

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/026526

発行日 平成25年10月28日(2013.10.28)

(43) 国際公開日 平成24年3月1日(2012.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	2GO45
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z N A Z	4BO24
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28	4CO84
CO 7 K 7/06 (2006.01)	CO 7 K 7/06	4CO85
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4CO86
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 35 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2012-530706 (P2012-530706)	(71) 出願人	504224153 国立大学法人 宮崎大学 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/069178	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(22) 国際出願日	平成23年8月25日(2011.8.25)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	61/471, 338	(74) 代理人	100101904 弁理士 島村 直己
(32) 優先日	平成23年4月4日(2011.4.4)	(74) 代理人	100168893 弁理士 岩崎 正路
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	西森 利敷 宮崎県宮崎市清武町木原5200 国立大 学法人宮崎大学医学部内
(31) 優先権主張番号	特願2010-191039 (P2010-191039)		
(32) 優先日	平成22年8月27日(2010.8.27)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモキニン-1 受容体及びヘモキニン-1 由来ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、SPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び掻痒抑制活性を有するペプチドを提供することを第1の課題とする。また、本発明は、HK-1に特異的な受容体を用いた疼痛治療薬、炎症治療薬、及び掻痒治療薬の探索方法を提供することを第2の課題とする。

以下の(a)~(c)のいずれかに示されるペプチド又はその製薬上許容される塩：

(a) Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号7)[C末端のArg-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(b) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号6)[C末端のGln-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたGlnを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(c) 上記(a)又は(b)のペプチドのアミノ酸配列において、Arg及びLys以外の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つサブスタンスPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び掻痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチド

(但し、

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-NH₂ (配列番号3)[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；及び

10

20

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物のスクリーニングのための、GPR83の使用。

【請求項 2】

GPR83が、

(i) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列の部分配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

(iii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

(iv) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列において、1 ~ 10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；又は

(v) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングする方法であって、

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物とGPR83とを接触させるステップ；

前記化合物の、GPR83への結合及び/又はアンタゴニスト活性を検出するステップ；及び

疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングするステップ；

を含む、上記方法。

【請求項 4】

GPR83を含有する細胞膜を調製するステップ；

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物と前記細胞膜とを接触させるステップ；及び

前記化合物が、GPR83に結合して、アンタゴニスト活性を発揮するかどうかを測定するステップ；

を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

GPR83が、

(i) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(ii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列の部分配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

(iii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

(iv) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列において、1 ~ 10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；又は

(v) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；

である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

GPR83機能阻害剤（前記阻害剤はアンタゴニスト、抗体、アンチセンス、及びsiRNAからなる群から選択される）を含有する、疼痛、炎症、又は掻痒の治療のための医薬組成物。

【請求項 7】

以下の(a) ~ (c) のいずれかに示されるペプチド又はその製薬上許容される塩；

(a) Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号 7)

[C末端のArg-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(b) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号 6)

[C末端のGln-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたGlnを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(c) 上記(a)又は(b)のペプチドのアミノ酸配列において、Arg及びLys以外の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つサブスタンスPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチド

(但し、

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-NH₂ (配列番号 3)

[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；及び

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-NH₂ (配列番号 5)

[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを除く)。

【請求項 8】

以下の(d)～(f)のいずれかに示されるペプチド又はその製薬上許容される塩：

(d) Arg-DTrp-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号 9)

[DTrpはD型のトリプトファンを示し、C末端のArg-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(e) Arg-DTrp-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号 8)

[DTrpはD型のトリプトファンを示し、C末端のGln-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたGlnを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；

(f) 上記(d)又は(e)のペプチドのアミノ酸配列において、DTrp、Arg及びLys以外の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つサブスタンスPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチド。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩からなる、サブスタンスPに対するアンタゴニスト。

【請求項 10】

請求項 7 又は 8 に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する疼痛治療薬。

【請求項 11】

請求項 7 又は 8 に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する炎症治療薬。

【請求項 12】

請求項 7 又は 8 に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する搔痒治療薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サブスタンスP (以下「SP」という)由来ペプチド及びヘモキニン-1 (以下「HK-1」という)由来ペプチド、並びにこれらのペプチドを含む疼痛治療薬、炎症治療薬、及び搔痒治療薬に関する。また、本発明は、HK-1受容体を用いた疼痛治療薬、炎症治療薬、及び搔痒治療薬のスクリーニング方法にも関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

SPは11個のアミノ酸からなるペプチドであり、そのアミノ酸配列は Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (配列番号1) [式中、C末端のメチオニンのカルボキシル基はアミド化されている。以下同様に表記する] である。

【0003】

一方、HK-1は11個のアミノ酸からなるペプチドであり、そのアミノ酸配列は Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂ (配列番号2) である。

10

【0004】

SP及びHK-1は共にタキキニンペプチドに属する。ここで、タキキニンペプチドとは、C末端にFXGLM-NH₂ (ここで、Xは疎水性アミノ酸である)を有するペプチドを意味する。

【0005】

SPは脊椎動物だけでなく、無脊椎動物においても見つけられており、炎症、疼痛、かゆみ、筋収縮などに関与し、生体において多様な機能を有している。従って、SPに対する新規のアンタゴニストを見出すことは、SPが関与する多くの症状(例えば、痛み、炎症やかゆみなど)を抑制するための医薬の開発に寄与すると考えられる。

【0006】

これまでの先行研究により、SPはN末端フラグメント (SP(1-7)) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-NH₂ (配列番号3) とC末端フラグメント (SP(7-11)) Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (配列番号4) と2領域に分割され、かつこれらのフラグメントは異なる機能を有していることが報告されている (非特許文献1)。具体的には、SPをラットやマウスに投与すると疼痛関連行動 (例えば、ひっかき行動)を誘発するが、SPのN末端フラグメントを投与することにより疼痛関連行動を抑制することができる。一方、SPのC末端フラグメントを投与すると疼痛関連行動が誘発される。

20

【0007】

また、SPのN末端フラグメント (SP(1-7)) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-NH₂ (配列番号3) 及びSPのN末端フラグメント (SP(1-8)) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-NH₂ (配列番号5) がSPに起因する疼痛関連行動を抑制することが報告されている (非特許文献2及び3)。

30

【0008】

ところで、HK-1はヒト及びげっ歯類のTAC4遺伝子からその存在が示唆されているペプチドであるが、HK-1特異的受容体と、HK-1と同属ペプチドであるSPに対する受容体(ニューロキニン-1受容体(NK1R))とが異なるかどうかは知られていない。

【0009】

HK-1がSPと同様にNK1Rに対して高い親和性を有していること (非特許文献4、5、及び6)、並びにHK-1及びSPをラットの髄腔内に投与することによりひっかき行動が誘発され、その行動が投与するペプチドの濃度に依存して誘発され (非特許文献7)、また、その行動が既知のNK1RアンタゴニストL-703,606により抑制されること (非特許文献7及び8)に基づいて、HK-1の受容体がNK1Rであることを示唆しているとの見解もある。

40

【0010】

しかし、(1)SPを髄腔内投与すると熱痛覚過敏を誘発することが知られているが (非特許文献9及び10)、HK-1投与では全くその反応が認められないこと (非特許文献7及び11)、(2)タキキニンペプチドのエンドキニン類ペプチドであるエンドキニンC及びエンドキニンDのC末端領域から12個の共通アミノ酸配列により構成されるエンドキニンC/

50

D(EK C/D)を前投与すると、SP誘発ひっかき行動を抑制することはできるが、HK-1誘発ひっかき行動を抑制することができないこと（非特許文献8）、並びに（3）受容体の脱感作に關与する細胞内情報伝達系に対する種々のプロテインキナーゼ阻害剤での処理による受容体脱感作用の阻止を指標に評価すると、SP及びHK-1が誘発する受容体脱感作には異なるプロテインキナーゼが關与していると示唆されること（非特許文献12）に基づけば、NK1Rとは異なるHK-1に特異的な受容体(HK-1-preferred receptor)が存在し、それらの受容体の機能は類似しているが同一ではないことが推測される（非特許文献7、8、及び13）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Michal E. Hall, John M. Stewart. Peptides 4 pp. 763-768 (1983)

【非特許文献2】Sakurada T et al., Neurosci Lett. 95 pp. 281-285 (1988)

【非特許文献3】Sakurada C et al., J Pharm Sci. 88 pp. 1127-1132 (1999)

【非特許文献4】R.A. Duffy, J.A. Hedrick, G. Randolp, C.A. Morgan, M.E. Cohen-Williams, G. Vassileva, J.E. Lachowicz, M. Laverty, M. Maguire, L.-S. Shan, E. Cus tafson, G.B. Varty, Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 recetor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbil s, Neuropharmacology 45 (2003) 242-250

【非特許文献5】O. Morteau, B. Lu, C. Gerard, N.P. Gerard, Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor, Nat. Immunol. 2 (2001) 1008

【非特許文献6】V. Camarda, A. Rizzi, G. Calo, R. Guerrini, S. Salivadori, D. Re goli, Pharmacological profile of hemokinin 1: a novel member of the tachykinin f amily, Life Sci. 71 (2002) 363-370

【非特許文献7】D. Endo, T. Ikeda, Y. Ishida, D. Yoshioka, T. Nishimori, Effect of intrathecal administration of hemokinin-1 on the withdrawal response to noxious thermal stimulation of the rat hind paw, Neurosci. Lett. 392 (2006) 114-117

【非特許文献8】R. Naono, T. Nakayama, T. Ikeda, O. Matsushima, T. Nishimori, Le ucine at the carboxyl-terminal of endokinin C and D contributes to elicitation o f the antagonistic effect on substance P in rat pain processing, Brain Res. 1165 (2007) 71-80

【非特許文献9】A.B. Malmberg, T.L. Yaksh, Hyperalgesia mediated by spinal gluta mate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition, Scienc e 257 (1992) 1276-1279

【非特許文献10】T. Nakayama, R. Naono, T. Ikeda, T. Nishimori, NMDA and AMPA r eceptors contributes to the maintenace of substance P-induced thermal hyperalges ia, Neurosci. Res. 67 (2010) 18-24

【非特許文献11】N. Sunakawa, R. Naono, T. Ikeda, O. Matsushima, S. Sakoda, T. Nishimori, The amino-terminal region of hemokinin-1 regulates the induction of t hermal hyperalgesia in rats, Neuropeptides 44 (2010) 273-278

【非特許文献12】R. Naono, T. Nakayama, T. Ikeda, O. Matsushima, T. Nishimori, Pharmacological characterization of desensitization in scratching behavior induc ed by intrathecal administration of hemokinin-1 in the rat, Neuropeptides 42 (20 08) 47-55

【非特許文献13】R. Naono, D. Yoshioka, T. Ikeda, T. Nakayama, T. Nishimori, Th e mommon carboxyl-terminal region of novel tachykinin peptide contributes to ind uce desensitization in scratching behavior of rats, Brain Res. Bull. 71 (2007) 4 61-465

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

上記の通り、SPのN末端フラグメント（SP(1-7)及びSP(1-8)）がSPに起因する疼痛関連行動を抑制することは知られていた。しかしながら、製剤化の観点からはSPのN末端フラグメントの更なる改良が求められている。また、アンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性を有する更なるペプチドも求められている。

【 0 0 1 3 】

加えて、未だ明らかとなっていないHK-1に特異的な受容体を見出すことも求められている。

【 0 0 1 4 】

そこで本発明は、SPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性を有するペプチドを提供することを目的としている。

10

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、HK-1に特異的な受容体を用いた疼痛治療薬、炎症治療薬、及び搔痒治療薬の探索方法を提供することを目的としている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

上述の課題を解決するために本発明者らが鋭意検討した結果、タキニンペプチドに属するSPのN末端フラグメント（SP(1-5)）及びHK-1のN末端フラグメント（HK-1(1-5)）

SP(1-5) : Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂（配列番号6）

HK-1(1-5) : Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂（配列番号7）

20

がそれぞれ、SPに起因する疼痛関連行動（ひっかき行動）や、ホルマリン投与により誘発される炎症性疼痛を抑制することを見出した。また、SPのN末端フラグメント（SP(1-5)）及びHK-1のN末端フラグメント（HK-1(1-5)）におけるL型アミノ酸の一部をD型アミノ酸に置換することによって、前記抑制効果が長時間持続することを見出した。

【 0 0 1 7 】

更には、HK-1に特異的な受容体がGタンパク質共役受容体（GPR）83であることを同定するに至った。

【 0 0 1 8 】

すなわち、本発明は以下を包含する。

【 0 0 1 9 】

30

（1）疼痛、炎症、又は搔痒の治療に有用な化合物のスクリーニングのための、GPR83の使用。

【 0 0 2 0 】

（2）疼痛、炎症、又は搔痒の治療に有用な化合物をスクリーニングする方法であって、

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物とGPR83とを接触させるステップ；

前記化合物の、GPR83への結合及び/又はアンタゴニスト活性を検出するステップ；及び

疼痛、炎症、又は搔痒の治療に有用な化合物をスクリーニングするステップ；

40

【 0 0 2 1 】

（3）GPR83を含有する細胞膜を調製するステップ；

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物と前記細胞膜とを接触させるステップ；及び

前記化合物が、GPR83に結合して、アンタゴニスト活性を発揮するかどうかを測定するステップ；

を含む、（2）に記載の方法。

【 0 0 2 2 】

（4）GPR83が、

50

- (i) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド ;
 (ii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列の部分配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド ;
 (iii) 配列番号 17 ~ 20 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド ;
 (iv) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列において、1 ~ 10個のアミノ酸が欠失、置換、及び / 又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド ; 又は
 (v) (i) ~ (iii) のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド ;
- である、(1)に記載の使用、又は(2)若しくは(3)に記載の方法。

10

【0023】

(5) GPR83機能阻害剤(前記阻害剤はアンタゴニスト、抗体、アンチセンス、及びsiRNAからなる群から選択される)を含有する、疼痛、炎症、又は掻痒の治療のための医薬組成物。

【0024】

(6) 以下の(a)~(c)のいずれかに示されるペプチド又はその製薬上許容される塩 :

(a) Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号7)

[C末端のArg-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたArgを示す]
 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド ;

20

(b) Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号6)

[C末端のGln-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたGlnを示す]
 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド ;

(c) 上記(a)又は(b)のペプチドのアミノ酸配列において、Arg及びLys以外の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つサブスタンスPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び掻痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチド

(但し、

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-NH₂ (配列番号3)

[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]
 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド ; 及び

30

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-NH₂ (配列番号5)

[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]
 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを除く)。

【0025】

(7) 以下の(d)~(f)のいずれかに示されるペプチド又はその製薬上許容される塩 :

(d) Arg-DTrp-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号9)

[DTrpはD型のトリプトファンを示し、C末端のArg-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド ;

40

(e) Arg-DTrp-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号8)

[DTrpはD型のトリプトファンを示し、C末端のGln-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたGlnを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチド ;

(f) 上記(d)又は(e)のペプチドのアミノ酸配列において、DTrp、Arg及びLys以外の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つサブスタンスPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び掻痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチド。

【0026】

(8) (6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩からなる、サブ

50

スタンスPに対するアンタゴニスト。

【0027】

(9)(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する疼痛治療薬。

【0028】

(10)(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する炎症治療薬。

【0029】

(11)(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する掻痒治療薬。

【0030】

本発明は更に以下の態様を包含する。

【0031】

(12)疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングするための、GPR83を含むスクリーニング剤。

【0032】

(13)疼痛、炎症、又は掻痒を治療するための、GPR83機能阻害剤(前記阻害剤はアンタゴニスト、抗体、アンチセンス、及びsiRNAからなる群から選択される)。

【0033】

(14)疼痛、炎症、又は掻痒を治療するための医薬の製造における、GPR83機能阻害剤(前記阻害剤はアンタゴニスト、抗体、アンチセンス、及びsiRNAからなる群から選択される)の使用。

【0034】

(15)疼痛、炎症、又は掻痒の治療を必要とする哺乳動物(例えば、ヒト)に、有効量のGPR83機能阻害剤(前記阻害剤はアンタゴニスト、抗体、アンチセンス、及びsiRNAからなる群から選択される)を投与することを含む、掻痒、疼痛、又は炎症の治療方法。

【0035】

(16)医薬として使用するための、(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩。

【0036】

(17)疼痛、炎症、又は掻痒を治療するための、(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩。

【0037】

(18)(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩と、製薬上許容される担体とを含む医薬組成物。

【0038】

(19)疼痛、炎症、又は掻痒を治療するための医薬の製造における、(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩の使用。

【0039】

(20)疼痛、炎症、又は掻痒の治療を必要とする哺乳動物(例えば、ヒト)に、有効量の(6)又は(7)に記載のペプチド又はその製薬上許容される塩を投与することを含む、疼痛、炎症、又は掻痒の治療方法。

【0040】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-191039号及び米国仮特許出願61/471,338号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0041】

本発明によれば、SPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び掻痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するペプチドを提供することができる。また、L型アミノ酸の一部をD型アミノ酸に置換することにより、上記活

10

20

30

40

50

性を長時間持続するペプチドを提供することができる。

【0042】

加えて、HK-1特異的受容体であるGPR83を用いる化合物スクリーニングによって、HK-1が関与する疼痛、搔痒、搔痒などの治療に有用な化合物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】SP、nSP (SP(1-5))、cSP (SP(6-11))、HK-1、nHK-1 (HK-1(1-5))、及びcHK-1 (HK-1(6-11))による、SP誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図2】nSP及びnHK-1とSPとの投与間隔と、SP誘発ひっかき行動の回数との関係を示す。

【図3】nSP及びnHK-1の投与濃度と、SP誘発ひっかき行動の回数との関係を示す。

【図4】Arg又はLysをLeuで置換したペプチドによる、SP誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図5】D型のトリプトファンを導入したペプチドによる、SP誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図6】nSP及びnHK-1による、ホルマリン誘発炎症性疼痛の抑制効果を示す。

【図7】nSP及びnHK-1による、ホルマリン誘発炎症性疼痛の抑制効果を示す。

【図8】 D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1による、ヒスタミン誘発性搔痒の抑制効果を示す。

【図9】 D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1による、セロトニン誘発性搔痒の抑制効果を示す。

【図10】NK1R siRNAによる、SP及びHK-1誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図11】GPR83 siRNAによる、SP及びHK-1誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図12】GPR15-like siRNAによる、SP及びHK-1誘発ひっかき行動の抑制効果を示す。

【図13】GPR83 siRNAによる、ホルマリン誘発性疼痛の抑制効果を示す。

【図14】GPR83 siRNAによる、ホルマリン誘発性疼痛の抑制効果を示す。

【図15】GPR83 siRNAによる、ヒスタミン誘発性搔痒の抑制効果を示す。

【図16】GPR83 siRNAによる、セロトニン誘発性搔痒の抑制効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0045】

1. ヘモキニン-1由来ペプチド及びサブスタンスP由来ペプチド

本発明に係るペプチドは、

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号6) 又は

Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号7)

[C末端のGln-NH₂及びArg-NH₂はそれぞれカルボキシル基がアミド化されたGln及びArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなる。

【0046】

本発明に係るペプチドをヒトなどの動物に投与することにより、SPに起因する疼痛関連行動、熱痛覚過敏、疼痛、炎症、かゆみなどを抑制することができる。また、ホルマリン投与などにより誘発される炎症性疼痛や痒み誘発物質投与などにより誘発される痒みをも抑制することもできる。

【0047】

また、本発明に係るペプチドは、上記のアミノ酸配列において、Arg及びLys以外の位置で1又は数個(例えば、1~3個、好ましくは1又は2個、特に好ましくは1個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つSPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するものであってもよい。

【0048】

ここで、「SPに対するアンタゴニスト活性」とは、SPに起因する疼痛関連行動、熱痛覚過敏、疼痛、炎症、かゆみなどを抑制する活性を意味する。「疼痛抑制活性」、「炎症抑

10

20

30

40

50

制活性」、及び「搔痒抑制効果」とは、疼痛、炎症、及び搔痒を抑制する活性を意味するが、前記疼痛、炎症、及び搔痒はSPに起因するものに限定されない。例えば、ホルマリンを投与することにより誘発される炎症性疼痛を抑制する活性も含まれる。また、ヒスタミンやセロトニンに代表される痒み誘発物質を投与することにより誘発される痒みを抑制する活性も含まれる。

【0049】

なお、ホルマリン投与により誘発される炎症性疼痛は、広義の神経障害性疼痛モデルと見なすことができる。また、起炎物質のカラゲニンを投与することにより誘発される炎症も広義の神経障害性疼痛モデルと見なすことができる。上記活性は実施例に記載の評価手順に従って評価することができる。

10

【0050】

本発明に係るペプチドにおいて、L型アミノ酸の一部をD型アミノ酸に置換することによって、ペプチドが生体内で分解されにくくなり、SPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性を長時間持続することができる。すなわち、本発明は、

Arg-DTrp-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号8) 又は

Arg-DTrp-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号9)

[DTrpはD型のトリプトファンを示し、C末端のGln-NH₂及びArg-NH₂はそれぞれカルボキシル基がアミド化されたGln及びArgを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチドも包含する。

20

【0051】

また、本発明に係るペプチドは、上記のペプチドのアミノ酸配列において、DTrp、Arg及びLys以外の位置で1又は数個(例えば、1又は2個、好ましくは1個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つSPに対するアンタゴニスト活性、疼痛抑制活性、炎症抑制活性、及び搔痒抑制活性からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有するものであってもよい。

【0052】

本発明に係るペプチドは、製薬上許容される塩の形態であってもよい。製薬上許容される塩としては、例えば、アルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(カルシウム塩、マグネシウム塩など)、有機酸付加塩(酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩など)、無機酸付加塩(塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩など)を挙げることができる。

30

【0053】

本発明に係るペプチドは、公知のペプチド合成方法により化学的に合成することができる。あるいは、本発明に係るペプチドをコードするDNAを宿主において導入し、発現した本発明に係るペプチドを回収することで、本発明に係るペプチドを得ることができる。

【0054】

本発明に係るペプチドは、SPの作用に拮抗する作用を有するため、SPに対するアンタゴニストとして使用することができる。

【0055】

SPは多くの症状(例えば、疼痛、炎症、かゆみ)に関与することが知られている(Pharmacological Reviews 54(2002)285-322)。また、ホルマリンは炎症性疼痛を誘発し、ヒスタミンやセロトニンは痒みを誘発する。そのため、SP、ホルマリン、ならびにヒスタミン及びセロトニンにより誘発される症状を抑制することができる本発明に係るペプチドは疼痛治療薬、炎症治療薬、及び搔痒治療薬の有効成分として使用することができる。ここで、治療とは、ある症状を既に有している対象において当該症状を抑制することに加えて、当該症状を有していない対象において当該症状の発症を抑制すること(すなわち、予防すること)を包含する。

40

【0056】

本発明に係るペプチドを有効成分として含有する疼痛治療薬、炎症治療薬、又は搔痒治

50

療薬を使用することで、ヒトにおける以下の疾患状態（生理学的な障害、症状又は疾患）のうち1以上を治療することができる：疼痛関連障害（例えば、片頭痛、神経障害疼痛、手術後疼痛、慢性疼痛症候群）、炎症性疾患（例えば、関節炎、乾癬）及び皮膚障害（例えば、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、帯状疱疹）。

【0057】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬の剤形としては、特に限定されるものではないが、例えば、錠剤、粉剤、乳剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、液剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤などの経口剤、又は注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、貼付剤、スプレー剤、軟膏剤などの非経口剤が挙げられる。

10

【0058】

本発明に係るペプチドと組み合わせることができる医薬用成分としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などが挙げられる。

【0059】

賦形剤としては、例えば、デンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類などが挙げられる。

【0060】

結合剤としては、例えば、結晶セルロース、結晶セルロース・カルメロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルメロースナトリウム、エチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デキストリン、アルファー化デンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、プルラン、ポリビニルピロリドン、アミノアルキルメタクリレートコポリマー-E、アミノアルキルメタクリレートコポリマー-RS、メタクリル酸コポリマー-L、メタクリル酸コポリマー、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルアルコール、アラビアゴム、アラビアゴム末、寒天、ゼラチン、白色セラック、トラガント、精製白糖、マクロゴールなどが挙げられる。

20

30

【0061】

崩壊剤としては、例えば、結晶セルロース、メチルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、トラガントなどが挙げられる。

【0062】

界面活性剤としては、例えば、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、セスキオレイン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート、モノステアリン酸グリセリン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウロマクロゴールなどが挙げられる。

40

【0063】

滑沢剤としては、例えば、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乾燥水酸化アルミニウムゲル、タルク、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム、無水リン酸水素カルシウム、ショ糖脂肪酸エステル、ロウ類、水素添加植物油、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

50

【0064】

流動性促進剤としては、例えば、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウムなどが挙げられる。

【0065】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬の剤形が、液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤又はエリキシル剤である場合には、矯味矯臭剤、着色剤などを含有してもよい。

【0066】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬は、更なる成分を含んでいてもよい。本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬が含むことができる成分としては、例えば、プロピオン酸誘導体系非ステロイド性抗炎症薬として、プロピオン酸誘導体であるイブプロフェン、ケトプロフェン、フルルビロフェン、フルルビロフェンアキセチル、オキサプロジン、フェノプロフェン、チアプロフェン酸、ナプロキセン、プラノプロフェン、ロキソプロフェン、アミノプロフェン、ザルトプロフェン又はこれらの塩、非ピリン系解熱鎮痛薬として、アセトアミノフェン、メシル酸ジメトチアジン又はこれらの塩、抗プラスミン薬として、トラネキサム酸、イブシロンアミノカプロン酸又はこれらの塩、消炎酵素薬として、塩化リゾチーム、セミアルカリプロテイナーゼ、セラペプターゼ、プロメライン又はこれらの塩などが挙げられる。

10

【0067】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬における本発明に係るペプチドの含有量は、投与目的、投与経路、剤形などによって適宜変更し得るが、例えば、0.001~1mg、好ましくは0.001~0.01mgである。

20

【0068】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬の投与回数、投与量及び投与期間は、特に限定されるものではなく、例えば、病気の種類、患者の年齢、性別、体重又は症状の程度、あるいは投与方法などに応じて適宜決定することができる。投与回数は、例えば、外用投与で、1日1回~3回、好ましくは1日1回である。本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬に含まれる本発明に係るペプチドの投与量は、インドメタシンでの投与量が外用で50mg、静注で1mgから換算して、例えば静注で1日当たり0.01mg~1mg/kg体重、好ましくは0.01mg~0.1mg/kg体重であり、外用ではその50倍である。また、投与期間は、例えば1~7日間、好ましくは1~2日間である。

30

【0069】

本発明に係る疼痛治療薬、炎症治療薬、又は掻痒治療薬の投与経路は、剤形や使用目的に応じて、適宜決定することができるが、例えば、経口投与、非経口投与(髄腔内投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、鼻内投与、舌下投与など)、及び局所投与(経皮用パッチ、ローション剤、液剤、エアゾール剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、ハップ剤など)が挙げられる。

【0070】

2. HK-1特異的受容体を用いたスクリーニング方法

HK-1は、疼痛、炎症、及び掻痒に関与する物質である。従って、HK-1に特異的に結合する受容体を利用し、そのアンタゴニストを探索することにより、疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な候補物質を見出すことが可能となる。

40

【0071】

本発明者らは、以下の実施例に示すように、HK-1特異的受容体としてGタンパク質共役受容体(GPR)83を同定した。そして、GPR83を使用して、疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【0072】

GPR83は、ヒトをはじめとし、マウスなどでも同定されており、アミノ酸配列は、GenBankなどのデータベースにて公知である。既に明らかになっているGPR83のアミノ酸配列を配列番号17~20に示す。なお、本発明において「GPR83」とは、GPR83タンパク質をコ

50

ードする遺伝子及びmRNAも包含し、タンパク質、遺伝子、及びmRNAのいずれに対しても使用される。また、「GPR83」は、前記タンパク質、遺伝子、及びmRNAにおけるアミノ酸又は塩基の一部が変異したタンパク質、遺伝子、及びmRNA、並びにそれらのフラグメントも包含する。

【0073】

本発明に係るスクリーニング方法で用いられるGPR83は、GPR83タンパク質の全長であってもよいが、そのペプチド断片であってHK-1受容体活性を有するもの、あるいは全長タンパク質をその断片とするものであってHK-1受容体活性を有するものでもよい。更に、これらのポリペプチドのアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は挿入されたアミノ酸配列、あるいは前記ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、HK-1受容体活性を有するポリペプチドを用いることも出来る。

10

【0074】

例えば、本発明におけるGPR83として、以下のものが挙げられる：

- (i) 配列番号17~20のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (ii) 配列番号17~20のいずれかで表されるアミノ酸配列の部分配列を含み（好ましくは、配列番号17~20のいずれかで表されるアミノ酸配列の部分配列からなり）、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；
- (iii) 配列番号17~20のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；
- (iv) (i)~(iii)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列において、1~10個、好ましくは1~7個、より好ましくは1~4個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド；又は
- (v) (i)~(iii)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み（好ましくは、(i)~(iii)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり）、且つHK-1受容体活性を有するポリペプチド。

20

【0075】

HK-1特異的受容体であるGPR83を使用したスクリーニング方法は、以下のステップを含む。

30

【0076】

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物とGPR83とを接触させるステップ；

前記化合物の、GPR83への結合及び/又はアンタゴニスト活性を検出するステップ；及び

疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングするステップ。

【0077】

より具体的には、以下のステップを含む：

GPR83を含有する細胞膜を調製するステップ；

40

HK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物と前記細胞膜とを接触させるステップ；及び

前記化合物が、GPR83に結合して、アンタゴニスト活性を発揮するかどうかを測定するステップ。

【0078】

GPR83とHK-1受容体機能のアンタゴニストであることが推測される化合物（試験化合物）との接触は、同じ反応液中に混合すること、培養液に入れること、同じ細胞内で保持することなどの公知のあらゆる手段を用いて行うことができる。反応条件はこれらの手段に応じて適宜最適な条件を選択することができるが、一例を挙げれば、室温や培養に適した温度で、数分から数時間にわたり行うことができる。

50

【 0 0 7 9 】

反応後に試験化合物のGPR83への結合及び/又はアンタゴニスト活性を検出する方法も公知の手段により行うことができる。

【 実施例 】

【 0 0 8 0 】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれにより限定されるものではない。

【 0 0 8 1 】

[実施例 1]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドの薬理的評価1

10

1. 実験目的

先行研究にて、SPのN末端領域とC末端領域では異なる機能を有すると報告されている（非特許文献1）。そこで、我々の実験系でも同様の効果を有するか否かについて検討した。なお、N末端領域のnHK-1（HK-1(1-5)）及びnSP（SP(1-5)）、C末端領域のcHK-1（HK-1(6-11)）及びcSP（SP(6-11)）は以下に示すアミノ酸配列である：

nHK-1：Arg-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂（配列番号7）

nSP：Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂（配列番号6）

cHK-1：Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂（配列番号10）

cSP：Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂（配列番号11）。

【 0 0 8 2 】

20

2. 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-3} M（10 nmol/10 μ l）のHK-1及びSP、N末端領域のnHK-1及びnSP、C末端領域のcHK-1及びcSPを投与し、投与直後の行動学的変化を、ペプチド投与5分間のひっかき行動回数を指標として評価した。ここで、「 10^{-3} M（10 nmol/10 μ l）の・・・を投与」とは、ペプチド（例えば、nHK-1）を10 nmol含有する10 μ lの溶液（すなわち 10^{-3} M溶液）を、10 μ l全量投与することを意味する。以下、同様に表記する。結果を図1に示す。なお、これらのグラフは 10^{-3} M（10 nmol/10 μ l）のSP及びHK-1の単独投与により誘発されるひっかき回数をControlとし、このひっかき回数を100%として示している。

【 0 0 8 3 】

30

これらの結果より、N末端領域のnHK-1及びnSPの単独投与ではひっかき行動を生じないが、C末端領域のcSP及びcHK-1の単独投与ではひっかき行動を生じ、このひっかき回数はSP及びHK-1単独投与と同様の効果を有することが認められた。

【 0 0 8 4 】

[実施例 2]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドの薬理的評価2

1. 実験目的

先行研究にて、SPのN末端領域はSPに対してアンタゴニスト効果を有するペプチドであると報告されている（非特許文献2及び3）。そこで、我々の実験系でも同様の効果を有するか否かについて検討した。なお、N末端領域のSPは非特許文献2及び3で用いたペプチド（SP(1-7)及びSP(1-8)）よりアミノ酸配列の短いペプチドSP(1-5)を用いて評価した。さらに、HK-1も同様にN末端領域のペプチドとしてHK-1(1-5)を用いて評価した。今回使用したペプチド（nSP及びnHK-1）がこれまでに報告されたSPフラグメントペプチド（SP(1-7)及びSP(1-8)）よりアミノ酸配列が短くなっているのは、より短いアミノ酸配列の方が製剤化の観点から有益であると推測されたからである。

40

【 0 0 8 5 】

2. 実験方法及び結果

(i) 投与間隔

図2は、髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-3} M（10 nmol/10 μ l）のN末端領域のnSP、nHK-1を投与後、 10^{-3} M（10 nmol/10 μ l）のSP投与により誘発さ

50

れるひっかき回数の変化についてnSP及びnHK-1とSPとの投与間隔を変化させた結果を示したものである。なお、生理食塩水投与後5分後のSP投与により誘発されるひっかき回数をControlとし、そのひっかき回数を100%として示した。

【0086】

nSPとnHK-1は、どちらもSPとの投与間隔が5分間の場合に顕著なひっかき回数の抑制を認め、その抑制効果は投与10分後でも有意に示した。しかし、投与間隔15分ではその抑制効果は消失した。

【0087】

従って、SP誘発ひっかき行動に対して、nSPとnHK-1は抑制効果を有するペプチドであることが示唆される。

【0088】

(ii) 投与濃度

図3は、髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて $10^{-5}M$ (100 pmol/10 μ l)、 $10^{-4}M$ (1 nmol/10 μ l)、 $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のN末端領域のnSP、nHK-1を投与後、 $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のSP投与により誘発されるひっかき回数の変化についてnSP及びnHK-1の投与濃度を変化させた結果を示したものである。なお、生理食塩水投与後5分後のSP投与により誘発されるひっかき回数をControlとし、そのひっかき回数を100%として示した。

【0089】

なお、図2の結果より、nSPとnHK-1はどちらもSPとの投与間隔が5分間の場合に顕著なひっかき回数の抑制が認められたので、以後の実施例においてはその投与間隔を用いた。

【0090】

$10^{-5}M$ (100 pmol/10 μ l)、 $10^{-4}M$ (1 nmol/10 μ l)、 $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のN末端領域のnSPをそれぞれ前投与するとSP投与によるひっかき行動を抑制し、 $10^{-3}M$ では顕著なひっかき回数の抑制効果を示した。一方、 $10^{-5}M$ (100 pmol/10 μ l)、 $10^{-4}M$ (1 nmol/10 μ l)、 $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のN末端領域のnHK-1をそれぞれ前投与すると $10^{-3}M$ のnHK-1前投与でSP投与によるひっかき行動の有意な抑制効果を示した。

【0091】

従って、SP誘発ひっかき行動に対して、nSPとnHK-1は $10^{-3}M$ で顕著な抑制効果があることが示唆される。

【0092】

[実施例3]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドのSPに対する抑制効果に關与するアミノ酸の同定

1. 実験目的

図2及び図3よりnSP及びnHK-1はSP誘発ひっかき行動に対して抑制効果を有するペプチドであることが示唆された。そこで、これらのペプチドの薬理学的効果に關与するアミノ酸を特定することを目的としてnSP及びnHK-1のアミノ酸のうちArgとLysをLeuに置換したペプチドを合成し、これらのペプチドの前投与によるSP誘発ひっかき行動の変化の違いを指標に、それぞれの合成ペプチドの薬理学的効果について評価した。

【0093】

2. 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のN末端領域のnSP、nHK-1及び置換ペプチド：

Leu¹-nSP：Leu-Pro-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号12)

Leu³-nSP：Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-NH₂ (配列番号13)

Leu¹-nHK-1：Leu-Ser-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号14)

Leu³-nHK-1：Arg-Ser-Leu-Thr-Arg-NH₂ (配列番号15)

Leu⁵-nHK-1：Arg-Ser-Arg-Thr-Leu-NH₂ (配列番号16)

を投与した5分後に $10^{-3}M$ (10 nmol/10 μ l)のSP投与により誘発されるひっかき回数を評価

10

20

30

40

50

した。なお、生理食塩水投与後5分後に 10^{-3} MのSP投与により誘発されるひっかき回数をControlとし、そのひっかき回数を100%として示した。結果を図4に示す。

【0094】

その結果、nSP及びnHK-1前投与ではSP誘発ひっかき行動の顕著な抑制効果を示したが、全ての置換ペプチドの前投与ではnSP及びnHK-1で示されたSP誘発ひっかき行動の抑制効果の消失が認められた。

【0095】

従って、ArgとLysをLeuに置換したペプチドでは抑制効果の消失が認められたことから、nSP及びnHK-1の抑制効果はArgとLysがその機能の発揮に重要な役割があることが示唆される。

10

【0096】

[実施例4]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドのSPに対する抑制効果の持続に關与するアミノ酸の同定

1. 実験目的

図2及び図3よりnSP及びnHK-1はSP誘発ひっかき行動に対して抑制効果を有するペプチドであることが示唆された。そこでnSP及びnHK-1のペプチドの薬理学的効果をより持続させることを目的として D Trp²-nSP、及び D Trp²-nHK-1:

D Trp²-nSP: Arg-DTrp-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号8)

D Trp²-nHK-1: Arg-DTrp-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号9)

20

を合成し、SP投与により誘発されるひっかき行動をこれらの合成ペプチドの前投与によって変化が生じるか否かを指標に、それぞれの合成ペプチドの薬理学的効果について評価した。

【0097】

また、 D Trpを2位に用いた理由として、図4の結果よりnSP及びnHK-1の抑制効果はArgとLysがその機能の発揮に重要な役割があることから、Arg及びLysを有し、かつ長期の抑制効果を有するためには、2位に D Trpを置換したペプチドを合成した方がその抑制効果を発揮できると推測されたので、このような合成ペプチドを用いた。

【0098】

2. 実験方法及び結果

30

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-3} M (10 nmol/10 μl)の D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1を投与後に 10^{-3} M (10 nmol/10 μl)のSP投与により誘発されるひっかき回数を評価した。図5は、 D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1とSPとの投与間隔を変化させた結果を示したものである。なお、生理食塩水投与後5分後のSP投与により誘発されるひっかき回数をControlとし、そのひっかき回数を100%として示した。

【0099】

D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1はどちらもSPとの投与間隔が5分間の場合に顕著なひっかき回数の抑制を認め、その抑制効果は投与20分後でも有意に示した。しかし、投与間隔30分ではその抑制効果は消失した。

【0100】

40

従って、SP誘発ひっかき行動に対して、nSPとnHK-1の抑制効果は投与15分後には消失したが、 D Trp²-nSP及び D Trp²-nHK-1は投与20分後でも有意な抑制効果を有することから、nSP及びnHK-1のアミノ酸配列に D Trpを組み込むことにより、その効果が長期になるということが示唆された。

【0101】

[実施例5]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドの疼痛抑制効果

1. 実験目的

本実験では、ホルマリン足底投与に伴う疼痛行動に対するnSP及びnHK-1の髄腔内への前投与による効果を確認した。

50

【 0 1 0 2 】

2. 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-2} M (100 nmol/10 μ l)のnSP及びnHK-1、または食塩水(10 μ l)を投与し、5分後に後肢の皮下に2%ホルマリンを50 μ l投与した。ホルマリンを投与してから60分間の疼痛行動(足を振る(flinching)行動)を計測し、疼痛の程度を評価した。ホルマリン投与後10分間の期間(phase Iと称する)は、2分に1回、各回1分間かけて疼痛行動を計測した。ホルマリン投与後10~60分間の期間(phase IIと称する)は、疼痛行動を5分に1回、各回1分間かけて計測し、疼痛の程度を評価した。phase Iではホルマリン投与に伴う化学刺激による行動(phasic pain)が見られ、phase IIではそれに続く持続疼痛(tonic pain)が見られる。

10

【 0 1 0 3 】

図6は、ホルマリン投与後の時間(分)を横軸とし、計測された1分間当たりの疼痛行動の回数を縦軸として結果を示す。図7は、phase I及びphase IIで計測された疼痛行動の平均回数を示す。

【 0 1 0 4 】

nSP及びnHK-1では、phase I及びphase IIにおいて共に疼痛行動が有意に減少することが確認された。

【 0 1 0 5 】

[実施例6]

HK-1及びSPのN末端領域からなるペプチドの痒み誘発物質投与に伴う痒みの抑制効果

20

1. 実験目的

図5の結果より、SPの髄腔内投与により誘発されるひっかき行動に対して、nSPとnHK-1の抑制効果は投与15分後には消失したが、 DTrp^2 -nSP及び DTrp^2 -nHK-1は投与20分後でも有意な抑制効果を有する。従って、nSP及びnHK-1のアミノ酸配列に DTrp を組み込むことにより、その効果が長期間維持されることが示唆された。そこで、皮下組織における痒み行動に対するペプチドの髄腔内投与の効果について確認した。髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-2} M (100 nmol/10 μ l)の DTrp^2 -nSP、及び DTrp^2 -nHK-1:

DTrp^2 -nSP: Arg-DTrp-Lys-Pro-Gln-NH₂ (配列番号8)

DTrp^2 -nHK-1: Arg-DTrp-Arg-Thr-Arg-NH₂ (配列番号9)

をそれぞれ合成し、頸部の皮下組織に内因性痒み誘発物質として知られているヒスタミンおよびセロトニン(5-HT)をそれぞれ投与した。これらの痒み誘発物質投与に伴う痒み行動に対して、ペプチドの髄腔内への前投与が痒み行動に変化をもたらすか否かを指標に評価した。

30

【 0 1 0 6 】

2. 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10^{-2} M (100 nmol/10 μ l)の DTrp^2 -nSP、 DTrp^2 -nHK-1、又は食塩水(10 μ l)を投与した直後に、痒み誘発物質である 10^{-3} M ヒスタミン(0.25 mg/50 μ l)、又は 1.13×10^{-4} M 5-HT(0.25 mg/50 μ l)をそれぞれ頸部の皮下に投与し、20分間の痒み行動を計測することで、痒みの程度を評価した。

【 0 1 0 7 】

図8及び9は、ヒスタミン及び5-HT投与による痒み行動の結果を示し、ヒスタミン及び5-HT投与後20分間のひっかき行動の回数を縦軸とし、 DTrp^2 -nSP、 DTrp^2 -nHK-1、及び食塩水の投与を横軸に示す。

40

【 0 1 0 8 】

図8において、ヒスタミン投与による痒み行動は、 DTrp^2 -nHK-1投与により顕著な減少が認められたが、 DTrp^2 -nSP投与では痒み行動は生理食塩水投与と違いが認められなかった。図9の5-HT投与による痒み行動も同様に、 DTrp^2 -nHK-1投与により顕著な減少が認められたが、 DTrp^2 -nSP投与では生理食塩水投与と違いが認められなかった。これらの結果より、ヒスタミン及び5-HT誘発の痒みは DTrp^2 -nHK-1の髄腔内への前投与によって顕著に抑制されることが示唆された。実施例1~5の結果に鑑みると、 DTrp を導入しないnHK-1

50

も、 $\text{D-Trp}^2\text{-nHK-1}$ と同様に、ヒスタミン及び5-HT誘発の痒みを抑制することが推定される。

【 0 1 0 9 】

[実施例 7]

BLAST検索によるHK-1特異的受容体候補物質の探索

1 . 目的

従来のHK-1に関する知見より、HK-1特異的受容体は、NK1Rとは異なるものの、ある程度の構造類似性があることが示唆される。そこで、GenBankのBLAST検索を実施した。

【 0 1 1 0 】

2 . 実験方法及び結果

NK1Rのアミノ酸配列を考慮して、BLAST検索を実施したところ、四つの遺伝子；NK3R、NK2R、GPR83、及びGPR15-likeがHK-1特異的受容体の候補遺伝子と考えられた。これらの遺伝子のNK1Rとの相同性は、それぞれ、60%、50%、35%、29%である。

【 0 1 1 1 】

NK3R、及びNK2Rの特異的アゴニストは、それぞれNKB、及びNKAであることが既に分かっているが、GPR83、及びGPR15-likeはリガンドが不明なオーファン受容体である。そこで、後者の二つがHK-1特異的受容体の候補として考えられる。ここで、GPR83には他の呼称としてGIR、JP05、及びGPR 72があり、GIRとタキキニン受容体の一つであるNK1Rとの相同性は31~34%となっていることから、GIRはタキキニン受容体ファミリーであると考えられている (D. Wang, J.P. Herman, L.M. Pritchard, R.H. Spitzer, R.L. Ahlbrand, G.J. Kramer, F. Petty, F.R. Sallee, N.M. Richtand, Cloning, expression, and regulation of glucocorticoid-induced receptor in rat brain: effect of repetitive amphetamine, *J. Neurosci.* 15 (2001) 9027-9035)。それゆえ、GIRのアゴニストはタキキニンペプチドである可能性が高い。

【 0 1 1 2 】

[実施例 8]

NK1Rノックダウン効果

1 . 実験目的

はじめに、NK1R siRNAによるNK1Rノックダウン効果を確認した。

【 0 1 1 3 】

2 . 実験方法及び結果

(1)

NK1R siRNA #1

sense 5' -CAACAGGACUUAUGAGAAATT-3' (配列番号 2 1)

antisense 5' -UUUCUCAUAAGUCCUGUUGTT-3' (配列番号 2 2)

NK1R siRNA #2

sense 5' -CAUCAGUGCAGGUGAUUAUTT-3' (配列番号 2 3)

antisense 5' -AUAAUCACCGCACUGAUGTT-3' (配列番号 2 4)

NK1R siRNA #3

sense 5' -GCAGAGAACUUCACAGGAATT-3' (配列番号 2 5)

antisense 5' -UUCCUGUGAAGUUCUCUGCTT-3' (配列番号 2 6)

MM siRNA #1

sense 5' -AUCCGCGCGAUAGUACGUATT-3' (配列番号 2 7)

antisense 5' -UACGUACUAUCGCGCGGAUTT-3' (配列番号 2 8)

MM siRNA #2

sense 5' -UUACGCGUAGCGUAAUACGTT-3' (配列番号 2 9)

antisense 5' -CGUAUUACGCUACGCGUAATT-3' (配列番号 3 0)

MM siRNA #3

sense 5' -UAUUCGCGGUAGCGGUTT-3' (配列番号 3 1)

antisense 5' -ACCGCUAUACGCGGAAUATT-3' (配列番号 3 2)

10

20

30

40

50

(2) ノックダウン効果の検証

HVJ Envelop Vector Kit (石原産業) を用い、当該キットのプロトコールに従って siRNA A を調製した。髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて 10 μ l の siRNA 溶液を投与した。HVJ-E のみの投与と、mismatch siRNA の投与とを対照とし、SP 又は HK-1 によるひっかき行動の回数の経時的な変化を評価すると、SP 及び HK-1 誘発ひっかき回数に変化が認められなかった。従って、HVJ-E 単独投与、又は MM siRNA を前処理しても SP 又は HK-1 誘発のひっかき行動には影響がほとんどないと見なされる。

【0114】

次に、NK1R siRNA を髄腔内投与し、4日、7日、10日そして14日後のそれぞれにおいて SP を髄腔内投与すると、SP 投与群では経時的なひっかき行動の抑制が認められ、siRNA 投与4日後では 49 ± 14.6 と顕著な抑制効果を示した (図10)。SP 誘発ひっかき行動の回数は siRNA 投与後に徐々に回復し、siRNA 投与4日後では Control level の 20% までひっかき回数は減少したが、siRNA 投与7日後では Control level の 40% となり、10日後、及び14日後では Control level までひっかき回数は回復した。

10

【0115】

これらのデータから、SP の髄腔内投与によるひっかき行動の回数は、NK1R siRNA 投与により、少なくとも、siRNA 投与7日後までひっかき行動の抑制効果が認められた。従ってこの結果は、NK1R siRNA により脊髄後角における NK1R の発現が抑制されると、SP に対する反応性が減少することを示唆しているだけでなく、SP が NK1R のアゴニストであることを再評価できた。

20

【0116】

次に、NK1R siRNA を髄腔内に投与した後に、HK-1 投与によるひっかき行動の回数を経時的に評価すると、SP 投与によるひっかき行動の経時変化とは異なる結果となった。具体的には、NK1R siRNA の投与4日、7日、10日そして14日後のそれぞれの日において HK-1 を髄腔内に投与することによるひっかき行動の回数を評価すると、すべての日において Control データと違いがなかった (図10)。SP 投与群では、NK1R siRNA 投与4日及び7日後において顕著なひっかき回数の減少が認められたが、HK-1 投与群ではその効果は示されなかった。従って、HK-1 によるひっかき行動の誘発は NK1R を介して生じていないことが推測され、HK-1 が NK1R のアゴニストである可能性は低いと考えられる。

30

【0117】

また、EKC/D 前投与により SP 誘発ひっかき行動は抑制されたが、HK-1 誘発ひっかき行動が抑制されなかったことから、EKC/D が NK1R 特異的アンタゴニストであることが示唆されている (R. Naono, T. Nakayama, T. Ikeda, O. Matsushima, T. Nishimori, Leucine at the carboxyl-terminal of endokinin C and D contributes to elicitation of the antagonistic effect on substance P in rat pain processing, Brain Res. 1165 (2007) 71-80)。従って、NK1R siRNA の投与による NK1R ノックダウンは、EKC/D 投与の結果と類似している。HK-1 特異的受容体はまだ不明であるが、HK-1 と SP とを比較すると、NK1R のアゴニストは HK-1 より SP が優位であると考えられる。

【0118】

[実施例 9]

GPR83 ノックダウン効果

1. 実験目的

GPR83 siRNA による GPR83 ノックダウン効果を確認した。

【0119】

2. 実験方法及び結果

(1)

GPR83 siRNA #1

sense 5' -GCACAUGGGUGUUUGGGAATT-3' (配列番号 33)

antisense 3' -UUCCCAAACACCCAUGUGCTT-3' (配列番号 34)

GPR83 siRNA #2

40

50

sense 5' -CCACUGUGGCCGUGAGUUATT-3' (配列番号 35)
 antisense 3' -UAACUCACGGCCACAGUGGTT-3' (配列番号 36)
 GPR83 siRNA #3

sense 5' -GGGAGGAGCUUCAGCCAUATT-3' (配列番号 37)
 antisense 3' -UAUGGCUGAAGCUCCUCCCTT-3' (配列番号 38)

(2) ノックダウン効果の検証

実施例 8 と同様に GPR83 siRNA を調製し、ラット髄腔内に投与した。

【0120】

GPR83 siRNA を投与後、経時的な SP 投与による ひっかき行動の回数はほとんど変化しなかった。また、図 10 にて示した NK1R siRNA での結果とは大きく異なり、GPR83 siRNA の投与 4 日、7 日、10 日そして 14 日後に SP により誘発される ひっかき回数は Control level と有意差がなかった (図 11)。この結果は、GPR83 siRNA は SP 誘発 ひっかき行動にほとんど効果がないことを示唆している。従って、GPR83 は SP 特異的受容体ではない可能性が示唆された。

10

【0121】

一方、HK-1 投与群に GPR83 siRNA を投与すると、図 10 の NK1R siRNA 投与による HK-1 誘発 ひっかき行動の経時変化とは異なる結果を示した。HK-1 誘発 ひっかき行動の回数は、GPR83 siRNA 投与 4 日後で顕著な ひっかき行動の減少が認められ、その ひっかき回数は 210 ± 18.9 であった (図 11)。また、この抑制効果は siRNA 投与 10 日後まで持続し、Control level と比較して有意な ひっかき回数の減少が認められた。また、GPR83 siRNA 投与 14 日後では、HK-1 誘発 ひっかき回数は、Control level まで回復した。従って、GPR83 は HK-1 誘発 ひっかき行動に関与していることから、GPR83 のアゴニストは HK-1 であると考えられる。

20

【0122】

さらに、興味深いこととして、SP 誘発 ひっかき行動を指標とした NK1R siRNA による ノックダウン効果は 7 日間持続したが、GPR83 siRNA による ノックダウンでは HK-1 誘発 ひっかき行動が 10 日間持続した。このことから、NK1R と GPR83 の siRNA による ノックダウンの効果は持続期間に違いがあることが認められる。また、いずれの siRNA も同量及び同濃度を単回投与しているため、ノックダウンの効果に違いが生じるのは、GPR83 が レセプター表面に現れ、そして細胞内へ戻っていく (トラフィック) のに要する時間が NK1R と異なることを意味している。

30

【0123】

[実施例 10]

GPR15-like ノックダウン効果

1. 実験目的

GPR15-like siRNA による GPR15-like ノックダウン効果を確認した。

【0124】

2. 実験方法及び結果

(1)

GPR15-like siRNA #1

sense 5' -GAUCAAAAGCUGCAAUCAUATT-3' (配列番号 39)
 antisense 5' -UAUGAUUGCAGCUUUGAUCTT-3' (配列番号 40)

GPR15-like siRNA #2

sense 5' -CCAUAUGAAACCAAGGCUAATT-3' (配列番号 41)
 antisense 5' -UUAGCCUUGGUUUCAUUGGTT-3' (配列番号 42)

GPR15-like siRNA #3

sense 5' -GGACAUUUUAUCUUGCUGUATT-3' (配列番号 43)
 antisense 5' -UACAGCAAGAUAAAUGUCCTT-3' (配列番号 44)

40

(2) ノックダウン効果の検証

実施例 8 と同様に GPR15-like siRNA を調製し、ラット髄腔内に投与した。

50

【 0 1 2 5 】

GPR15-like siRNAの投与4日、7日、10日そして14日後におけるSP又はHK-1誘発ひっかき行動はControl levelと有意差がなく、全ての日における実験結果は、Control levelに近い値となっている((図 1 2))。このことは、SPとHK-1はGPR15-likeのアゴニストとしての可能性が低いことを意味する。

【 0 1 2 6 】

[実施例 1 1]

GPR83 siRNA髄腔内投与による脊髄細胞でのGPR83ノックダウンにおける疼痛抑制効果

1 . 実験目的

本実験では、ホルマリン足底投与に伴う疼痛行動に対する、GPR83 siRNA髄腔内投与によるGPR83ノックダウン条件下における抑制効果を確認した。

10

【 0 1 2 7 】

2 . 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて4.5 mM(45 pmol/10 μ l)のGPR83 siRNA、対象群として4.5 mM(45 pmol/10 μ l)のNK1R siRNA、4.5 mM(45 pmol/10 μ l)のmismatch siRNA(MM siRNA: ネガティブコントロール)、及び10 μ lのHVJ-E (siRNAの導入試薬) を投与した4日後に、後肢の皮下に2%ホルマリンを50 μ l投与した。そしてホルマリンを投与してから60分間の疼痛行動 (足を振る (flinching) 行動) を計測し、疼痛の程度を評価した。ホルマリン投与後10分間の期間 (phase I と称する) は、2分に1回、各回1分間かけて疼痛行動を計測した。ホルマリン投与後10 ~ 60分間の期間 (phase II と称する) は、疼痛行動を5分に1回、各回1分間かけて計測し、疼痛の程度を評価した。phase I ではホルマリン投与に伴う化学刺激による行動 (phasic pain) が見られ、phase II ではそれに続く持続疼痛 (tonic pain) が見られる。

20

【 0 1 2 8 】

図 1 3 は、ホルマリン投与後の時間(分)を横軸とし、計測された1分間当たりの疼痛行動の回数を縦軸として結果を示す。図 1 4 は、phase I 及びphase II で計測された疼痛行動の平均回数を示す。

【 0 1 2 9 】

その結果、phase I においてGPR83 siRNA投与群は、HVJ-E投与群及びMM siRNA投与群と比較して疼痛行動の回数に違いが認められなかったが、NK1R siRNA投与群では疼痛行動の回数が減少していた。一方、phase II では、GPR83 siRNA投与群は、HVJ-E投与群、及びMM siRNA投与群と比較して、疼痛行動の回数が減少していたが、有意差は認められなかった。一方、NK1R siRNA投与群では、HVJ-E投与群及びMM siRNA投与群と比較して疼痛行動の抑制効果が見られた。これらの結果より、脊髄細胞におけるGPR83は、疼痛の伝達系への関与がNK1Rより低いことが示唆された。

30

【 0 1 3 0 】

[実施例 1 2]

GPR83 siRNA髄腔内投与による脊髄細胞でのGPR83ノックダウンにおける痒み誘発物質投与に伴う痒みの抑制効果

1 . 実験目的

図 1 1 の結果より、GPR83 siRNA髄腔内投与による脊髄細胞のGPR83ノックダウン条件下において、SP髄腔内投与により誘発されるひっかき行動は抑制できなかったが、HK-1誘発ひっかき行動は抑制することができた。

40

【 0 1 3 1 】

一方、図 1 3 及び 1 4 の結果より、GPR83 siRNA投与群は、ホルマリン皮下投与による疼痛行動を抑制できなかった。そこで、脊髄におけるGPR83の生理学的機能を評価するために、痒みの伝達機構への関与について検討した。具体的には、末梢組織に痒み誘発物質を投与することで生じる痒みに対してGPR83が関与しているか否かを評価するために、ラットの頸部における皮下組織に内因性痒み誘発物質として知られているヒスタミン及びセロトニン(5-HT)をそれぞれ投与し、これらの痒み誘発物質投与に伴う痒み行動に変化をも

50

たらずか否かを指標に評価した。

【0132】

2. 実験方法及び結果

髄腔内にカテーテルを留置したラットにカテーテルを通じて4.5 mM(45 pmol/10 µl)のGPR83 siRNA、対象群として4.5 mM(45 pmol/10 µl)のNK1R siRNA、及び10 µlのHVJ-E (siRNAの導入試薬)を投与した4日後に、痒み誘発物質である 10^{-3} M ヒスタミン(0.25 mg/50 µl)、及び 1.13×10^{-4} M 5-HT(0.25 mg/50 µl)をそれぞれ頸部の皮下に投与し、20分間の痒み行動を計測することで、痒みの程度を評価した。

【0133】

図15及び16は、ヒスタミン及び5-HT投与による痒み行動の結果を示し、ヒスタミン及び5-HT投与後20分間のひっかき行動の回数を縦軸とし、HVJ-E (siRNAの導入試薬)、GPR83 siRNA、及びNK1R siRNAの投与を横軸に示す。

10

【0134】

図15において、ヒスタミン投与による痒み行動は、GPR83 siRNA、及びNK1R siRNAのどちらの投与群においても、HVJ-E(Contorl level)と違いがなかったことから、これらの受容体の発現が抑制されても、痒み行動の抑制効果は認められなかった。

【0135】

一方、図16において、GPR83 siRNA投与群における5-HT投与による痒み行動は、HVJ-E投与群と比較して、抑制が認められたが、NK1R siRNA投与群はHVJ-E投与群と違いが認められなかった。

20

【0136】

以上の通り、GPR83 siRNAの髄腔内投与は、5-HTの皮下投与により誘発された痒み行動を抑制できた。そのため、脊髄細胞において発現しているGPR83が、5-HTにより誘発される抹消組織の痒みの伝達機構に関与していることが示唆される。

【0137】

[結論]

これまでの結果をまとめると、3種の遺伝子を標的としたsiRNAを導入したHVJ-Eの投与後における、SP又はHK-1投与によるひっかき行動は、対照的な実験結果をもたらした。実際、SP投与によるひっかき行動はNK1R siRNA前投与で抑制され、HK-1投与によるひっかき行動はGPR83 siRNA前投与によって抑制された。

30

【0138】

一方、GPR15-like siRNAは、SP及びHK-1のいずれの投与によるひっかき行動も抑制することができなかった。これらの結果より、GPR83がHK-1に特異的な受容体である可能性が高まることとなった。また、同様の評価方法により、NK1RのアゴニストがSPであることも確認できた。

【0139】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許、及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

【0140】

配列番号1：アミド化。

40

【0141】

配列番号2：アミド化。

【0142】

配列番号3：合成ペプチド。アミド化。

【0143】

配列番号4：合成ペプチド。アミド化。

【0144】

配列番号5：合成ペプチド。アミド化。

【0145】

50

配列番号 6 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 4 6 】

配列番号 7 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 4 7 】

配列番号 8 : 合成ペプチド。XaaはD型のトリプトファンである。アミド化。

【 0 1 4 8 】

配列番号 9 : 合成ペプチド。XaaはD型のトリプトファンである。アミド化。

【 0 1 4 9 】

配列番号 10 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 5 0 】

配列番号 11 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 5 1 】

配列番号 12 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 5 2 】

配列番号 13 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 5 3 】

配列番号 14 : 合成ペプチド。アミド化。

【 0 1 5 4 】

配列番号 15 : 合成ペプチド。アミド化。

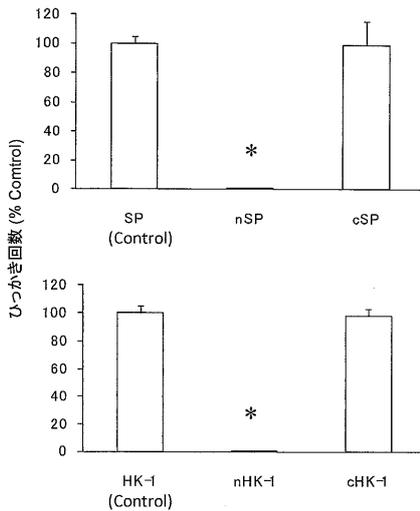
【 0 1 5 5 】

配列番号 16 : 合成ペプチド。アミド化。

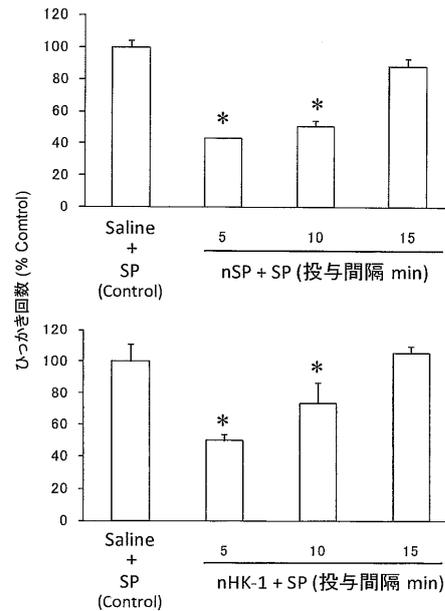
10

20

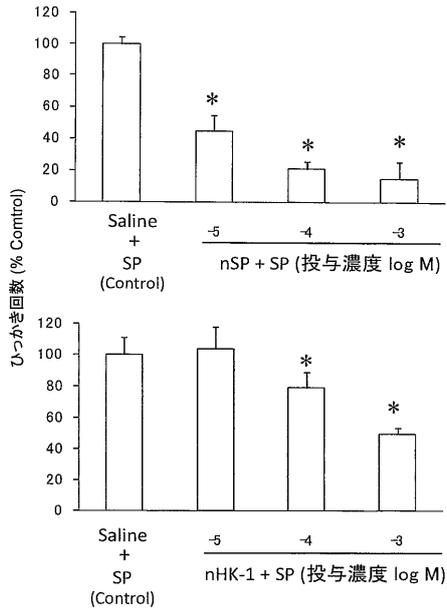
【 図 1 】



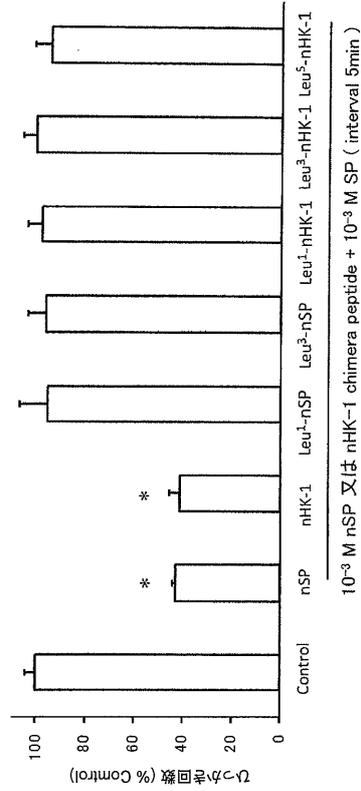
【 図 2 】



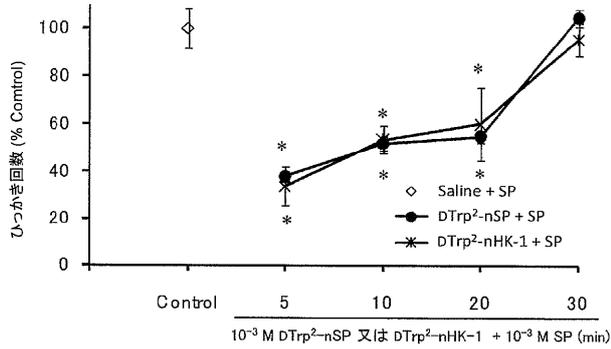
【 図 3 】



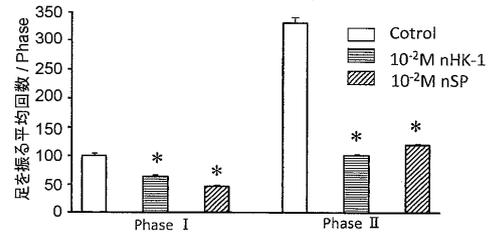
【 図 4 】



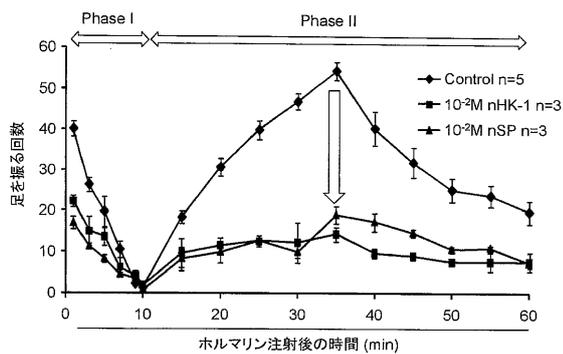
【 図 5 】



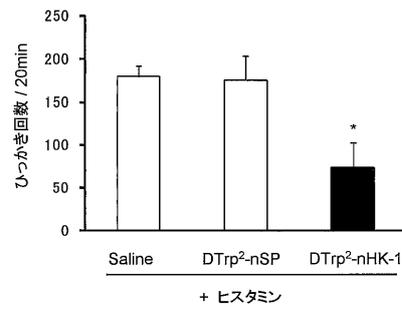
【 図 7 】



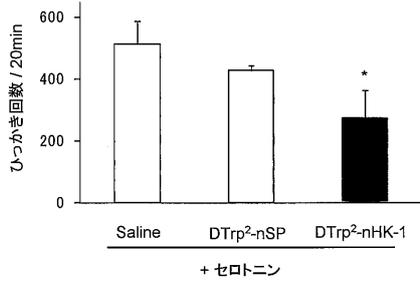
【 図 6 】



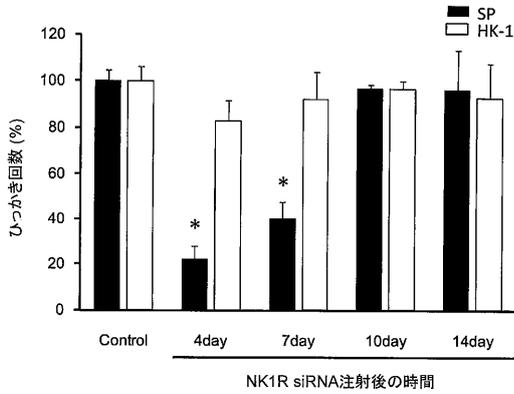
【 図 8 】



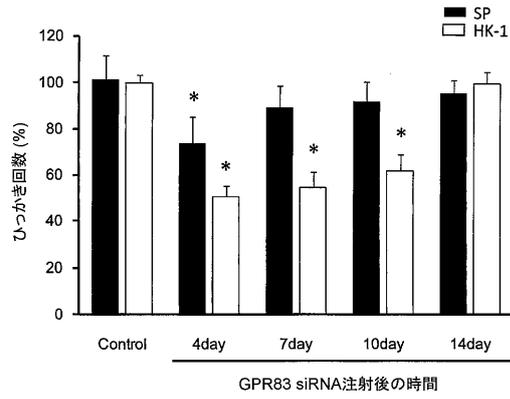
【 図 9 】



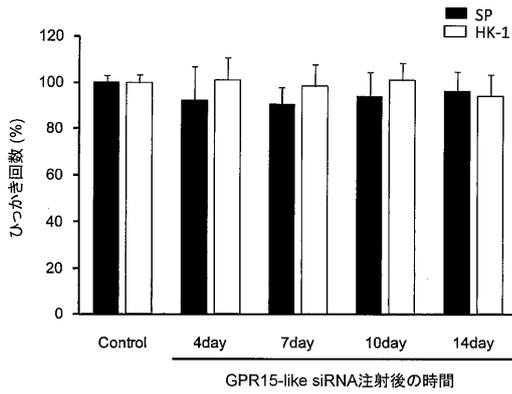
【 図 10 】



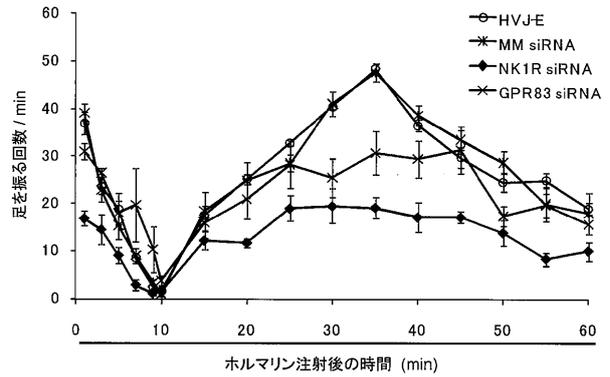
【 図 11 】



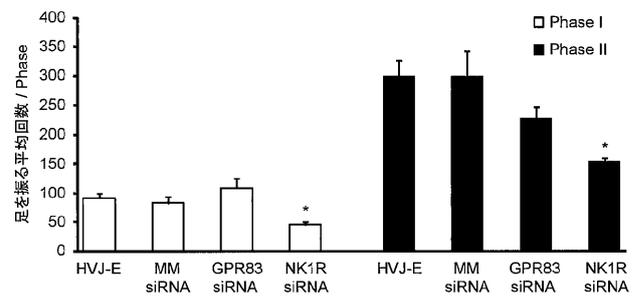
【 図 12 】



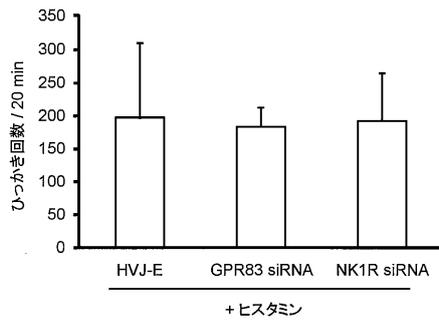
【 図 13 】



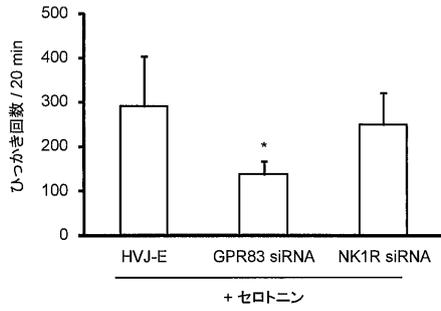
【 図 14 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

2012026526000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/50(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)n 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) G01N33/50, A61K38/00, A61P29/00, A61P43/00, C07K7/06, C07K16/28, G01N33/15, C12N15/113		
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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAPLUS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rumi NAONO et al., "siRNA no Rat Zuikunai Toyo ni yoru NK1 Juyotai no Knockdown", Pain. Res., 19 July 2008 (19.07.2008), vol.23, no.2, page 106	1-5
A	R.NAONO et al., Pharmacological characterization of desensitization in scratching behavior induced by intrathecal administration of hemokinin-1 in the rat, neuropeptides, 2008, Vol.42, P.47-55	1-5
A	SAKURADA C. et al., Major Metabolites of Substance P Degraded by Spinal Synaptic Membranes Antagonize the Behavioral Response to Substance P in Rats, J. Pharm. Sci., 1999.11, Vol.88, No.11, P.1127-1132	6-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 14 November, 2011 (14.11.11)		Date of mailing of the international search report 06 December, 2011 (06.12.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069178

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

2. Claims Nos.:
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:

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 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069178

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

The invention described in claim 1, the invention described in claim 6, the invention described in claim 7 and the invention described in claim 8 do not have the same or corresponding special technical feature. Claims include the following six (groups of) inventions.

(Invention 1) The inventions described in claims 1-5.
Use of GPR83 for screening for a compound useful for the treatment of pain, an inflammation or pruritus.

(Invention 2) The invention described in claim 6.
A pharmaceutical composition for treating pain, an inflammation or pruritus, which contains a GPR83 function inhibitor.

(Inventions 3 and 4) The inventions described in claim 7 and parts of claims 9-12 which refer to claim 7.
A peptide recited as item (a) or (b) in claim 7 and a derivative thereof.

(Inventions 5 and 6) The inventions described in claim 8 and parts of claims 9-12 which refer to claim 8.
A peptide recited as item (d) or (e) in claim 8 and a derivative thereof.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 9 1 7 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)n			
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. G01N33/50, A61K38/00, A61P29/00, A61P43/00, C07K7/06, C07K16/28, G01N33/15, C12N15/113			
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 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CPlus (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	直野留美ほか, siRNAのラット髄腔内投与によるNK1受容体のノックダウン, Pain. Res., 2008.07.19, Vol.23, No.2, P.106	1-5	
A	R.NAONO et al., Pharmacological characterization of desensitization in scratching behavior induced by intrathecal administration of hemokinin-1 in the rat, neuropeptides, 2008, Vol.42, P.47-55	1-5	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 14.11.2011		国際調査報告の発送日 06.12.2011	
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) 海野 佳子	2 J 3906
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/069178

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	SAKURADA C. et al., Major Metabolites of Substance P Degraded by Spinal Synaptic Membranes Antagonize the Behavioral Response to Substance P in Rats, J. Pharm. Sci., 1999, 11, Vol. 88, No. 11, P. 1127-1132	6-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/069178

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、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 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、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、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：

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/069178

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. 請求項 _____ 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、
2. 請求項 _____ 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、
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。
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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/069178

第Ⅲ欄の続き

請求項 1 に係る発明、請求項 6 に係る発明、請求項 7 に係る発明、請求項 8 に係る発明は、それぞれ同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しない。そして、請求の範囲には以下に示す 6 の発明（群）が含まれる。

（発明 1）請求項 1－5 に係る発明

疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物のスクリーニングのための、GPR83 の使用方法。

（発明 2）請求項 6 に係る発明

GPR83 機能阻害剤を含有する、疼痛、炎症、又は掻痒の治療のための医薬組成物。

（発明 3、4）請求項 7 およびこれを引用する請求項 9－12 に係る発明

請求項 7 に（a）又は（b）として記載されているペプチドおよびその誘導体

（発明 5、6）請求項 8 およびこれを引用する請求項 9－12 に係る発明

請求項 8 に（d）又は（e）として記載されているペプチドおよびその誘導体

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, I D, 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, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(72) 発明者 中山 留美

宮崎県宮崎市清武町木原 5 2 0 0 国立大学法人宮崎大学医学部内

Fターム(参考) 2G045 AA24

4B024 AA01 CA11 HA17

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA16 BA17 CA59 NA14 ZA082

ZA892 ZB112 ZC412

4C085 AA13 BB31 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA08 ZA89 ZB11 ZC42

4H045 AA11 AA30 BA13 BA16 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-NH₂ (配列番号 5)

[C末端のPhe-NH₂は、カルボキシル基がアミド化されたPheを示す]

で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを除く) ;

により第1の課題を解決することができる。また、GPR83の使用して、疼痛、炎症、又は掻痒の治療に有用な化合物をスクリーニングすることにより第2の課題を解決することができる。

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。