

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年10月27日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100987 A1(51) 国際特許分類: G01N 33/50,
33/15, A61K 45/00, 48/00, A61P 1/04, 3/00, 3/06, 3/10,
7/00, 7/02, 9/04, 9/10, 11/00, 11/04, 19/02, 21/00, 29/00,
35/00, 35/02, 37/06, 43/00, C12Q 1/02, C12N 15/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007354

(22) 国際出願日: 2005年4月11日 (11.04.2005)

(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2004-116725 2004年4月12日 (12.04.2004) 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).

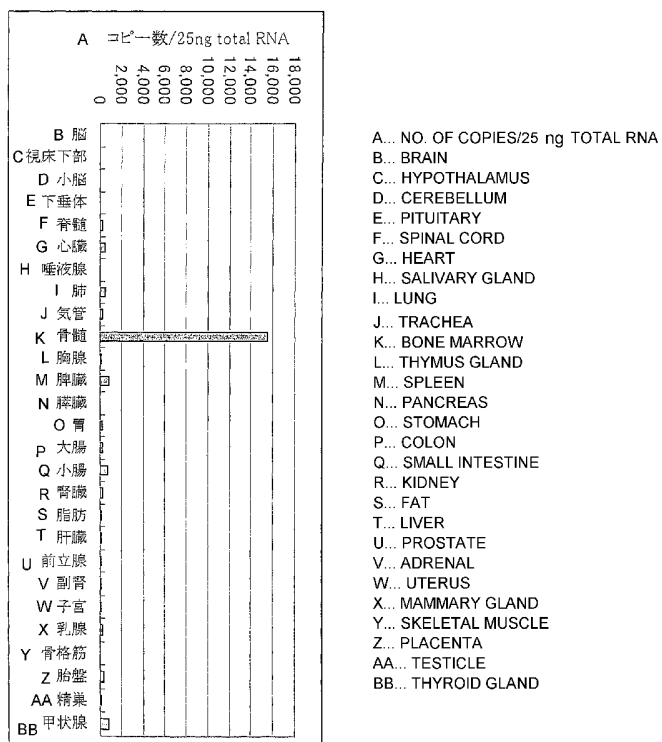
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 藤井 亮 (FUJII,
Ryo) [JP/JP]; 〒3004293 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). 大久保 尚
一 (OKUBO, Shoichi) [JP/JP]; 〒3004293 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). 西一紀 (NISHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒3004293 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). 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP]; 〒
3004293 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). 森 正明 (MORI, Masaaki)
[JP/JP]; 〒3004293 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).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL LIGAND OF G PROTEIN COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の新規リガンドとその用途



(57) Abstract: There is provided, for example, a method of screening an agonist or antagonist of G protein coupled receptor protein or its salt, characterized in that use is made of, containing an amino acid sequence identical to or substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, G protein coupled receptor protein or its salt, and ligand thereof or its salt. This method is useful in the screening of preventive/therapeutic agent for, e.g., leukopenia, leukemia, lymphoma, malignant tumor, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, tonsil disease, collagenosis, inflammatory disease, leukocytosis, cardiac failure, hereditary muscle disease, muscular dystrophy, myodegeneration disease, myocardial infarction, obesity, diabetes mellitus, hyperlipemia, arteriosclerosis, metabolic syndrome, thrombocytopenia, thrombocytocytosis, cancer, lung edema, multiple organ failure, etc.

(57) 要約: 本発明は、配列番号: 1 で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩およびリガンドまたはその塩を用いることを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法などを提供する。本発明は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性

大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球增多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫、多臓器不全などの予防・治療剤のスクリーニングに有用である。



(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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, 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.

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, 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

(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,

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。

明細書

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の新規リガンドとその用途

技術分野

- 5 本発明は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の新規リガンドとその用途に関する。

背景技術

- 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異
10 的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein
(以下、Gタンパク質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていること
15 から、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質 (GPCR) または7回膜貫通型レセプタータンパク質 (7TMR) と総称される。

- Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。
レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシ
20 グナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質、特にGタンパク質共役型レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

- 25 例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプタータンパク質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター

タンパク質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプタータンパク質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプタータンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプタータンパク質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

10 レセプタータンパク質のうち、アゴニストおよびアンタゴニストを含むリガンドが不明なレセプタータンパク質をオーファンレセプタータンパク質と称する。このオーファンGタンパク質共役型レセプタータンパク質の一つとして、TGR25が知られている (WO 02/46394号公報)。このタンパク質はまた、GPR97とも呼ばれ (FEBS Letters 531, 407-414 (2002))、そのマウスホモログとしてPb99が知ら
15 れている (Mol. Cell. Biol. 20, 4405-4410 (2000))。Pb99はB前駆細胞と胸腺細胞において発現するが、成熟B細胞およびT細胞では発現せず、リンパの発達に関与していると報告されている。またTGR25が骨髄で発現しているレセプターであるという報告もある (特開2003-24070)。

AM251 [1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-ピペリ
20 ジン-1-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド] は、カンナビノイドレセプターのアンタゴニストで、食欲抑制、体重減少作用を有することが [Eur J Pharmacol 462(1-3):125-132 (2003)]、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の一つであるGPR55にアゴニスト作用を有することが報告されている (WO 01/86305号公報) に開示されている。AM251、AM281 [1-(2,4-ジクロロフェニ
25 ル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-モルホリン-4-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド] などは、カンナビノイド受容体CB₁特異的なアンタゴニストであると報告されている (Life Sci. 76(12): 1307-1324(2005))。N-ペンタノイル 2-ベンジルトリプタミン [N-pentanoyl 2-benzyltryptamine (DH97)] は、メラトニン受容体MT₂アンタゴニストであると報告されている [Naunyn

Schmiedebergs Arch Pharmacol. 358(5): 522-528(1998)]。

発明の開示

従来、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質と生理活性物質（すなわち、
5 リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガ
ンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的な
アンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用
されてきた。従って、このように生体内での生理現象において重要であるばかり
でなく、医薬品開発の標的ともなりうるGタンパク質共役型レセプタータンパク
10 質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規
Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の特異的リガンドや、アゴニスト、ア
ンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、Gタンパク質共役型レセプターはその全てが見出されているわけでは
なく、現時点でもなお、未知のGタンパク質共役型レセプター、また上記の
15 TGR25のようなオーファンレセプターが多数存在しており、新たなGタンパク質
共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

Gタンパク質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新た
な生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプターに対するア
ゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なりガンドが
20 見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセ
プターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまた
はアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリ
ガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、Gタンパク質共役型レセプタ
ーの機能不全に関連する疾患の予防および／または治療薬や診断薬として活用す
25 ることが期待できる。

さらにまた、Gタンパク質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく生体での該
レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も
多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与
だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、

該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防および／または治療薬や診断薬に応用することもできる。

具体的には、本発明はTGR25に対するリガンドを決定し、さらにTGR25とそのリガンドの用途を提供することを目的とする。すなわち本発明は、リガンドとTGR25との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニング用キットを用いて得られるリガンドとTGR25との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドとTGR25との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）を含有してなる医薬、例えば白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の予防・治療剤などを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記の課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、特願2003-393056（PCT-JP04-017519）に開示される、特別な細胞株を必要としない、リガンドのスクリーニング方法を用いて、AM251がTGR25のサロゲートリガンドであることを見出した。さらに、AM281、DH97もTGR25のサロゲートリガンドであることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

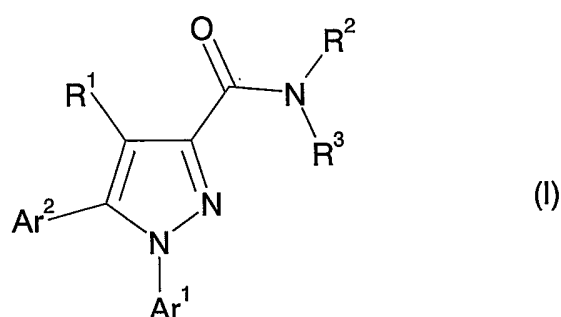
すなわち、本発明は、

〔1〕（1）配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および（2）リガンドまたはその塩を用いることを特徴とする、該レセプタータンパク質またはその塩と該リガンドまたはその塩との

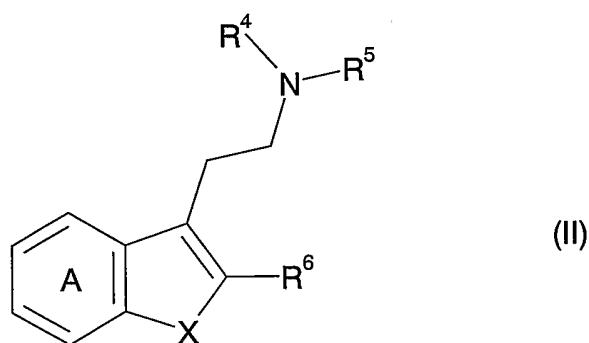
結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 〔1 a〕シグナル伝達が、(1) 配列番号：1 で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および(2) リガンドまたはその塩との結合による生じるシグナル伝達である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔2〕リガンドが、式



- 〔式中、Ar¹およびAr²は、それぞれ置換基を有していてもよいアリール、R¹は、置換基を有していてもよい炭化水素基、R²およびR³は、それぞれ水素原子、または置換基を有していてもよい同素もしくは複素環基を示す〕で表される化合物またはその塩〔以下、化合物(I)と略記することもある〕である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、
- 〔3〕リガンドが、AM251〔1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-ピペリジン-1-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド；1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-piperidin-1-yl-1H-pyrazole-3-carboxamide〕またはAM281〔1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-モルホリン-4-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド；1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-morpholin-4-yl-1H-pyrazole-3-carboxamide〕である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、
- 〔4〕リガンドが、AM251である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、
- 〔5〕リガンドが、式



〔式中、環Aは、置換基を有していてもよいベンゼン環、

R^4 および R^5 は、それぞれ水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基またはアシル、

5 R^6 は、置換基を有していてもよい炭化水素基、

Xは、 $-NR^7-$ (R^7 は、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す)、 $-O-$ または $-S-$ を示す〕で表される化合物またはその塩〔以下、化合物 (II) と略記することもある〕である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

10 〔6〕リガンドが、DH 9 7 [N-[2-(2-ベンジル-1H-インドール-3-イル)エチル]ペンタンアミド ; N-[2-(2-benzyl-1H-indol-3-yl)ethyl]pentanamide] である上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔7〕 (1) 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および (2) リガンドまたはその塩と該レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、

〔8〕リガンドが、AM 2 5 1、AM 2 8 1またはDH 9 7である上記〔7〕記載のスクリーニング方法、

20 〔9〕 (1) 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および (2) リガンドまたはその塩を含有することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩と該リガンドまたはその塩との

結合性またはシグナル伝達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、

- 〔9 a〕シグナル伝達が、（1）配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および（2）リガンドまたはその塩との結合による生じるシグナル伝達である上記〔9〕記載のスクリーニング用キット、

〔10〕リガンドが、AM251、AM281またはDH97である上記〔9〕記載のスクリーニング用キット、

- 10 〔11〕（1）配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および（2）リガンドまたはその塩と該レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストまたは
- 15 はアンタゴニストのスクリーニング用キット、

〔12〕リガンドがAM251、AM281またはDH97である上記〔11〕記載のスクリーニング用キット、

- 〔13〕リガンドまたはその塩と配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有して
- 20 なる医薬、

- 〔14〕配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の予防・治療剤、
- 25

〔15〕配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストを含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療剤、

- 5 〔16〕アゴニストが、化合物（I）または化合物（II）である上記〔15〕記載の予防・治療剤、

〔17〕配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストを含有してなる白血球増多症の予防・治療剤または白血

- 10 球賦活剤、

〔18〕リガンドまたはその塩を配列番号：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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、試験化合物を配列番号：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Gタン

15 パク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における結合性またはシグナル伝達の変化を比較することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストのスクリーニング方法、

- 〔19〕リガンドまたはその塩の存在下、試験化合物を配列番号：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Gタンパク
- 20 質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における結合性またはシグナル伝達の変化を測定することを特徴とする、該レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストのスクリーニング方法、

- 〔20〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療剤、
- 25

〔21〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分

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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療剤、

- 〔22〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の診断剤、

- 〔23〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤、

- 〔24〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の診断剤、

- 〔25〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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を含有してなる白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤、

〔26〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、(ii) 上記レセプタータンパク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、(iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニスト、または(iv) レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの有効量を投与することを特徴とする白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療方法、

〔27〕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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、(ii) 上記レセプタータンパク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(iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする白血球増多症の予防・治療方法または白血球賦活方法、

〔28〕白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、(ii) 上記レセプタータンパク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、

(iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニスト、または(iv) レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの使用、

〔29〕白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、(ii) 上記レセプタータンパク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 (iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストの使用、

- 〔30〕 骨髓に存在する幹細胞、間葉系未分化細胞もしくは幼若造血系細胞の機能、または骨髓内造血支持組織中に存在する脂肪細胞もしくは脂肪前駆細胞の機能
- 5 能を制御することを特徴とする上記〔14〕記載の医薬、

- 〔31〕 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の活性、または上記レセプタータンパク質に対するリガンドの活性を促進することを特徴とする白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、
- 10 潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療方法、

- 〔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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の活性、または上記レセプタータンパク質に対するリガンドの
- 15 活性を阻害することを特徴とする白血球増多症の予防・治療方法または白血球賦活方法などを提供する。

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」または「本発明の蛋白質」と略記する場合がある。

- 20 さらに、本発明は、

- (i) 標識したGTP γ S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GTP γ S結合促進活性を測定し、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のスクリーニング方法、
- 25

- (ii) 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の濃度を測定し、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のスクリーニング

方法、

- (iii) 本発明のリガンドを、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を導入した本発明の受容体発現細胞に接
- 5 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のスクリーニング方法、
- (iv) 本発明のリガンドを、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、
- 10 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のスクリーニング方法、
- (v) 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
- 15 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のスクリーニング方法、
- (vi) 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
- 20 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のスクリーニング方法、
- (vii) 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
- 25 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のスクリーニング方法、
- (viii) 本発明のリガンドを、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を導入した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

5 化合物のスクリーニング方法、

(ix) 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のスクリーニング方法、

- 10 (x) 標識したルビジウムの存在下、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、標識したルビジウムの流出活性を測定し、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のスクリーニング方法、

- 15 (xi) 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のスクリーニング方法、

- 20 (xii) ヒスチジン合成遺伝子を導入した本発明の受容体発現酵母を、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のスクリーニング方法、

- 25 (xiii) 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のスクリーニング方法なども提供する。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト各種組織でのTGR25 mRNAの発現分布を示す。

図2は、ヒト末梢血多形核白血球におけるTGR25のmRNAの特異的な高発現を示す図を示す。

- 5 図3は、ヒト末梢血多形核白血球に対するAM251のMAPキナーゼ活性化抑制作用を示す図を示す。

図4は、AM251のヒト白血病細胞株であるHL-60に対する好中球様細胞への分化誘導促進活性を示す図を示す。破線は無処理細胞、細い実線はDMSOのみを投与した細胞、太い実線はDMSOおよびAM251を投与した細胞のそれぞれにおける好中球分

- 10 化マーカーである細胞表面抗原CD11b/Mac-1の発現量を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明で使用されるTGR25は、配列番号：1で表わ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レセプタータンパク質である。

- TGR25は、例えばヒトや哺乳動物（モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、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、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、また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、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、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）、腸管、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、特に、脾臓、骨髄、腸管、単球、マ

クロファージなどの免疫担当臓器と免疫担当細胞に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表わ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、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

10 本発明の配列番号：1で表わ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タンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わ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で表わされるアミノ酸配列からなるTGR25と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

15 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、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(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タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、
20 例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、TGR25としては、a)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(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、
25 b)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(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、c)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(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、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

5 本明細書におけるTGR25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。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するTGR25をはじめとするTGR25は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

10 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} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイル
15 ルオキシメチル基などが用いられる。

TGR25がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基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TGR25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。

20 さらに、TGR25には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル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、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、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、ホルミル基、アセチルなど
25 の C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）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タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のTGR25の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来TGR25（WO 200246394）が用いら

れる。

- TGR25の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記したTGR25の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、TGR25のタンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位で
- 5 あって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

- 具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するTGR25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）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。
- 10 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良い。

- 本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプタータンパク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。
- 15 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列の相同性は、前記と同様の相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用い、同様の条件にて計算することができる。

- ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。
- 20

- また、本発明の部分ペプチドは、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、または、そのアミノ酸配列に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））
- 25 のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の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。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COO

R) の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基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。

- 5 さらに、本発明の部分ペプチドには、上記したTGR25と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル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が適当な保護基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ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。
- 10 本発明のTGR25またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、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（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、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、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
- 15

本発明のリガンドとしては、TGR25と特異的に結合する能力を有するものであれば、何れの物であってもよい。例えば、TGR25との結合の解離定数が $10\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $2\mu\text{M}$ 以下、さらに好ましくは $1\mu\text{M}$ 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。

20

本発明のリガンドとしては、例えば、化合物(I)、化合物(II)などが用いられる。

- 化合物(I)における Ar^1 または Ar^2 で示される「置換基を有していてもよいアリール」の「アリール」としては、例えば C_{6-14} アリール（例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アンスリル、3-インデニルなど）などが挙げられる。好ましくはフェニルである。
- 25

上記「置換基を有していてもよいアリール」の「置換基」としては、例えば、ハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、 C_{1-3} アルキレンジオ

- キシ（例、メチレンジオキシ、エチレンジオキシなど）、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル、ハロゲン化されていてもよい C_{2-6} アルケニル、カルボキシ C_{2-6} アルケニル（例、2-カルボキシエテニル、2-カルボキシ-2-メチルエテニルなど）、ハロゲン化されていてもよい C_{2-6} アルキニル、ハロゲン化されていてもよく、縮合していてもよい C_{3-8} シクロアルキル、 C_{6-14} アリール（例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アンスリルなど）、ハロゲン化されていてもよい C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル- C_{1-6} アルコキシ（例、エトキシカルボニルメチルオキシなど）、 C_{3-8} シクロアルキル-オキシ（例、シクロプロピルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシなど）、ヒドロキシ、 C_{6-14} アリールオキシ（例、フェニルオキシ、1-ナフチルオキシ、2-ナフチルオキシなど）、 C_{7-16} アラルキルオキシ（例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなど）、メルカプト、ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ、 C_{6-14} アリールチオ（例、フェニルチオ、1-ナフチルチオ、2-ナフチルチオなど）、 C_{7-16} アラルキルチオ（例、ベンジルチオ、フェネチルチオなど）、アミノ、ヒドロキシアミノ、モノ- C_{1-6} アルキルアミノ（例、メチルアミノ、エチルアミノなど）、モノ- C_{6-14} アリールアミノ（例、フェニルアミノ、1-ナフチルアミノ、2-ナフチルアミノなど）、ジ- C_{1-6} アルキルアミノ（例、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノなど）、ジ- C_{6-14} アリールアミノ（例、ジフェニルアミノなど）、ニトロ、ニトリル、ホルミル、カルボキシ、 C_{1-6} アルキル-カルボニル（例、アセチル、プロピオニルなど）、 C_{3-8} シクロアルキル-カルボニル（例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニルなど）、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニル（例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど）、 C_{6-14} アリール-カルボニル（例、ベンゾイル、1-ナフトイル、2-ナフトイルなど）、 C_{7-16} アラルキル-カルボニル（例、フェニルアセチル、3-フェニルプロピオニルなど）、 C_{6-14} アリールオキシ-カルボニル（例、フェノキシカルボニルなど）、 C_{7-16} アラルキルオキシ-カルボニル（例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオ

- キシカルボニルなど)、5または6員複素環カルボニル(例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイル、モルホリノカルボニル、チオモルホリノカルボニル、ピペラジーン-1-イルカルボニル、ピロリジン-1-イルカルボニルなど)、カルバモイル、モノ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル(例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイルなど)、ジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイル(例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイルなど)、 C_{6-14} アリール-カルバモイル(例、フェニルカルバモイル、1-ナフチルカルバモイル、2-ナフチルカルバモイルなど)、 C_{1-6} アルコキシ-カルバモイル(例、メトキシカルバモイル、エトキシカルバモイルなど)、5または6員複素環カルバモイル(例、2-ピリジルカルバモイル、3-ピリジルカルバモイル、4-ピリジルカルバモイル、2-チエニルカルバモイル、3-チエニルカルバモイルなど)、スルホ、 C_{1-6} アルキルスルホニル(例、メチルスルホニル、エチルスルホニルなど)、 C_{6-14} アリールスルホニル(例、フェニルスルホニル、1-ナフチルスルホニル、2-ナフチルスルホニルなど)、ホルミルアミノ、 C_{1-6} アルキル-カルボニルアミノ(例、アセチルアミノなど)、 C_{6-14} アリール-カルボニルアミノ(例、ベンゾイルアミノ、ナフトイルアミノなど)、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニルアミノ(例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノなど)、 C_{1-6} アルキルスルホニルアミノ(例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノなど)、 C_{6-14} アリールスルホニルアミノ(例、フェニルスルホニルアミノ、2-ナフチルスルホニルアミノ、1-ナフチルスルホニルアミノなど)、 C_{1-6} アルキル-カルボニルオキシ(例、アセトキシ、プロピオニルオキシなど)、 C_{6-14} アリール-カルボニルオキシ(例、ベンゾイルオキシ、ナフチルカルボニルオキシなど)、 C_{1-6} アルコキシ-カルボニルオキシ(例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシなど)、モノ- C_{1-6} アルキル-カルバモイルオキシ(例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシなど)、ジ- C_{1-6} アルキル-カルバモイルオキシ(例、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシなど)、 C_{6-14} アリール-カルバモイルオキシ(例、

フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモイルオキシなど)、5または6員複素環カルボニルオキシ(例、ニコチノイルオキシ、イソニコチノイルオキシなど)、5ないし7員飽和環状アミノ(例、ピロリジン-1-イル、ピペリジノ、ピペラジン-1-イル、モルホリノ、チオモルホリノ、テトラヒドロアゼピン-1-イル、ホモピペラジン-1-イルなど)、5ないし10員芳香族複素環基(例、2-チエニル、3-チエニル、2-フリル、3-フリル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンゾ〔b〕チエニル、3-ベンゾ〔b〕チエニル、2-ベンゾ〔b〕フラニル、3-ベンゾ〔b〕フラニルなど)、3ないし10員非芳香族複素環基(例、1-アゼチジニル、2-アゼチジニル、3-アゼチジニル、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、2-オキシラニル、2-オキセタニル、3-オキセタニル、2-テトラヒドロフラニル、4-テトラヒドロピラニルなど)、オキソなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子(例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)を有していてもよいアルキル(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどの C_{1-6} アルキルなど)などが挙げられる。具体例としては、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-ブロモエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、3, 3, 3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、4, 4, 4-トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、5, 5, 5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6, 6, 6-トリフルオロヘキシルなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよい C_{2-6} アルケニル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよい C_{2-6} アルケニル（例、ビニル、プロペニル、イソプロペニル、2-ブテン-1-イル、4-ペンテン-1-イル、5-ヘキセン-1-イルなど）などが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよい C_{2-6} アルキニル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよい C_{2-6} アルキニル（例、プロパルギル、2-ブチン-1-イル、4-ペンチン-1-イル、5-ヘキシン-1-イルなど）などが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよく、縮合していてもよい C_{3-8} シクロアルキル」の「ハロゲン化されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよい C_{3-6} シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。具体例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4,4-ジクロロシクロヘキシル、2,2,3,3-テトラフルオロシクロペンチル、4-クロロシクロヘキシルなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよく、縮合していてもよい C_{3-8} シクロアルキル」の「縮合した C_{3-8} シクロアルキル」としては、例えば、8ないし14員の二環または三環性 C_{3-8} シクロアルキル（例、1-アダマンチル、2-アダマンチル、デカリン-1-イル、テトラリン-1-イル、9-フルオレニル、1-インダニル、1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフチルなど）などが挙げられる。また、該「縮合した C_{3-8} シクロアルキル」は、ハロゲン化されていてもよい。

前記「ハロゲン化されていてもよい C_{1-8} アルコキシ」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよい C_{1-8} アルコキシ（例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチ

ルオキシ、ヘキシルオキシなど)などが挙げられる。具体例としては、例えばメ
トキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、2, 2, 2-
トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、4, 4, 4-
トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシ
5 ルオキシなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよい C_{1-6} アルキルチオ」としては、例えば1
ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子(例、フッ素、塩素、臭素、
ヨウ素など)を有していてもよい C_{1-6} アルキルチオ(例、メチルチオ、エチル
チオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-
10 ブチルチオなど)などが挙げられる。具体例としては、メチルチオ、ジフルオロ
メチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピ
ルチオ、ブチルチオ、4, 4, 4-トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘ
キシルチオなどが挙げられる。

上記「アリール」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、
15 好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換
基は同一または異なってもよい。

化合物(I)における R^1 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素
基」の「炭化水素基」としては、例えば、鎖状または環状炭化水素基(例、アル
キル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、
20 アラルキル、多環式炭化水素基など)などが挙げられる。このうち、炭素数1な
いし19個の鎖状または環状炭化水素基などが好ましい。

上記「アルキル」としては、例えば C_{1-6} アルキル(例、メチル、エチル、プ
ロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペン
チル、ネオペンチル、ヘキシルなど)などが挙げられる。

25 上記「アルケニル」としては、例えば C_{2-6} アルケニル(例、ビニル、アリル、
イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-
プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニルな
ど)などが挙げられる。

上記「アルキニル」としては、例えば C_{2-6} アルキニル(例、エチニル、プ

ロパルギル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ヘキシニルなど)などが挙げられる。

上記「シクロアルキル」としては、例えば C_{3-6} シクロアルキル(例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど)などが挙げられる。

上記「シクロアルケニル」としては、例えば C_{5-6} シクロアルケニル(例、1-シクロペンテニル、3-シクロペンテニル、4-シクロペンテニル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、4-シクロヘキセニルなど)などが挙げられる。

10 上記「アリール」としては、例えば C_{6-14} アリール(例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アンスリル、3-インデニルなど)などが挙げられる。

上記「アラルキル」としては、例えば C_{7-19} アラルキル(例、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、トリチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2, 2-ジフェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル、9-フルオレニルなど)などが挙げられる。

上記「多環式炭化水素基」としては、例えば2ないし4環性非芳香族炭化水素基(例、1-アダマンチル、2-アダマンチル、デカリン-1-イル、テトラリン-1-イル、インダン-1-イル、アンドロスタン-3-イル、5-アンドロステン-3-イルなど)などが挙げられる。

上記「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」としては、例えば、上記 Ar^1 で示される「置換基を有していてもよいアリール」の「置換基」が挙げられる。上記「炭化水素基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

25 化合物(I)における R^2 または R^3 で示される「置換基を有していてもよい同素または複素環基」の「同素または複素環基」としては、例えば、3ないし14員(好ましくは5ないし7員)同素または複素環基などが挙げられる。

「3ないし14員同素環基」としては、例えば C_{3-14} シクロアルキル(例、シ

クロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど)、 C_{3-14} シクロアルケニル(例、例、1-シクロペンテニル、3-シクロペンテニル、4-シクロペンテニル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、4-シクロヘキセニルなど)、 C_{6-14} アリール(例、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、2-ビフェニリル、3-ビフェニリル、4-ビフェニリル、2-アンスリル、3-インデニルなど)などが挙げられる。

「3ないし14員複素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1または2種、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員(単環、2環または3環式)複素環、好ましくは(i) 5ないし14員(好ましくは5ないし10員)芳香族複素環、(ii) 3ないし14員非芳香族複素環または(iii) 7ないし10員複素架橋環から任意の1個の水素原子を除いてできる1価基などが挙げられる。

上記「5ないし14員(好ましくは5ないし10員)の芳香族複素環」としては、例えば、チオフェン、ベンゾ[b]チオフェン、ベンゾ[b]フラン、ベンズイミダゾール、ベンズオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンズイソチアゾール、1H-ベンゾトリアゾール、ナフト[2,3-b]チオフェン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、1,2,3-トリアゾール、1,2,4-トリアゾール、テトラゾール、1,3,4-チアジアゾール、1,3,4-オキサジアゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドール、イソインドール、1H-インダゾール、プリン、4H-キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、 β -カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン、イソオキサゾール、フラザン、フェノキサジンなどの芳香族複素環、またはこれらの環(好ましくは単環)が1ないし複数個(好ましくは1または2個)の芳香環(例、ベンゼン環、ピリジン環、イミダゾール環等)と縮合して形成された環などが挙げられる。

上記「3ないし14員非芳香族複素環」としては、例えば、オキシラン、オキセタン、テトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、ピラン、ジオキサラン、ジオキ

サン、アゼチジン、ピロリジン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、チアゾリジン、オキサゾリジン、オキサジアゾリン、チアジアゾリン、トリアゾリン、1, 4-ジアゼパン、1, 4-オキサゼパン、1, 4-チアゼパン、および上記芳香族複素環の還元体または部分還元体（例、1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、インドリンなど）などが挙げられる。

上記「7ないし10員複素架橋環」としては、例えば、キヌクリジン、7-アザビシクロ〔2. 2. 1〕ヘプタンなどが挙げられる。

該「複素環基」として好ましくは、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1または2種、好ましくは、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の（単環または2環式）複素環基である。具体的には、例えば2-チエニル、3-チエニル、2-フリル、3-フリル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、1-ピロリル、3-ピロリル、1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、3-ピリダジニル、2-チアゾリル、2-オキサゾリル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンゾ〔b〕チエニル、3-ベンゾ〔b〕チエニル、2-ベンゾ〔b〕フラニル、3-ベンゾ〔b〕フラニルなどの芳香族複素環基、例えば1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などである。

上記「置換基を有していてもよい同素または複素環基」の「置換基」としては、例えば、上記Ar¹で示される「置換基を有していてもよいアリール」の「置換基」が挙げられる。上記「同素もしくは複素環基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換

基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

Ar^1 として好ましくは、置換基を有していてもよいフェニル、さらに好ましくはハロゲン原子1ないし3個を有するフェニルなどである。

5 Ar^2 として好ましくは、置換基を有していてもよいフェニル、さらに好ましくはハロゲン原子1ないし3個を有するフェニルなどである。

R^1 として好ましくは、置換基を有していてもよいアルキル、さらに好ましくは C_{1-6} アルキルなどである。

10 R^2 および R^3 として好ましくは、一方が水素原子、他方が置換基を有していてもよい5ないし7員複素環基である。さらに好ましくは、一方が水素原子、他方が置換基を有していてもよい5ないし7員非芳香族複素環基（例、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなど）である。

15 化合物(I)の具体例としては、

Ar^1 が、ハロゲン原子1ないし3個を有するフェニル、

Ar^2 がハロゲン原子1ないし3個を有するフェニル、

R^1 が C_{1-6} アルキル、

20 R^2 および R^3 として好ましくは、一方が水素原子、他方が6員非芳香族複素環基である化合物などが挙げられる。

なかでも好ましくは、AM251〔1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-ピペリジン-1-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド〕、AM281〔1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-モルホリン-4-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド〕などが挙げられる。

25 化合物(II)における環Aで示される「置換基を有していてもよいベンゼン環」の「置換基」としては、例えば、上記 Ar^1 で示される「置換基を有していてもよいアリール」の「置換基」が挙げられる。上記「炭化水素基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし4個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なっても

よい。

化合物 (II) における R^4 または R^5 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、例えば、上記 R^1 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」と同様のものが挙げられる。

- 5 化合物 (II) における R^4 または R^5 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」としては、例えば、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる 1 または 2 種、1 ないし 4 個のヘテロ原子を含む 5 ないし 14 員 (単環、2 環または 3 環式) 複素環、好ましくは (i) 5 ないし 14 員 (好ましくは 5 ないし 10 員) 芳香族複素環、(ii) 3 ないし 14 員非芳香族複素環または (iii) 7 ないし 10 員複素架橋環から任意の 1 個の水
10 素原子を除いてできる 1 価基などが挙げられる。

- 上記「5 ないし 14 員 (好ましくは 5 ないし 10 員) の芳香族複素環」としては、例えば、チオフエン、ベンゾ [b] チオフエン、ベンゾ [b] フラン、ベン
ズイミダゾール、ベンズオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンズイソチアゾ
15 ル、1H-ベンゾトリアゾール、ナフト [2, 3-b] チオフエン、フラン、ピ
ロール、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、1, 2, 3-トリアゾール、
1, 2, 4-トリアゾール、テトラゾール、1, 3, 4-チアジアゾール、1,
3, 4-オキサジアゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、イ
ンドール、イソインドール、1H-インダゾール、プリン、4H-キノリジン、
20 イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリ
ン、シンノリン、カルバゾール、 β -カルボリン、フェナントリジン、アクリジ
ン、フェナジン、チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン、イソオキサゾ
ール、フラザン、フェノキサジンなどの芳香族複素環、またはこれらの環 (好ま
しくは単環) が 1 ないし複数個 (好ましくは 1 または 2 個) の芳香環 (例、ベン
25 ゼン環、ピリジン環、イミダゾール環等) と縮合して形成された環などが挙げら
れる。

上記「3 ないし 14 員非芳香族複素環」としては、例えば、オキシラン、オキ
セタン、テトラヒドロフラン、ジヒドロフラン、ピラン、ジオキサラン、ジオキ
サン、アゼチジン、ピロリジン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ピ

ペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、チアゾリジン、オキサゾリジン、オキサジアゾリン、チアジアゾリン、トリアゾリン、1, 4-ジアゼパン、1, 4-オキサゼパン、1, 4-チアゼパン、および上記芳香族複素環の還元体または部分還元体（例、1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、インドリンなど）などが挙げられる。

上記「7ないし10員複素架橋環」としては、例えば、キヌクリジン、7-アザビシクロ〔2. 2. 1〕ヘプタンなどが挙げられる。

該「複素環基」として好ましくは、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる1または2種、好ましくは、1ないし4個のヘテロ原子を含む5ないし14員（好ましくは5ないし10員）の（単環または2環式）複素環基である。具体的には、例えば2-チエニル、3-チエニル、2-フリル、3-フリル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、8-キノリル、1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、ピラジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、1-ピロリル、3-ピロリル、1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、3-ピリダジニル、2-チアゾリル、2-オキサゾリル、3-イソチアゾリル、3-イソオキサゾリル、1-インドリル、2-インドリル、3-インドリル、2-ベンゾチアゾリル、2-ベンゾ〔b〕チエニル、3-ベンゾ〔b〕チエニル、2-ベンゾ〔b〕フラニル、3-ベンゾ〔b〕フラニルなどの芳香族複素環基、例えば1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、2-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノ、2-ピペリジル、3-ピペリジル、4-ピペリジル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などである。

上記「置換基を有していてもよい複素環基」の「置換基」としては、例えば、上記Ar¹で示される「置換基を有していてもよいアリール」の「置換基」が挙げられる。上記「複素環基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

化合物 (II) における R^4 または R^5 で示される「アシル」としては、例えば、式 $-(C=O)-OR^7$ 、 $-(C=O)-R^8$ 、 $-(C=O)-NR^8R^9$ 、 $-(C=S)-NR^8R^9$ 、 $-SO-R^7$ 、 $-SO_2-R^7$ または $-SO_2-NR^8R^9$

- 〔式中、 R^7 は置換基を有していてもよい炭化水素基、または置換基を有していてもよい複素環基； R^8 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、または置換基を有していてもよい複素環基； R^9 は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示し、 NR^8R^9 は環状アミノであってもよい〕で表される基などが挙げられる。

- R^7 、 R^8 または R^9 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、上記 R^1 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」などが挙げられる。

R^7 、 R^8 または R^9 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」としては、上記 R^4 または R^5 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」などが挙げられる。

- NR^8R^9 で示される「環状アミノ」としては、例えば、1 個の窒素原子と炭素原子以外に、窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる 1 または 2 種、1 ないし 4 個のヘテロ原子を含んでいてもよい 5 ないし 7 員飽和環状アミノが挙げられ、具体例としては、ピロリジン-1-イル、ピペリジノ、ピペラジン-1-イル、モルホリノ、チオモルホリノ、テトラヒドロアゼピン-1-イル、ホモピペラジン-1-イルなどが挙げられる。

化合物 (II) における R^6 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、上記 R^1 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」などが挙げられる。

- 化合物 (II) における R^7 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」としては、上記 R^1 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」などが挙げられる。

化合物 (II) における R^7 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」としては、上記 R^4 または R^5 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」などが挙げられる。

環Aとして好ましくは、無置換のベンゼン環などである。

R^4 および R^5 として好ましくは、一方が水素原子で、他方がアシルなどである。さらに好ましくは、一方が水素原子で、他方が C_{1-8} アルキル-カルボニルなどである。

- 5 R^6 として好ましくは、置換基を有していてもよい C_{7-19} アラルキルなどである。さらに好ましくはベンジルなどである。

Xとして好ましくは、 $-NR^7-$ である。 R^7 として好ましくは、水素原子である。

化合物(II)の具体例としては、

- 10 環Aが、無置換のベンゼン環、

R^4 および R^5 の一方が水素原子で、他方が C_{1-8} アルキル-カルボニル、

R^6 が置換基を有していてもよいベンジル、

Xが $-NR^7-$ 、

R^7 が水素原子である化合物などが挙げられる。

- 15 なかでも好ましくは、DH 97 [N-[2-(2-ベンジル-1H-インドール-3-イル)エチル]ペンタンアミド] などである。

式(I)または(II)で表される化合物の塩としては、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

- 20 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-ピリジンジールアミン、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

- 25 -ジベンジリ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。

標識された化合物（I）および（II）も、本発明のリガンドとして、スクリーニングに用いることができる。

- 標識物質としては、放射性同位元素（例、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ など）、蛍光物質（例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート、NBD（7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol）など）、酵素（例、 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）、発光物質（例、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）、ビオチン、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 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ が好ましい。

本発明のリガンド、例えば化合物（I）、化合物（II）などは、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製造または抽出することもできる。

- 本発明のTGR25またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプタータンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のTGR25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も製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて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。

- 5 本発明のTGR 25もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質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-
- 10 (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挙げるることができる。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、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮
- 15 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タンパク質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、目的のタンパク質またはそ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、タンパク質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。
- 20 これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、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。
- 25

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、タンパク質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
- 5 温度はタンパク質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 $-20 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 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 $1.5 \sim 4$ 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
- 10 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ができる。

- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリー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、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフ
- 15 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、ターシャリーブチル、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
- 20 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、ターシャリー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。

- 25 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、Bz1、Cl₂-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリー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
5 -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
10 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
15 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-2
20 0~40℃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、
25 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。

タンパク質のアミド体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（タンパク質）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タンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質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タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、
10 所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質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タンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質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、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることが
15 できる。

本発明のTGR 25の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のTGR 25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、
20 液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のTGR 25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a)～e)に記載された方法が挙げられる。

- 25 a) 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)
b) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

d) 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)

e) 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部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の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、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のTGR25をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のTGR25をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のTGR25をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のTGR25をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15（7）、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のTGR25のmRNAを定量することができる。

本発明のTGR25をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・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、上記した細胞・組織より全RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接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。

具体的には、本発明のヒトTGR25をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わ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で表わされるアミノ酸配列からなるヒトTGR25と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプタータンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 配列番号：2で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、
- 5 例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約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。塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することが
- 10 できる。

- ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、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
- 15 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。該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
- 20 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で表わされるアミノ酸配列からなるヒトTGR25をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

- また、本発明のTGR25をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本
- 25 発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、TGR25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、あるいは決定され

たTGR25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。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、TGR25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TGR25関連RNAとの相互作用を介してTGR25遺伝子の発現を調節・制御することができる。TGR25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TGR25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TGR25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（タンパク質）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（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。TGR25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、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域、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、TGR25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で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、対象物と、「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デオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、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、市販のタンパク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、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1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、例えばタンパク質(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、ポリー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核酸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核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸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核酸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。

- 5 本発明のアンチセンス核酸は、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
- 10 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）といった粗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
- 15 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
- 20 れに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質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。

- 25 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明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、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・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、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、R T - P C R法と略称する）によって増幅することもできる。

- 5 具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
- (1) 配列番号：2で表わ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(2) 配列番号：2で表わ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で表わされるアミノ酸配列からなるT G R 2 5と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、
- 10 シグナル情報伝達作用など）を有するレセプタータンパク質をコードする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で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA
- 15 などが用いられる。

塩基配列の相同性は、前記した相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用い、同様の条件にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションの方法および条件は前記と同様である。

- 本発明のT G R 2 5またはその部分ペプチド（以下、本発明のT G R 2 5と略
- 20 記する場合がある）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T G R 2 5の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてP C R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T G R 2 5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。

- 25 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の塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））などを用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法などの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
5 できる。

クローン化されたTGR25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
10 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TGR25の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のTGR25をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）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
15 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）、
20 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/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、SR α プロモーター、SV40プロモーター、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挙げられる。
25 これらのうち、CMVプロモーター、SR α 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、 λ PLプロモーター、lpp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。

- 5 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^r*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neor*と略称する場合がある、*G418*耐性）等が挙げられる。
- 10 特に、*CHO*（*dhfr⁻*）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不含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、本発明のレセプタータンパク質の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、*MF α* ・シグナル配列、*SUC2*・シグナル配列など、
- 15 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TGR25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。

- 25 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*) M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255 (1983)] , 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984)] などが用いられる。

- 5 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2 , A H 2 2 R⁻ , N A 8 7 - 1 1 A , D K D - 5 D , 2 0 B - 1 2 、 シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3 , N C Y C 2 0 3 6 、 ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。

- 10 昆虫細胞としては、例えば、ウィルスが A c N P V の場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; S f 細胞) 、 *Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、 *Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM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 B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711) 、 S f 2 1 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)] 。

- 20 動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 (C O S 7) , V e r o , チヤイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記) , d h f r 遺伝子欠損チヤイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r⁻) 細胞と略記) , マウス L 細胞, マウス A t T - 2 0 , マウスミエローマ細胞, ラット G H 3 , ヒト F L 細胞などが用いられる。

- 25 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、生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、通気や攪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、必要により通気や攪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、パークホ

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 °C ~ 35 °C で約 24 ~ 72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

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 °C で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

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)] , DME M 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 °C ~ 40 °C で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

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に本発明の TGR 25 を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の TGR 25 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 TGR 25 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 TGR 25 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タンパク質変性剤や、トリトン X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に TGR 25 が分泌される場合には、培養終了後、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TGR25の精製は、公知の分離・精製法を適切に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新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。

- 10 このようにして得られるTGR25が遊離体で得られた場合には、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。

15 なお、組換え体が産生するTGR25を、精製前または精製後に適当なタンパク質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。タンパク質修飾酵素としては、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。

20 このようにして生成する本発明のTGR25の活性は、標識したリガンド（リガンドペプチド）との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のTGR25に対する抗体は、本発明のTGR25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。

25 本発明のTGR25に対する抗体は、本発明のTGR25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TGR25は、哺乳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回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、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、抗原を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骨髓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、後記の標識化レセプタータンパク質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巻、495頁(1975年)]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) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、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）数と骨髓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、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約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、レセプタータンパク質の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レセプタータンパク質を加え、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挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知の方法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が、通常は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など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））また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、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に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、抗原結合固相またはプロテイン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、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（TGR25抗原）とキャリアタンパク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哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のTGR25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できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク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、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・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。

- 5 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、ジチオビ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
10 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回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、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、上記の血清中の抗体価の測定と同
15 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。

- 本発明のTGR25に結合するサロゲートリガンド（以下、リガンドと称する場合もある）として、例えばAM251、AM281、DH97などの非ペプチ
20 ド性化合物をあげることができ、例えば、ペプチド、タンパク質、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、血漿などであってもよく、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。

- 上記リガンドは塩を形成していてもよく、その塩としては、生理学的に許容さ
25 れる酸または塩基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。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、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、蔞酸、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。

リガンドがペプチドである場合、例えばヒトやその他の温血動物（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、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
5 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、幹細胞もしくはガン細胞等）もしくは
10 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、嗅球、扁桃核、大脳基底核、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、唾液腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、骨格筋等に由来するポリペ
15 プチドであってもよく、また組換えポリペプチド、あるいは合成ポリペプチドであってもよい。以下、リガンドがペプチドである場合をリガンドペプチドと称する。

「実質的に同一」とはリガンドの活性、例えば、TGR25への結合活性、細胞内シグナル伝達活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C
20 a^{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
25 ナーゼ）の活性化、血清応答因子遺伝子の発現上昇、TGR25タンパク質の細胞内局在の変化などを促進または抑制する活性など）、抗炎症作用など、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。リガンドペプチドの場合、アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入が、その生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさない限り、当該置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたりガ

ンドペプチドは、当該置換、欠失、付加あるいは挿入されていないものと実質的に同一である。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。

- 5 例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。
- 10

- また、リガンドペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基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ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。さらに、リガンドペプチドには、おのこのN末端またはC末端などにエピトープ（抗体認識部位）となりうる任意の外来ペプチド配列（例えば、FLAG、Hisタグ、HAタグ、HSVタグなど）を有しているものも含まれる。
- 15

- リガンドペプチドは、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。配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるペプチドをはじめとするリガンドペプチドは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよいが、アミドである場合が好ましい。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-ブチル等の C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等の C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチル等の C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチル等の α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基等の C_{7-14} アラルキル基のほか、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基等が用いられる。リガンドペプチドがC末端以外にカルボキシル基
- 20
- 25

(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本願明細書におけるリガンド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末端のエステル等が用いられる。

- さらに、リガンドペプチドには、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、ホルミル基、アセチル基等の C_{1-6} アルカノイル等の C_{1-6} アシル基等)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミル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、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等の C_{1-6} アルカノイル基等の C_{1-6} アシル基等)で保護されているもの、糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド、C末端のアミノ酸残基が修飾されているもの等も含まれる。特に、N末端のメチオニン残基のアミノ基がホルミル基で保護されている場合が好ましく、この場合、さらに上記した保護、修飾等を受けていてもよい。
- 15 リガンドペプチドは塩であってもよく、該塩としては、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)等との塩が用いられ、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(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、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、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。
- 20

- リガンドペプチドは、前述したヒトや非ヒト温血動物の細胞または組織から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、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、得られた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等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。
- 25

リガンドペプチドまたはそのアミド体の合成には、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)フェノキシ樹脂等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、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)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、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、対応する酸無水物または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-メチルピロリドン等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。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 $-20\sim 50^{\circ}\text{C}$ 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 $1.5\sim 4$ 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等が用いられる。

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-アダマンチル等の直鎖状、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等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、アセチル基等の低級(C_{1-6})アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられる。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-ブチル基等である。

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、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチル等が用いられる。

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等が用いられる。

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，
5 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〕等が用いられる。

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。

10 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd－黒あるいはPd－炭素等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等による酸処理や、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、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－20～4
15 0℃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－エタンジチオール等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
20 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－ブタンジチオール等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、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

25 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等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

リガンドペプチドのアミド体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リガンドペプチドのアミド体を得ることができる。

リガンドペプチド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、リガンドペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

リガンドペプチドは、公知のペプチドの合成法に従っても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、リガンド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)に記載された方法などが挙げられる。

- (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)、および
- (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、反応後は通常の前製法、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・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペプチ

ド、本発明の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ポリ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。

- 5 リガンドペプチドに対する抗体は、本発明のTGR25に対する抗体と同様にして製造することができる。

リガンド、TGR25、TGR25をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、リガンドペプチドまたはTGR25に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、本発明のDNAに対するアンチセンスDNA（以下、本発明のアンチセンスDNAと略記する場合がある）の用途について以下に記述する。

10

（1）本発明のTGR25の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤

- リガンドもしくはTGR25またはそれをコードするポリヌクレオチド（例、
- 15 DNA等）などに異常が生じたり、欠損している場合あるいは発現量が異常に減少している場合、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板
- 20 減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、
- 25 絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、

リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの種々の疾病が発症する。

したがって、生体内においてリガンドまたはTGR 25が減少しているために、リガンドの生理作用が期待できない（リガンドまたはTGR 25の欠乏症）患者
5 がいる場合に、a) リガンドまたはTGR 25を該患者に投与し、リガンドまたはTGR 25の量を補充したり、b) (i) TGR 25をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによつて、あるいは(ii) 対象となる細胞にTGR 25をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによつて、患者の体内におけるリガンドまたはTGR 25の量を増加させ、
10 リガンドの作用を充分に発揮させることができる。

すなわち、a) リガンド、b) TGR 25またはc) TGR 25をコードするDNAを、リガンドまたはTGR 25の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

具体的には、リガンド、TGR 25または本発明のDNAは、例えば、白血球
15 減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、
20 中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巢癌、卵巢胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リン
25 パ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髓増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患など

の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

リガンドまたはTGR25を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイ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。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、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。

例えば、a) リガンド、b) TGR25またはc) 本発明のDNAは、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、a) リガンド、b) TGR25またはc) 本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、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容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、上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)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80TM、HCO-50)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、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、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、ヒトやその他の哺乳動物(ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

例えば、リガンドの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、白血球減少症患者(体重60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球減少症患者(体重60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度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、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、白血球減少症患者(体重60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても

- 異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球減少症患者（体重60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度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、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(2) 遺伝子診断剤

- 本発明のDNAおよびアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたはその他の哺乳動物（ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のTGR25またはその部分ペプチドをコードする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剤として有用である。
- 15 本発明のDNAまたはアンチセンス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。
- 20 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりTGR25の発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱
- 25

- 癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、
卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部
肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、
急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血
5 病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、
肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫
瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎
症性疾患などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することが
できる。
- 10 一方、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりTGR25の発現過剰
が検出された場合は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰
瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾
患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心
筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血
15 小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘
腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細
胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵
内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精
巢腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉
20 腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息
肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、
多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白
血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌
腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症な
25 どの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(3) 本発明のTGR25の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のTGR25の

発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の a) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞、または (ii) 形質転換体等に含まれる本発明の T G R 2 5 の mRNA 量を測定することによる、本発明の T G R 2 5 の発現量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を提供する。本発明の T G R 2 5 の mRNA 量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例えば、免疫調節薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた細胞に含まれる本発明の T G R 2 5 の mRNA は、例えば、通常の方法により細胞等から mRNA を抽出し、例えば、T a q M a n P C R などの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノーザンブロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) 本発明の T G R 2 5 を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明の T G R 2 5 の mRNA を同様にして定量、解析することができる。

20 本発明の T G R 2 5 の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれる本発明の T G R 2 5 の mRNA 量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のTGR25のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

- 5 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、血漿などが用いられ、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。試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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-ピリジン、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。
- 10
- 15
- 20
- 25 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、本発明のTGR25の発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(a) 本発明のTGR25の発現量を増加させることにより、TGR25を介する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺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

5 などを促進する活性、TGR25細胞内移行活性、血清応答因子の発現量変動活性など）を増強させる化合物、（b）本発明のTGR25の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、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

10 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、生理学的に許容される金属塩、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

15 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-ピリジン、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

20 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

25 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。

上記スクリーニング方法で得られる化合物は、

（i）本発明のTGR25の発現量を増加し、本発明のTGR25の機能不全に関連する疾患を予防・治療する化合物、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ

- 腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、
膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、
筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシ
ンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経
5 膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小
細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細
胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、
腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体
部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒
10 色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異
形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急
性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾
患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白
血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、
15 炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療作用を有する
化合物、または
- (ii) 本発明のTGR25の発現量を減少させ、本発明のTGR25の発現過多
に起因する疾患、例えば、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、
潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性
20 疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、
心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、
血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経
鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小
細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、
25 膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、
精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮
肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状
息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、
多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白

血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症などの予防・治療作用を有する化合物、白血球賦活作用を有する化合物などである。

したがって、上記スクリーニング方法で得られる本発明のTGR25の発現量

- 5 を増加する化合物またはその塩は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。
- 10
15
20

- 一方、上記スクリーニング方法で得られる本発明のTGR25の発現量を減少させる化合物またはその塩は、本発明のTGR25の発現過多に起因する疾患、例えば、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、
- 25

- 食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、陰嚕癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、
- 5 軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髓増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症の予防・治療剤、または白血球賦活剤などとして、低毒性で安全な医薬として使用することができる。
- 10 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。
- 例えば、該化合物は、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
- 15 口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、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容量が得られるようにするものである。
- 20 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
- 25 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、上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）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）
5 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、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ
10 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、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル
15 など）に対して投与することができる。

上記化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、例えば、白血球減少症患者（体重60 kgとして）においては、一日につき本発明のTGR25の発現量を増加する化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは
20 約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球減少症患者（体重60 kgとして）においては、一日につき本発明のTGR25の発現量を増加する化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を
25 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、体重60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

また、経口投与の場合、例えば、白血球増多症患者（体重60 kgとして）においては、一日につき本発明のTGR25の発現量を減少する化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20

mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球増多症患者（体重60kgとして）においては、一日につき本発明のTGR25の発現量を減少する化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度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、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(4) 本発明の抗体を用いる診断方法

10 リガンドペプチドに対する抗体は、本発明のリガンドペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中のリガンドペプチドの検出や中和に使用することができる。

本発明のTGR25に対する抗体は、本発明のTGR25を特異的に認識することができるので、被検液中のTGR25の検出や中和に使用することができる。

15 以下、本発明のTGR25に対する抗体を用いるTGR25の定量法について説明するが、リガンドペプチドに対する抗体を用いるリガンドペプチドの定量法も同様にして実施することができる。

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TGR25とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたTGR25の割合を測定することを特徴とする被検液中のTGR25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TGR25の定量法を提供する。

25 上記(ii)の定量法においては、一方の抗体がTGR25のN端部を認識する抗体で、他方の抗体がTGR25のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、TGR25に対するモノクローナル抗体を用いてTGR25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、Fa

b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いるT G R 2 5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、T G R 2 5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
5 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
10 えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 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、
15 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T
20 G R 2 5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
25 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本発明のT G R 2 5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。

5 本発明のサンドイッチ法によるTGR25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、TGR25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、TGR25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。

10 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。

20 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。

25 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TGR 25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）、
- 5 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.
- 10 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
- 15 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TGR 25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TGR 25の濃度を定量することによって、
- 20 TGR 25の濃度の変化が検出された場合、例えば、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下
- 25 垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、腫瘍、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、

- 皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など
- 5 の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(5) TGR 25に対するアゴニストのスクリーニング方法

- リガンドがTGR 25に結合することによって、血清応答因子遺伝子の発現上昇、TGR 25タンパク質の細胞内局在の変化が見られることから、TGR 25
- 10 は、これらの変化を指標としてTGR 25に対する上記リガンド以外のアゴニスト（天然リガンド、合成リガンドを含む）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

- すなわち、本発明は、試験化合物をTGR 25を含有する細胞に接触させた場合における、TGR 25を介した細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを
- 15 特徴とするTGR 25に対するアゴニストの決定方法を提供する。

- 試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、
- 20 カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、
- 25 アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , HCC-1, MIP-3

α /LARC、MIP-3 β /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー; fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1-リン酸など)の他に、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物(マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清、低分子合成化合物などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などをTGR25に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

(6) 本発明のTGR25とリガンドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、および本発明のTGR25とリガンドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬

本発明のTGR25を用いるか、または組換え型TGR25の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のTGR25との結合性を変化させる、またはこの結合によって生じるシグナル伝達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。

このような化合物には、(イ)TGR25を介して細胞刺激活性を有する化合物(いわゆる、本発明のTGR25に対するアゴニスト)、(ロ)TGR25を介する細胞刺激活性を阻害する化合物(いわゆる、本発明のTGR25に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のTGR25との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のTGR25との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

細胞刺激活性としては、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、GTP γ S 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
5 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、血清応答因子遺伝子の発現上昇、TGR 25 タンパク質の細胞内局在の変化などを促進する活性または抑制する活性などが挙げられ、なかでも、血清応答因子の発現上昇活性が好ましい。

すなわち、本発明は、(i) 本発明の TGR 25 とリガンドとを接触させた場合
10 合と (ii) 本発明の TGR 25 とリガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の TGR 25 との結合性またはシグナル伝達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を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と (ii) の場合における、例
15 えば、TGR 25 に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

リガンドとしては、前記したリガンドに代えて、リガンドと本発明の TGR 25 との結合性を変化させる化合物またはその塩（例えば、低分子合成化合物、好ましくは低分子合成アゴニスト）を用いることができる。リガンドと本発明の TGR 25 との結合性を変化させる化合物またはその塩は、後述するスクリーニング方法を用いて得ることができる。本発明のスクリーニング方法においては、これらリガンドと本発明の TGR 25 との結合性を変化させる化合物またはその塩も含めてリガンドと称する。

より具体的には、本発明は、

25 a) 標識したリガンドを、本発明の TGR 25 に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の TGR 25 に接触させた場合における、標識したリガンドの該 TGR 25 に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の TGR 25 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) 標識したリガンドを、本発明のTGR25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、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のTGR25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、標識した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リガンドと本発明のTGR25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、

c) 標識したリガンドを、本発明の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TGR25に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の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TGR25に接触させた場合における、標識したリガンドの該TGR25に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のTGR25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、

d) 本発明のTGR25を活性化する化合物（例えば、本発明のTGR25に対するリガンドなど）を本発明のTGR25を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のTGR25を活性化する化合物および試験化合物を本発明のTGR25を含有する細胞に接触させた場合における、TGR25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リガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達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

e) 本発明のTGR25を活性化する化合物（例えば、本発明のTGR25に対するリガンドなど）を本発明の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TGR25に接触させた場合と、本発明のTGR25を活性化する化合物および試験化合物を本発明の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TGR25に接触させた場合における、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達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を提供する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下に記述する。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のTGR25としては、上記した本発明のTGR25を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のTGR25を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。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ヒト由来のTGR25などが適している。

本発明のTGR25を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のTGR25をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のTGR25を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したTGR25であってもよいし、該TGR25を含有する細胞を用いてもよく、また該TGR25を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のTGR25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。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のTGR25を含有する細胞としては、該TGR25を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞

などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、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。細胞の破碎方法としては、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
5 トロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、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碎などが挙げられる。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、細胞破碎液を低速（500～3000 rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（1500
10 0～30000 rpm）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TGR25と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

該TGR25を含有する細胞や膜画分中のTGR25の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。
15 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。

リガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物をスクリーニングする上記のa)～c)を実施するためには、例えば、適当
20 なTGR25画分と、標識したリガンドが必要である。TGR25画分としては、天然型のTGR25画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型TGR25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、シグナル情報伝達作用などを示す。標識したリガンドとしては、例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

25 具体的には、リガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のTGR25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TGR25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、トリスー塩酸バッファーなどのリガン

- ドとTGR25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-80TM（花王ーアトラス社）、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レセプターやリガンド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の該レセプタータンパク質溶液に、一定量（5000~500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} M~ 10^{-10} 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リガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0~50℃、望ましくは約4~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約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拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- リガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のd)~e)の方法を実施するためには、例えば、TGR25を介する細胞刺激活性を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TGR25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な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、cAMP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TGR 25を発現する細胞が必要である。本発明のTGR 25を発現する細胞としては、天然型
5 の本発明のTGR 25を有する細胞株、上記の組換え型TGR 25を発現した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、血漿などが用いられ、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
10 物であってもよい。試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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-ピリジン、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
15 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
20 酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

また、試験化合物としては、本発明のTGR 25の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するよう

に設計された化合物が好ましく用いられる。本発明のTGR 25の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

- 5 リガンドと本発明のTGR 25との結合性またはシグナル伝達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TGR 25、本発明のTGR 25を含有する細胞、または本発明のTGR 25を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

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

- 10 a) 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0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

- 15 b) TGR 25 標品

本発明のTGR 25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% CO₂、95% airで2日間培養したもの。

c) 標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したリガンド

- 20 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

d) リガンド標準液

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。

- 25 2. 測定法

a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のTGR 25発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

b) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識リガンドを5

μ l 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 のリガンドを 5μ l 加えておく。

c) 反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを $0.2\text{ N NaOH} - 1\% \text{ SDS}$ で溶解し、4 ml の液体シンチ

5 レーターA（和光純薬製）と混合する。

d) 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) を次の式で求める。

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

PMB : Percent Maximum Binding

10 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

TGR25 に対するアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の (i) または (ii) に従えばよい。

15 (i) 前記 a) ~ c) 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、リガンドペプチドと本発明の TGR25 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 TGR25 に対するアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は
20 本発明の TGR25 に対するアンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物を本発明の TGR25 を含有する細胞に接触させ、上記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 TGR25 に対するアゴニストである。

(b) 本発明の TGR25 を活性化する化合物（例えば、リガンド）を本発明の
25 TGR25 を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の TGR25 を活性化する化合物および試験化合物を本発明の TGR25 を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の TGR25 を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の TGR25 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 TGR25 に対するアンタゴニストである。

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、リガンドと本発明のTGR25との結合性またはシグナル伝達を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明のTGR25に対する
5 アゴニスト）、（ロ）レセプターへの結合活性は有するが該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のTGR25に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のTGR25との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のTGR25との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、抗体、非ペプチド性化合物、合成
10 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。

本発明のTGR25に対するアゴニストは、リガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、リガンドペプチドが有する生理活性に応じて安全で低
15 毒性な医薬として有用である。

本発明のTGR25に対するアンタゴニストは、リガンドが有する生理活性を抑制することができるので、リガンドペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のTGR25との結合力を増強する化合物は、リガンドが有
20 する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のTGR25との結合力を減少させる化合物は、リガンドが有する生理活性を減少させるためのリガンドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、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
25 いて得られる化合物またはその塩、特にアゴニストまたはリガンドと本発明のTGR25との結合力を増強する化合物またはその塩は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、

メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

一方、上記スクリーニング方法で得られるアンタゴニストまたはリガンドと本発明のTGR25との結合力を減少させる化合物またはその塩は、本発明のTGR25の発現過多に起因する疾患、例えば、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好まし

くは白血球増多症などの予防・治療剤、白血球賦活剤などとして低毒性で安全な医薬として使用することができる。

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組成物として使用する場合、常套手段に従って

5 製剤化することができる。

例えば、該化合物は、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、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味

10 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容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

15 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、上記タイプの材料に

20 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

25 トリウムなど）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）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80™、HCO-50）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、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても

よい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、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、ヒトや哺乳動物（ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、白血球減少症患者（体重 60 kg として）においては、一日につきアゴニストを約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球減少症患者（体重 60 kg として）においては、一日につきアゴニストを約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度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、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。経口投与の場合、一般的に例えば、白血球増多症患者（体重 60 kg として）においては、一日につきアンタゴニストを約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球増多症患者（体重 60 kg として）においては、一日につきアンタゴニストを約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度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、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

また本発明は、骨髓などに存在する幹細胞または間葉系未分化細胞、幼若造血

系細胞の機能、あるいは骨髄内造血支持組織中などに存在する脂肪細胞、脂肪前駆細胞の機能を制御することを特徴とする、リガンドまたはその塩とTGR25との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬を提供する。

- 骨髄は、長骨の髄腔や、椎体、肋骨、胸骨、骨盤など骨の内部にある海綿状の組織であり、造血の場である。大きくは血液細胞とそれを支持する間質細胞からなり、さらに細かくは様々な血球系細胞に分化しうる能力をもった多能性造血幹細胞の他、各血球の前駆細胞、マクロファージ、脂肪細胞、細網細胞、細網繊維等からなっている。骨髄中の造血幹細胞の分化には、細胞や基質との接着、局所で作用するサイトカインなどが重要で、それは造血微小環境という概念でよばれており、細胞が造血微小環境に着床することに関与するホーミングをになう分子、多能性幹細胞の増殖、維持に関与する分子、骨髄からの血球の遊出、動員に関与する分子が作用していると考えられる。また、骨髄間質の脂肪細胞、繊維芽細胞、細網細胞は他の部位とは異なる独特の性質をもち、骨髄の造血微小環境の形成に重要と考えられている。Gタンパク質共役型レセプターが生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達すると、タンパク質など様々な液性因子の分泌や新たな細胞表面抗原分子の発現により、近接した他の細胞の機能にも影響を及ぼす。従って、骨髄に発現するGタンパク質共役型レセプターのシグナルを制御するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストは、こうした細胞集団中において、特定の細胞機能に直接或いは間接的に影響を及ぼすため、骨髄に存在する上記の各種細胞機能に由来する疾患の予防および／または治療薬や診断薬に応用することもできる。

- National Center for Biotechnology InformationのGene Expression Omnibusに開示されているマイクロアレイで解析したデータによれば、cardiotoxinを投与した骨格筋で、該レセプターの遺伝子発現が亢進することが示されている。このことから該レセプターのシグナルを制御するリガンド、アゴニスト、アンタゴニストは筋細胞の損傷、あるいは機能異常などによる疾患の治療に応用できる。

(7) 各種薬物の作用メカニズムの解明方法

TGR25を用いることによって、各種薬物がTGR25を介して薬理効果を

発揮しているか否かを確認することができる。

すなわち、本発明は、

- (i) TGR25を用いることを特徴とする、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全などの予防・治療薬が該レセプタータンパク質またはその塩に結合することを確認する方法、
- (ii) TGR25を用いることを特徴とする、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血

病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全などの予防・治療薬が該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストであることを確認する方法、

- 5 (iii) TGR25を用いることを特徴とする、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、
- 10 悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全などの予防・治療薬が該レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストであることを確認する方法、
- 15 20

(iv) 各薬をTGR25に接触させた場合における、各薬とTGR25との結合量を測定することを特徴とする上記(i)～(iii)記載のスクリーニング方法を提供する。

- 25 この確認方法は、前記したリガンドとTGR25との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法において、試験化合物に代えて、上記の薬物を使用することによって実施することができる。

また、本発明の確認方法用キットは、前記したリガンドとTGR25との結合性を変化させる化合物のスクリーニング用キットにおいて、試験化合物に代えて、上記の薬物を含有するものである。

このように、本発明の確認方法を用いることによって、市販または開発途中の各種薬物がTGR25を介して薬理効果を発揮していることを確認することができる。

5 **(8) 細胞膜における本発明のTGR25またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬**

本発明の抗体は、本発明のTGR25を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のTGR25の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングに用いることができる。

10 すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25を定量することによる、細胞膜における本発明のTGR25の量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、

15 (ii) 本発明のTGR25を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25を定量することによる、細胞膜における本発明のTGR25の量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、

20 (iii) 非ヒト哺乳動物のa) 血液、b) 特定の臓器、c) 臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のTGR25の量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、

25 (iv) 本発明のTGR25を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のTGR25の量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を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25の定量は具体的には以下のようにし

て行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例、免疫調節薬など）あるいは物理的ストレス（例、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例、トリトンX100TM、ツイーン20TMなど）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

- 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、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。細胞の破碎方法としては、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）による破碎、超音波による破碎、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碎などが挙げられる。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、細胞破碎液を低速（500～3000 rpm）で短時間（通常、約1～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000～30000 rpm）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TGR25と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

- 細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

このようなサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができる、ウエスタンブロットは公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のTGR25を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25を定量することができる。

細胞膜における本発明のTGR25の量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前
5 ～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に試験化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分～3日後、好ましくは1時間～2日後、より好ましくは1時間～24時間後）、細胞膜における本発明のTGR25の量を定量することにより行なうことができ、
10

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に試験化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日～7日後、好ましくは1日～3日後、より好ましくは2日～3日後）、細胞膜における本発明のTGR25の量を定量することにより行なうことができる。

15 細胞膜画分に含まれる本発明のTGR25の確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的にはアルツハイマー病モデルのラット、マウス、ウサギなど）に対して、薬剤（例えば、免疫調節薬など）
20 あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化
25 することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のTGR25の量を確認することができる。

(iv) 本発明のTGR25を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜

における本発明の T G R 2 5 の量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(a) 細胞膜における本発明の T G R 2 5 の量を増加させることにより、T G R 2 5 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 C a ²⁺ 遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c A M P 生成抑制、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、細胞内タンパク質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下、血清応答因子遺伝子の発現上昇、T G R 2 5 タンパク質の細胞内局在の変化などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(b) 細胞膜における本発明の T G R 2 5 の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

- 10 該化合物としては、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。

- 15 該化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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、
20 2, 6 - オールチジン、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、
25 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。

- 細胞膜における本発明のTGR25の量を増加させることにより、細胞刺激活性を増強させる化合物またはその塩は、本発明のTGR25の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。具体的には、該化合物またはその塩は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、
- 5 潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小
- 10 細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髄異形成症候群、
- 15 多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療剤として、低毒性で安全な医
- 20 薬として使用することができる。

- 細胞膜における本発明のTGR25の量を減少させることにより、細胞刺激活性を減弱させる化合物またはその塩は、本発明のTGR25の発現過多に起因する疾患、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増
- 25 多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆

管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症などに対する安全で低毒性な予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、該化合物またはその塩は、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公知の担体、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容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、上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)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80TM、HCO-50)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、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、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、ヒトや哺乳動物(ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

15 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、白血球減少症患者(体重60kgとして)においては、一日につき細胞膜における本発明のTGR25の量を増加させる化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、白血球減少症患者(体重60kgとして)においては、一日につき細胞膜における本発明のTGR25の量を増加させる化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。

25 他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(9) 本発明のTGR25に対する抗体を含有してなる医薬

本発明のTGR25に対する抗体の中和活性とは、該TGR25の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有

する場合は、該TGR25の関与するシグナル伝達、例えば、該TGR25を介する細胞刺激活性（例、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、GTP γ S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、血清応答因子遺伝子の発現上昇、TGR25タンパク質の細胞内局在の変化などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、本発明のTGR25に対する中和抗体は、TGR25の過剰発現やリガンド過多などに起因する疾患、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、陰癌、卵巢癌、卵巢胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髓増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症の予防・治療剤、白血球賦活剤などとして用いることができる。

上記予防・治療剤は、前記した本発明のTGR25を含有する医薬と同様にして製造し、使用することができる。

(10) 本発明のアンチセンスDNAを含有してなる医薬

本発明のアンチセンスDNAは、TGR 25の過剰発現やリガンド過多などに起因する疾患、例えば、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性

5 疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、

10 膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、膣癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白

15 血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髓増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症の予防・治療剤、白血球賦活剤などとして用いることができる。

該アンチセンス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イルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイ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、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

20 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。

25

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)など）、TGR 25をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、TGR 25

の発現を抑制することができ、生体内におけるTGR25またはそ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、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、陰癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髄増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など、好ましくは白血球増多症の予防・治療剤、白血球賦活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。

(11) 本発明のDNA導入動物の作製

本発明は、外来性の本発明の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、

- 5 〔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第〔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第〔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を提供するものである。

- 10 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、
15 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
20 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、C57B
25 L/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、
B6D2F1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TGR25を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のTGR25の機能を抑制するTGR25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（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（例えば、ベクター）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TGR25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、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイ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）ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）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 I I、ウロプラキン I I、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、グリア線維性酸性タンパク質、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 K 1, K 10 および K 14、コラーゲン I 型および II 型、サイクリック AMP 依存タンパク質キナーゼ β I サ
- 5 プユニット、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 Tie 2 と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン三リン酸化酵素（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 II A、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-2 L）、H-ras、
- 10 lenin、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子 1 α （EF-1 α ）、 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、ミエリン基礎タンパク質、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、
- 15 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イルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1 α （EF-1 α ）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 mRNA の転写を終

20 結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイ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、シミアンウイルスの SV 40 ターミネー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

25 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 TGR 25 の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（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TGR25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。

10 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。

20 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。

25 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TGR25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TGR25の機能亢進症や、本発明のTGR25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
5 発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明のTGR25の増加症状を有することから、本発明のTGR25に関連する疾患に対する治療薬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
10 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料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
15 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
20 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TGR25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
25 発明のTGR25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TGR25の機能不活性型不応症における本発明の異常TGR25による正常TGR25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、本発明のTGR25の増加症状を有することから、本発明のTGR25または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
5 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TGR25組織を分析することによる、本発明のTGR25により特異的に発現あるいは活性化するTGR25との関連性について
10 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
- 15 (v) 本発明の変異TGR25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TGR25の機能不活性型不応症などを含む、本発明のTGR25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TGR25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
20 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、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、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TGR25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
25 発明のTGR25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TGR25の機能不活性型不応症を含む、本発明のTGR25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TGR25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。

5 (12) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全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DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 10 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第〔4〕項記載の胚幹細胞、
- 15 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
- 20 (9) ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩の、血清応答因子遺伝子の発現上昇、TGR25タンパク質の細胞内局在の変化を提供する。

- 25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のTGR25の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のTGR25の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト

哺乳動物の胚幹細胞（以下、E S細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的
手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ
5 ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読
み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することに
より本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のD
NA不活性化E S細胞または本発明のノックアウトE S細胞と略記する）の具体
10 例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離
し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子
を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝
子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代
表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、
15 あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列
（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなく
することによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有す
るDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換
え法により該動物の染色体に導入し、得られたE S細胞について本発明のDNA
20 上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーショ
ン解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベ
クター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマー
としたPCR法により解析し、本発明のノックアウトE S細胞を選別することに
より得ることができる。

25 また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のE S細胞とし
ては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知の
EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスの
E S細胞の場合、現在、一般的には129系のE S細胞が使用されているが、免
疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背

景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス(C57BL/6とDBA/2とのF1)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという

5 利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

15 ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

25

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~1000

0 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内 (好ましくは、5 %炭酸ガス、95 %空気または5 %酸素、5 %炭酸ガス、90 %空気) で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液 (通常0.001~0.5 %トリプシン/0.1~5 mM EDTA、好ましくは約0.1 %トリプシン/1 mM EDTA) 処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1~3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. EvansおよびM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のTGR25または本発明のTGR25の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知の方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近

- 傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた
- 5 場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。
- 10 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のTGR25のヘテロ発現不全個体であり、本
- 15 発明のTGR25のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のTGR25のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。
- 20

- このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。
- 25 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化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うる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の

雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

- 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のTGR25により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のTGR25の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明および治療法の検討に有用である。

10 **(12a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法**

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 15 すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 20 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、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。試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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-オールチジン、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。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、例えば、該試験動物の炎症症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

- 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のTGR25の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血

小板増加症、癌（例、脳腫瘍、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、肝細胞癌、膵癌、膵内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、腎臓癌、腎盂癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫、絨毛性疾患、臆癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、菌状息肉症、基底細胞腫、軟部肉腫、悪性リンパ腫、ホジキン病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、慢性骨髓増殖性疾患、膵内分泌腫瘍、原発不明癌など）、肺水腫、多臓器不全など）に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬品として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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-ピリジンジエタノールアミン、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、シユウ酸、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。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のTGR25とリガンドペプチドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 5 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、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に炎症患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常、炎症患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、
15 好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度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、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

20 (12b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性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を提供する。

- 25 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のTGR25をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のTGR25の発現する組織で、本発明のTGR25の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のTGR25の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のTGR25欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される金属塩、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-ピリジン、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

5 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

10 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。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、

15 本発明のTGR25の発現を促進し、該TGR25の機能を促進することができるので、例えば、本発明のTGR25の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。具体的には、該化合物は、例えば、抗炎症剤として、さらには、例えば心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、白血球減少症、血小板減少症、白血球増加症、血小板増加症癌、白血病、リンパ腫、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、肺水腫、多臓器不全、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

20

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、

25 本発明のTGR25の発現を阻害し、該TGR25の機能を阻害することができるので、例えば、本発明のTGR25の発現過多に関連する疾患、例えば、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、白血球減少症、血小板減少症、白血球増加症、血小板増加症癌、白血病、リンパ腫、潰瘍性大腸炎、慢性関

節リウマチ、肺水腫、多臓器不全、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のTGR25またはその塩とリガンドペプチドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

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、ヒトまたはその他の哺乳動物（ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウ

- 10 シ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）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、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に炎症患者（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、
15 該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常、炎症患者（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度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
20 も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性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で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の
25 原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のTGR25のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのTGR25を合成させ、その生体での作用を検討することも可能とな

る。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明の T G R 2 5 そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

5

本明細書および図面において、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。

10	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
15	C	: シトシン
	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
20	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
25	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン

	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
5	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
10	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
15	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
20	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記

25 する。

T o s	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
B z l	: ベンジル
Cl ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル

	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
5	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
10	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

15

本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] 本発明のヒト由来TGR25のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：2] 本発明のヒト由来TGR25をコードするcDNAの塩基配列を示す。

20 [配列番号：3] 実施例3で使用したプライマーを表す。

[配列番号：4] 実施例3で使用したプライマーを表す。

[配列番号：5] 実施例3で使用したプローブを表す。

[配列番号：6] 実施例4で使用したプライマーを表す。

[配列番号：7] 実施例4で使用したプライマーを表す。

25 [配列番号：8] 実施例4で使用したプローブを表す。

実 施 例

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。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・

クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例 1

GPCR発現プラスミドおよびレポータープラスミドの宿主細胞 (HeLa) での一過性

5 発現

まず、公知の方法によって作製したGタンパク質共役型受容体タンパク質TGR25 (配列番号: 1) をコードするcDNAをpAKK0-111H (Biochem. Biophys. Acta, Hinuma, S. et al., 1219, 251-259, 1994記載のpAKK0-1.111Hと同一のプラスミドベクター) に挿入した動物細胞用発現プラスミドを用いて、大腸菌JM109を形質転換し、得られたコロニーを単離・培養後、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (キアゲン) を用いてプラスミドの大量調製を行なった。また、血清応答配列 (SRE) の下流にレポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子が連結されたpSRE-Luc (Invitrogen) のレポータープラスミドおよびGタンパク質の一種であるヒトGαA、ヒトGβ1、ヒトGγ2の発現ベクタープラスミドを同様にして調製した。

- 15 Gタンパク質共役型レセプタータンパク質発現プラスミドおよびレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、HeLa細胞を用い、384穴アッセイプレート (COSTAR 3704) に4000細胞/穴、培養液量25μlで播種し、一晩培養した。培地はDMEM (Invitrogen) に10%のウシ胎児血清と1% MEM non-essential amino acids solutionを添加したもの (DMEM/NEAA) を用いた。
- 20 各プラスミドを240ng/μlの濃度に希釈し、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現プラスミド、あるいは対照実験としてレセプターの発現プラスミドの代りにレセプタータンパク質をコードするDNAを含まない発現ベクターpAKK0-111Hのプラスミドを1μlとレポータープラスミド9μlおよびGαA、Gβ1、Gγ2のGタンパク質発現プラスミド各1μlの割合で240μlのOpti-MEM-I (Invitrogen) に添加した。これを、同じく240μlのOpti-MEM-Iに10μlのLipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) を添加したものと等量混合して、添付のマニュアル記載の方法に従ってリポソームとプラスミドの複合体を形成させた。これらを5μl/穴ずつHeLa細胞の培養液に添加し、プラスミドの導入を行った後、37°C、5% CO₂ 下で一晩培養した。
- 25

実施例 2

レポーターアッセイによるリガンド活性の検出

- 実施例 1 で準備したHeLa細胞を、ウシ胎児血清を含まないDMEM/NEAA（アッセイ用培地）で2回洗浄後、37℃、5% CO₂下で2時間培養した。さらにアッセイ用培地
5 地で1回洗浄後、0.05% CHAPSを含むアッセイ用培地に溶解したAM251（Biomol）を各穴の細胞に添加した。サンプル添加後に37℃、5% CO₂下で4時間のインキュベーションを行ない、レセプターを介したリガンドのアゴニスト活性によって惹起される細胞内シグナル伝達に由来するレポーター遺伝子の転写・翻訳の促進を
10 誘導した。インキュベーション終了後に各穴の培地を除去し、ルシフェラーゼ活性測定用の基質であるピッカジーンLT2.0（東洋インキ社）を8μlずつ加えた。細胞が溶解し、基質と十分に混合した後、各穴のレポーター遺伝子の発現誘導量に由来する化学発光量をプレートリーダー（EnVision™、パーキンエルマー）にて測定した。
- 15 その結果、表 1 に示したようにTGR25の発現細胞でAM251（2μM）添加によってルシフェラーゼ活性亢進が認められた。一方、対照のpAKK0-111H導入細胞では、AM251（2μM）を添加しても有意な活性の亢進は検出されなかった。

〔表 1〕

- 20 TGR25発現細胞におけるAM251によるルシフェラーゼ活性（cps）の亢進

AM251濃度（μM）	TGR25	pAKK0-111H（対照）
0	7527	6220
2	17897	5756

25

実施例 3

ヒトTGR25 mRNAの発現分布

mRNAの発現量の定量にはABI PRISM7700 SequenceDetector（アプライドバイオシステムズ社）を用いた。発現量の定量に用いるプライマー [5'-

5 TGAGTGTGGGACAAATGCATGT-3' (配列番号: 3)、5'-ACACAGGTGAGGGTCATGTTAGG-3' (配列番号: 4)] とプローブ [5'-ATCGTCTTCTCTCACCAGCGACCGC-3' (配列番号: 5)] は、ヒト型TGR25の塩基配列 (配列番号: 2) をもとにABI PRISM SequenceDetector専用のソフトウェアPrimerExpress (アプライドバイオシステムズ社) を利用してデザインした。鋳型となるcDNAは、ヒト各種組織由来の全RNA (クロンテック社) 1 μ gからランダムプライマーを用いて逆転写反応して合成したものを使用した。逆転写反応は逆転写酵素としてSuperScriptII (GIBCO BRL社) を使用し、添付のプロトコールにしたがって行った。ABI PRISM7700 SequenceDetectorの反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) を12.5 μ l、各プライマーを0.9 μ M、プローブを0.25 μ M、cDNA溶液を混合し、蒸留水で25 μ lとして調製した。ABI PRISM7700 SequenceDetectorでの反応は、50 $^{\circ}$ Cで2分、95 $^{\circ}$ Cで10分の後、95 $^{\circ}$ C・15秒、60 $^{\circ}$ C・1分のサイクルを40回繰り返して行った。ヒト各種組織でのmRNAの発現分布を図1に示す。骨髄で高い発現量が検出された。

15

実施例 4

マウスTGR25 mRNAの3T3-L1細胞における発現

マウス由来3T3-L1細胞は常法により培養した (前駆脂肪)。この細胞をインスリン (10 μ g/ml)、デキサメタゾン 2.5 μ M、IBMX 0.5mM添加により2日間分化誘導をかけ、その後インスリン (10 μ g/ml) を含む培地で12日間培養し、脂肪細胞へ分化させた。それぞれの細胞よりIsogen (ニッポンジーン社) を用いて、マニュアルにしたがい、全RNAを調製した。鋳型となるcDNAは、実施例1と同様の方法で調製した。mRNAの発現量の定量にはABI PRISM7700 SequenceDetector (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。発現量の定量に用いるプライマー [5'-GCTGTCGGAACCTGTAGAGATCA-3' (配列番号: 6)、5'-TCCCAGAATACACAGGTGAGGAT-3' (配列番号: 7)] とプローブ [5'-TCCCATGAGCGTCAACCACCTAACGT-3' (配列番号: 8)] は、マウス型TGR25の塩基配列 (Mol. Cell. Biol. 20, 4405-4410 (2000)) をもとにABI PRISM SequenceDetector専用のソフトウェアPrimerExpress (アプライドバイオシステムズ社) を利用してデザインした。ABI

PRISM 7700 SequenceDetectorでの反応は、50℃で2分、95℃で10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返して行った。前駆脂肪細胞では25ng 全RNAあたり35コピーと発現量は非常に少なかったが、脂肪細胞へ分化させると25ng 全RNAあたり81582コピーに上昇し、脂肪分化により発現が上昇した。

5

実施例 5

CHO細胞に発現させたTGR25-GFP融合タンパク質のAM251添加による細胞内移行

- TGR25のC末端に翻訳のフレーム合わせてオワンクラゲより単離されたGreen Fluorescent Protein (GFP) cDNAをつないだ融合タンパク質を発現させるための
- 10 発現プラスミドを構築した。その際GFP cDNAにはGFPの発現ベクターpQBI25 (宝酒造) から切り出した断片を用いた。TGR25はPCR法によりその終止コドン制限酵素NheIの認識配列に修正し、ここにGFP断片を連結して、実施例 1 に記載の発現ベクターpAKK0-111Hに挿入した。このようにして得たTGR25とGFPの融合タンパク質 (以下、TGR25-GFP融合タンパク質) 発現ベクターのプラスミドを用いて、
- 15 公知の方法でTGR25-GFPを安定的に発現するTGR25-GFP発現CHO (CHO-TGR25-GFP) を作製した。これをチェンバー数8つのLab-TekIIカバーグラスチェンバー (Nalgen Nunc社) にまき、37℃、5% CO₂条件下で一晩培養した後、共焦点顕微鏡 (ライカ社) でGFPの蛍光像を観察した。その後、培地をAM251 100μM含有のDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO BRL社) に置き換え、37℃、
- 20 5% CO₂条件下で45分間反応させ、共焦点顕微鏡でGFPの蛍光像の変化を観察した。

その結果、AM251添加前には細胞膜を中心に検出されたTGR25-GFP融合タンパク質の一部が細胞質に移動していることが見出された。このことはTGR25がAM251に反応して細胞質へ移行、すなわちAM251がTGR25に作用していることを示していた。

25 実施例 6

(1) ヒト末梢血からの血球細胞の調製

健康人ボランティア由来ヘパリン添加ヒト末梢血をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 4 倍に希釈し、Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences) に重層した。800 G で 40 分間遠心した後、浮遊層 (リンパ球および単球画分) および

沈澱層（多形核白血球および赤血球画分）をそれぞれ回収し、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で 2 回洗浄した。浮遊層画分はそのまま培養用培地（10% 非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地）に懸濁してリンパ球・単球浮遊液とした。沈澱層画分は滅菌水中で 40 秒間の浸透圧ショックによって溶血させた後、1/10 容の 10 倍濃縮 PBS を添加し、さらに培養用培地で洗浄して同培地に懸濁し、多形核白血球浮遊液とした。

（2）RT-PCR による TGR25 mRNA のヒト末梢血血球細胞での発現量の検討

血球細胞からの Total RNA の調製は、上記で調製したリンパ球、単球および多形核白血球を用いて、Isogen（ニッポンジーン）の処方に従って行なった。得られた Total RNA を DNaseI（Amplification Grade, Invitrogen）で処理後、1 μ g を SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase（Invitrogen）および Random Primers（Invitrogen）を用いて、処方に従い cDNA を合成した。cDNA は Total RNA 換算で 25 ng/ μ l の溶液とし、以後の PCR 反応の鋳型として用いた。PCR 反応は Sequence Detection System Prism 7700（Applied Biosystems）を用い、増幅と検出のためのプライマーおよび TaqMan probe は、実施例 3 で用いたもの（配列番号：3、4 および配列番号：5）を使用した。PCR 反応液は TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems）12.5 μ l に、それぞれ 100 μ M のプライマー溶液を 0.05 μ l、5 μ M の TaqMan probe を 0.5 μ l、および上記で調製した cDNA 溶液を 0.5 μ l 加え、蒸留水で総反応液量を 25 μ l とした。PCR 反応は 50°C を 2 分、95°C を 10 分の後、95°C を 15 秒、60°C を 1 分のサイクルを 40 回繰り返した。TGR25 mRNA の発現量は、増幅 DNA を含む標準 DNA 断片を鋳型とした PCR 反応から得られた検量線を用いて Total RNA 25 ng 当りのコピー数として算出した。

結果を図 2 に示す。TGR25 が多形核白血球で特異的に高発現していた。

25

実施例 7

ヒト末梢血多形核白血球に対する AM251 の MAP キナーゼ活性抑制作用

TGR25 が高発現していると考えられるヒト末梢血多形核白血球に対し、MAP キナーゼ（ERK1/2）の活性化（リン酸化）状態を指標に TGR25 アゴニスト（AM-251）の作用を調べた。実施例 6 - （1）に記載した方法に従って健常人末梢血より多

30

- 形核白血球の細胞集団を分離回収した。該細胞は、氷冷HBSS (Hank' s balanced salt solution、インビトロジェン社) で 4×10^6 cells/mlの濃度に懸濁後、 2×10^6 細胞 (0.5ml) ずつプラスチックチューブに分け、37℃で5分間静置した。その後、AM251を終濃度30 μ M、10 μ Mになるように添加し、37℃で5分間、10分間、30分間
- 5 静置、遠心後、上清を除去して細胞沈渣を得た。該細胞には直ちに50 μ lのBlue Loading Buffer (第一化学薬品) を添加し、ピペティングにて細胞を溶解した。さらに該細胞溶解液を超音波処理後95℃で5分間熱処理を行い、遠心分離 (15,000 rpm, 4℃, 5分間) を行い、上清を細胞粗蛋白質抽出液として得た。
- 次に該蛋白質 (各10 μ l分) を10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、
- 10 公知の方法にてPVDF膜 (BIO-RAD社) に電氣的に転写した。次に該膜をまず5%ウシ血清アルブミンを含むTBS-T溶液 (50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) でブロッキング後、一次抗体 (Phospho-p44/42 Map Kinase antibody; 第一化学薬品、2000倍希釈) を含むTBS-T溶液に浸し、室温で1時間振とうした。次に該膜をTBS-T溶液で洗浄後、TBS-T溶液で5000倍希釈したホースラディッシュ
- 15 ペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate、第一化学薬品) に浸し、室温で1時間浸とうした。最後に該膜をTBS-T溶液で再洗浄後、ECLplus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences社) とルミノ・イメージアナライザー (LAS-1000; FUJIFILM) を用いて化学発光の検出を行った。
- 20 結果を図3に示す。
- 解析の結果、AM251処理細胞ではヒト末梢血多形核白血球のMAPキナーゼ (ERK1/2) のリン酸化 (活性化) が抑制されていることが明らかとなった。

実施例 8

25 HL-60細胞株に対するAM251の分化促進作用

- ヒト白血病細胞株 (ヒト急性前骨髄性白血病細胞由来) HL-60はDMSO (dimethyl sulfoxide) 処理により好中球様細胞に分化することが知られている (Blood, 70, 1233-1244 (1987))。実施例3に準拠した遺伝子発現解析で該細胞株でのTGR25の発現が確認された。そこで、同細胞の分化へのTGR25アゴニスト
- 30 であるAM251の作用を調べた。

- 増殖期のHL-60細胞を10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地で懸濁後、12穴組織培養プレート（日本ベクトンディッキンソン社）に 5×10^4 細胞ずつ播種した。該細胞は、DMSO（終濃度1.25%）存在下、またはDMSO（終濃度1.25%）とAM251（終濃度 $10 \mu\text{M}$ ）共存下、 37°C 、5% CO_2 で4日間培養することで分化誘導させた。細胞分化の程度は、分化マーカーである細胞表面抗原CD11b/Mac-1の発現量を指標に、蛍光標識抗体（PE-anti-human CD11b/Mac-1、日本ベクトンディッキンソン社）とフローサイトメトリー（BD FACS Vantage™、日本ベクトンディッキンソン社）を用いて解析した。

結果を図4に示す。

- 10 薬剤非添加コントロール細胞群に比べ、1.25% DMSO 処理 HL-60 細胞群で CD11b/Mac-1 の発現亢進が認められたが、AM251（ $10 \mu\text{M}$ ）の共存下ではその発現量がさらに増大した。AM251 は HL-60 の好中球様細胞分化に対し、促進的に作用することが明らかとなった。

15 実施例 9

レポーターアッセイによる AM281 および DH97 のリガンド活性の検出

- 実施例 1 と同様にして HeLa 細胞に TGR25 を一過性に発現させ、実施例 2 と同様の方法で細胞を洗浄後、CHAPS を含むアッセイ用培地に溶解した AM281（TOCRIS）または DH97（TOCRIS）を添加した。さらに 37°C 、5% CO_2 下で 4 時間のインキュベーション後、実施例 2 と同様にしてアゴニスト活性を測定した。その結果、表 2 および表 3 に示すように TGR25 の発現細胞において、AM281（ $20 \mu\text{M}$ ）または DH97（ $20 \mu\text{M}$ ）の添加によりルシフェラーゼ活性亢進が認められた。一方、対照の pAKK0-111H 導入細胞では、AM281（ $20 \mu\text{M}$ ）または DH97（ $20 \mu\text{M}$ ）を添加しても有意な活性の亢進は検出されなかった。

25

〔表 2〕

TGR25発現細胞におけるAM281によるルシフェラーゼ活性の亢進（cps）

AM281 濃度（ μM ）	TGR25	pAKK0-111H（対照）
0	6113	4506
20	9279	4590

〔表 3〕

TGR25発現細胞におけるDH97によるルシフェラーゼ活性の亢進 (cps)

DH 97 濃度 (μ M)	TGR25	pAKK0-111H (対照)
0	2642	2016
20	5674	1451

産業上の利用可能性

- 5 TGR25とリガンドまたはその塩の結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩は、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、
- 10 血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫、多臓器不全などの予防・治療作用を有する。

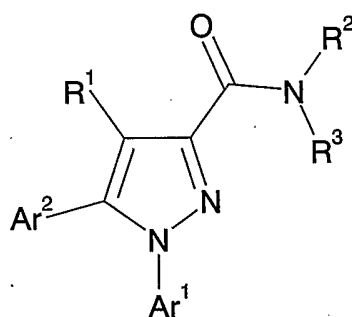
- TGR25の活性を促進する化合物またはその塩（例、化合物（I）、化合物（II）など）、TGR25とリガンドとの結合を促進する化合物またはその塩、TGR25などは、例えば、低毒性な、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性
- 15 腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患などの予防・治療剤として有用である。

TGR25の活性を阻害する化合物またはその塩、TGR25の抗体、TGR25のアンチセンスポリヌクレオチドなどは、例えば、低毒性な、白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤として有用である。

- 20 TGR25およびそのリガンドは、例えば、白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫、多臓器不全などの予防・
- 25 治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニングに有用である。

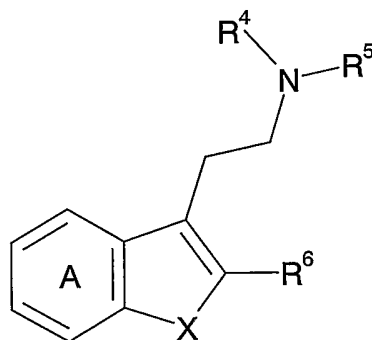
請求の範囲

1. (1) 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分
 5 ペプチドまたはその塩、および(2) リガンドまたはその塩を用いることを特徴とする、該レセプタータンパク質またはその塩と該リガンドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達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。
2. リガンドが、式



- 10 [式中、Ar¹およびAr²は、それぞれ置換基を有していてもよいアリール、R¹は、置換基を有していてもよい炭化水素基、R²およびR³は、それぞれ水素原子、または置換基を有していてもよい同素もしくは複素環基を示す] で表される化合物またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。
- 15 3. リガンドが、AM251 [1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-ピペリジン-1-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド] またはAM281 [1-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-モルホリン-4-イル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド] である請求項1記載のスクリーニング方法。
- 20 4. リガンドが、AM251である請求項1記載のスクリーニング方法。
5. リガンドが、式

133



〔式中、環Aは、置換基を有していてもよいベンゼン環、
 R^4 および R^5 は、それぞれ水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、
 置換基を有していてもよい複素環基またはアシル、

5 R^6 は、置換基を有していてもよい炭化水素基、

Xは、 $-NR^7-$ (R^7 は、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す)、 $-O-$ または $-S-$ を示す〕で表される化合物またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

6. リガンドが、DH97 [N-[2-(2-ベンジル-1H-インドール-3-イル)エチル]ペンタンアミド] である請求項1記載のスクリーニング方法。

7. (1) 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および(2) リガンドまたはその塩と該レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を用いることを
 15 特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

8. リガンドが、AM251、AM281またはDH97である請求項7記載のスクリーニング方法。

9. (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一
 20 のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および(2) リガンドまたはその塩を含有することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩と該リガンドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達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。

10. リガンドが、AM251、AM281またはDH97である請求項9記載のスクリーニング用キット。

11. (1) 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、および(2) リガンドまたはその塩と該レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用キット。

12. リガンドがAM251、AM281またはDH97である請求項11記載のスクリーニング用キット。

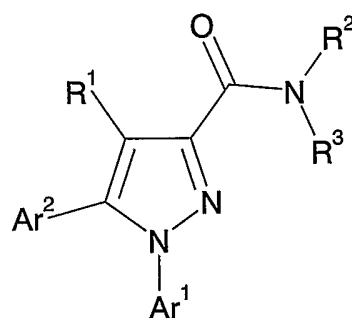
13. リガンドまたはその塩と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

14. 配列番号：1で表わ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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の予防・治療剤。

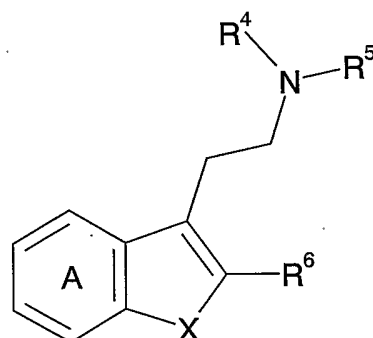
15. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストを含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療剤。

16. アゴニストが、式

135



- 〔式中、 Ar^1 および Ar^2 は、それぞれ置換基を有していてもよいアリール；
 R^1 は、置換基を有していてもよい炭化水素基； R^2 および R^3 は、それぞれ水素
 原子、または置換基を有していてもよい同素もしくは複素環基を示す〕で表され
 5 る化合物またはその塩、または式



- 〔式中、環Aは、置換基を有していてもよいベンゼン環、
 R^4 および R^5 は、それぞれ水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、
 置換基を有していてもよい複素環基またはアシル、
 10 R^6 は、置換基を有していてもよい炭化水素基、
 X は、 $-NR^7-$ (R^7 は、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基ま
 たは置換基を有していてもよい複素環基を示す)、 $-O-$ または $-S-$ を示
 す〕で表される化合物またはその塩である請求項15記載の予防・治療剤。
17. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア
 15 ミノ酸配列を含有するGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に
 対するアンタゴニストを含有してなる白血球増多症の予防・治療剤または白血球
 賦活剤。
18. リガンドまたはその塩を配列番号：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Gタンパク質共役型レセプタータン

- パク質を含有する細胞に接触させた場合と、試験化合物を配列番号：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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における結合性またはシグナル伝達の変化を比較することを特徴とする該レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニストのスクリーニング方法。
- 5 19. リガンドまたはその塩の存在下、試験化合物を配列番号：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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における結合性またはシグナル伝達の変化を測定することを特徴とする、該レセプタータンパク質
- 10 またはその塩に対するアンタゴニストのスクリーニング方法。
20. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または
- 15 は炎症性疾患の予防・治療剤。
21. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマ
- 20 チ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療剤。
22. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマ
- 25 チ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の診断剤。
23. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤。

24. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病、炎症性疾患、白血球増多症、心不全、遺伝性筋疾患、筋ジストロフィー、筋変性疾患、心筋梗塞、肥満、糖尿病、高脂血症、動脈硬化症、メタボリックシンドローム、血小板減少症、血小板増加症、癌、肺水腫または多臓器不全の診断剤。

25. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク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を含有してなる白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤。

26. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、(ii) 上記レセプタータンパク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、(iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニスト、または(iv) レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの有効量を投与することを特徴とする白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療方法。

27. 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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、(ii) 上記レセプタータンパク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 (iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストの有効量を投与することを特徴とする白血球増多症の予防・治療方法または白血球賦活方法。

- 5 28. 白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療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 G タンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩、 (ii) 上記レセプタータンパク質またはその部
- 10 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、
- (iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアゴニスト、または
- (iv) レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの使用。

29. 白血球増多症の予防・治療剤または白血球賦活剤を製造するための (i)
- 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 G タンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、 (ii) 上記レセプタータンパク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 (iii) 上記レセプタータンパク質またはその塩に対するアンタゴニストの使用。

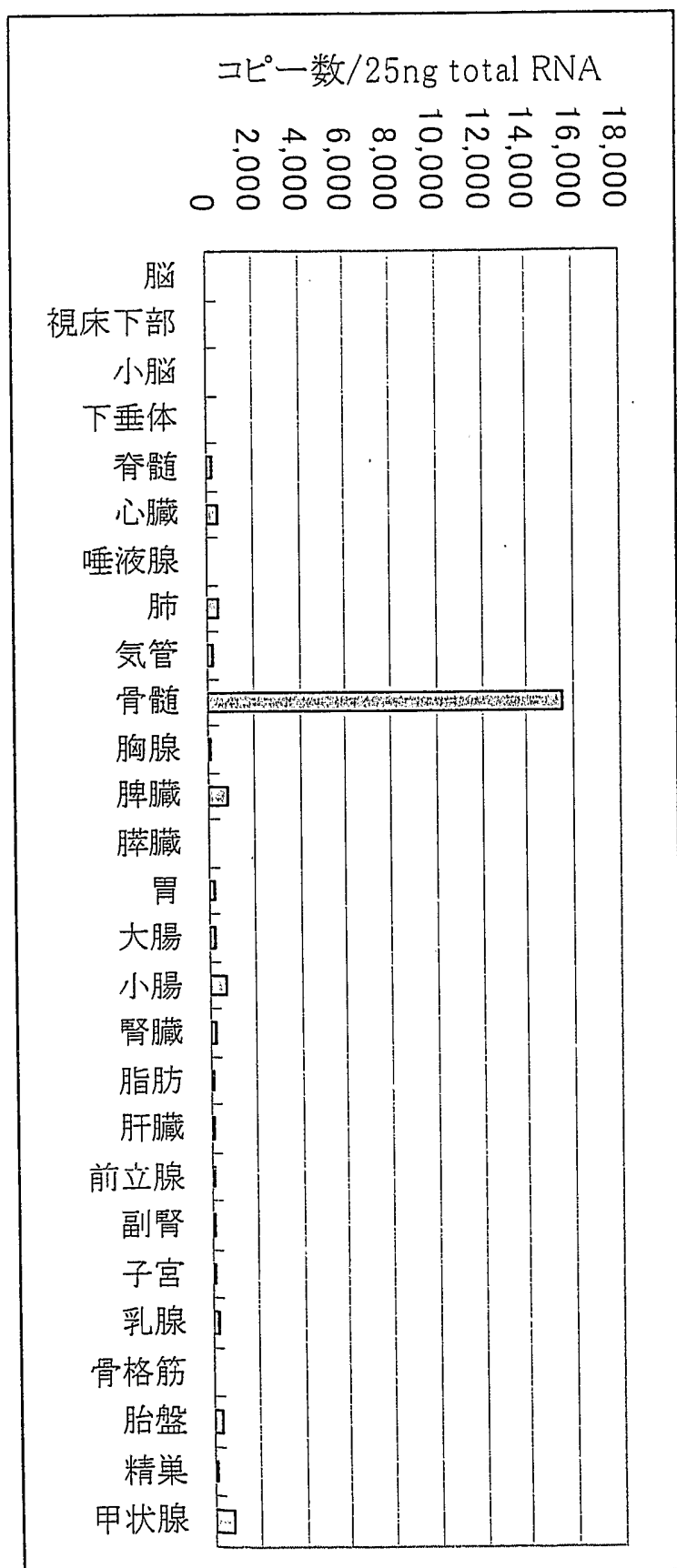
- 20 30. 骨髓に存在する幹細胞、間葉系未分化細胞もしくは幼若造血系細胞の機能、または骨髓内造血支持組織中に存在する脂肪細胞もしくは脂肪前駆細胞の機能を制御することを特徴とする請求項 14 記載の医薬。

31. 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 G タンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチ
- 25 ドまたはその塩の活性、または上記レセプタータンパク質に対するリガンドの活性を促進することを特徴とする白血球減少症、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、扁桃腺疾患、膠原病または炎症性疾患の予防・治療方法。

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Gタンパク質共役型レセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の活性、または上記レセプタータンパク質に対するリガンドの活性を阻害することを特徴とする白血球増多症の予防・治療方法または白血球賦活方法。

図 1



2/3

図 2

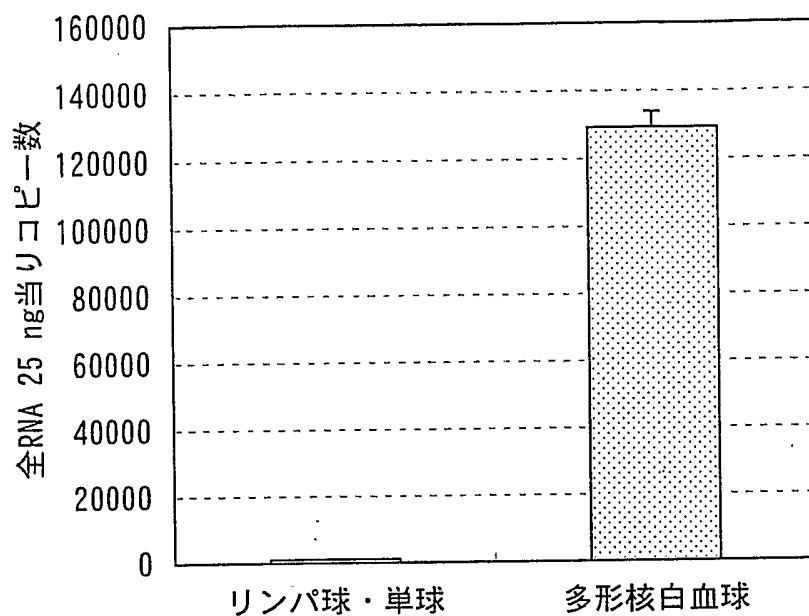


図 3

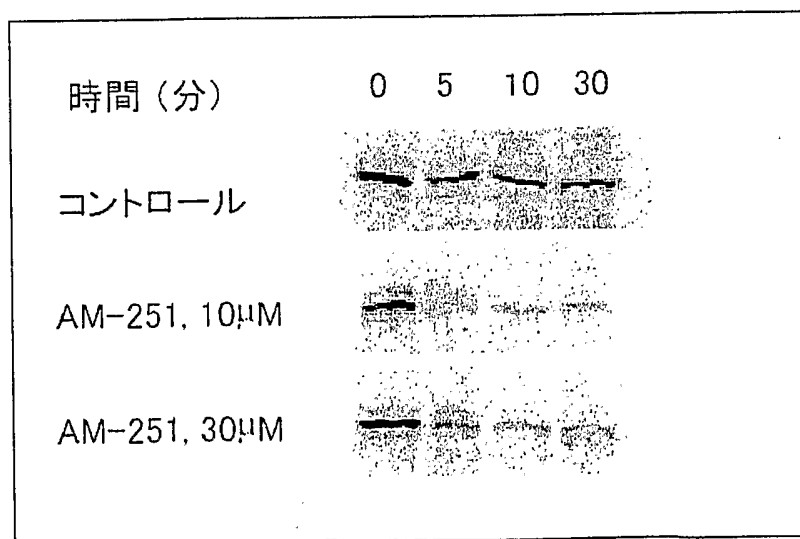
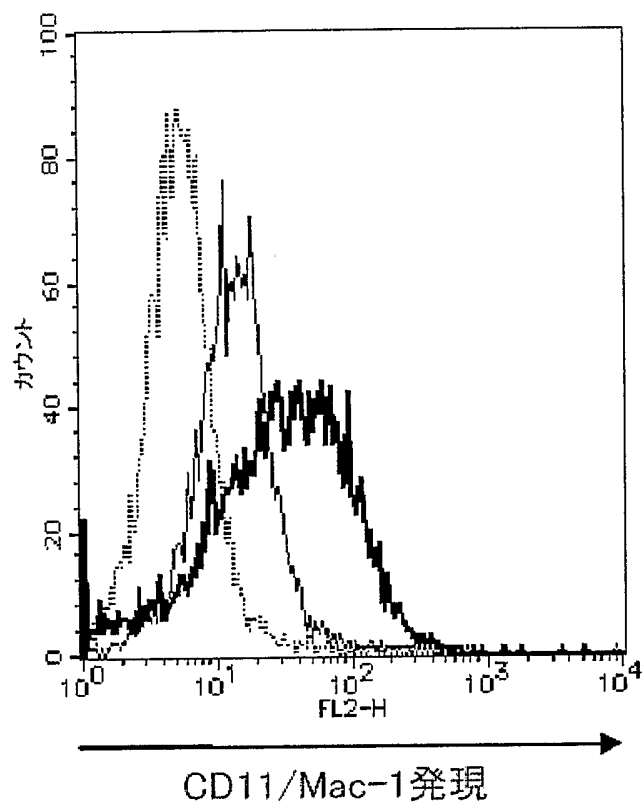


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> A novel ligand for G protein-coupled receptor protein and its use

<130> PCT05-0026

<150> JP2004-116725

<151> 2004-04-21

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 549

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ala Thr Pro Arg Gly Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15
Pro Thr Ser Gly Gln Glu Lys Pro Thr Glu Gly Pro Arg Asn Thr Cys
           20           25           30
Leu Gly Ser Asn Asn Met Tyr Asp Ile Phe Asn Leu Asn Asp Lys Ala
           35           40           45
Leu Cys Phe Thr Lys Cys Arg Gln Ser Gly Ser Asp Ser Cys Asn Val
           50           55           60
Glu Asn Leu Gln Arg Tyr Trp Leu Asn Tyr Glu Ala His Leu Met Lys
65           70           75           80
Glu Gly Leu Thr Gln Lys Val Asn Thr Pro Phe Leu Lys Ala Leu Val
           85           90           95
Gln Asn Leu Ser Thr Asn Thr Ala Glu Asp Phe Tyr Phe Ser Leu Glu
           100          105          110
Pro Ser Gln Val Pro Arg Gln Val Met Lys Asp Glu Asp Lys Pro Pro
           115          120          125
Asp Arg Val Arg Leu Pro Lys Ser Leu Phe Arg Ser Leu Pro Gly Asn
           130          135          140
Arg Ser Val Val Arg Leu Ala Val Thr Ile Leu Asp Ile Gly Pro Gly

```

2/5

145 150 155 160
 Thr Leu Phe Lys Gly Pro Arg Leu Gly Leu Gly Asp Gly Ser Gly Val
 165 170 175
 Leu Asn Asn Arg Leu Val Gly Leu Ser Val Gly Gln Met His Val Thr
 180 185 190
 Lys Leu Ala Glu Pro Leu Glu Ile Val Phe Ser His Gln Arg Pro Pro
 195 200 205
 Pro Asn Met Thr Leu Thr Cys Val Phe Trp Asp Val Thr Lys Gly Thr
 210 215 220
 Thr Gly Asp Trp Ser Ser Glu Gly Cys Ser Thr Glu Val Arg Pro Glu
 225 230 235 240
 Gly Thr Val Cys Cys Cys Asp His Leu Thr Phe Phe Ala Leu Leu Leu
 245 250 255
 Arg Pro Thr Leu Asp Gln Ser Thr Val His Ile Leu Thr Arg Ile Ser
 260 265 270
 Gln Ala Gly Cys Gly Val Ser Met Ile Phe Leu Ala Phe Thr Ile Ile
 275 280 285
 Leu Tyr Ala Phe Leu Arg Leu Ser Arg Glu Arg Phe Lys Ser Glu Asp
 290 295 300
 Ala Pro Lys Ile His Val Ala Leu Gly Gly Ser Leu Phe Leu Leu Asn
 305 310 315 320
 Leu Ala Phe Leu Val Asn Val Gly Ser Gly Ser Lys Gly Ser Asp Ala
 325 330 335
 Ala Cys Trp Ala Arg Gly Ala Val Phe His Tyr Phe Leu Leu Cys Ala
 340 345 350
 Phe Thr Trp Met Gly Leu Glu Ala Phe His Leu Tyr Leu Leu Ala Val
 355 360 365
 Arg Val Phe Asn Thr Tyr Phe Gly His Tyr Phe Leu Lys Leu Ser Leu
 370 375 380
 Val Gly Trp Gly Leu Pro Ala Leu Met Val Ile Gly Thr Gly Ser Ala
 385 390 395 400
 Asn Ser Tyr Gly Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Arg Glu Asn Arg Thr Ser
 405 410 415
 Leu Glu Leu Cys Trp Phe Arg Glu Gly Thr Thr Met Tyr Ala Leu Tyr
 420 425 430
 Ile Thr Val His Gly Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Leu Phe Gly Met Val
 435 440 445
 Val Leu Ala Leu Val Val Trp Lys Ile Phe Thr Leu Ser Arg Ala Thr
 450 455 460

3/5

Ala Val Lys Glu Arg Gly Lys Asn Arg Lys Lys Val Leu Thr Leu Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Ser Leu Val Gly Val Thr Trp Gly Leu Ala Ile Phe Thr
 485 490 495
 Pro Leu Gly Leu Ser Thr Val Tyr Ile Phe Ala Leu Phe Asn Ser Leu
 500 505 510
 Gln Gly Val Phe Ile Cys Cys Trp Phe Thr Ile Leu Tyr Leu Pro Ser
 515 520 525
 Gln Ser Thr Thr Val Ser Ser Ser Thr Ala Arg Leu Asp Gln Ala His
 530 535 540
 Ser Ala Ser Gln Glu
 545

<210> 2

<211> 1650

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcgacgc ccaggggcct gggggccctg ctcttgctcc tcttgctccc gacctcaggt 60
 caggaaaagc ccaccgaagg gccaaagaaac acctgcctgg ggagcaacaa catgtacgac 120
 atcttcaact tgaatgacaa ggctttgtgc ttaccaaagt gcaggcagtc gggcagcgac 180
 tcttgcaatg tggaaaactt gcagagatac tggctaaact acgaggccca tctgatgaag 240
 gaaggtttga cgcagaaggt gaacacgcct ttctgaagg ctttgggtcca gaacctcagc 300
 accaactctg cagaagactt ctatttctct ctggagccct ctcaggttcc gaggcaggtg 360
 atgaaggacg aggacaagcc cctgacaga gtgcgacttc ccaagagcct ttttcgatcc 420
 ctgccaggca acaggtctgt ggtccgcttg gccgtcacca ttctggacat tgggtccaggg 480
 actctcttca agggcccccg gctcggcctg ggagatggca gcggcggtgtt gaacaatcgc 540
 ctggtgggtt tgagtgtggg acaaatgcat gtcaccaagc tggctgagcc tctggagatc 600
 gtcttctctc accagcgacc gcccctaac atgacctca cctgtgtatt ctgggatgtg 660
 actaaaggga ccactggaga ctggtcttct gagggctgct ccacggaggt cagacctgag 720
 gggaccgtgt gctgctgtga ccacctgacc ttttcgccc tgctcctgag accaccttg 780
 gaccagtcca cgggtgcatat cctcacagc atctcccagg cgggctgttg ggtctccatg 840
 atcttccctg cttcaccat tattctttat gcctttctga ggctttcccg ggagagggtc 900
 aagtcagaag atgccccaaa gatccacgtg gccctgggtg gcagcctgtt cctcctgaat 960
 ctggccttct tgggtcaatgt ggggagtggt tcaaaggggt ctgatgctgc ctgctgggcc 1020
 cggggggctg tcttccacta ctctctgctc tgtgccitca cctggatggg ccttgaagcc 1080
 ttccacctct acctgctcgc tgtcagggtc ttcaaacct acttcgggca ctacttcctg 1140
 aagctgagcc tgggtgggctg gggcctgccc gccctgatgg tcatcggcac tgggagtgcc 1200

4/5

```

aacagctacg gcctctacac catccgtgat agggagaacc gcacctctct ggagctatgc 1260
tggttccgtg aagggacaac catgtacgcc ctctatatca ccgtccacgg ctacttcctc 1320
atcaccttcc tctttggcat ggtgggtccg gccctgggtg tctggaagat cttcacctg 1380
tcccgctgcta cagcgggtcaa ggagcggggg aagaaccgga agaagggtgt caccctgctg 1440
ggccctctga gcctgggtggg tgtgacatgg ggggtggcca tcttcacccc gttgggcctc 1500
tccaccgtct acatctttgc acttttcaac tccttgcaag gtgtcttcat ctgctgctgg 1560
ttcaccatcc ttacctccc aagtcagagc accacagtct cctcctctac tgcaagattg 1620
gaccaggccc actccgcac tcaagaatag 1650

```

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 tgagtgtggg acaaatgcat gt 22

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

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 acacaggtga gggatcatgtt agg 23

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Probe

<400> 5
atcgtcttct ctcaccagcg accgc 25

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
gctgtcggaa cctgtagaga tca 23

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
tcccagaata cacaggtgag gat 23

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Probe

<400> 8
tcccatgagc gtcaaccacc taacgt 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/04,
A61P3/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P7/00, A61P7/02, A61P9/04,
A61P9/10, A61P11/00, A61P11/04, A61P19/02, A61P21/00,

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)

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15

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	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

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

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-345491 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 03 December, 2002 (03.12.02), Claims 20, 25; Par. Nos. [0059], [0062], [0084], [0072], [0074], [0078], [0080], [0091], [0110] & US 2004/048284 A1	1, 7-9, 11-15, 18-22, 24, 28

☐ 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

10 May, 2005 (10.05.05)

Date of mailing of the international search report

31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007354

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

Int.Cl⁷ A61P29/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/06, A61P43/00,
C12Q1/02, C12N15/00

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

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

It has become apparent that screening of compounds capable of changing a receptor protein-ligand binding property or signal transmission by the use of TGR25 and a ligand is disclosed in the reference 1 (JP 2002-345491 A) and hence is not novel.

Consequently, this screening method cannot be recognized as constituting a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

As far as claims 1-4, 7-12, 18 and 19 are compared with the above prior art, the special technical feature of main invention is a method of screening compounds capable of changing a TGR25-ligand binding property or signal transmission by the use of the compound defined by the structural formula of claim 2 as a ligand.

As far as claims 5 and 6 (second invention) are compared with the above prior art, the special technical feature of the second invention is a method of screening compounds capable of changing a TGR25-ligand binding property or signal transmission by the use of the compound defined by the structural formula of claim 5 as a ligand.

As far as claims 13-16, 20, 21, 28 and 30 (third invention) are compared with the above prior art, the special technical feature of the third invention is a preventive/therapeutic agent for diseases attributed to malfunction of TGR 25.

As far as claims 17, 23, 25 and 29 (fourth invention) are compared with the above prior art, the special technical feature of the fourth invention is a preventive/therapeutic agent for diseases attributed to hyperfunction of TGR 25.

As far as claims 22 and 24 (fifth invention) are compared with the above prior art, the special technical feature of the fifth invention is a diagnostic agent for quantitative determination of TGR 25.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007354

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. ☒ Claims Nos.: 26, 27, 31 and 32

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods are a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☒ Claims Nos.: 14, 15 and 16

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:

Although claims 14-16 claim a medicine containing a ligand or agonist, in the description, only AM251, AM281 and DH97 are mentioned as the ligand or agonist, and other compounds are indefinite. Accordingly, with respect to claims 14-16, search has been restricted to AM251, AM281 and DH97.

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:

See extra sheet.

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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/04, A61P3/00, A61P3/06, A61P3/10, A61P7/00, A61P7/02, A61P9/04, A61P9/10, A61P11/00, A61P11/04, A61P19/02, A61P21/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/06, A61P43/00, C12Q1/02, C12N15/00

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.⁷ G01N33/50, G01N33/15

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	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)

CA (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 請求の範囲の番号
X	J P 2002-345491 A (武田薬品工業株式会社) 2002. 12. 03 【請求項20】、【請求項25】、【0059】、【0062】、【0084】、 【0072】、【0074】、【0078】、【0080】、【0091】、【0110】 & US 2004/048284 A1	1,7-9,11-15, 18-22,24,28

☐ 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

10.05.2005

国際調査報告の発送日

31.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

加々美 一恵

2 J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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 26,27,31,32 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、
人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法は国際調査をすることを要しない。
2. ☒ 請求の範囲 14,15,16 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 14～16 には、リガンド又はアゴニストを含有する医薬とあるが、明細書には、リガンド又はアゴニストとして AM251, AM281, DH97 が記載されているのみであって、それ以外の化合物が不明であるため、請求の範囲 14～16 は AM251, AM281, DH97 についてのみ調査を行った。
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ろの国際調査機関は認めた。
(別紙参照)

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ため、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ため、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なかった。

第Ⅲ欄

TGR25とリガンドを用いることによる、レセプタータンパク質とリガンドとの結合性又はシグナル伝達を変化させる化合物をスクリーニングすることは、文献1(JP 2002-345491 A)に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

したがって、当該スクリーニング方法はPCT規則13.2の第2文の意味において、特別な技術的特徴とは認められない。

請求の範囲1～4、7～12、18、19と上記先行技術とを比較する限りにおいて、主発明の特別な技術的特徴は、請求の範囲2に記載の構造式で特定される化合物をリガンドとして使用する、TGR25とリガンドの結合性又はシグナル伝達を変化させる化合物をスクリーニングする方法である。

請求の範囲5、6(第2発明)と上記先行技術とを比較する限りにおいて、第2発明の特別な技術的特徴は、請求の範囲5に記載の構造式で特定される化合物をリガンドとして使用する、TGR25とリガンドの結合性又はシグナル伝達を変化させる化合物をスクリーニングする方法である。

請求の範囲13～16、20、21、28、30(第3発明)と上記先行技術とを比較する限りにおいて、第3発明の特別な技術的特徴は、TGR25の機能不全に起因する疾患の予防・治療剤である。

請求の範囲17、23、25、29(第4発明)と上記先行技術とを比較する限りにおいて、第4発明の特別な技術的特徴は、TGR25の機能亢進に起因する疾患の予防・治療剤である。

請求の範囲22、24(第5発明)と上記先行技術とを比較する限りにおいて、第5発明の特別な技術的特徴は、TGR25を定量するための診断剤である。