysoPS が選択的に関与する疾患、例えば、敗血症もしくは敗血症性ショックの発症予防および／または治療剤にもなり得る。

[0052] 本発明にかかる LysoPS の位置異性体測定法は、被検サンプル中の 1-アシル LysoPS と 2-アシル LysoPS を分離して測定する方法である。

[0053] 従来、被検サンプルからの脂質の抽出に用いられる $\text{Bligh \& Dyer}$ 法 (*Biochem. Physiol.*, 37, 911-917 (1959)) は抽出効率が非常に低いため、その定量的分析は困難であった。本発明にかかる測定法は、あらかじめ被検サンプルに適量の有機酸もしくは無機酸あるいは飽和食塩水を添加しておき、続いて、 $\text{Bligh \& Dyer}$ 法あるいはこれに準ずる方法で LysoPS を含む総脂質を被検サンプルから抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などでの分離・解析カラムとしてオクタデシルシリル化シリカゲルカラム (ODS カラム) を使用し、水性移動相として適当濃度のリン酸塩および酢酸アンモニウム水溶液を使用することにより、従来法では困難で

あったL y s o P S位置異性体の分離測定を可能とした。

[0054] ここで、被検サンプルとしては、水溶性の何れのサンプルでもよいが、好ましくは血漿あるいは血清サンプルが挙げられる。

[0055] あらかじめ被検サンプルに添加される有機酸もしくは無機酸あるいは飽和食塩水としてより好ましくは、ギ酸または酢酸であり、さらに好ましくは酢酸であり、その添加量は最終濃度が約1%となる量が好ましい。ここで、最終濃度とは、B l i g h & D y e r法での抽出・分離操作における水／メタノール／クロロホルム溶液の総量に対する濃度である。この操作により、L y s o P Sを含む総脂質の有機層への抽出効率を約5～10倍以上改善させることが可能となる。

[0056] 本発明にかかる測定法において、上記方法による抽出サンプルは、オンラインあるいはオフラインの高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、超高速液体クロマトグラフィー（U P L C）または中高圧液体クロマトグラフィー（F P L C）などにより分離することができる。

[0057] さらに、その被検対象であるL y s o P Sの検出は、各種液体クロマトグラフィーと質量分析計、ダイオードアレイ検出計もしくは蛍光検出計との組み合わせからなる方法で実施することができる。液体クロマトグラフィーと質量分析計との組み合わせからなる方法としては、例えば、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析（例えば、L C／MS／MS、L C／MS／MS／MSなど）法または液体クロマトグラフィー・質量分析（L C／MS）法などが挙げられるが、好ましくは、L C／MS／MS法あるいはこれに準ずる実施例5記載の方法である。ここで、質量分析計としては、二重収束磁場型質量分析計、イオントラップ型質量分析計、四重極型質量分析計などが用いられる。

[0058] H P L Cなどにおいて使用される分離・解析カラムとしては、例えば、逆相系カラムを用いることができるが、好ましくはO D Sカラム、より好ましくは3 μ O D Sカラム（例えば、U n i s o n UK-C18, 3.0 μ mなど）を用いることができる。さらに、その移動相のうち、水性移動相には

約 0.01 ~ 5 mM のリン酸塩および約 1 ~ 100 mM の有機酸アンモニウム、特に同濃度の酢酸アンモニウムを含む水溶液を用いるのが好ましく、有機溶媒性移動相にはアセトニトリル-メタノール混合溶液を用いるのが好ましい。特に水性移動相のリン酸塩濃度を約 1 mM とすることが好ましい。以上のような移動相の選択により、被検対象の溶解性と高いイオン化効率の改善が期待でき、Lys o P S の位置異性体の分離の向上につながる。なお、分離測定時の濃度勾配および流速は、各種分離カラムの口径や長さ、ゲルのサイズなどにより種々変化するため、特に限定されるものではないが、実施例 5 の表 1 に記載の例が好ましい。

[0059] なお、本発明にかかる測定法は、Lys o P S の位置異性体のみならず、リゾホスファチジン酸、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロールまたはモノアシルグリセロールなどの脂質の各位置異性体、さらにはグリセロール骨格およびその類似体を中心骨格に有する脂質の測定にも用いることができる。

実施例

[0060] 以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 : H 9 6 3 発現ベクターの作製

特許文献 1 に基づきクローニングされた H 9 6 3 c D N A を含むサブクローニングベクターを鋳型とし、以下のフォワードプライマー 1（配列番号：1）および 2（配列番号：2）とリバースプライマー（配列番号：3）；
 フォワードプライマー 1 : 5'-aaaactcatctcagaagaggatctgacaaacagttcgttc
 ttctg-3'

フォワードプライマー 2 : 5'-ccgaattcgccgccaccatggaacaaaaactcatctcaga
 agag-
 gatctg-3'

リバースプライマー : 5'-ccgcggccgcttatgcattattttcacatc-3'

を用いて、PCR 反応 [9 6 ° C , 1 分間 → (9 8 ° C , 1 0 秒 → 4 5 ~ 6 0 ° C

、30秒→72℃、90秒)を35サイクル→72℃、10分間]を行い、所望の末端構造を有するDNA断片を増幅させた。これを発現ベクター(pEF6/V5-His TOP0: Invitrogen社)にライゲーションさせ、これを公知の方法により、大腸菌DH5 α コンピテント細胞(東洋紡)に導入し、その中から適切にH963を発現し得るベクターを有する大腸菌DH5 α を単離した。同ベクターの調製はアンピシリン-LB培地で培養した同大腸菌DH5 α から抽出・精製して行った。

実施例2: H963発現細胞、H963およびG α 16発現細胞の作製

Cell Line Nucleofector Kit T (Amaxa社)の添付文書に従い、Nucleofector II (右同)にて、実施例1で作製したH963発現ベクター(2 μ g)を、 1×10^6 個のCHO-K1細胞に遺伝子導入した。さらに、F-12培地(10% FBS, 100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.25 μ g/mL アムホテリシンBおよび5 μ g/mL ブラストサイジン含有)中、37℃、5%CO₂下にて約2週間培養し、FACSにて安定的にH963を発現するCHO-K1細胞クローン(以下、H963発現CHO-K1細胞株と略す。)を単離した。

[0061] 前記方法に従い、 1×10^6 個のG16/NFAT-b1a CHO-K1細胞(Invitrogen社)に同H963発現ベクターを遺伝子導入した。さらに、DMEM培地(10% FBS, 100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.25 μ g/mL アムホテリシンB, 5 μ g/mL ブラストサイジン, 400 μ g/mL ジエネティシン, 100 μ mol/L 非必須アミノ酸, 1 mmol/L HEPESおよび100 μ g/mL ゼオシン含有)中、37℃、5%CO₂下にて約2週間培養し、FACSにて安定的にH963を発現するG16/NFAT-b1a CHO-K1細胞クローン(以下、H963/G α 16発現CHO-K1細胞株と略す。)を単離した。

実施例3: ERKリン酸化アッセイ

3. 5×10^4 /100 μ LのH963発現CHO-K1細胞株を37℃、

5%CO₂下にて一晩培養し、培養上清を除いた後、最終濃度30μmol/L C18:1-LysoPSで刺激した。10分後、培養上清を除き、1回洗浄した後、50μL/ウェル RIPA Cell Lysis Buffer 2 Inhibitors (Assay designs社) および150μL/ウェル Assay Buffer 21 plus Inhibitors (右同) をそれぞれ添加して攪拌した。その細胞懸濁液100μL/ウェルをpERK Standards (0~2000pg/mL) (右同) とともにERK Microtiter Plate (Assay designs社) にそれぞれ添加し、Phospho-ERK1/2 Enzyme Immunometric Assay Kit (Assay designs社) 添付文書に従い、プレートリーダーSPECTRA MAX250 (Molecular Devices社) を用いて、吸光度(450nm)を測定した。ERKリン酸化率(%)は、450nmで測定した吸光度(pERK値)を用いて、以下の式にて算出した。

[0062] [数1]

$$\text{ERKリン酸化率(\%)} = \frac{[\text{pERK値(LysoPS刺激あり)} - \text{pERK値(LysoPS刺激なし)}]}{\text{pERK値(LysoPS刺激なし)}} \times 100$$

[0063] [結果] LysoPSにより、H963発現CHO-K1細胞株でのERKのリン酸化の亢進が認められた(図1)。この結果は、LysoPSがH963のリガンドであることを示している。

実施例4: Ca²⁺アッセイ

3. 5×10⁴/100μLのH963/Gα16発現CHO-K1細胞株を37℃、5%CO₂下にて一晩培養し、培養上清を除いた後、100μL DMEM/F12培地(5μmol/L Fura-2 AM, 10% FBS, 20mmol/L HEPES, 2.5mmol/L プロベネシド含有)を添加した。さらに、37℃、5%CO₂下にて1時間培養したのち、アッセイバッファー(5mmol/L HEPES, 2.5mmol/L プロベネシド含有ハンクス平衡塩溶液)で3回洗浄し、60μL アッセイバッファーを添加した。30分間、遮光、室温下にて静置したのち、最終濃度0~20μM LysoPS含有アッセイバッファーを添加し、添加前後の細胞内カルシウム濃度の増加を励起波長340nmおよび380nm、蛍光波長500nmで測定した。細胞内Ca²⁺濃度の増加を各励起波長での測

定比（励起340nm/380nmでの蛍光比）で評価した。なお、ポジティブコントロールとして、最終濃度3μM ATP（アデノシン三リン酸）溶液を添加した。

〔結果〕Lys o P Sにより、H963/Gα16発現CHO-K1細胞株での細胞内Ca²⁺濃度の増加が認められた（図2）。

実施例5：LPS刺激敗血症動物モデルにおけるLys o P Sの測定

C57BL/6マウス（8週齢雌、日本チャールス・リバー株式会社）に、生理食塩水または10mg/kg LPS（リポポリサッカライド、Sigma-Aldrich社）を腹腔内投与し、6時間後にエーテル麻酔下にて開腹して腹部大静脈より採血した。採取した血液は、4℃、8000Gで3分間遠心して血漿を分離し、-80℃にて保管した。

[0064] 測定当日、血漿を解凍し、内部標準としてC16:1-ccPA（1-アシルーサイクリックホスファチジン酸：国際公開第2002/94286号）を用いて、以下の方法により、血中Lys o P S量を測定した。

[0065] シリコナイズドガラスチューブに2mg/mL アスコルビン酸水溶液5μLを分注し、採取した被検血漿100μL、4.0μg/mL C16:1-ccPA メタノール溶液100μLおよび酢酸6μLを順次添加し、室温にて2分間攪拌した。さらにクロロホルム125μLを添加し、1分間攪拌した後、室温にて10分間静置した。さらにクロロホルム125μLを添加し、0.5分間攪拌し、飽和食塩水125μLを添加し、さらに0.5分間攪拌した後、遠心処理（4℃、3000回/分、10分）し、クロロホルム層を採取した。残渣に再びクロロホルム125μLを添加し、1分間攪拌した後、再度遠心分離（4℃、3000回/分、10分）し、クロロホルム層を採取した。回収したクロロホルムを合わせて減圧にて溶媒を除去し、残渣にクロロホルム100μL、メタノール60μL、ジメチルスルホキシド40μLを加えて溶解し、MultiScreen Solvinert Filter Plates 0.45μm, Low Binding PTFEにて遠心ろ過（4℃、2500回/分、15分）した後、以下に示

す条件にてLC/MS/MS測定に供した。Lys o P S濃度は、既定量の内部標準C 1 6 : 1 - c c P Aとの比から算出した。

(高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 条件)

H P L C装置 : Agilent 1100

オートサンプラー : Agilent 1100 Autosampler

解析カラム : U n i s o n UK-C 1 8, 3. 0 μ m (2 x 1 5 0 mm) (Imtakt社)

移動相 : A ; 2 5 m M 酢酸アンモニウムおよび1 m M リン酸二水素ナトリウム水溶液

B ; アセトニトリル : メタノール = 4 : 1

流速 : 0. 2 m L / 分

カラム温度 : 室温

(移動相濃度勾配)

[0066] [表1]

時間(分)	流速(μ L / 分)	A (%)	B (%)
0	200	80	20
1	200	80	20
25	200	20	80
50	200	0	100
60	200	0	100
60.2	200	80	20
90	200	80	20.2

[0067] (タンデム型質量分析 (MS/MS) 条件)

MS/MS装置 : 4000 Q TRAP LC/MS/MS (アプライド・バイオシステムズ社)

イオン化モード : E S +, MRM

カーテンガス : 窒素

コリジョンガス : 窒素

デソルベーションガス : 窒素

(MS/MS解析パラメーター)

[0068]

[表2]

解析対象	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Dwell(msec)
C16:1 ccPA	389.3	152.64	100
C14:0 LPS	470.25	285.18	100
C16:0 LPS	498.28	313.21	100
C18:0 LPS	526.36	341.27	100
C18:1 LPS	524.3	339.23	100
C18:2 LPS	522.28	337.21	100
C18:3 LPS	520.26	335.19	100
C20:3 LPS	548.29	363.22	100
C20:4 LPS	546.28	361.21	100
C20:5 LPS	544.27	359.2	100
C22:5 LPS	572.3	387.23	100
C22:6 LPS	570.28	385.21	100
C24:6 LPS	598.31	413.24	100

[0069] [結果] LPS刺激により、2-アシル体であるC18:1-LysoPS、C18:2-LysoPS、C20:4-LysoPS、C22:5-LysoPSおよびC22:6-LysoPSの血中濃度の上昇が確認された(図3)。一方、1-アシル体の有意な上昇は認められなかった。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明にかかるLysoPS受容体拮抗剤、すなわちH963拮抗剤のスクリーニング方法は、敗血症や敗血症性ショックなどの発症予防および／または治療に適用できる医薬品の開発に有用である。

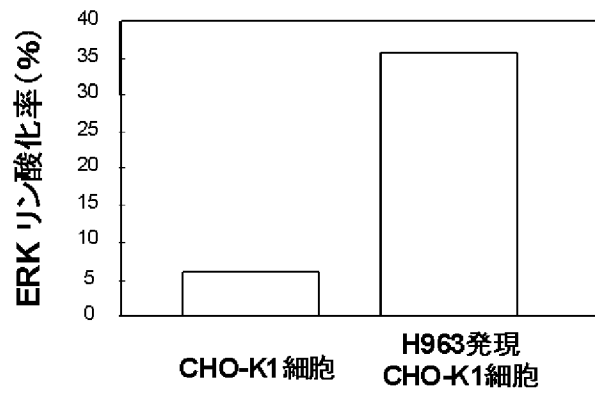
配列表フリーテキスト

[0071] 配列番号1：プライマー。
配列番号2：プライマー。
配列番号3：プライマー。

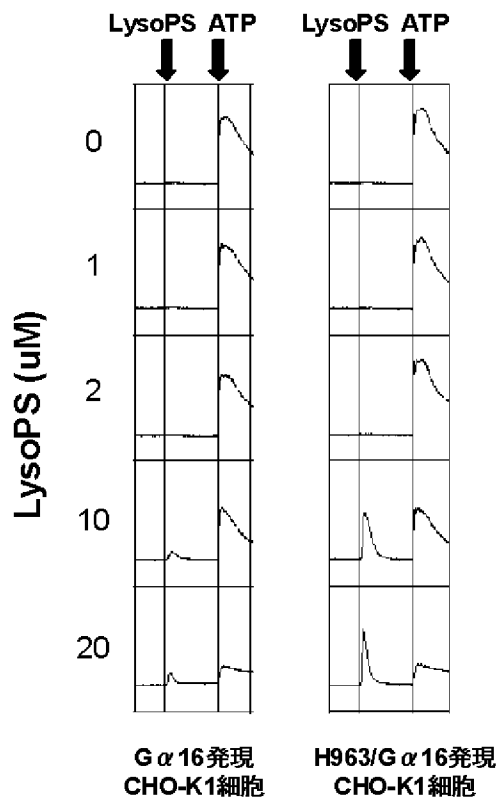
請求の範囲

- [請求項1] リゾホスファチジルセリン受容体としてのH963の使用。
- [請求項2] リゾホスファチジルセリンが、C18:1-LysoPS、C18:2-LysoPS、C20:4-LysoPS、C22:5-LysoPSおよびC22:6-LysoPSから選択される一以上である請求項1記載のH963の使用。
- [請求項3] リゾホスファチジルセリン受容体拮抗剤のスクリーニングにおける請求項2記載のH963の使用。
- [請求項4] リゾホスファチジルセリン受容体拮抗剤のスクリーニングが、以下の工程からなる請求項3記載のH963の使用；
- (A) H963発現細胞と被験物質を接触させる工程、
 - (B) さらに、最終濃度が約10～40 μ Mとなるようリゾホスファチジルセリンを添加する工程および
 - (C) 前記被験物質存在下におけるH963活性化シグナルと、被験物質非存在下における同シグナルを比較し、リゾホスファチジルセリン添加によるH963の活性化を抑制する被験物質を選択する工程。
- [請求項5] H963活性化シグナルが、ERKのリン酸化の亢進である請求項4記載のH963の使用。
- [請求項6] H963発現細胞が、さらにG α 16を発現する細胞である請求項4記載のH963の使用。
- [請求項7] H963活性化シグナルが、細胞内Ca²⁺濃度の増加である請求項6記載のH963の使用。
- [請求項8] リゾホスファチジルセリン受容体拮抗剤が、敗血症または敗血症性ショックの発症予防および／または治療剤である請求項3記載のH963の使用。

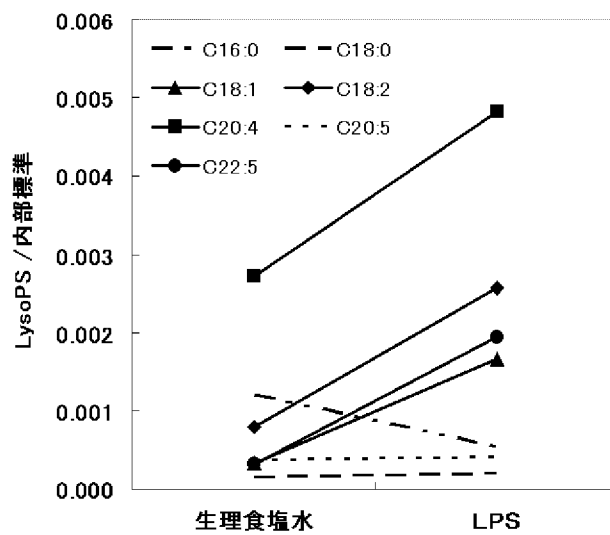
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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)

C12Q1/02, A61K45/00, A61P31/04, A61P43/00, C12N15/09

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq,
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 1998/007859 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 26 February 1998 (26.02.1998), & JP 2001-501460 A & EP 0920507 A2 & US 5723315 A	1, 2/1-8
X/Y	WO 2005/028667 A1 (Riken, Japan, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 31 March 2005 (31.03.2005), (Family: none)	1, 2/1-8
Y	Kumiko MAKIDE et al., "Lysophosphatidylserine ni yoru Mast Saibo Kasseika Kiko no Kaiseki", Proceedings of Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids, vol.49, 2007, pages 218 to 221	1-8

☒ 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
23 October, 2009 (23.10.09)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2009 (02.11.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066348

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUGO T., et al., Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. Biochem Biophys Res Commun., 2006, Vol.341, No.4, p.1078-1087	1-8
Y	Kumiko MAKIDE et al., "Lyso Phospho Shishitsu ni yoru Allergy Hanno no Chosetsu", Forum 2006: Pharmaceutical Health Science Environmental Toxicology Koen Yoshishu, 2006, page 81, F5-5	1-8
A	WO 2005/095644 A2 (OLIGENE GMBH), 13 October 2005 (13.10.2005), & EP 1733050 A2 & US 2008/0108509 A1	1-8
A	WO 2003/071272 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 August 2003 (28.08.2003), & JP 2004-180668 A & EP 1477806 A1 & US 2005/0118639 A1	1-8
A	YAMATO M, et al., The characterization of rat GPR34 as a lyso-phosphatidylserine receptor. The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2007, p.76P 01F3-4	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12Q1/02, A61K45/00, A61P31/04, A61P43/00, C12N15/09

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、UniProt/GeneSeq、CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

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 請求項の番号
X / Y	WO 1998/007859 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC) 1998.02.26 & JP 2001-501460 A & EP 0920507 A2 & US 5723315 A	1,2 / 1-8
X / Y	WO 2005/028667 A1 (独立行政法人理化学研究所、協和醗酵工業株式会社) 2005.03.31 & (ファミリーなし)	1,2 / 1-8

☒ 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

2 3 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 2 . 1 1 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

横田 倫子

4 B

3 7 6 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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 請求項の番号
Y	巻出久美子 他、 リゾホスファチジルセリンによるマスト細胞活性化機構の解析 日本脂質生化学研究, Vol.49, 2007, p.218-221	1-8
Y	SUGO T., et al., Identification of a lysophosphatidylserine receptor on mast cells. Biochem Biophys Res Commun., 2006, Vol.341, No.4, p.1078-1087	1-8
Y	巻出久美子 他、 リゾリン脂質によるアレルギー反応の調節 フォーラム 2006 : 衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨集, 2006, p.81 F5-5	1-8
A	WO 2005/095644 A2 (OLIGENE GMBH) 2005.10.13 & EP 1733050 A2 & US 2008/0108509 A1	1-8
A	WO 2003/071272 A1 (武田薬品工業株式会社) 2003.08.28 & JP 2004-180668 A & EP 1477806 A1 & US 2005/0118639 A1	1-8
A	YAMATO M., et al., The characterization of rat GPR34 as a lyso-phosphatidylserine receptor. The 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, 2007, p.76P O1F3-4	1-8