

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010年5月6日(06.05.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/050513 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 14/575 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/068512
- (22) 国際出願日: 2009年10月28日(28.10.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-277253 2008年10月28日(28.10.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福嶋 信広 (FUKUSHIMA, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学医学部内 Fukuoka (JP). 平岡 弘二 (HIRAOKA, Koji) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学医学部内 Fukuoka (JP). 永田 見生 (NAGATA, Kensei) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学医学部内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING FUNCTION TO INCREASE CALCIUM CONCENTRATION IN OSTEOBLAST

(54) 発明の名称: 骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させる機能を有するポリペプチド

(57) Abstract: Disclosed is a polypeptide having a function to increase the calcium concentration in an osteoblast. Specifically disclosed is a polypeptide selected from the following polypeptides (1) to (3): (1) a polypeptide which comprises the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1; (2) a polypeptide which has a function to increase the calcium concentration in an osteoblast and comprises an amino acid sequence having 60% or more sequence identity to the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1; and (3) a polypeptide which has a function to increase the calcium concentration in an osteoblast and comprises an amino acid sequence produced by deleting, substituting, inserting or adding one to nine amino acid residues in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:1.

(57) 要約: 骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させる機能を有するポリペプチドを提供する。以下の(1)~(3)から選択されるいずれかのポリペプチド: (1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド; (2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド; 及び (3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1~9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。



WO 2010/050513 A1

## 明 細 書

発明の名称：

**骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させる機能を有するポリペプチド**

### 技術分野

[0001] 本発明は、骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させ、骨形成を促進させる機能を有するポリペプチドに関する。

### 背景技術

[0002] 骨粗鬆症の患者は、日本国内に現在1000万人存在するといわれている。しかも高齢者の増加と共にさらに骨粗鬆症の患者数も増加すると考えられる。このため、より健康的な社会の実現を図るうえから、骨粗鬆症の適切な治療法の確立は重要な社会的課題である。ここで、骨粗鬆症とは、破骨細胞による骨組織の破壊・吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることにより発生する疾患である。このような疾患は、骨形成を促進することや破骨細胞による骨組織の破壊・吸収等の機能を抑制することにより改善されると考えられているが、骨粗鬆症の治療研究は、破骨細胞に働き骨組織の破壊・吸収を抑制する製剤の開発が中心となっている。このため、骨質をさらに改善させるためには、破骨細胞に働き、骨組織の破壊・吸収を抑制するだけでなく、骨芽細胞に働き骨形成を促進する製剤の開発が必要である。

[0003] また、血中カルシウム濃度を一定の範囲に保持することは生体機能の維持に必須であるが、血中のカルシウム濃度を調節する因子としては、副甲状腺ホルモン、ビタミンD、カルシトニンしか知られておらず、その中でも、血中カルシウム濃度を低下させる因子としては、カルシトニンしか知られていない。

[0004] また、近年、さまざまな因子が骨代謝に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。例えば、エネルギー代謝に重要な役割を果たす因子（レプチンやニューロメジンUなど）の骨代謝における役割が注目され研究されている（非特許文献1、2）。これはエネルギー代謝に関与するペプチドと骨

代謝との密接な関係を推測させる。

また、消化管由来のペプチドもエネルギー代謝に重要な役割を果たし、これらのペプチドと骨代謝との関係において、例えば、消化管から分泌され骨芽細胞に作用するペプチドホルモンの存在が推測されており、動物実験において胃酸分泌部の選択的切除により骨減少が引き起こされることが報告されている（非特許文献3-7）。また、腸内クロム親和性様細胞ECL cell（acid-producing part）の抽出物により骨芽細胞における細胞内のカルシウム濃度の上昇が認められ、さらにラットの血中カルシウム濃度を低下させるという報告もある（非特許文献8-10）。つまり胃から分泌されるカルシウム調節ペプチドの存在が推測されている。しかしながら、これらのペプチドと骨代謝との関係は十分に研究されておらず、具体的にどのようなペプチドがどのように骨代謝に関与するのか、何の知見も得られていない。

#### 先行技術文献

##### 非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R et al. : Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317, 2002

非特許文献2 : Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K and Takeda S: Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature Med* 13: 1234-1240, 2007

非特許文献3 : Lehto-Axtelius D, Stenstrom M and Johnell O: Osteopenia after gastrectomy, fundectomy or antrectomy: an experimental study in the rat. *Regul Pept* 78:41-50, 1998

非特許文献4 : Heiskanen JT, Kroger H, Paakkonen M, Parviainen MT, Lamb erg-Allardt C and Alhava E: Bone mineral metabolism after total gastrectomy. *Bone* 28:123-127, 2001

非特許文献5 : Lehto-Axtelius D, Chen D, Surve VV and Hakanson R: Post-

gastrectomy osteopenia in the rat: bone structure is preserved by retaining 10%–30% of the oxyntic gland area. Scand J Gastroenterol 37:437–443, 2002

非特許文献6 : Persson P, Gagnemo–Persson R, Chen D, Axelson J, Nylander AG, Johnell O and Hakanson R: Gastrectomy causes bone loss in the rat: is lack of gastric acid responsible? Scand J Gastroenterol 28:301–306, 1993

非特許文献7 : Klinge B, Lehto–Axtelius D, Akerman M and Hakanson R: Structure of calvaria after gastrectomy: an experimental study in the rat. Scand J Gastroenterol 30:952–957, 1995

非特許文献8 : Persson P et al. : Gastrin releases a blood calcium-lowering peptide from the acid-producing part of the rat stomach. Proc Natl Acad Sci USA 86:2834–2838, 1989

非特許文献9 : Larsson B, Gritli–Linde A, Norlen P, Lindstrom E, Hakanson R and Linde A: Extracts of ECL–cell granules/vesicles and of isolated ECL cells from rat oxyntic mucosa evoke a  $Ca^{2+}$  second messenger response in osteoblastic cells. Regul Pept 97:153–161, 2001

非特許文献10 : Larsson B, Norlen P, Lindstrom E, Zhao D, Hakanson R and Linde A: Effects of ECL cell extracts and granule/vesicle–enriched fractions from rat oxyntic mucosa on cAMP and IP(3) in rat osteoblast–like cells. Regul Pept 106:13–18, 2002

非特許文献11 : Kitagawa M, Mukai H and Ono Y: Molecular cloning and characterization of a novel mitochondrial phosphoprotein, MIPP65, from rat liver. Exp Cell Res 235(1):71–78, 1997

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 上記事情に鑑み、本発明は、骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させ、骨形成を促進させる機能を有するポリペプチドを提供することを目的とする。

また、血中のカルシウム濃度を低下させ、適度な濃度に調節する機能を有するペプチドを提供することも目的としている。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、胃から分泌されるポリペプチドの分離・精製を行い、その機能を解析したところ、血中のカルシウム濃度を低下させ、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、骨形成を促進させる機能を有するポリペプチドの同定に成功し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチド：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含み、且つ長さが400アミノ酸以下であるポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ長さが400アミノ酸以下であるポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ長さが400アミノ酸以下であるポリペプチド。

[2] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させるための剤：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[3] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む

、骨形成低下に関連する疾患の予防・治療剤：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[4] 骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、[3]記載の予防・治療剤。

[5] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨増強剤：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[6] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨増強促進食品組成物：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

〔7〕以下の（1）～（3）から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、医薬組成物：

- （1）配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- （2）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
- （3）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

〔8〕哺乳動物に対して、以下の（1）～（3）から選択されるいずれかのポリペプチドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における骨形成低下に関連する疾患の予防・治療方法：

- （1）配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- （2）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
- （3）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

〔9〕骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、〔8〕記載の方法。

〔10〕骨形成低下に関連する疾患の予防又は治療に使用するための、以下の（1）～（3）から選択されるいずれかのポリペプチド：

- （1）配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- （2）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
- （3）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で

表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

〔11〕骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、〔10〕記載のポリペプチド。

〔12〕哺乳動物に対して、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における骨強度を増加させる方法：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

〔13〕骨強度の増加に使用するための、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチド：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

## 発明の効果

[0009] 本発明のポリペプチドを用いれば、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、骨形成を促進させ、更には血中カルシウムイオン濃度を低下させることができる。本発明のポリペプチドは、例えば骨粗鬆症、高カルシウム血症、癌の骨転移等の予防や治療に有用である。



## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]SP- I I I 分画のゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を示す図である。

[図2]SP- I I I 分画と骨芽細胞様細胞株である UMR 1 0 6 細胞との反応により、活性が認められたフラクションの、逆相クロマトグラフィー（リニアグラジエント：40min、アセトニトリル（ACN）濃度10%→60%）による分離を示す図である。

[図3]図2で分離したフラクションと骨芽細胞様細胞株である UMR 1 0 6 細胞との反応により、活性が認められたフラクションの、逆相クロマトグラフィー（リニアグラジエント：40min、ACN濃度22.5%→32.5%）によるピーク分集及び分離を示す図である。

[図4]天然ペプチドと合成ペプチドの、逆相クロマトグラフィー（アイソクラティック：20min、ACN濃度25%）による析出時間を比較した結果を示す図である。

[図5]天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドによる UMR 1 0 6 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

[図6]ラット頭蓋骨由来の骨芽細胞に、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、 $10^{-4}$ 、 $2 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ mol 添加後の、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

[図7]骨芽細胞、骨芽細胞様細胞（SaOS2、U2OS）、破骨細胞前駆細胞（RAW264.7）、CHO細胞に、ポリペプチドを、 $5 \times 10^{-4}$ mol 添加後の、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

[図8]配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの投与濃度（0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg）別に測定した血中カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

[図9]配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（濃度2mg/kg）を、ラットの腹腔内に投与し、投与から0分、20分、60分、180分経過後における血中カルシウムイオン濃度を示す図である。

[図10] 培養した初代骨芽細胞に配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与し、72 時間経過後に RNA を回収して、リアルタイム PCR 法により測定したアルカリフォスファターゼ (ALP) 値を示す図である。

[図11] 培養した初代骨芽細胞に配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド投与をし、72 時間経過後に RNA を回収し、リアルタイム PCR 法により測定したオステオカルシン (OCN) 値を示す図である。

[図12] 培養した初代骨芽細胞に、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与し、48 時間経過後に細胞を回収して、alkaline-phosphatase kit (WAKO Pure Chemical Industry, Osaka, Japan) により測定した ALP 活性値を示す図である。

[図13] 胃切除手術を行った SD rat (Sprague-Dawley rat) に対し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを 4 週間持続投与した後の SD rat の total 骨密度と、ポリペプチドの代わりに生理食塩水を 4 週間持続投与した後の SD rat の total 骨密度を比較した図である。

[図14] 胃切除手術を行った SD rat (Sprague-Dawley rat) に対し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを 4 週間持続投与した後の SD rat の海綿骨密度と、ポリペプチドの代わりに生理食塩水を 4 週間持続投与した後の SD rat の海綿骨密度を比較した図である。

[図15] 胃切除手術を行った SD rat (Sprague-Dawley rat) に対し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを 4 週間持続投与した後の SD rat の体重と、ポリペプチドの代わりに生理食塩水を 4 週間持続投与した後の SD rat の体重を比較した図である。

[図16] 胃切除手術を行った SD rat (Sprague-Dawley rat) に対し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを 4 週間持続投与した後の SD rat の血清中の ALP 値と、ポリペプチドの代わりに生理食塩水を 4 週間持続投与した後の SD rat の血清中の ALP 値を比較した図である。

[図17] 胃切除手術を行った SD rat (Sprague-Dawley rat) に対し、配列番号

1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを4週間持続投与した後のSD ratの血清中のOCN値と、ポリペプチドの代わりに生理食塩水を4週間持続投与した後のSD ratの血清中のOCN値を比較した図である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチド(本発明のポリペプチド)を提供するものである：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[0012] 配列番号1で表されるアミノ酸配列は、ラットのミトコンドリアのリン酸化ペプチドMIPP65(非特許文献11)のアミノ酸配列(全長458アミノ酸)の一部と一致する。

[0013] 本発明のポリペプチドは、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有する。骨芽細胞とは、骨組織において骨形成を行う細胞である。古い骨を溶かして壊す破骨細胞と、骨芽細胞とが、破壊と再生を繰り返しながら骨が新しく生まれ変わり、骨が代謝される(骨代謝)。「骨芽細胞内のカルシウム濃度」とは、骨芽細胞内に存在する全ての態様のカルシウムの濃度を意味する。かかる態様としては、可溶性のカルシウムイオン、不溶性のカルシウム塩(例えばリン酸カルシウム)等を挙げることができるがこれらに限定されない。本発明のポリペプチドは、骨芽細胞外(例えば血中)に存在するカルシウムイオンの骨芽細胞内への取り込みを促進することにより、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させると考えられる。ポリペプチドが骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有するか否かは、以下の方法に基づいて判定することができる：カルシウムイオン蛍光指示薬(例えば、Fluo-3

)で標識した骨芽細胞(例えば、骨芽細胞様細胞株であるUMR106細胞)にポリペプチドを接触させ、蛍光強度を指標に接触の前後で細胞内カルシウムイオン濃度をモニターし、骨芽細胞内カルシウムイオン濃度が有意に上昇した場合は、該ポリペプチドは骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有すると判定する。

[0014] 本発明のポリペプチドが有する細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能は、骨芽細胞に特異的であり、それ以外の細胞種(破骨細胞、CHO等)に対しては細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こさない。

[0015] 本発明のポリペプチドの長さは、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有する限り特に限定されないが、通常400アミノ酸以下、好ましくは200アミノ酸以下、より好ましくは100アミノ酸以下、更に好ましくは50アミノ酸以下、より更に好ましくは30アミノ酸以下、最も好ましくは25アミノ酸以下(例えば24アミノ酸)である。

[0016] 上記(2)のポリペプチドに含まれるアミノ酸配列は、配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0017] ここで「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する、同一アミノ酸残基の割合(%)を意味する。

[0018] 本明細書におけるアミノ酸配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST-2 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(マトリックス=BLOSUM62; ギャップオープン=11; ギャップエクステンション=1; x\_\_ドロップオフ=50; 期待値=10; フィルタリング=0N)にて計算することができる。アミノ酸配

列の同一性を決定するためのアルゴリズムとしては、例えば、Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)) ]、Needleman et al., J. Mol. Biol., 48:444-453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている]、Myers and Miller, CABIOS, 4:11-17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれている]、Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられるが、それらに限定されない。

- [0019] 上記 (3) のポリペプチドに含まれるアミノ酸配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、例えば、(1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は複数 (好ましくは 1~9 個、より好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1~2 個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に 1 又は複数 (好ましくは 1~9 個、より好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1~2 個) のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、(3) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に 1 又は複数 (好ましくは 1~9 個、より好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1~2 個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中の 1 又は複数 (好ましくは 1~9 個、より好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1~2 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(5) 上記(1)~(4)の変異が組み合わされたアミノ酸配列 (この場合、変異したアミノ酸の総和が、好ましくは 1~9 個、より好ましくは 1~5 個、さらに好ましくは 1~2 個) である。

- [0020] また、本発明のポリペプチドは、修飾されていてもよい。該修飾としては、アミド化、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（N-グリコシル化、O-グリコシル化）等を挙げることができる。
- [0021] また、本発明のポリペプチドは、薬理的に許容される塩の形態であってもよい。薬理的に許容される塩としては薬理的に許容される酸（例：無機酸、有機酸）や塩基（例：アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ薬理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）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、メタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸）との塩などが挙げられる。
- [0022] 本発明のポリペプチドの好適な例としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。
- [0023] 本発明のポリペプチドは、例えば哺乳動物（ヒト、マウス、ラット等）の胃から、カラムクロマトグラフィー等の公知のペプチド精製技術を用いて分離精製することができる。また、本明細書に開示されたアミノ酸配列に基づき公知のペプチド合成法を用いて、本発明のポリペプチドを製造することができる。ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。ポリ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し、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とするポリペプチドを製造することができる。また、周知の遺伝子工学技術を用いて、本発明のポリペプチドを発現し得る発現ベクターを調製し、該ベクターを組み込んだ形質転換体（大腸菌等）を培養し、該培養物をカラムクロマトグラフィー等の公知のペプチド精製手段に付すことにより、本発明のポリペプチドを得ることができる。前記発現ベクターは、宿主内に

において機能し得るプロモーターの下流に機能的に連結された、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

[0024] また、本発明は本発明のポリペプチドを含む剤（組成物）を提供する。

[0025] ここで、本発明の剤は、医薬製剤（医薬組成物）及び食品（食品組成物）の態様を包含する。さらに、本発明の食品組成物としては、栄養機能食品や特定保健用食品などの機能性食品を含む。

[0026] 本発明のポリペプチドは、骨芽細胞外（例えば血中）に存在するカルシウムイオンの骨芽細胞内への取り込みを促進することにより、血中のカルシウムイオン濃度を低下させ、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、骨形成を促進し得る。したがって、本発明の剤は、骨形成低下に関連する疾患（例えば、高カルシウム血症、骨粗鬆症、癌の骨転移）の予防・治療剤、骨増強剤、骨増強促進食品等として有用である。本発明のポリペプチドの有効量を哺乳動物（ヒト、マウス、ラット等）に投与することにより、該哺乳動物における骨形成低下に関連する疾患（例えば、高カルシウム血症、骨粗鬆症、癌の骨転移）を予防又は治療することが可能である。また、本発明のポリペプチドの有効量を哺乳動物に投与することにより、該哺乳動物の骨強度、骨密度を増加させることが可能である。骨粗鬆症は、破骨細胞による骨組織の破壊・吸収が、骨芽細胞による骨形成を上回ることにより発生する疾患であるため、本発明のポリペプチドにより骨形成を促進させることにより、骨粗鬆症を予防又は治療し得る。また、本発明のポリペプチドにより血中のカルシウムイオン濃度を低下させることにより、高カルシウム血症を予防又は治療し得る。消化器癌においては一般に骨転移の発生が少ないことから、本発明のポリペプチドが癌の骨転移を抑制する可能性が推測される。

[0027] また、本発明の医薬製剤は、活性成分として本発明のポリペプチド単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。それら医薬製剤は、活性成分を薬理的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

[0028] 薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、その具体例としては、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などが挙げられる。製剤化の際には、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加剤を用いてもよい。

[0029] また、投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は、経皮、静脈内等の非経口又は経口で投与される。非経口投与に適切な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。これら非経口剤には、更に、必要に応じて溶解補助剤、緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤等を添加することもできる。また、非経口に適切な製剤は、本発明のポリペプチドを注射用蒸留水または植物油に懸濁して調製したものであってもよく、この場合、必要に応じて基剤、懸濁化剤、粘調剤等を添加することができる。また、非経口に適切な製剤は、本発明のポリペプチドの粉末又は凍結乾燥品を用時溶解する形であってもよく、必要に応じて賦形剤等を添加することができる。経口製剤としては、錠剤（舌下錠、口腔内崩壊剤を含む）、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、散剤、顆粒剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。これらの製剤は、速放性製剤または除放性製剤などの放出制御製剤（例、除放性マイクロカプセル）であってもよい。

[0030] 本発明のポリペプチドを含む医薬製剤における、本発明のポリペプチドの含有量は、通常0.01～100重量%の範囲内であるが、製剤の形態等により変動し得る。注射剤の場合には、本発明のポリペプチドの含有量は、好ましくは0.01～10重量%の範囲内である。

[0031] 本発明のポリペプチドは、骨増強等を目的として、一般食品類、病者用食品、栄養機能食品、特定保健用食品等の形態として製剤化することができる



。食品の形態は、粉末、顆粒、錠剤、カプセル、クッキー、ゼリー、飲料、あるいは一般食品の形態が可能である。食品中の本発明のポリペプチドの含有量は、通常0.01～100重量%、好ましくは0.1～30重量%程度とするが、食品が飲料である場合は、溶解性等の理由から飲料100mLに対し好ましくは0.01～5g（0.01～5重量%）程度が含まれる。

[0032] 本発明の食品組成物には、一般の食品素材をベースとするほか、例えば、様々な栄養剤、ビタミン、鉱物（電解質）、ミネラル、合成風味剤、天然風味剤、着色剤、充填剤（チーズ、チョコレートなど）、ペクチン酸又はその塩、アルギン酸又はその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール等を含んでも良い。

[0033] 本発明のポリペプチドの投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、疾患の種類、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なるが、通常、高カルシウム血症の患者を静脈内投与により治療する場合、成人一人当たり約1mg～300mgの本発明のポリペプチドを一日一回ないし数回投与する。しかしながら、これら投与量および投与回数に関しては、前述の種々の条件により変動する。

また、本発明の医薬組成物、医薬製剤、食品組成物には、本発明のポリペプチドに代えて、本発明のポリペプチドをコードするポリ核酸（DNAまたはRNA）もしくはこれらポリ核酸を含む本発明のポリペプチドを発現し得る発現ベクターが含まれていても差し支えない。

これら、ポリ核酸、ポリ核酸を含む発現ベクターを哺乳動物の体内投与によって、本発明のポリペプチドは体内にて生産されるためである。

[0034] 以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

## 実施例

### [0035] 1. ポリペプチドの分離・精製

ラットの胃からペプチド画分を抽出し、各種クロマトグラフィーにて展開し、これを骨芽細胞に反応させ、細胞内セカンドメッセンジャーの変化を測

定した。このアッセイ法を指標としてポリペプチドを分離・精製し、構造決定した。具体的には以下の通りである。

[0036] まずラットの胃（100g）を切除し煮沸処理によって、プロテアーゼを不活化後1M AcOH, 20mM HCL内でホモジェナイズを行った。その後、遠心し上清を回収しペプチドを抽出した。このペプチド抽出液をSep-Pak C18（Waters社製）にて固相抽出し有機酸や糖類等を除去後、イオン交換クロマトグラフィーにてSP-Sephadex C-25（I I +form）カラム（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いSP-I、SP-I I、SP-I I Iに分離した。得られたSP-I I I分画を、Sephadex G50 gel-filtration colum（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにて分離した（図1）。

[0037] 次に、この分離した抽出液による細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、該分離した抽出液と骨芽細胞様細胞株であるUMR 106細胞との反応の前後で、カルシウムイオン濃度を測定することにより求めた。カルシウムイオン濃度は、カルシウムイオン蛍光指示薬としてFluo-3を用い、FLEXstation（Molecular Devices）により測定した。骨芽細胞様細胞株であるUMR 106細胞との反応の前後で、細胞内カルシウムイオン濃度が有意に上昇したフラクションを活性が認められたフラクションとし、活性が認められたフラクションを、C-18 reverse-phaseカラムを用いた逆相クロマトグラフィー（リニアグラジエント：40min、アセトニトリル（ACN）濃度10%→60%）にて分離した（図2）。この分離したフラクションによる細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、先と同様の方法で測定し、先と同様の基準で活性が認められたフラクションをさらにC-18 reverse-phaseカラムを用いた逆相クロマトグラフィー（リニアグラジエント：40min、ACN濃度22.5%→32.5%）にてピーク分集し分離した（図3）。分離したフラクションによる細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、再度、先と同様の方法で測定し、先と同様の基準で活性が認められたフラクションを確認した。該フラクションのアミノ酸配列を、ペプチドシーケンサー（Procise 494 cLC Protein Sequencing System（Applie

d Biosystems, USA)) を用いて同定した。

[0038] その結果、24アミノ酸からなるポリペプチド (LDLNLDLSKFRLPQPSSGRESRHH : 配列番号 1) を同定した。

また、質量分析器MALDI-TOF MS (Voyager-DE STR (Applied Biosystems, USA)) により分子量を測定したところ、ポリペプチドの質量は、2763.4Daであった。

[0039] 2. 天然ポリペプチドと合成ポリペプチドの比較

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、ペプチド合成器 (433A Protein Synthesize System (Applied Biosystems, USA)) を用いて合成した。

次に、天然ペプチドと合成ペプチドの、逆相クロマトグラフィー (アイソクラティック : 20min、ACN濃度25%) による析出時間の比較を行ったところ、天然ポリペプチドと合成ポリペプチドで析出時間に差が認められなかった (図 4)。これにより、天然ポリペプチドと合成ポリペプチドで構造が一致していることが確認された。

また、天然ポリペプチドおよび合成ポリペプチドによる UMR 106 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化をそれぞれ測定したところ、細胞内カルシウムイオン濃度が増加する挙動は、天然ポリペプチドと合成ポリペプチドの間で差が認められなかった (図 5)。これにより、天然ポリペプチドと合成ポリペプチドは機能的にも一致していることが確認された。

以上より、天然ポリペプチドと合成ポリペプチドは、構造・機能の面で一致していることが確認された。

[0040] 3. ポリペプチドの生理作用の検討

まず、ラット頭蓋骨由来の骨芽細胞に、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、 $10^{-4}$ 、 $2 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ mol 添加し、その前後で細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を、Fluo-3を用いFLEXstation (Molecular Devices) により測定した。その結果、 $5 \times 10^{-4}$ molにて約 3500RFU (Relative fluorescence units) の変化が認められ、細胞内のカルシウムイオン

濃度の上昇を確認した（図6）。

また、ラット頭蓋骨由来の骨芽細胞、骨芽細胞様細胞（SaOS2、U2OS）、破骨細胞前駆細胞（RAW264.7）、CHO細胞に、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、 $5 \times 10^{-4}$ mol添加し、その前後で細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、Fluo-3を用いFLEXstation (Molecular Devices)により測定した。その結果、骨芽細胞および骨芽細胞様細胞（SaOS2、U2OS）では変化（活性）が認められ、それ以外の破骨細胞前駆細胞（RAW264.7）、CHO細胞では変化（活性）が認められなかった（図7）。

以上より、本発明のポリペプチドは、骨芽細胞（骨芽細胞様細胞を含む）に特異的に作用することを確認した。

[0041] 次に、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（投与量：0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg）を、ラットの腹腔内に投与し、投与から20分経過後、該ポリペプチドの投与量別に血中カルシウムイオン濃度の変化を、Calcium Assay Kit QuantiChromにより測定した。測定には、各投与量につき8匹のラットを用い、8匹のラットの平均を投与量毎に求めた。その結果、ポリペプチドの投与量が高い程、血中のカルシウムイオン濃度が低下することを確認した（図8）。

[0042] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、8匹のラットの腹腔内に投与し（投与量：2mg/kg）、投与から0分、20分、60分、180分経過後における血中カルシウムイオン濃度を、Calcium Assay Kit QuantiChromにより測定し、8匹のラットの平均を、投与後の経過時間毎に求めた。その結果、ポリペプチドを投与して20分経過後に血中カルシウムイオン濃度の有意な減少（ $-0.34\text{mg/dl}$ ）が認められた（図9）。

[0043] 4. 骨芽細胞分化に対するペプチドの検討

<アルカリフォスファターゼ（ALP）値およびオステオカルシン（OCN）値>

まず、初代骨芽細胞を6well plateの各ウェルに $10^5$ 個ずつ培養した。各ウ

エル内の培地は、50mg/mlのアスコルビン酸(シグマケミカル社製)および10mmol/Lのb-グリセロリン酸エステル(シグマケミカル社製)からなる。培養した初代骨芽細胞に、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(0M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M)を2ウェルずつ投与し、72時間経過後、RNAを回収し、リアルタイムPCR法によりアルカリフォスファターゼ(ALP)値およびオステオカルシン(OCN)値を測定した。その結果、ALP値およびOCN値の上昇が認められた(図10、図11)。

[0044] <ALP活性>

まず、初代骨芽細胞を6well plateの各ウェルに $10^5$ 個ずつ培養した。各ウェル内の培地は、50mg/mlのアスコルビン酸(シグマケミカル社製)および10mmol/Lのb-グリセロリン酸エステル(シグマケミカル社製)からなる。培養した初代骨芽細胞に、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを投与し(投与量:0、 $10^{-5}$ M)、48時間経過後に細胞を回収し、alkaline-phosphatase kit (WAKO Pure Chemical Industry, Osaka, Japan)によりALP活性値を測定した。その結果、ALP活性値の上昇が認められた(図12)。

以上より、本発明のポリペプチドは骨芽細胞分化に関与することを確認した。

[0045] 5. 骨密度に対するペプチドの検討 (in vivo)

4週間投与後、dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)により骨密度を測定した。また、血清を回収し、ALPおよびOCNの血中濃度を測定した。

その結果、ペプチド投与群において、total骨密度および海綿骨密度ともに上昇した(図13、図14)。また、ペプチド投与群・生理食塩水投与群間に体重の差は認められなかった(図15)。

また、血清中のALPおよびOCNの濃度はペプチド投与群において上昇が認められた(図16、図17)。

以上より、本発明のポリペプチドが、骨密度を上昇させる効果を有するこ

とを確認した。

### 産業上の利用可能性

- [0046] 本発明は、骨芽細胞のカルシウム濃度を上昇させる機能を有するポリペプチドに関し、特に骨粗鬆症、高カルシウム血症、癌の骨転移等の治療に有用である。
- [0047] 本出願は日本で出願された特願2008-277253（出願日：2008年10月28日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の（１）～（３）から選択されるいずれかのポリペプチド：
- （１）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含み、且つ長さが４００アミノ酸以下であるポリペプチド；
  - （２）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号１で表されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ長さが４００アミノ酸以下であるポリペプチド；及び
  - （３）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号１で表されるアミノ酸配列において１～９個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ長さが４００アミノ酸以下であるポリペプチド。
- [請求項2] 以下の（１）～（３）から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させるための剤：
- （１）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
  - （２）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号１で表されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
  - （３）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号１で表されるアミノ酸配列において１～９個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。
- [請求項3] 以下の（１）～（３）から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨形成低下に関連する疾患の予防・治療剤：
- （１）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
  - （２）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号１で表されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
  - （３）骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番

号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項4] 骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、請求項3記載の予防・治療剤。

[請求項5] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨増強剤：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項6] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、骨増強促進食品組成物：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項7] 以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドを含む、医薬組成物：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び



(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項8]

哺乳動物に対して、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における骨形成低下に関連する疾患の予防・治療方法：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項9]

骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、請求項7記載の方法。

[請求項10]

骨形成低下に関連する疾患の予防又は治療に使用するための、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチド：

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び

(3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号1で表されるアミノ酸配列において1～9個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項11]

骨形成低下に関連する疾患が、高カルシウム血症、骨粗鬆症又は癌の骨転移である、請求項10記載のポリペプチド。

[請求項12]

哺乳動物に対して、以下の(1)～(3)から選択されるいずれかのポリペプチドの有効量を投与することを含む、該哺乳動物における

骨強度を増加させる方法：

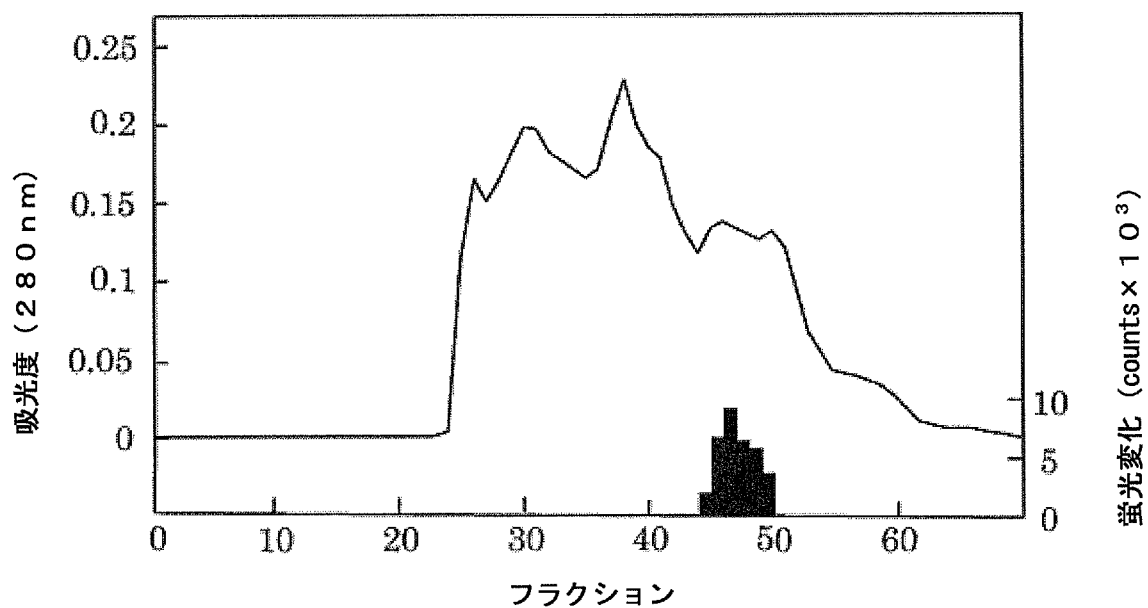
- (1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
- (3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1～9 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項13]

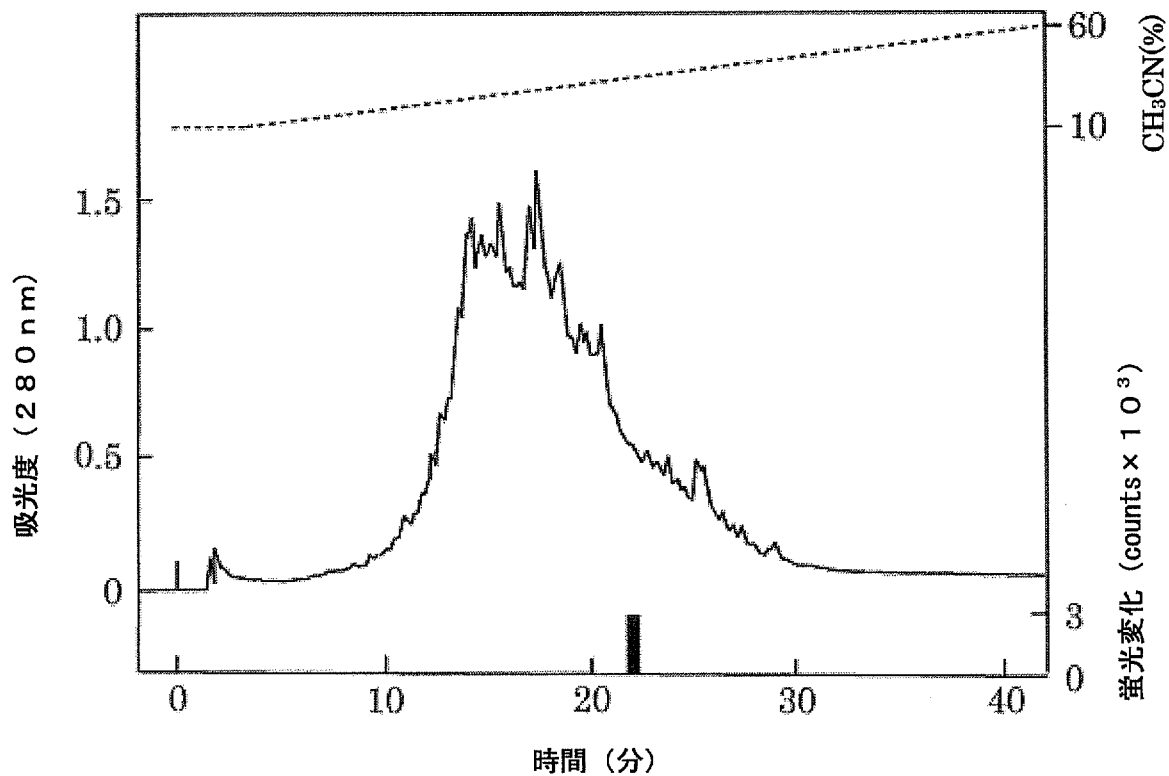
骨強度の増加に使用するための、以下の (1)～(3) から選択されるいずれかのポリペプチド：

- (1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (2) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、且つ配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；及び
- (3) 骨芽細胞内のカルシウム濃度を上昇させる機能を有し、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1～9 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチド。

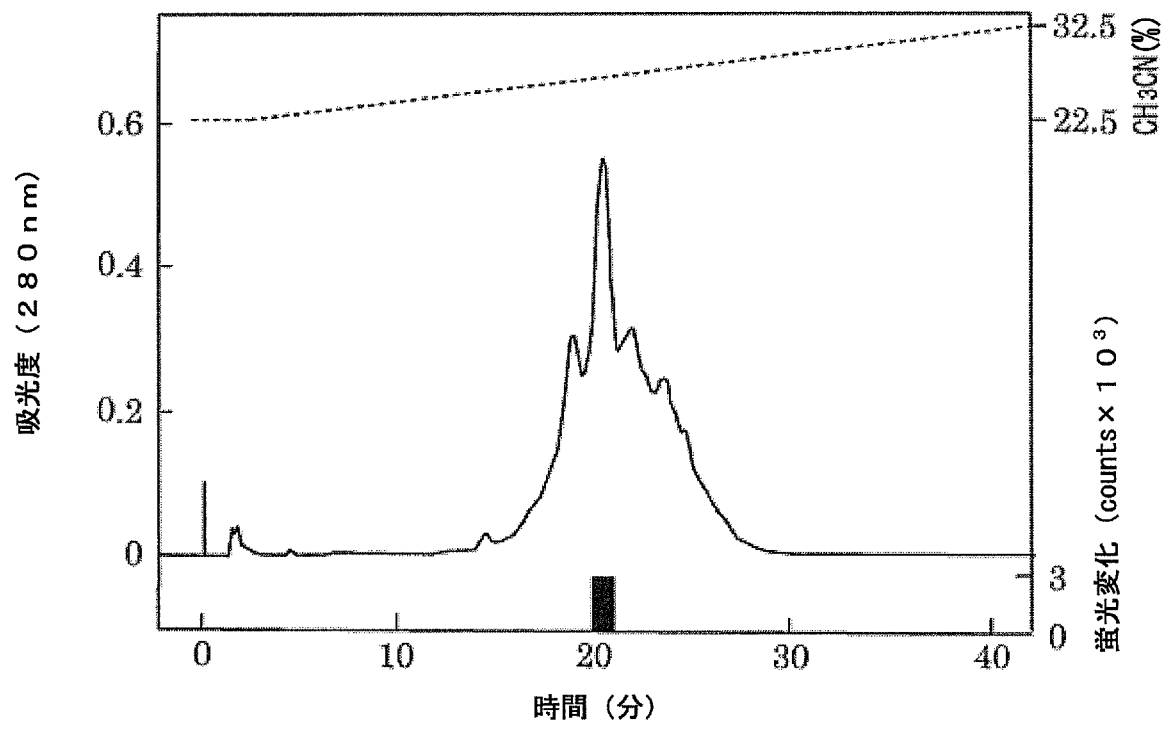
[図1]



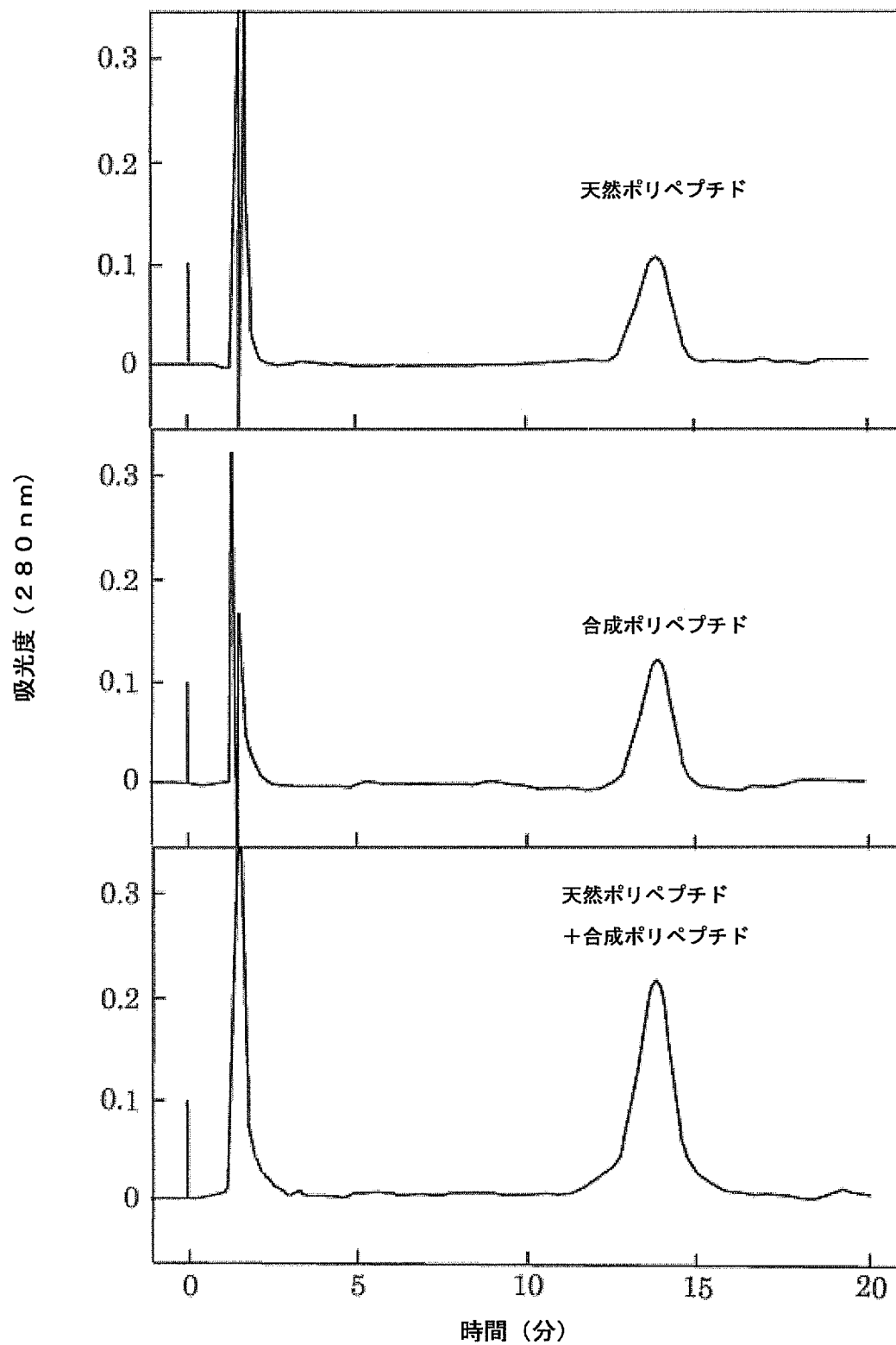
[図2]



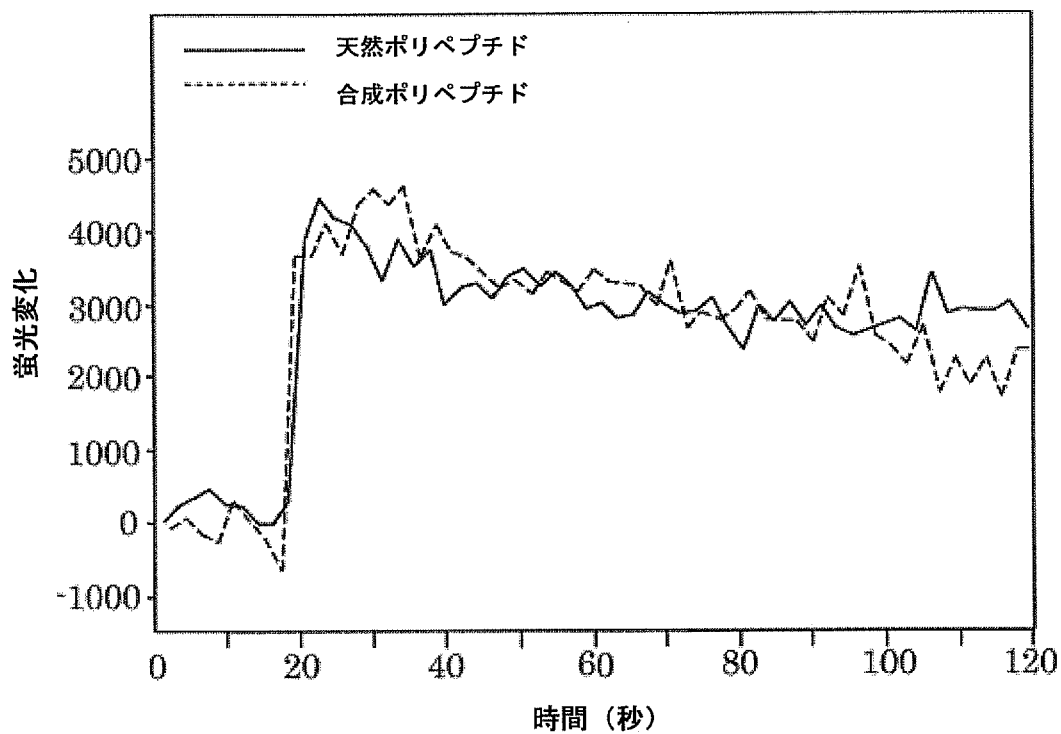
[図3]



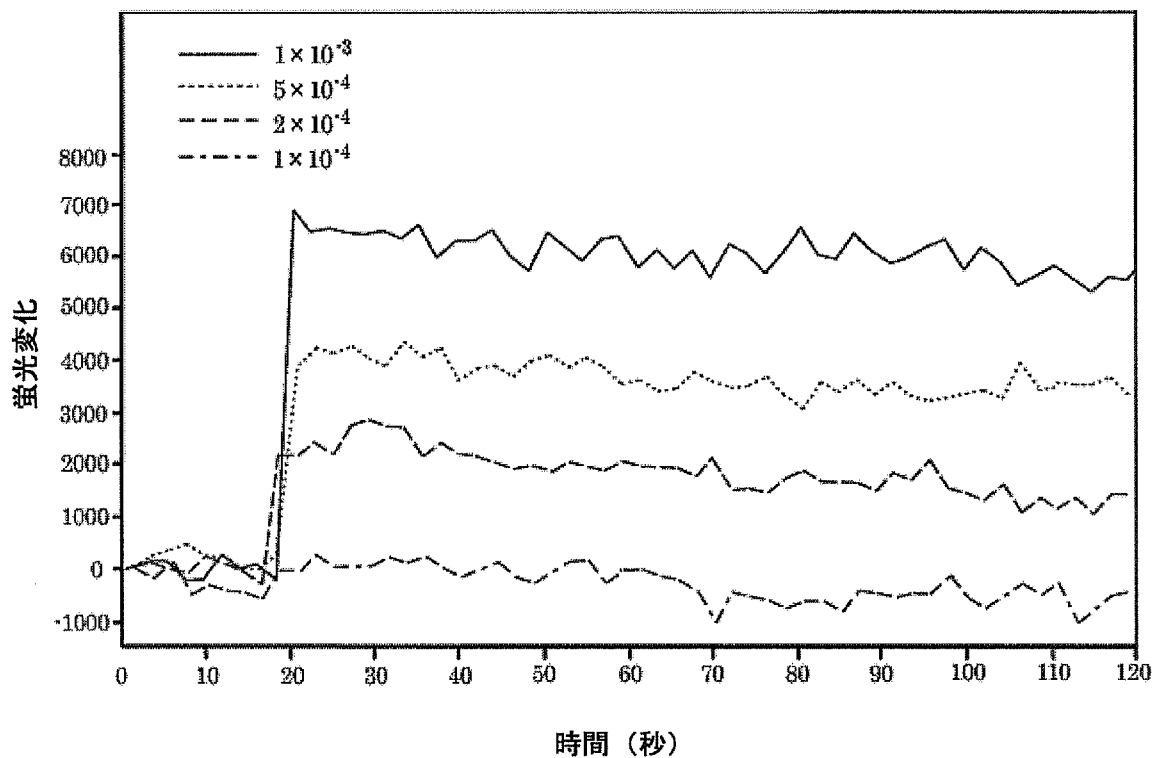
[図4]



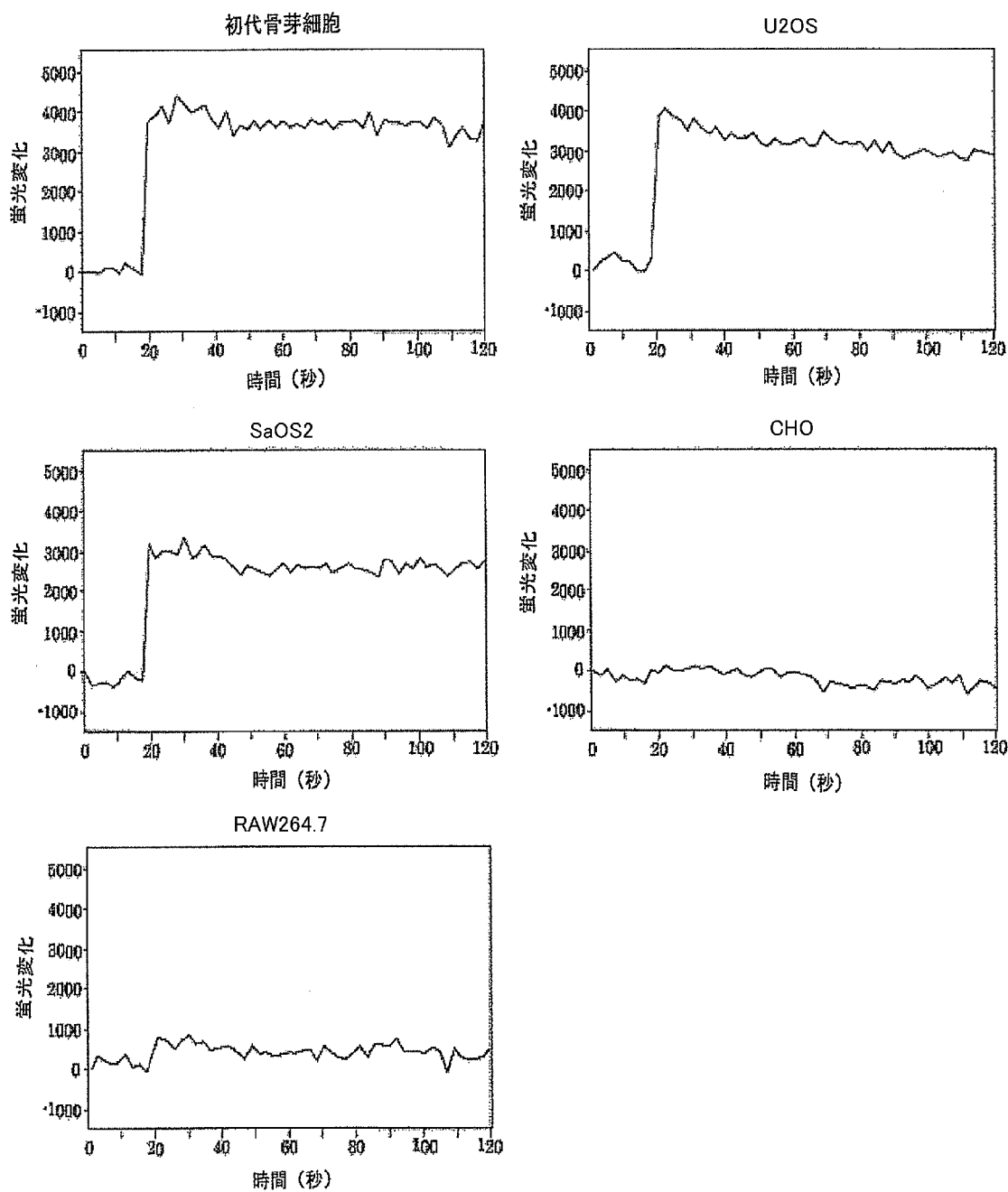
[図5]



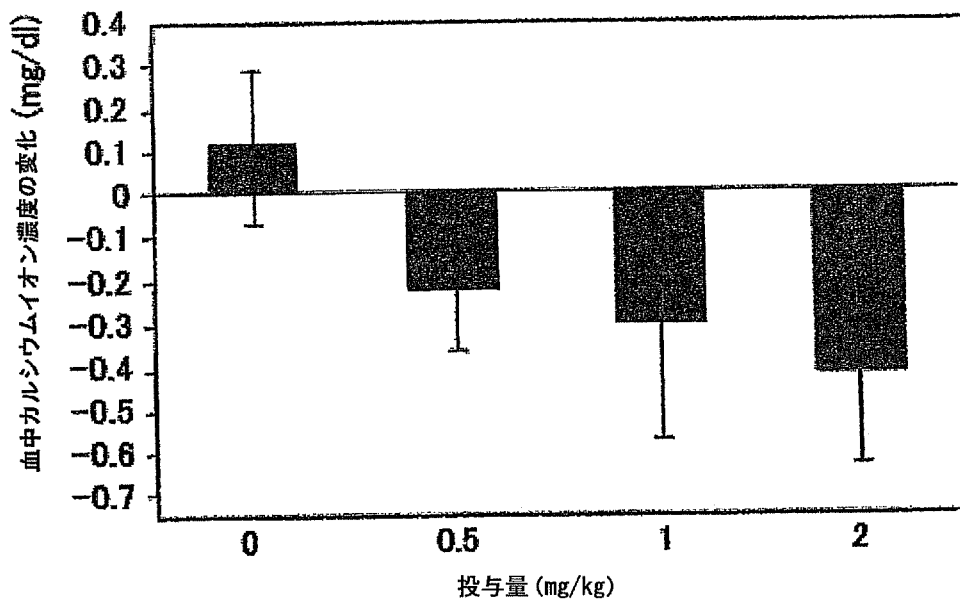
[図6]



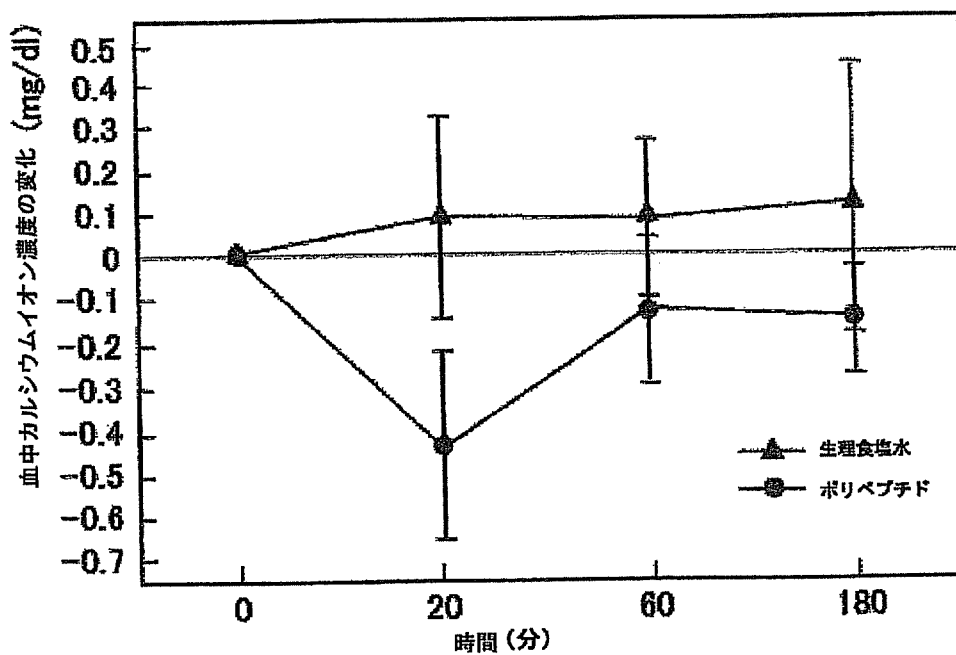
[図7]



[図8]

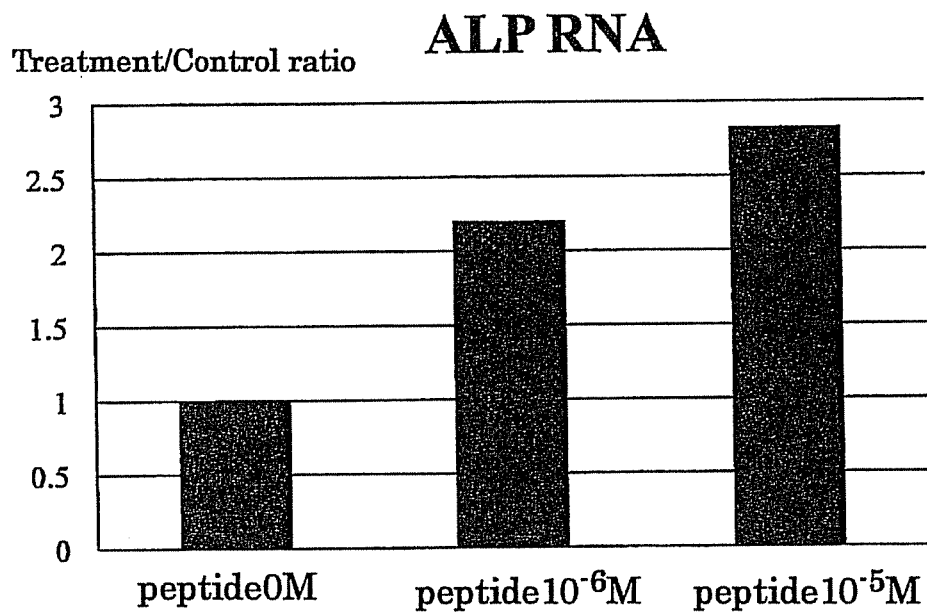


[図9]

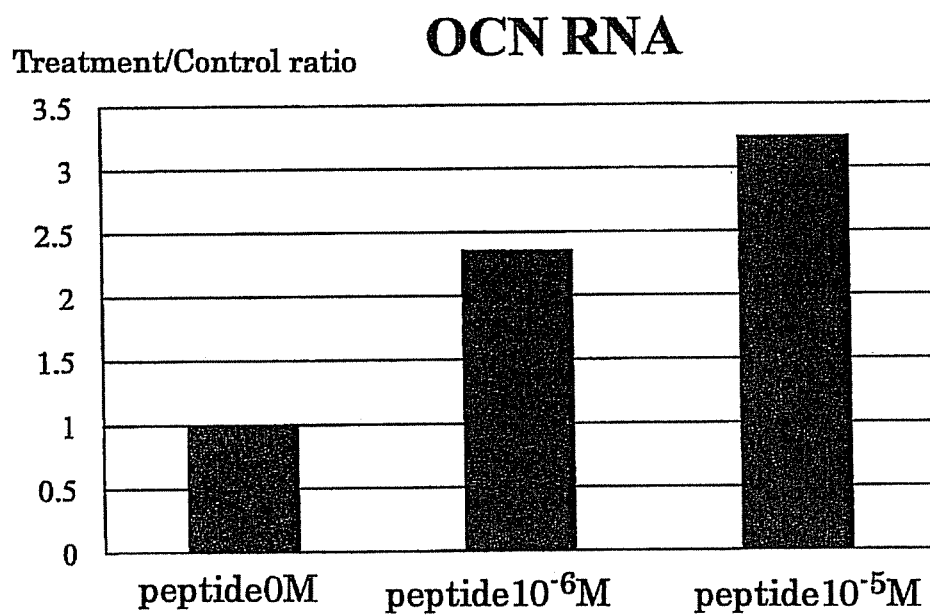




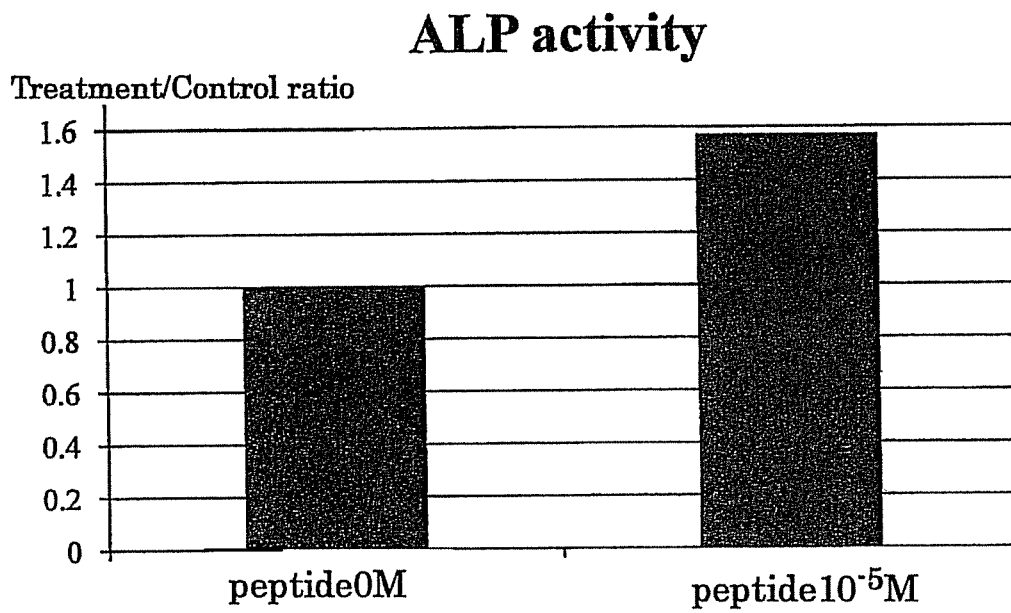
[図10]



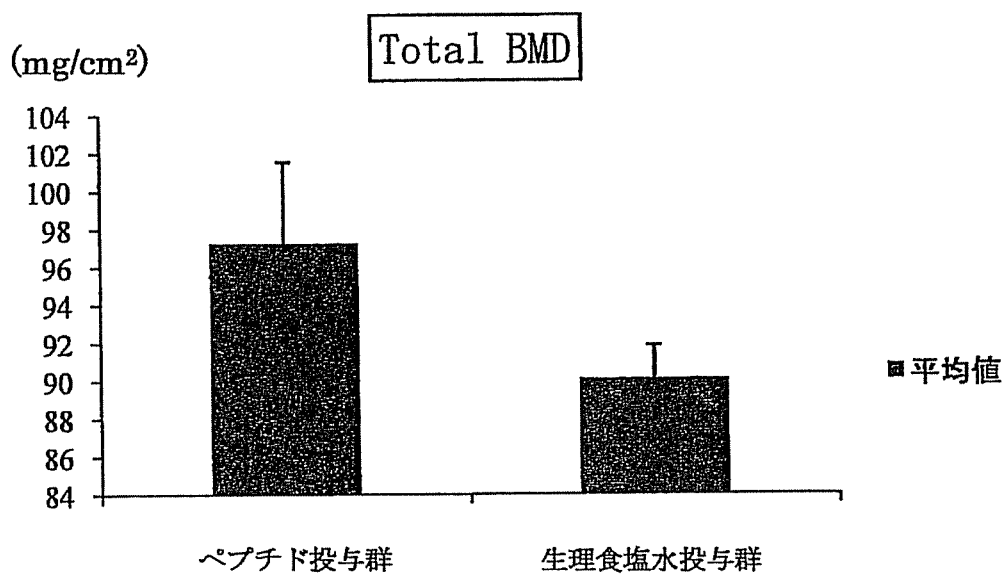
[図11]



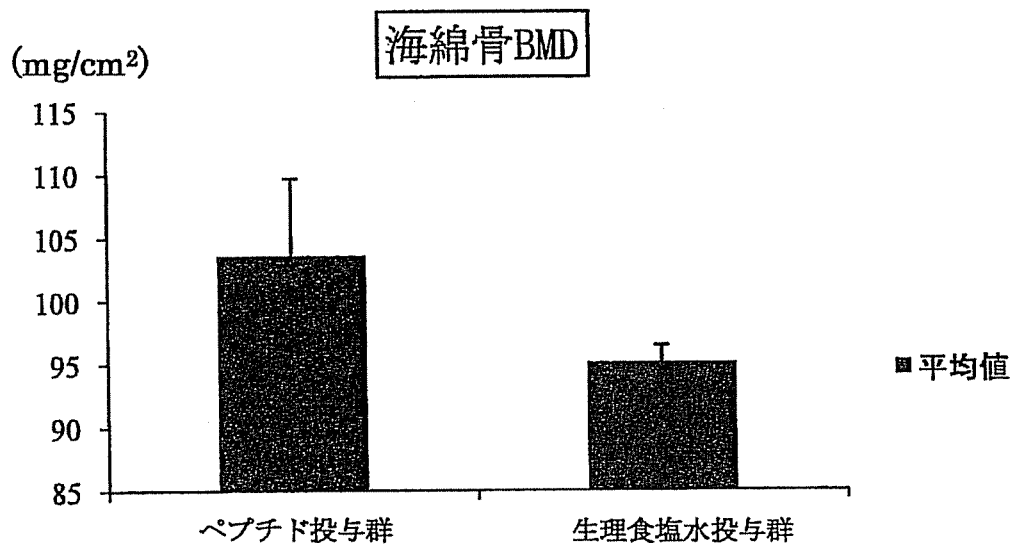
[図12]



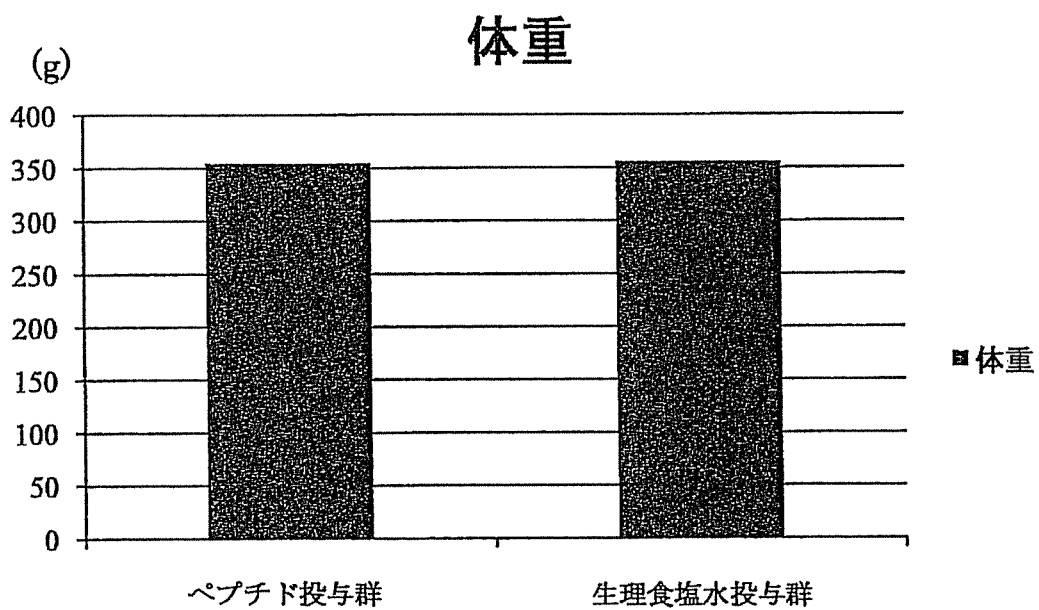
[図13]



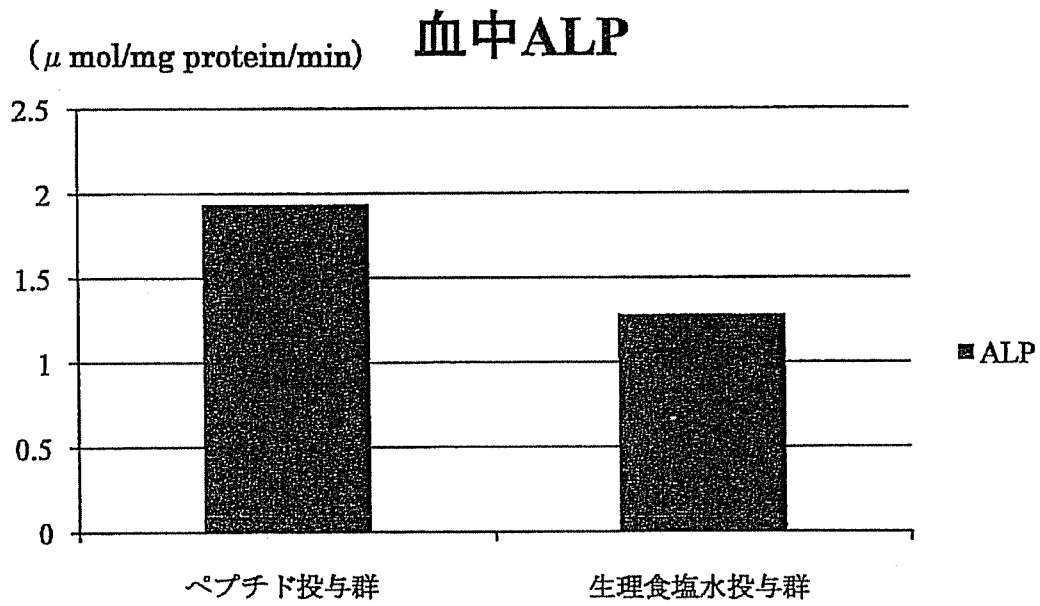
[図14]



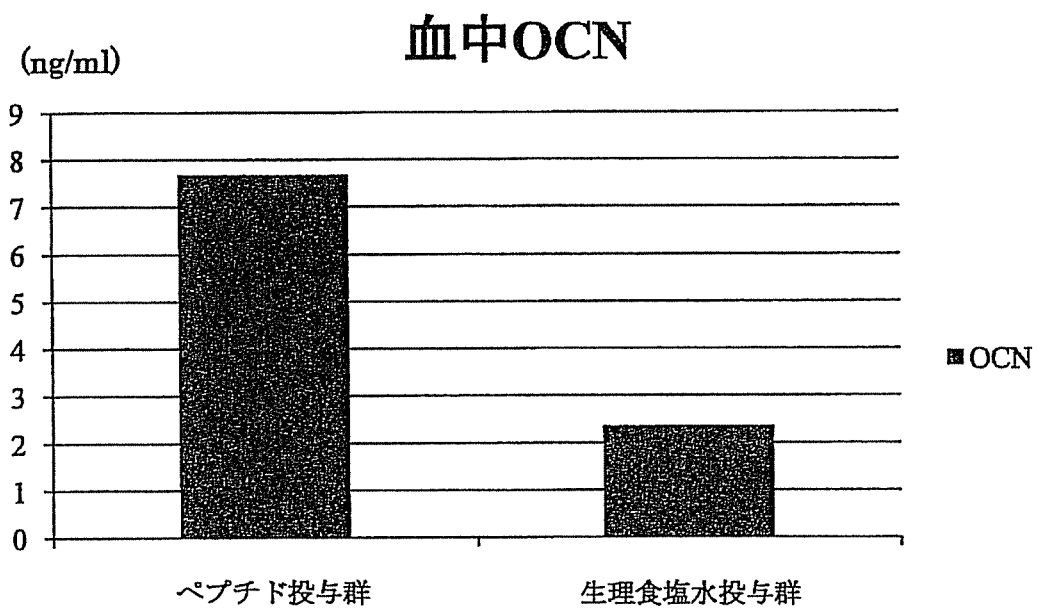
[図15]



[図16]



[図17]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/068512

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K14/575(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/575, A61K38/00, A61P19/08, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. XP_001061260, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/109497874?report=genpept>22-JUN-2006 uploaded, [retrieved on 2009-12-16] Definition: similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-9KD) (CI-9KD) [Rattus norvegicus].	1/2-7,10,11,13
A	Fukushima, N., et al., Ghrelin directly regulates bone formation., Journal of Bone and Mineral Research, 2005, Vol.20, No.5, p.790-798	1-7,10,11,13
A	JP 2006-241098 A (Kurume University), 14 September 2006 (14.09.2006), (Family: none)	1-7,10,11,13

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  
13 January, 2010 (13.01.10)

Date of mailing of the international search report  
26 January, 2010 (26.01.10)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/068512

**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.: 8, 12  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 8 and 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
- 2.  Claims Nos.: 9  
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:  
In claim 9, there is an expression "the invention recited in claim 7". However, claim 7 describes no method. Therefore, claim 9 does not comply with the requirement of clarity.
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C07K14/575 (2006.01) i, A61K38/00 (2006.01) i, A61P19/08 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C07K14/575, A61K38/00, A61P19/08, A61P43/00

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 1971-2010年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. XP_001061260, < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/109497874?report=genpept">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/109497874?report=genpept</a> > 22-JUN-2006 uploaded, [retrieved on 2009-12-16] Definition: similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-9KD) (CI-9KD) [Rattus norvegicus].	1/ 2-7, 10, 11, 13
A	Fukushima, N., et al., Ghrelin directly regulates bone formation., Journal of Bone and Mineral Research, 2005, Vol.20, No.5, p.790-798	1-7, 10, 11, 13

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 13.01.2010	国際調査報告の発送日 26.01.2010
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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 3963

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2006-241098 A (学校法人 久留米大学) 2006.09.14, (ファミリーなし)	1-7, 10, 11, 13



## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ  配列表  
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット  紙形式  
 電子形式
- c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれていたもの  
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの  
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 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 (PCT 17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.  請求項 8、12 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項8、12は、治療による人体の処置方法に関するものであり、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT 規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 9 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、請求項9には、「請求項7記載の方法」なる記載があるが、請求項7には方法は記載されていないことから明確性の要件を欠いている。
3.  請求項 \_\_\_\_\_ 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きの国際調査機関は認めた。

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

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。