

(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
2011年5月19日(19.05.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/058993 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/070003
- (22) 国際出願日: 2010年11月10日(10.11.2010)
- (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 2009-260655 2009年11月16日(16.11.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘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): 石井 優 (ISHII, Masaru) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

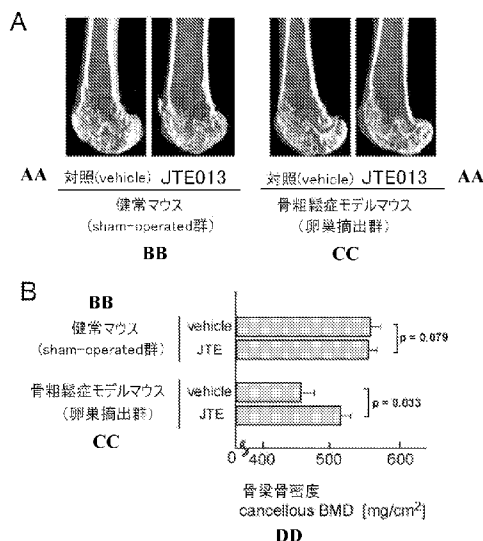
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, TH, 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, LR, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR NOVEL BONE RESORPTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 新規骨吸収抑制剤のスクリーニング方法

[図7]



AA CONTROL (vehicle) JTE013
BB NORMAL MICE (sham-operated group)
CC OSTEOPOROSIS MODEL MICE (ovary-removed group)
DD TRABECULAR BONE MASS DENSITY, cancellous BMD [mg/cm²]

(57) Abstract: Disclosed is a screening method for developing a bone resorption inhibitor having a different mechanism of action from conventional bone resorption inhibitors, which relies on a novel mechanism. Specifically disclosed is a method for screening for a novel bone resorption inhibitor, which is characterized by detecting a substance capable of inhibiting the interaction between sphingosine-1-phosphate (S1P) and sphingosine-1-phosphate type-2 receptor (S1P₂). More specifically disclosed is a screening method comprising at least the steps of: A) confirming the influence of candidate substances on the interaction between S1P and S1P₂ and selecting a candidate substance capable of inhibiting the interaction between S1P and S1P₂; and B) confirming the influence of candidate substances on the migration ability of a cell and selecting a candidate substance which has been confirmed to enhance the migration ability.

(57) 要約: 本発明は、骨吸収抑制剤について、既存の薬剤とは異なる作用機序を有する薬剤を開発するための、新規メカニズムによるスクリーニング方法を提供する。スフィンゴシン1リン酸(S1P)とスフィンゴシン1リン酸受容体2型(S1P₂)との相互作用を阻害する物質を検出することを特徴とする、新規骨吸収抑制物質のスクリーニング方法による。具体的には、少なくともA)候補物質のS1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認し、S1PとS1P₂との相互作用を阻害する候補物質を選別する工程、及びB)候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認し、遊走能の増強が確認された物質を選別する工程を含むスクリーニング方法による。

WO 2011/058993 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：新規骨吸収抑制剤のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規メカニズムを有する骨吸収抑制剤のスクリーニング方法に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2009-260655号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 破骨細胞は骨を融解・吸収する生体内での唯一の細胞であり、骨を作る骨芽細胞と協調して骨の新陳代謝を担っている。

[0004] 骨組織は「骨芽細胞による骨新生」と「破骨細胞による骨吸収」のバランスによって恒常性が維持されている。破骨細胞の膜表面には分化や機能調節をつかさどる膜表面分子が存在している。破骨細胞は、血球系の単球・マクロファージ由来の細胞であり、破骨細胞前駆細胞が血中から骨表面に定着し、その場所で骨芽細胞からRANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) という分化因子による刺激を受けることにより破骨能を持った成熟破骨細胞に分化し、骨吸収が行われる (Nat Rev Genet. 2003 Aug;4(8):638-49. Review)。正の制御に関与するものとして、RANK (RANKLレセプター) とIL-1レセプター、及びインテグリン $\alpha_v\beta_3$ などが挙げられる。関節リウマチや閉経後骨粗鬆症などの骨吸収性疾患では、この破骨細胞の活性が増強している。

[0005] 骨粗鬆症の治療薬としては、骨量の減少を防止する薬剤として、ビタミンD3、ビタミンK2、イプリフラボンなどが使用されており、骨減少を防止し、骨量増加が期待される薬剤として、女性ホルモンの1種であるエストロゲンやエストロゲン受容体に作用する薬剤 (選択的エストロゲン受容体モジュレーター、通称SERM) などが使用されている。また、近年、最も効果が期待されている薬剤として破骨細胞を細胞死させて機能を抑えるビスホスホネート製剤が、これらの骨吸収性疾患の予防・治療薬として汎用されている。ビ

スホスホネート製剤は骨表面に接着し、これを破骨細胞が取り込むことによりアポトーシスが誘導されと考えられている。

- [0006] 骨関節疾患の予防及び改善薬として、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする薬剤が開示されている（特許文献１）。また、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする骨形成促進剤についても開示されている（特許文献２）。これらの文献では、スフィンゴシン骨格を有する化合物が骨芽細胞を活性化し、骨形成促進剤としての機能を有することが開示されている。
- [0007] スフィンゴシン１リン酸（以下、「S1P」という。）は、生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代表産物であり、血中に存在する脂質メディエーターの１種である。S1Pは、酵素などにより膜から切り出されて遊離した後に、細胞膜に発現しているGタンパク質共役受容体に結合することによって、細胞遊走などを引き起こす生理活性物質でもある。S1Pの受容体としてスフィンゴシン１リン酸受容体１型（S1P₁）～５型（S1P₅）の５種類のGタンパク質共役受容体が知られている。特にS1P₁とS1P₃は低分子量Gタンパク質の一種であるRacの活性を促進し、S1Pに対する正の走化性（chemo taxis）を誘導するといわれており、一方、S1P₂は走化性を抑制するといわれている。以降、走化性を遊走能という場合もある。
- [0008] またS1Pは、免疫システムでのリンパ球などの移動に重要であることも示されている。例えば、Tリンパ球がリンパ節内で抗原提示を受けて全身循環に戻っていくときに、S1P₁の発現が増強されることで、血中に戻っていくことができるようになる機構が知られている（Nat Rev Immunol. 2005 Jul;5(7):560-70. Review）。
- [0009] 破骨細胞前駆細胞に、S1P受容体のひとつであるS1P₁が発現していることを初めて見出したことに基づき、S1P₁の血中S1Pへの走化性により当該前駆細胞が血中へ再還流しうることを示唆する報告がある（特許文献３）。S1Pが破骨細胞前駆細胞の遊走能を刺激し、S1P₁とS1Pとの相互作用により当該前駆細胞が破骨細胞に成熟する前に骨表面から当該前駆細胞を引き離して破骨細胞に

成熟するのを阻止するというメカニズムによる。

[0010] 具体的には、破骨細胞前駆細胞に、RANKLを含む条件(RANKL(+))又は含まない条件(RANKL(-))で培養したところ、RANKL(-)でS1P₁及びS1P₂のmRNAが発現し、RANKL(+)ではS1P₁の発現が著明に減弱しており、S1P₂の発現が不変～軽度亢進していることが確認されている(特許文献3、図2A参照)。また、細胞の遊走能は、RANKL(-)の場合に増強することが確認されている(特許文献3、図2B参照)。さらに、S1P₁アゴニストであるSEW2871を加えて細胞の遊走能を調べたところ、SEW2871の添加により遊走能が増強することが確認されている(特許文献3、図3参照)。しかしながら、SEW2871による骨代謝に及ぼす影響までは確認していない。つまり、S1P₁を発現した破骨細胞前駆細胞が、血中S1Pへの走化性により血中へ再還流するというメカニズムについては示唆はあるものの、それにより、骨量に対して実際に影響を及ぼすことについては確認されていない。

[0011] S1P₁アゴニストとして公知のフィンゴリモド(Fingolimod: FTY720)を骨粗鬆症モデル動物に投与すると、骨量が増加したことについて報告がある(非特許文献1)。しかしながら、S1Pとの相互作用において、S1P₁以外のS1P受容体の作用についてはなんら言及されていない。

[0012] 従来公知のビスホスホネート製剤など破骨細胞の機能を抑制する薬剤は、有効ではあるが、骨量の減少を完全に抑制するには至っていない。現存の薬剤とは異なる作用機序を有する薬剤の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1: 特開2001-158736号公開公報

特許文献2: 特開2004-231616号公開公報

特許文献3: 特開2007-267665号公開公報

非特許文献

[0014] 特許文献1: Nature, Vol. 458, 26 March 2009, 524-528

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0015] 本発明は、骨吸収抑制剤について、現存の薬剤とは異なる作用機序を有する薬剤を開発するための、新規メカニズムによるスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0016] 本発明者らは上記課題を解決するために、S1PやCXCL12 (C-X-C motif ligand 12)、CX₃CL1 (C-X₃-C motif ligand 1)等のケモカインが破骨細胞前駆細胞の遊走能を刺激することに着目し、鋭意検討を重ねた結果、S1P受容体のひとつであるS1P₂を調節することで、破骨細胞前駆細胞の遊走能に影響を及ぼし、当該前駆細胞が破骨細胞に成熟する前に骨表面から当該前駆細胞を引き離して破骨細胞に成熟するのを阻止し、骨量を変化させうることを初めて見出し、本発明を完成した。

- [0017] すなわち、本発明は以下よりなる。

1. スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) とスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 型 (S1P₂) との相互作用を阻害しうる物質を検出することを特徴とする、新規骨吸収抑制物質のスクリーニング方法。

2. 少なくとも以下の A) 及び B) の工程を含むことを特徴とする前項 1 に記載のスクリーニング方法：

A) 候補物質のS1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認し、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程；

B) 候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認し、遊走能の増強が確認された物質を選別する工程。

3. 以下の工程を含む前項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法：

1) 試験系に候補物質を添加し、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；

2) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程；

3) 前記工程により選別された候補物質を、S1Pを含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；

4) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された物質をさらに選別する工程。

4. 以下の工程を含む前項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法：

1) 候補物質をS1Pを含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；

2) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された候補物質を選別する工程；

3) 試験系に前記工程により選別された候補物質を添加し、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；

4) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質をさらに選別する工程。

5. S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認する工程が、S1P₂活性又はS1P₂発現量を確認する工程による、前項 2～4 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。

6. スクリーニング方法に用いる細胞が、少なくともS1P₁及びS1P₂を発現している細胞である、前項 2～5 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。

7. スクリーニング方法に用いる細胞が、破骨細胞前駆細胞である、前項 2～6 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。

8. S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質を有効成分とする、新規骨吸収抑制剤。

9. S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質が、破骨細胞前駆細胞の遊走能を増強しうる物質である、前項 8 に記載の新規骨吸収抑制剤。

10. S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質が、S1P₂アンタゴニスト、抗S1P₂抗体又はS1P₂発現抑制剤である、前項 8 又は 9 に記載の新規骨吸収抑制剤。

発明の効果

[0018] 本発明のスクリーニング方法により、現存の骨吸収抑制剤とは異なる作用機序を有する薬剤を開発するための、新規メカニズムによるスクリーニング

を行うことができる。具体的には、S1PとS1P₂との相互作用並び破骨細胞前駆細胞の遊走能に及ぼす効果に基づく新規骨吸収抑制物質を選別しうるスクリーニングを行うことができる。従来公知のビスホスホネート製剤は骨表面で成熟破骨細胞をアポトーシスさせる作用によるものであり、成熟破骨細胞の機能を抑制する薬剤である。一方、本発明のスクリーニング方法により選別される薬剤は、成熟した破骨細胞の前段階である破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決めを標的としている点において、極めて優れている。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]破骨細胞による骨吸収メカニズム及び破骨細胞前駆細胞の血中への再還流メカニズムを示す図である。

[図2]破骨細胞前駆細胞の培養系にRANKLを含む条件(RANKL(+))又は含まない条件(RANKL(-))で、各濃度のS1Pを加えて培養したときの、各種S1P受容体の発現を確認した写真図である。(参考例1)

[図3]破骨細胞前駆細胞の培養系にRANKL(+)又はRANKL(-)で、各濃度のS1Pを加えて培養したときの、S1Pに対する細胞の遊走能を示す図である。(参考例1)

[図4]RAW264.7細胞の培養系に、RANKL(-)で、百日咳毒素(PTX: Pertussis toxin)を含む条件(PTX(+))又は含まない条件(PTX(-))で各濃度のS1Pを加えて培養したときの、S1Pに対する破骨細胞前駆細胞の遊走能を示す図である。(参考例1)

[図5]破骨細胞前駆細胞内でのRacの活性化について確認した写真図である。(参考例1)

[図6]骨粗鬆症モデルマウスにS1P₁アゴニスト(FTY720)を作用させたときの、骨量の変化を示す写真図である。(参考例2)

[図7]骨粗鬆症モデルマウスにS1P₂アンタゴニスト(JTE013)を作用させたときの、骨量の変化を示す図である。(実施例1)

[図8]生体多光子励起イメージングを用いた破骨細胞前駆細胞の動態解析結果を示す写真図である。(実施例2)

[図9] 生体多光子励起イメージングを用いた細胞速度の解析結果を示す図である。（実施例2）

[図10] S1P₂遺伝子欠損マウス及び野生型マウスを用いて、S1P₂の単球系細胞（破骨細胞前駆細胞）及びTリンパ球の遊走に及ぼす役割について検討した結果を示す図である。（実施例3）

[図11] S1P₂遺伝子欠損マウス及び野生型マウスの骨の組織形態を示す写真図である。（実施例4）

[図12] S1P₂遺伝子欠損マウス及び野生型マウスの骨の組織形態学的解析結果を示す図である。（実施例4）

[図13] S1P₂遺伝子欠損マウス及び野生型マウスについて、骨吸収を促進させるためのRANKL投与群、RANKLに加えJTE013を投与した群及び対照(PBS)群の3種類を作製し、それぞれの骨の組織形態学的解析結果を示す図である。（実施例4）

[図14] 骨粗鬆症モデルマウスにS1P₂アンタゴニスト(JTE013)を投与した場合の骨の組織形態学的解析結果を示す図である。（実施例5）

発明を実施するための形態

[0020] 本発明を説明するにあたり、本発明を完成するに至った経緯をまず詳述する。

[0021] S1PやCXCL12 (C-X-C motif ligand 12)、CX₃CL1 (C-X₃-C motif ligand 1)等のケモカインは破骨細胞前駆細胞の遊走を刺激し、当該前駆細胞に発現したS1P₁と血中S1Pとが相互作用することにより、破骨細胞前駆細胞の一部は破骨細胞へ成熟することなく血中へ再還流される（図1参照）。

[0022] 破骨細胞前駆細胞に発現したS1P₁と血中S1Pとが相互作用することによる細胞の遊走能を確認するために、破骨細胞前駆細胞由来細胞(RAW264.7)及び骨髓由来破骨細胞前駆細胞(BM-MDM : bone marrow-derived M-CSF dependent monocytes)細胞をRANKLを含む条件(RANKL(+))又は含まない条件(RANKL(-))で培養し、各培養系に各濃度のS1Pを加えて、ポイデンチェンバー法により細胞の遊走能を調べた。その結果、RANKL(-)ではS1P濃度により遊走能に顕著な違

いが認められた。また、RANKL(+)ではRANKL(-)に比べて遊走能は低いものの、添加したS1P濃度により遊走能に違いが認められた(図3参照)。

[0023] さらに、RAW264.7細胞をGタンパク質共役受容体に対して阻害活性を有する百日咳毒素(PTX: Pertussis toxin)を含む条件(PTX(+))又は含まない条件(PTX(-))で培養し、各濃度のS1Pを加えて、ボイデンチェンバー法により細胞の遊走能を調べた。その結果、PTX(-)ではS1P濃度により遊走能に顕著な違いが認められた。一方、PTX(+)ではPTX(-)に比べて細胞の遊走能は低く、添加したS1P濃度が低い方がやや細胞の遊走能が高い傾向が認められた(図4参照)。背景技術の欄でも説明したように、S1Pは細胞膜に発現しているGタンパク質共役受容体(S1P受容体)に結合することによって、細胞遊走などを引き起こす生理活性物質でもある。Gタンパク質共役受容体に対して阻害活性を有するPTXを添加した場合、S1Pを加えた系でも遊走能が抑制されていることから、破骨細胞前駆細胞はS1PとGタンパク質共役受容体との相互作用において、遊走能を有することが確認された。

[0024] 上記により、破骨細胞前駆細胞に発現したS1P₁と血中S1Pとが相互作用することによる細胞の遊走能が確認された。また、特許文献3により、S1P₁アゴニストが細胞の遊走能をさらに増強させることが確認されたことに基づき、S1P₁アゴニストの一種であるFTY720について、実際に骨代謝に及ぼす影響を確認した。卵巣摘出により作製した骨粗鬆症モデルマウスに、FTY720を3mg/kg/dayで4週間腹腔内投与を行なった結果、FTY720を投与しない系に比べて明らかに骨代謝が改善することが確認された(図6参照)。このことより、破骨細胞前駆細胞の遊走能が増強されると、骨代謝も改善されることが示唆された。

[0025] ここで、S1P₁アゴニストとして、例えばSEW2871 (5-(4-Phenyl-5-trifluoromethylthiophen-2-yl)-3-(3-trifluoromethylphenyl)-1,2,4-oxadiazole)、KRP-203 (2-amino-2-[2-[4-(3-benzyloxyphenylthio)-2-chlorophenyl]ethyl]-1,3-propanediol hydrochloride)、FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride) 及びこれらの誘導体等が例示さ

れる。FTY720は、冬虫夏草の一種である*lasaria sinclairii*菌が産生するミリオシン (myriocin) をリード化合物として、化学修飾により創製された化合物である。細胞傷害を引き起こすT細胞に直接作用することが特徴で、既存の薬剤もしくは既存の免疫抑制剤と併用することで、臓器移植の拒絶反応抑制や自己免疫疾患などの治療薬になると期待されている。KRP-203は、FTY720と同様に、拒絶反応を抑える免疫抑制剤として使用可能であることが報告されている (Shimizu et al., Circulation 2005、Takahashi et al., Transplant Proc 2005)。

- [0026] ここで、上述の細胞培養系に各濃度のS1Pを添加した場合における、S1P添加濃度と細胞の遊走能との関係をさらに検討した。図3の結果より、S1P添加濃度が高い場合に、却って遊走能が低下している傾向が認められた。また、S1P₁はS1P₂に比べて、S1Pに対する結合能が高く、このため低濃度のS1P存在下では、S1P₁のみが作用して正の走化性を示すのに対し、高濃度のS1P存在下では、S1P₂にも作用することにより、走化性が阻害されと考えられる。
- [0027] そこで、本発明において、破骨細胞前駆細胞のモデル細胞であるRAW264.7にS1P₁ siRNA又はS1P₂ siRNAを作用させた場合の細胞の遊走能に及ぼす影響について初めて確認した。その結果、S1P₂ siRNAを作用させた場合は、S1P₁ siRNAを作用させた場合に比べて遊走能が増強していることが観察された。このことより、S1P₂を抑制することで、細胞の遊走能を増強しうることが示唆された。
- [0028] 上記の知見に基づき、本発明の新規骨吸収抑制物質のスクリーニング方法を完成した。以下、本発明の内容を詳細に説明する。
- [0029] 本発明は、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質を検出することを特徴とする、新規骨吸収抑制物質のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング方法では、新規骨吸収抑制物質の候補物質について、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認することを要する。ここで、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響とは、S1PとS1P₂との相互作用を阻害することをいう。このような影響を確認するために、具体的にはS1P₂活性又はS1P₂発現を確認する

ことが必要である。さらに、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質が、破骨細胞前駆細胞の遊走能を増強しうることを確認することも必要である。

[0030] 従って、本発明のスクリーニング方法では、少なくとも以下のA)及びB)の工程を含むことが必要である。

A) 候補物質のS1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認し、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程。

B) 候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認し、遊走能の増強が確認された物質を選別する工程。

[0031] 上記において、これら2種の工程の順序は特に限定されず、いずれが先であっても良いが、好ましくはA)の工程で選別された物質について、さらにB)の工程で選別するのが好適である。より具体的には、以下の1.又は2.の方法により、スクリーニングすることができる。

[0032] 1. A)の工程の後、B)の工程を行なうスクリーニング方法：

- 1) 試験系に候補物質を添加し、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；
- 2) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程；
- 3) 前記工程により選別された候補物質を、S1Pを含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；
- 4) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された物質をさらに選別する工程。

[0033] 2. B)の工程の後、A)の工程を行なうスクリーニング方法：

- 1) 候補物質をS1Pを含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；
- 2) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された候補物質を選別する工程；
- 3) 試験系に前記工程により選別された候補物質を添加し、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；
- 4) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1PとS1P₂との相互

作用を阻害しうる物質をさらに選別する工程。

- [0034] 本発明のスクリーニング方法において、A) S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる候補物質を選別するためのS1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響の確認は、S1P₂活性又はS1P₂発現量を確認する試験系によることができる。
- [0035] 本発明のスクリーニング方法において、S1P₂活性を確認する方法としては、自体公知の方法又は今後開発される方法を採用することができ、特に限定されない。例えばS1P₂（受容体＝膜タンパク質）を組み込んだ担体と標識されたS1Pとの結合を測定する試験系において、候補物質を添加して、S1P₂担体と標識化S1Pの結合の阻害を観察する方法や、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した、タンパク質間相互作用、脂質－タンパク質間相互作用測定装置を用いてS1Pを結合させた基盤に対し、S1P₂ミセルを添加して結合を見る測定系による方法などを適用することができる。具体的には、S1P₂を組み込んだ擬似的な脂質ミセルを作製し、これに³²P（ラジオアイソトープ）で標識したS1Pとの結合能を測定する系において、S1P₂ミセルとS1P（³²P）の結合が阻害されるかを観察する方法が挙げられる。また、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したタンパク質間相互作用、脂質－タンパク質間相互作用測定装置を用いる方法では、市販されている自体公知の装置、例えば商品名BIAcore装置を用いることができる。また候補物質が、S1P₂抗原を阻害しうる物質、例えば抗S1P₂抗体の場合には、単にS1P₂と候補物質の抗原抗体反応を確認する方法であっても良い。具体的には、免疫クロマトグラフィー、ELISA法によることができる。
- [0036] 本発明のスクリーニング方法において、S1P₂発現量を確認する方法としては自体公知の方法によることができる。例えば、mRNAの発現量を確認する方法としては、リアルタイムPCRによることができ、発現したタンパク質を確認する方法としては、例えばウェスタンブロット（Western blot）法やフローサイトメトリー法によることができる。フローサイトメトリー法による解析は、自体公知のフローサイトメーター、例えば商品名FACSCanto装置により解析することができる。ハイスループットスクリーニングとして適しているのは、表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した測定方法や、フローサイトメトリー法

による測定方法が挙げられる。

[0037] 本発明のスクリーニング方法のうち、S1PとS1P₂との相互作用に及ぼす影響の確認工程で使用可能な細胞は、少なくともS1P₁とS1P₂が発現している細胞、又はS1P₁・S1P₂を強制発現させた細胞を使用することができる。このような細胞としては、好ましくは破骨細胞前駆細胞であり、スクリーニング系に使用するために株化され、入手可能な細胞であることが好ましい。具体的にはRAW 264.7細胞、MOC-5細胞、BM2細胞、HL-60細胞、又はS1P₂を強制発現させたNIH 3T3やHEK293細胞などが挙げられ、好ましくはRAW264.7細胞、MOC-5細胞であり、最も好ましくはRAW264.7細胞である。

[0038] 本発明のスクリーニング方法において、B) 候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響の確認は、候補物質とS1Pを含む系で細胞を培養し、候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認することにより達成することができる。この場合に添加するS1P濃度は、試験系において使用する細胞数及び候補物質との関係で適宜決定することができるが、具体的には10⁻⁹ M以上の濃度が好ましく、好適には10⁻⁸ M以上、特に好ましくは10⁻⁷ M以上である。また、添加するS1P濃度の上限は特に限定されないが、培養液に溶解しうる濃度が好ましく、例えば10⁻⁶ M以下であることが好ましい。

[0039] 本発明のスクリーニング方法で使用する遊走能の測定は、自体公知の方法により行うことができる。具体的には、細胞遊走能測定技術として公知のボイデンチェンバー法、ジグモンドチェンバー法やその変法を採用することができる。さらに、今後開発される新たな細胞遊走能測定技術を採用することもできる。具体的には、多数の孔を有するメンブレンにより遮断された上室に細胞を加え、下段に走化性因子を加え、一定時間反応させると、走化性因子に対して遊走活性を示す細胞は、メンブレンの孔を通過して下室に落ちるか、又はメンブレンの裏側に接着する。その落下した細胞を直接計測するか、又はメンブレンに接着した細胞を固定・染色後に一定面積内の細胞を計測することにより、遊走能を判定することができる。チェンバーをマルチウェルとすることにより、多くの試料を処理することができる。例えば、Neuro P

robe社製のケモタキシスチェンバーが市販されており、利用することができる。

[0040] より具体的には、次の方法によりスクリーニングすることができる。

上述の破骨細胞前駆細胞を、細胞増殖に必要な培地を用いて2～7日間培養容器内で培養する。得られた細胞を、常法に従って培養容器から単離し、細胞の維持に必要な培地に懸濁し、細胞浮遊液を調製する。細胞浮遊液中の細胞の濃度は、遊走能の測定方法に従い適宜決定することができる。

[0041] 例えば、Neuro Probe社製のケモタキシスチェンバーを用いる場合について説明するが、これらに制限されるものではない。ケモタキシスチェンバーの下段には適当な濃度の候補物質を含む溶液を満たし、メンブレンをセットし、さらに上段に上記得られた細胞浮遊液を加えて、適当な時間培養する。培養時間は、細胞の種類、細胞数、候補物質の濃度等により適宜決定することができる。培養後、メンブレンをチェンバーから取り外し、その後メンブレンに付着している細胞を固定し、染色する。その後、上室に接していた面の細胞をふき取り風乾したのち、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することにより、候補物質による細胞の遊走能を測定し、評価することができる。

[0042] 本発明のスクリーニング方法のうち、遊走能に及ぼす影響の確認工程で、候補物質とS1Pを含む系で細胞を培養し、候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認する場合に使用可能な細胞は、少なくともS1P₁とS1P₂が発現している細胞、又はS1P₁とS1P₂を強制発現させた細胞であることが必要である。発現しているS1P₁とS1Pとの相互作用による細胞の遊走能を確認することが必要だからである。このような細胞としては、好ましくは破骨細胞前駆細胞であり、スクリーニング系に使用するために株化され、入手可能な細胞であることが好ましい。具体的にはRAW264.7細胞、MOCp-5細胞、BM2細胞、HL-60細胞、又はS1P₂を強制発現させたNIH3T3やHEK293細胞などが挙げられ、好ましくはRAW264.7細胞、MOCp-5細胞であり、最も好ましくはRAW264.7細胞である。

[0043] また、本発明のスクリーニング方法により選抜された候補物質の機能的効

果は、S1P₁発現細胞、好ましくはS1P₁及びS1P₂を発現している細胞に候補物質とS1Pを加えて培養し、細胞のS1Pに対する遊走能を測定することにより確認することができる。さらには、S1P₁発現細胞、好ましくはS1P₁及びS1P₂を発現している細胞に、候補物質とS1Pを加えて培養し、細胞内での低分子量Gタンパク質の一種であるRacの活性化を測定することでも確認可能である。RacはS1P₁の刺激により活性化し、この作用によりS1Pに対して細胞が遊走能を示すからである。効果の確認に用いる細胞は、スクリーニングに使用可能な細胞を使用することができる。

- [0044] 本発明は、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質を有効成分とする、新規骨吸収抑制剤にも及ぶ。ここにおいて、S1PとS1P₂との相互作用を阻害しうる物質は、破骨細胞前駆細胞の遊走能を増強しうる物質である。そのような物質としては、S1P₂アンタゴニスト、抗S1P₂抗体又はS1P₂発現抑制剤が挙げられる。S1P₂アンタゴニストとして公知の化合物はJTE013であるが、本発明のスクリーニング方法により選別される新規S1P₂アンタゴニストであってもよい。また、抗S1P₂抗体は、自体公知の方法、例えばハイブリドーマから得たモノクローナル抗体、若しくは遺伝子組換えにより作製するモノクローナル抗体であっても良い。S1P₂発現抑制剤としては、スクリーニング方法により選別される新規S1P₂発現抑制剤であっても良いし、siRNAやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどであっても良い。

実施例

- [0045] 以下に、本発明を完成させるために行なった実験結果を参考例として示し、実施例において本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。
- [0046] (参考例1) 破骨細胞前駆細胞とS1Pとの作用について

1) S1Pの受容体発現の確認

破骨細胞前駆細胞由来細胞(RAW264.7)又は骨髓由来破骨細胞前駆細胞(BM-MDM)について、S1P₁～S1P₅及びインテグリン α_v のmRNA発現を確認した。mRNAの

発現確認のため、対照としてGAPDHについても調べた。

- [0047] RAW264.7細胞又はBM-MDM細胞を、培地として α MEM (Minimal Essential Medium) に10%熱非働化ウシ胎児血清 (以下、「FCS」) とペニシリン/ストレプトマイシンを加えたものを用いて、RANKLを含まない系(RANKL(-))及び終濃度50ng/mlのRANKLを添加した系(RANKL(+))で37°C、3日間培養した。この細胞をセルスクレーパーを用いて単離して集め、該細胞からフェノール・クロロホルム抽出によりRNAを抽出し、これを基にして逆転写酵素によりcDNAを作製した。これを鋳型として各種遺伝子(S1P₁~S1P₅、インテグリン α_v 、GAPDH)に特異的なプライマーを用いてPCR反応を行った。PCRに用いたプライマー及びPCRの条件は、特許文献3の記載に従った。
- [0048] 得られたPCR産物を電気泳動用ローディングバッファー(10×loading buffer (タカラバイオ製))と混合し、2%アガロースゲルにて100V・20分の電気泳動を行い、目的とする遺伝子の発現を確認した。
- [0049] その結果を図2に示した。破骨細胞前駆細胞においては、RANKL(-)では、S1P₁及びS1P₂のmRNAが発現していることが確認された。一方、RANKL(+)の系では、S1P₁の発現が著明に減弱しており、S1P₂の発現が不変~軽度亢進していることが確認された。また、S1P₃~S1P₅の発現は見られなかった。
- [0050] なお、破骨細胞前駆細胞及び破骨細胞に発現し、RANKLにてその発現が亢進することが知られているインテグリン α_v については、RANKL(+)の系で発現増強が見られた。これより、本試験系において破骨細胞前駆細胞はRANKLにより分化誘導シグナルを受けていることが確認された。また、GAPDHの結果より、RANKL(+)(-)の系で全mRNAレベルに変化がない(またはその抽出過程での変化もない)ことを確認した。図2において、RTは逆転写反応を意味し、RT(+)は逆転写反応を行ったもの、RT(-)は逆転写反応を行わなかったもの意味する。RT(-)はmRNAを抽出する際に、ゲノムのDNAがコンタミネーションしていないことを確認するためのネガティブ・コントロールである。
- [0051] 2) 破骨細胞前駆細胞のS1Pに対する遊走能の確認

上記1)と同様に、RANKL(+)又は(-)の系で37°C、3日間培養したRAW264.7

細胞又はBM-MDM細胞をセルスクレーパー及び0.025%トリプシン-EDTAを用いて単離した。96ウェル・ケモタキシスチェンバー(Neuro Probe社製)にフィブロネクチンでコートしたポリカーボン製メンブレンフィルターをセットし、下段にはS1Pの終濃度が0, 10^{-10} ~ 10^{-7} Mとなるように調製したS1P含有培地を加えた。上段には単離したRAW264.7細胞又はBM-MDM細胞を、1ウェルあたり 3×10^5 個加え、CO₂インキュベーターにて37°C、5時間培養した。その後、メンブレンフィルターを取り出してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、プレートリーダーを用いて吸光度を測定し、遊走によりメンブレンフィルターへ移動した細胞の数を定量した。

[0052] その結果in vitroの試験系で、RANKL(-)、即ちRANKLにより分化誘導されていない破骨細胞前駆細胞がS1Pに対する遊走能を示すことが確認された(図3 a b)。また、RAW264.7細胞ではS1Pの終濃度が 10^{-9} ~ 10^{-8} Mの場合に遊走能が最も高く、 10^{-7} Mの場合はやや低下した(図3 a)。BM-MDM細胞ではS1Pの濃度依存的に遊走能も増強した(図3 b)。

[0053] 3) 破骨細胞前駆細胞のS1Pに対する遊走能の確認

RANKL(-)の条件で、PTX(+)又は(-)の系で37°C、3日間培養したRAW264.7細胞を上記2)と同手法にてメンブレンフィルターをセットし、下段にはS1Pの終濃度が0, 10^{-12} ~ 10^{-5} Mとなるように調製したS1P含有培地を加えた。上記2)と同手法にて上段には単離したRAW264.7細胞を加え、培養後、メンブレンフィルターを取り出してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、プレートリーダーを用いて吸光度を測定し、遊走によりメンブレンフィルターへ移動した細胞の数を定量した。

[0054] その結果を図4に示した。in vitroの試験系で、PTX(+)の系で、破骨細胞前駆細胞のS1Pに対する遊走能の阻害が確認された。

[0055] 4) 破骨細胞前駆細胞内でのRacの活性化の確認

上記2)及び3)と同様に、RANKL(-)の条件で、37°C、3日間培養したRAW264.7を、S1Pの終濃度が0, 10^{-8} ~ 10^{-6} Mとなるように調製したS1P含有培地を用いてさらに3時間培養した。該RAW264.7細胞をセルスクレーパーを用いて単離

し、遠心分離により細胞を沈殿させた。沈殿した細胞をタンパク質抽出用緩衝液（150 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 1 mM PMSF, プロテアーゼ阻害剤カクテル）を用いて再懸濁し、これを超音波破砕器で処理し、高速微量遠心分離により不溶解物を除去したものをRac活性測定用の試料とした。

[0056] 上記により得た試料の1/100量を分離し、試料 1（Rac(1/100)）とした。残りの試料に、グルタチオン・セファロース（ビーズ）に固着させた「活性型（GTP結合型）Rac結合ドメインタンパク質（大腸菌で発現・精製）」を添加し、プルダウン・アッセイ法（標準的プロトコールに従う）によりこれに結合するタンパク質を単離し、試料 2（GTP-Rac）とした。

[0057] 試料 1 及び試料 2 について、15%アクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行った。電気泳動終了後、PVDF膜へトランスファーした後に、抗Rac抗体（Upstate Biotechnology社製）を用いてウェスタン・ブロッティングを行い、膜上でのRacタンパク質の同定を行った。この方法により、破骨細胞前駆細胞での総Rac量（Rac(1/100)）、及び活性型（GTP結合型）Rac量（GTP-Rac）のそれぞれを調べた。

[0058] その結果を図 5 に示した。S1Pの添加により、細胞内での総Rac量（Rac(1/100)）には変化がないのに対し、遊走能に重要な活性型Rac量（GTP-Rac）が増加していることが認められた。この結果は、S1Pによる刺激により破骨細胞前駆細胞内でRacの活性化が見られることを意味している。

[0059] 5) 結果

破骨細胞前駆細胞にS1Pの受容体（S1P₁及びS1P₂）が発現していることが確認された。また、RANKLの刺激により破骨細胞前駆細胞が成熟破骨細胞に分化すると、S1P₁の発現が低下することが確認された（図 2）。in vitroの試験系で、破骨細胞前駆細胞が実際にS1Pに対する遊走能を示すことが確認された（図 3, 4）。さらに、細胞の遊走に重要なRacの活性化が破骨細胞前駆細胞内で起こっていることが確認された（図 5）。

[0060] （参考例 2）骨粗鬆症モデルマウスにFTY720（S1P₁アゴニスト）を投与した場

合の骨代謝に及ぼす影響

1) 実験方法

8～12週齢のC57BL/6マウス（雌性）の卵巢を麻酔下で摘出した骨粗鬆症モデルマウスを用いて、FTY720（ $S1P_1$ アゴニスト）を投与した場合の骨代謝に及ぼす影響を確認した。卵巢摘出手術を行った骨粗鬆症モデルマウス及び偽手術を行った健常マウス（sham-operated）を作製した。健常マウス（sham-operated）群及び骨粗鬆症モデルマウス群について、FTY720投与群及び対照群（vehicle）に分類した。FTY720投与群では、卵巢摘出翌日若しくは偽手術翌日より、FTY720を3 mg/kgを毎日1度ずつ4週間連続して腹腔内投与した。各群5匹のマウスを用いた。4週間後に屠殺し、大腿骨の断面を観察した。

[0061] 2) 結果

上記の結果、骨粗鬆症モデルマウス群では、対照群に比べてFTY720投与群の方が、明らかに骨密度が増加し、骨代謝が行なわれていることが観察された。一方、健常マウス群においては、骨密度に違いは殆ど認められなかった。このことより、 $S1P_1$ アゴニストであるFTY720の投与により、骨粗鬆症モデルの場合は、骨密度が改善したのに対し、健常マウスでは健常な骨密度を維持し、骨密度を異常に上昇させることはなかった（図6参照）。

[0062] （実施例1）骨粗鬆症モデルマウスにJTE013（ $S1P_2$ アンタゴニスト）を投与した場合の骨代謝に及ぼす影響

1) 実験方法

参考例2と同手法により作製した骨粗鬆症モデルマウスを用いて、 $S1P_2$ アンタゴニストであるJTE013を投与した場合の骨代謝に及ぼす影響を確認した。JTE013は、vehicle（5% DMSO含有、脂肪酸を含まない3% BSA含有PBS）で溶解した。実験は、健常マウス（sham-operated）群及び骨粗鬆症モデルマウス群を準備し、各マウス群について、JTE013投与群及びvehicleを投与した対照群（vehicle）に分類した。JTE013投与群では、卵巢摘出翌日若しくは偽手術翌日より、JTE013を1 mg/kgを毎日1度ずつ4週間連続して腹腔内投与した。各群5匹のマウスを用いた。4週間後に屠殺し、大腿骨の断面を観察し、骨重量を測定し

た。以下の実施例において、特に説明する場合を除き、本実施例と同様に、JTE013はvehicleで溶解し、対照群を、「対照 (vehicle)」と示す。

[0063] 2) 結果

上記の結果、骨粗鬆症モデルマウス群では、対照群に比べてJTE013投与群の方が、明らかに骨密度が増加し、骨代謝が行なわれていることが観察された。一方、健常マウス群においては、骨密度に違いは殆ど認められなかった。このことより、S1P₂アンタゴニストであるJTE013の投与により、骨粗鬆症モデルの場合は骨密度が改善したのに対し、健常マウスでは健常な骨密度を維持し、必要以上に骨密度を上昇させることはなかった（図7 A, B参照）。

[0064] (実施例2) 生体多光子励起イメージングを用いた破骨細胞前駆細胞の動態解析とS1P₂アンタゴニストの薬理効果の検討

破骨細胞前駆細胞を含む骨髓内単球系細胞が緑色蛍光 (GFP) にて標識されたマウス (CX3CR1-EGFPノックインマウス) の生きた骨髓内を、生体多光子励起蛍光イメージングにより可視化し、これにS1P₂アンタゴニストであるJTE013を投与した場合の、破骨細胞前駆細胞の血中への再灌流効果について確認した。

[0065] その結果、骨髓内での破骨細胞前駆細胞を含む単球系細胞は定常状態ではほとんどが静止しているが（図8、上段）、JTE013の投与により、対照に比べて動きが大きくなり、より多くの細胞が血中に再灌流されることが確認された（図8、下段）。実際に細胞速度の解析結果からも、JTE013投与群の方が、対照群 (vehicle) に比べて細胞の動きが速くなっていることが観察された（図9）。これらは独立した6回の実験で確認されており、速度の解析の際には、JTE013投与群で237個、対照 (vehicle) で252個の細胞から速度を算出し、unpaired t-testにて統計的有意差を検定した。

[0066] (実施例3) 破骨細胞前駆細胞の遊走制御におけるS1P₂の役割の解明と、S1P₂アンタゴニストの薬理効果の評価

S1P₂遺伝子欠損マウス (S1P₂^{-/-}) 及び野生型マウス (WT) を用いて、S1P₂が単球系細胞 (破骨細胞前駆細胞) 及びTリンパ球の遊走に及ぼす役割について

検討した。なお、S1P₂遺伝子欠損マウス (S1P₂^{-/-}) は、米国国立衛生研究所より分与された。

[0067] S1P₂遺伝子欠損マウス (S1P₂^{-/-}) 及び野生型マウス (WT) から末梢血を採取し、その中の単球系細胞 (Mo, CD11b⁺) 及びTリンパ球 (T, CD3⁺) の各分画数を計測した。またこの際、S1P₂アンタゴニストであるJTE013の薬理効果について検討するため、末梢血採取前にJTE013を投与した群 (J) と対照 (vehicle) (C) を作製し、各群から細胞を回収した。各分画数の計数のために、細胞を抗CD11b抗体 (FITC標識) と抗CD3抗体 (PE標識) で染色し、フローサイトメトリ (BD FACS Canto™ II (BD Biosciences社) など) において細胞数を算出した。この結果、S1P₂を発現しないTリンパ球 (T) では、WTやS1P₂^{-/-}、CやJ間で細胞数に変化がないのに対し (図 10、左側)、CD11b陽性の単球系細胞 (Mo) はS1P₂^{-/-}で有意に増加していることが確認された (図 10、右側)。これは単球系細胞がS1P₁作用により骨髓から末梢血中に再還流するのをS1P₂が阻害しており、S1P₂の欠損によりS1P₁作用が増強し血中への流出が増加していることを表している。

[0068] またJTE013投与により血中のCD11b陽性細胞数は増加しているが、この効果はS1P₂^{-/-}では見られない。JTE013がS1P₂を阻害するため単球の末梢血への流出が増加すると考えられるが、この効果はS1P₂遺伝子欠損マウスでは見られないことから、JTE013の効果が確かにS1P₂を介したものであることを示している。これらは独立した3回以上の実験で確認された。

[0069] (実施例 4) S1P₂遺伝子欠損マウスにおける骨組織の解析

S1P₂の骨代謝調節に対する機能を解析するため、実施例 3 で使用したS1P₂遺伝子欠損マウス (S1P₂^{-/-}) 及び野生型マウス (WT) について、骨の組織形態学的解析を行った (各 3 匹ずつ)。この結果、S1P₂^{-/-}ではWTに比べて、骨量が有意に増加していることが確認された (図 11、12)。図 11 では各骨組織のCT画像 (上段) 及び顕微鏡組織像 (下段) を示す。図 12 では、図 11 で取得した画像データを元に、数値パラメータを計測したものを示す。各パラメータは以下を示す。

- [0070] 骨密度 : BV/TV (Bone Volume Fraction) (%)、
骨梁幅 : Tb.Th (Trabecular Thickness) (mm)、
骨梁数 : Tb.N (Trabecular Number) (1/mm)、
骨芽接着細胞面 % : ObS/BS (%) (osteoblast surface/bone surface)、
骨吸収面 % : (ES/BS) eroded surface/bone surface (≡破骨細胞接着面)
- [0071] 結果としては、S1P₂^{-/-}ではWTに比べて骨密度（及び骨梁幅・骨梁数）が有意に増加しており、骨芽細胞接着面には有意な変化が見られないものの、骨吸収面（破骨細胞接着面）が有意に低下していることから、S1P₂^{-/-}による骨密度の増加は破骨細胞の接着・骨吸収機能の低下による（骨芽細胞の機能亢進ではなく）と判断される。これは、S1P₂が破骨細胞前駆細胞の骨組織への流入を促している（骨から血中への再還流を阻害している）ことと対応する結果である。
- [0072] 次に、S1P₂遺伝子欠損マウス（S1P₂^{-/-}）及び野生型マウス（WT）について、骨吸収を促進させるためのRANKL投与群、RANKLに加えJTE013を投与した群及び対照（PBS）群の3種類を作製し、それぞれの骨組織を解析した（図13）。RANKLは、PBSで溶解し、JTE013は、vehicle（5% DMSO含有、脂肪酸を含まない3% BSA含有PBS）で溶解した。RANKLは2 mg/kgを、JTE013は3 mg/kgをそれぞれ2日連続で腹腔内に投与し、その翌日にマウスを屠殺し、骨組織を回収・解析した。実験においては各群につき3匹ずつのマウスを使用した。
- [0073] この結果、WTでのRANKL投与群では、骨吸収面が増加し骨密度が低下したのに対し、RANKLに加えてJTE013を投与した群ではこれがいずれも抑制されており、JTE013が骨吸収抑制効果を示すことが確認された（図13、上段）。一方、S1P₂^{-/-}では図11、12で示したと同様に、ベースの骨密度が高いが、RANKL投与で骨密度が低下するものの、JTE013では回復が見られなかった。これはJTE013の効果が、確かにS1P₂を介したものであることを示すものである（図13、下段）。
- [0074] （実施例5）骨粗鬆症モデルマウスにS1P₂アンタゴニスト投与した場合の骨組織の解析

参考例 2 と同手法により作製した骨粗鬆症モデルマウスを用いて、S1P₂アンタゴニストとしてJTE013を投与した場合の骨組織に及ぼす影響を確認した。実験は、健常マウス(sham-operated, Sham) 群及び骨粗鬆症モデルマウス群(OVX)を準備し、各マウス群について、JTE013投与群(JTE) 及び対照(vehicle)に分類した。

[0075] JTE013投与群では、卵巣摘出翌日若しくは偽手術翌日より、JTE013を3 mg/kgを毎日1度ずつ4週間連続して腹腔内投与した。各群5匹のマウスを用いた。4週間後に屠殺し、大腿骨の断面を観察し、骨密度を測定した。各パラメータは、実施例 4 と同様である。

[0076] 上記の結果、骨粗鬆症モデルマウス群では対照群に比べてJTE013投与群の方が、明らかに骨密度 (BV/TV)、骨梁幅(Tb. Th)が増加することが観察された。一方、健常マウス群においては、対照群に比べてJTE013投与群による骨密度、骨量幅の増加の程度は、骨粗鬆症モデルマウス群に比べて低かった。このことより、S1P₂アンタゴニストであるJTE013の投与により、骨粗鬆症モデルの場合は骨密度が改善したのに対し、健常マウスでは健常な骨密度を維持し、必要以上に骨密度を上昇させることはなかった。また、骨梁数(Tb. N)は、いずれのマウス群でも、JTE013の投与により微増したが、各マウス群の間で、差をほとんど認めなかった(図 1 4 参照)。

産業上の利用可能性

[0077] 以上詳述したように、本発明のスクリーニング方法により、現存の骨吸収抑制剤とは異なるメカニズムによるスクリーニングを行うことができる。具体的には、S1PとS1P₂との相互作用、並び破骨細胞前駆細胞の遊走能に及ぼす効果に基づく新規骨吸収抑制物質を選別しうるスクリーニングを行うことができる。本発明のスクリーニング方法により選別された骨吸収抑制剤は、現存する骨吸収抑制剤の作用機序とは異なり、成熟した破骨細胞の前段階である破骨細胞前駆細胞の遊走・位置決めを標的としている点において、極めて優れている。

[0078] 従来公知のビスホスホネート製剤は骨表面で成熟破骨細胞をアポトーシス

させる作用によるものであるが、本発明の方法により選別される薬剤は破骨細胞前駆細胞の骨細胞への流出入のバランスを制御するものであり、より安全性が高い薬剤といえることができる。異なる作用機序による骨吸収抑制剤は、従来の薬剤と併用して使用することもできる。併用することで、従来の薬剤の使用量を軽減させ、かつ相乗効果も期待できる。さらに、破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に成熟するのを防止する作用があることから、予防的に使用することで、骨粗鬆症の発症を抑制することも期待できる。

[0079] 人口の4人に1人が65歳以上の高齢者という超高齢者時代を迎えた日本では、加齢による骨粗鬆症の患者数は1000万人を突破しつつある。また、社会の高齢化及び骨吸収性疾患の増加は、日本に限ったものではなく先進諸国に共通した問題である。現在、骨粗鬆症の罹患患者数は日米欧の先進諸国において約7500万人と推定されており、ビスホスホネート製剤をはじめとする骨吸収抑制剤の世界市場は総額8000億円に及ぶ巨大なマーケットである。また、この市場は今後確実に増加することが予想される。このため、本発明を基にした新規の有効な骨吸収抑制剤の開発の意義は、日本国内に留まらず、世界規模での創薬ビジネスへと発展することが期待される。

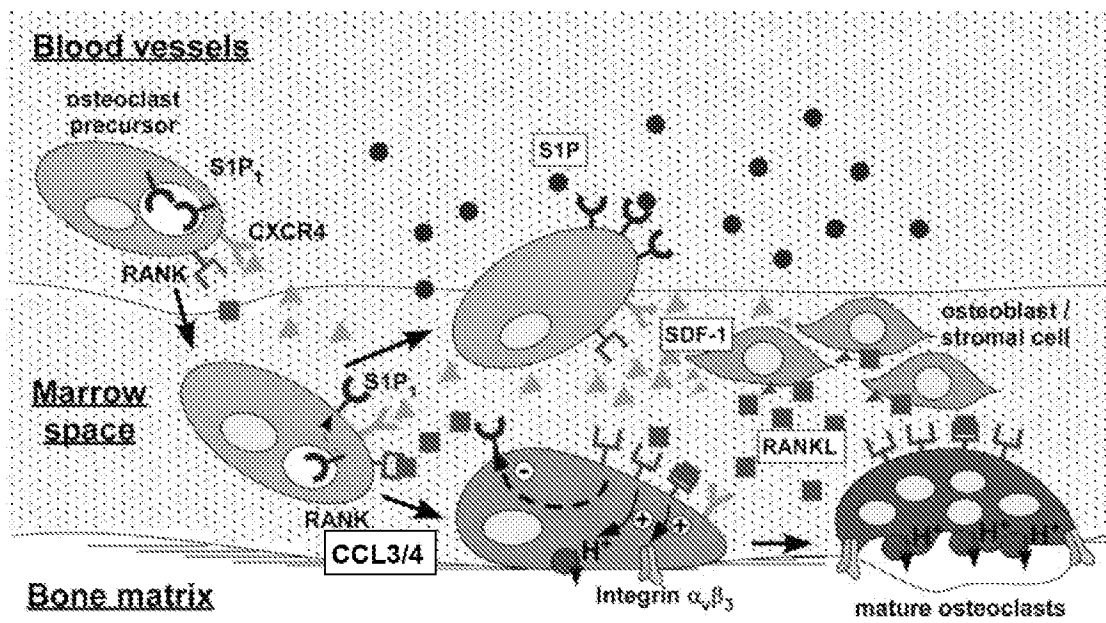
請求の範囲

- [請求項1] スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) とスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 型 (S1P₂) との相互作用を阻害しうる物質を検出することを特徴とする、新規骨吸収抑制物質のスクリーニング方法。
- [請求項2] 少なくとも以下の A) 及び B) の工程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のスクリーニング方法：
- A) 候補物質の S1P と S1P₂ との相互作用に及ぼす影響を確認し、S1P と S1P₂ との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程；
- B) 候補物質による細胞の遊走能に及ぼす影響を確認し、遊走能の増強が確認された物質を選別する工程。
- [請求項3] 以下の工程を含む請求項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法：
- 1) 試験系に候補物質を添加し、S1P と S1P₂ との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；
- 2) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1P と S1P₂ との相互作用を阻害しうる候補物質を選別する工程；
- 3) 前記工程により選別された候補物質を、S1P を含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；
- 4) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された物質をさらに選別する工程。
- [請求項4] 以下の工程を含む請求項 1 又は 2 に記載のスクリーニング方法：
- 1) 候補物質を S1P を含む系で培養した細胞培養系に添加する工程；
- 2) 前記工程の後、細胞の遊走能を測定し、遊走能の増強が確認された候補物質を選別する工程；
- 3) 試験系に前記工程により選別された候補物質を添加し、S1P と S1P₂ との相互作用に及ぼす影響を確認する工程；
- 4) 前記相互作用に及ぼす影響を確認した結果に基づき、S1P と S1P₂ との相互作用を阻害しうる物質をさらに選別する工程。
- [請求項5] S1P と S1P₂ との相互作用に及ぼす影響を確認する工程が、S1P₂ 活性又は

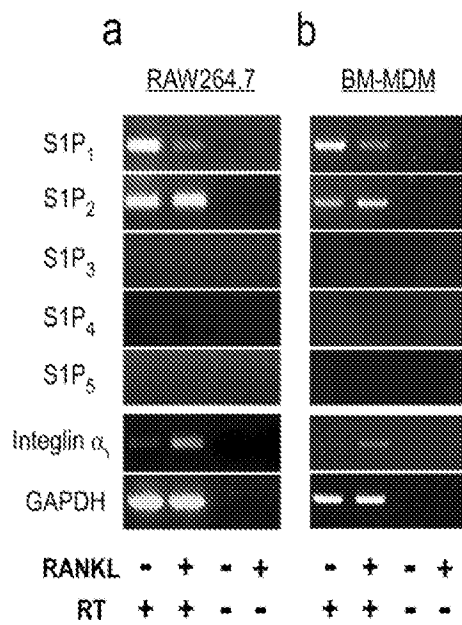
S1P₂発現量を確認する工程による、請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。

- [請求項6] スクリーニング方法に用いる細胞が、少なくともS1P₂及びS1P₁を発現している細胞である、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。
- [請求項7] スクリーニング方法に用いる細胞が、破骨細胞前駆細胞である、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 に記載のスクリーニング方法。
- [請求項8] S1PとS1P₂との相互作用を阻害する物質を有効成分とする、新規骨吸収抑制剤。
- [請求項9] S1PとS1P₂との相互作用を阻害する物質が、破骨細胞前駆細胞の遊走能を増強する物質である、請求項 8 に記載の新規骨吸収抑制剤。
- [請求項10] S1PとS1P₂との相互作用を阻害する物質が、S1P₂アンタゴニスト、抗S1P₂抗体又はS1P₂発現抑制剤である、請求項 8 又は 9 に記載の新規骨吸収抑制剤。

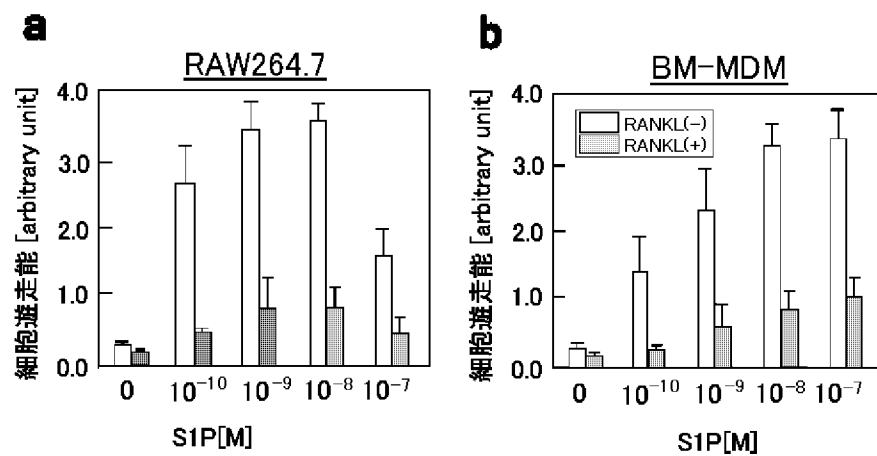
[図1]



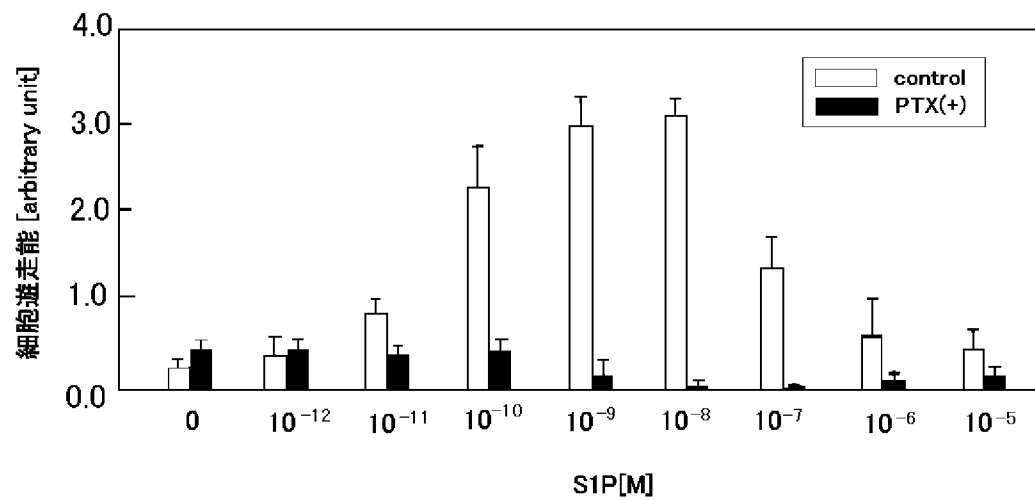
[図2]



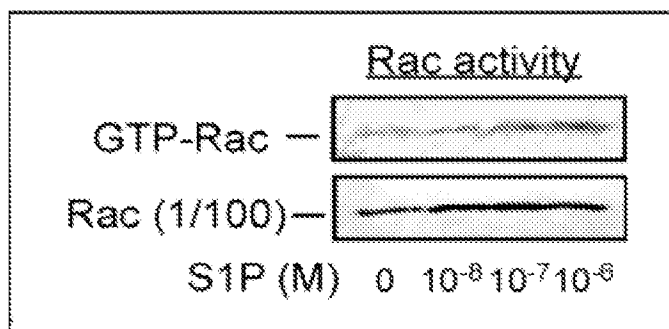
[図3]



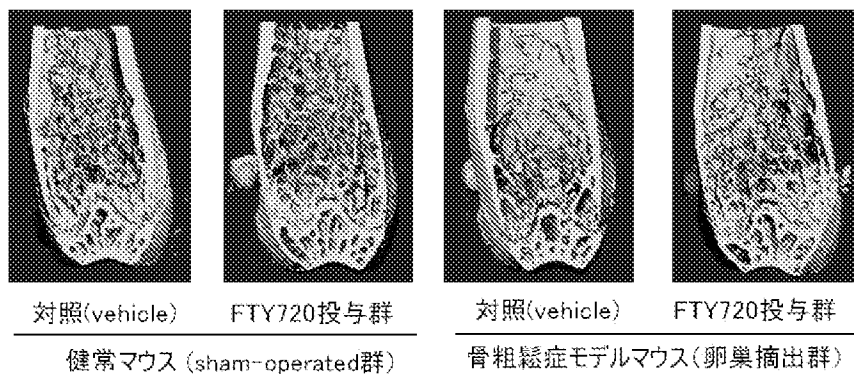
[図4]



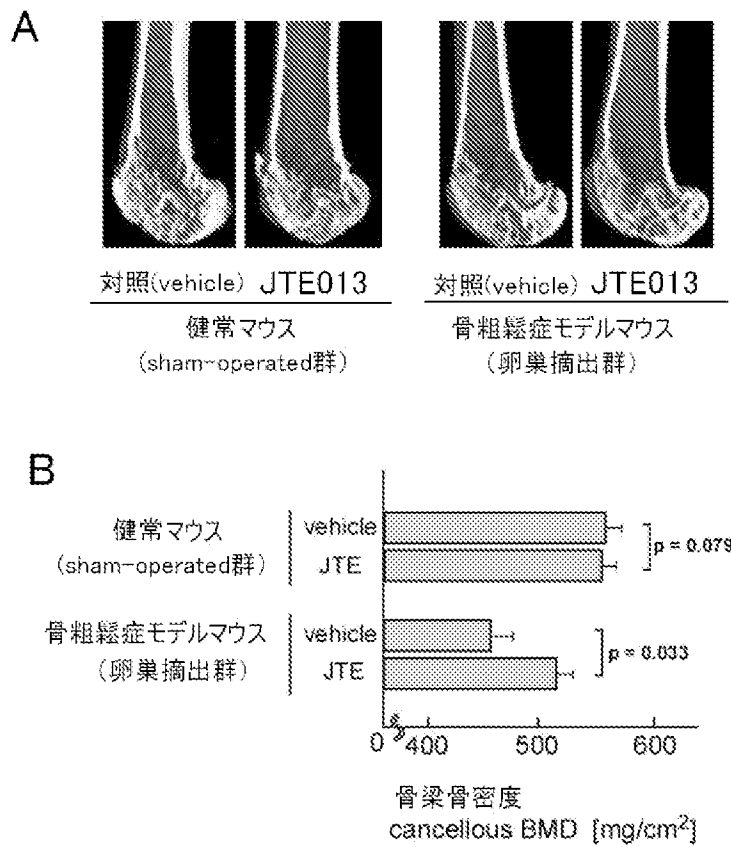
[図5]



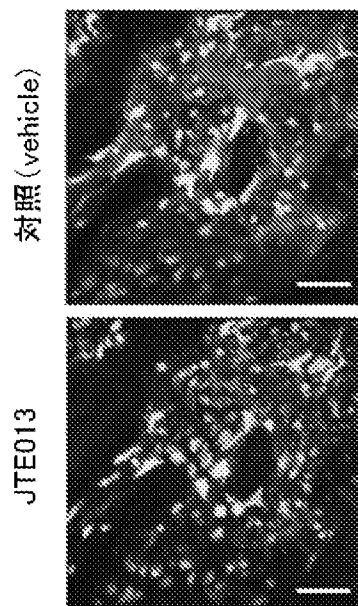
[図6]



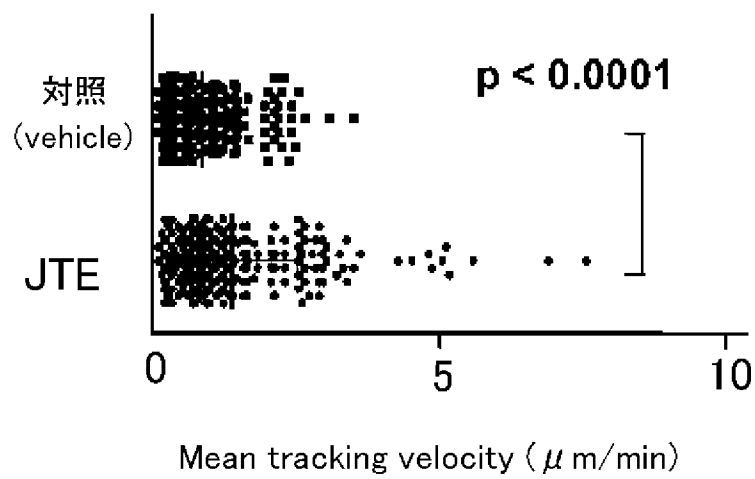
[図7]



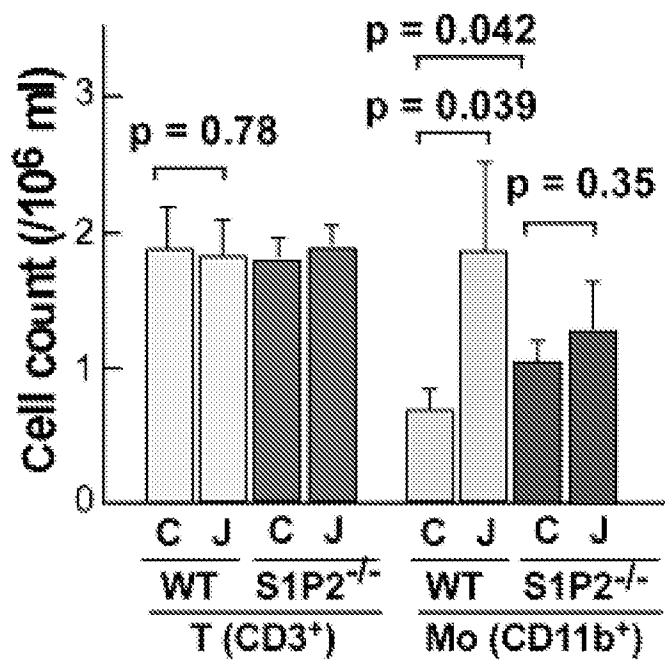
[図8]



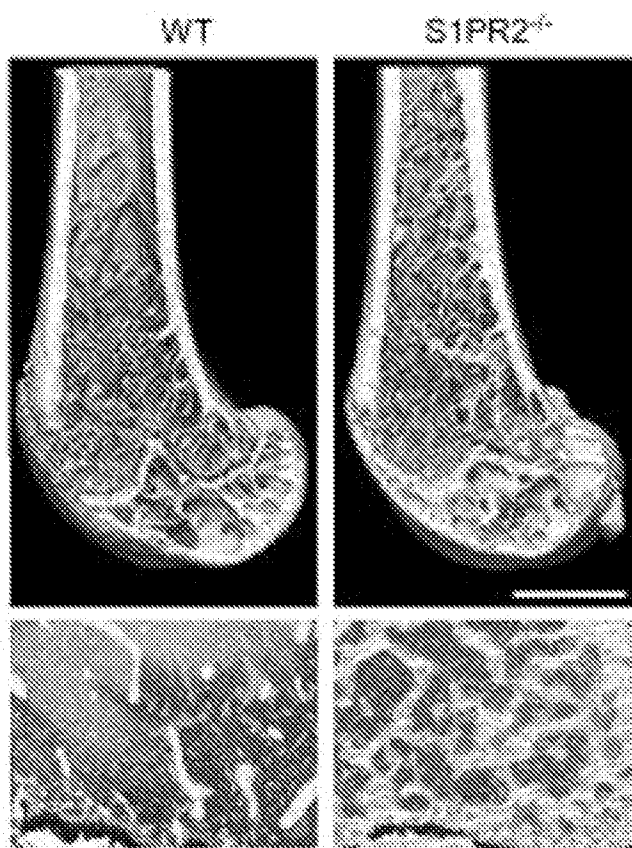
[図9]



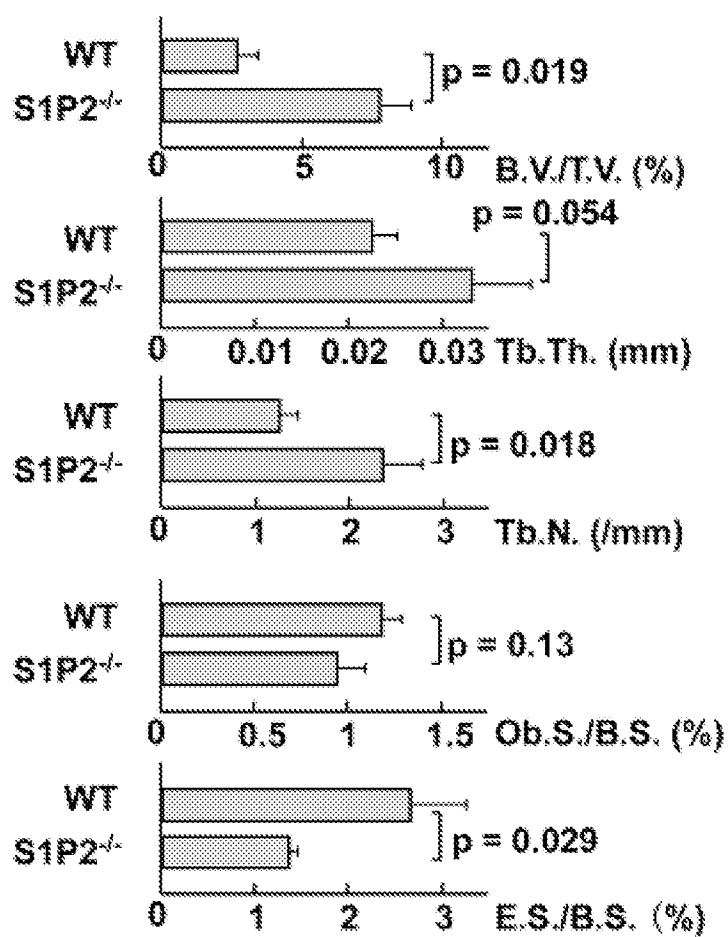
[図10]



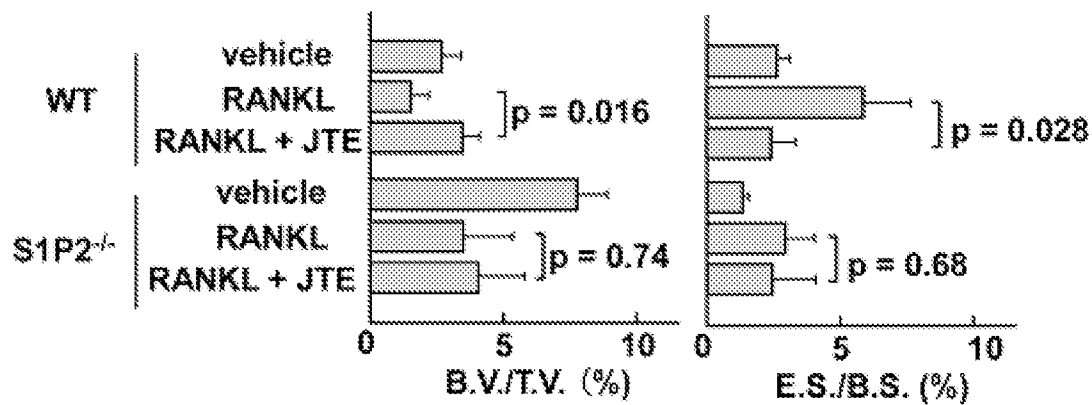
[図11]



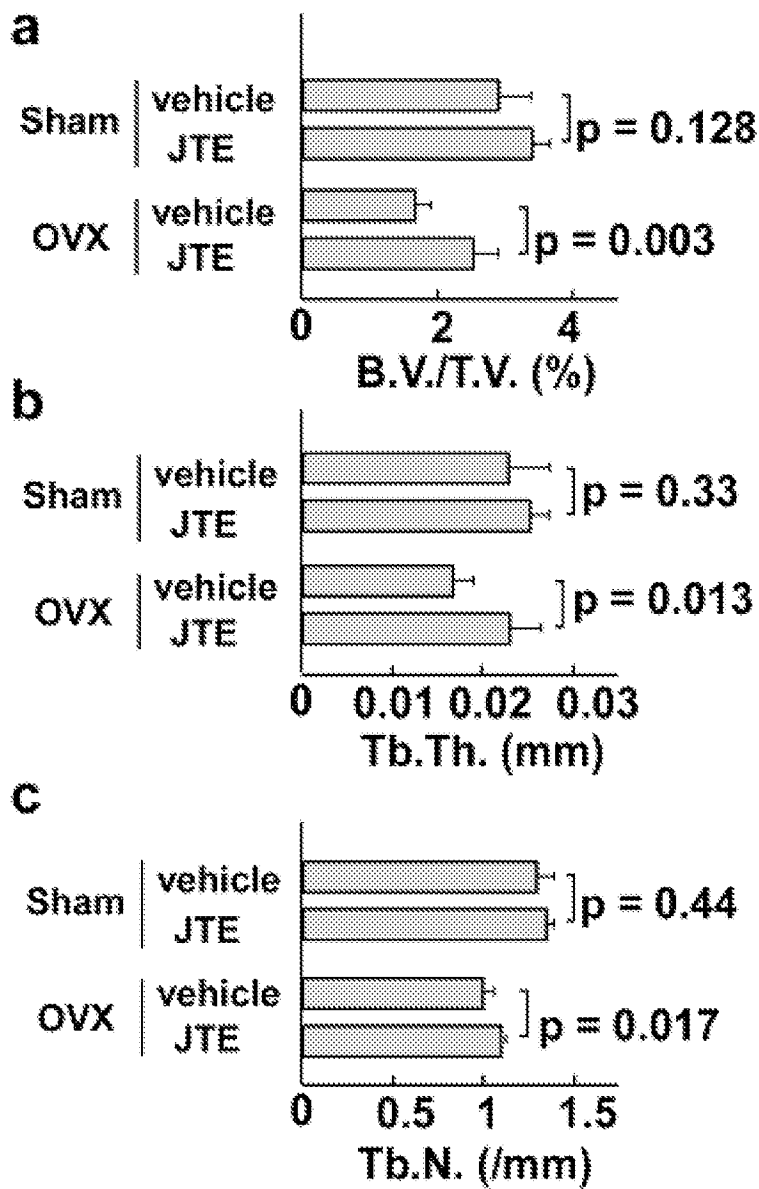
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P19/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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, A61K39/395, A61K45/00, A61P19/08, A61P19/10, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-267665 A (Japan Health Sciences Foundation), 18 October 2007 (18.10.2007), (Family: none)	1, 8-10/1-10
Y	Masako OKAZAKI, "Effect of Sphingosine-1-phosphate on Osteoclast Formation", Dental Medicine Res., 2009 Mar, vol.29, no.1, pages 40 to 45	1-10
Y	Masaru ISHII et al., "Hakotsu Saibo no Yuso·Ichi Kime no Kiko no Kaimei to kore o Target to shita Atarashii Kotsu Soshosho Chiryoyaku no Kaihatsu", Osteoporosis Japan, 2009 Oct, vol.17, no.4, pages 19 to 21	1-10

☒ 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
08 December, 2010 (08.12.10)

Date of mailing of the international search report
21 December, 2010 (21.12.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070003

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ISHII M, et al, Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. Nature, 2009 Mar 26, Vol.458, No.7237, p.524-8. (Epub 2009 Feb 8.)	1-10
A	ROELOFSEN T, et al, Sphingosine-1-phosphate acts as a developmental stage specific inhibitor of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis of osteoblasts. J Cell Biochem., 2008, Vol.105, No.4, p.1128-38.	1-10
A	LI QF, et al, Sphingosine 1-phosphate induces Mcl-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. Biochem Biophys Res Commun., 2008, Vol.371, No.1, p.159-62. (Epub 2008 Apr 25.)	1-10
A	JP 2004-231616 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 19 August 2004 (19.08.2004), (Family: none)	1-10

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, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i,
A61P19/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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, A61K39/395, A61K45/00, A61P19/08, A61P19/10, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	JP 2007-267665 A（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団）2007.10.18 （ファミリーなし）	1, 8-10 / 1-10
Y	岡崎雅子、 スフィンゴシン 1 リン酸の破骨細胞形成に及ぼす影響 Dental Medicine Res., 2009 Mar, Vol.29, No.1, p.40-45	1-10

☒ 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

0 8 . 1 2 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 1 . 1 2 . 2 0 1 0

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	石井優 他、 破骨細胞の遊走・位置決めの機構の解明とこれをターゲットとした新しい骨粗鬆症 治療薬の開発 Osteoporosis Japan, 2009 Oct, Vol.17, No.4, p.19-21	1-10
A	ISHII M, et al, Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. Nature, 2009 Mar 26, Vol.458, No.7237, p.524-8. (Epub 2009 Feb 8.)	1-10
A	ROELOFSEN T, et al, Sphingosine-1-phosphate acts as a developmental stage specific inhibitor of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis of osteoblasts. J Cell Biochem., 2008, Vol.105, No.4, p.1128-38.	1-10
A	LI QF, et al, Sphingosine 1-phosphate induces Mcl-1 upregulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. Biochem Biophys Res Commun., 2008, Vol.371, No.1, p.159-62. (Epub 2008 Apr 25.)	1-10
A	JP 2004-231616 A (森永乳業株式会社) 2004.08.19 (ファミリーなし)	1-10