

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-11855

(P2010-11855A)

(43) 公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	A 6 1 K 31/7076	4 B O 6 4
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-196458 (P2009-196458)	(71) 出願人	505386797
(22) 出願日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)		アフエクティス ファーマシューティカルズ アーゲー
(62) 分割の表示	特願2006-505172 (P2006-505172) の分割		ドイツ国 マルティンスリート フラウンフォファーストラッセ 1 3
原出願日	平成16年4月16日 (2004. 4. 16)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	03008753.0		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成15年4月17日 (2003. 4. 17)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	03019626.5	(72) 発明者	バーデン ニコラス
(32) 優先日	平成15年9月4日 (2003. 9. 4)		カナダ国 ケベック サントーフォアルー ド ブリュイエール 1 6 5 2
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	シラバー インゲ
			ドイツ国 ミュンヘン ギセラストラッセ 3 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 情動障害の診断および治療のための手段および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 情動障害の診断及び治療のための医薬品及び方法を提供する。

【解決手段】 5'UTR領域もしくは3'UTR領域における変異、エクソン3、5、6、8もしくは13またはイントロン1、3、4、5、6、7、9、11もしくは12における変異、またはエクソン13における欠失を含む、ATP感受性イオンチャネルP2X7Rをコードする核酸分子、好ましくはゲノム配列。該核酸分子によってコードされるポリペプチド、該核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞、さらには前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを生産するための方法。また、前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを特異的に対象とする抗体、および前記核酸分子と特異的に結合するアプタマー。さらに、該ポリペプチドと特異的に相互作用することが可能な化合物の同定および特徴付けのための方法、ならびに薬学的組成物の製造のための方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のものからなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子：

(a) ATP感受性(ATP-gated)イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO：1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのゲノム配列の位置362、532、1100、1122、1171または1702に対応する、5'UTR領域内の変異を含むゲノムヌクレオチド配列であって、該位置で該ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

(b) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列であって、以下の表Aの「エクソン」欄に示されたエクソンにおいて、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列の表Aの「野生型における位置」欄に示された位置に対応する表Aの「アミノ酸残基」欄に示されたアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基によって置換されている核酸配列；

【表 A】

エクソン	アミノ酸残基	野生型における位置
エクソン 3	R (Arg)	117
エクソン 5	G (Gly)	150
エクソン 6	E (Glu)	186
エクソン 6	L (Leu)	191
エクソン 8	R (Arg)	270
エクソン 13	I (Ile)	568
エクソン 13	R (Arg)	578

(c) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO：1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の位置32548または位置37633に対応する、エクソン5または8内の変異を含むヌクレオチド配列であって、該位置で該ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているヌクレオチド配列；

(d) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列であって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置488～494に対応するアミノ酸が欠失している核酸配列；

(e) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードするゲノムヌクレオチド配列であって、以下の表Bの「イントロン」欄に示されたイントロンにおいて、SEQ ID NO：1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の表Bの「野生型における位置」欄に示された位置に対応する表Bの「置換されるヌクレオチド」欄に示されたヌクレオチドが、別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

10

20

30

【表 B】

イントロン	置換されるヌクレオチド	野生型における位置
イントロン1	G	3166
イントロン1	C	24778
イントロン1	C	24830
イントロン3	A	26308
イントロン3	G	26422
イントロン4	G	32394
イントロン4	T	32434
イントロン5	A	32783
イントロン6	G	35641
イントロン6	A	35725
イントロン6	T	36001
イントロン7	G	36378
イントロン7	T	36387
イントロン7	G	36398
イントロン9	C	47214
イントロン11	T	47563
イントロン12	C	54307
イントロン12	G	54308

10

20

(f) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO: 1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の位置54925、55169、55170、55171、または55917に対応する、3'UTR領域内の変異を含むゲノムヌクレオチド配列であって、該位置で該ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

(g) 少なくとも20または21ヌクレオチドを含み、かつ(a)～(f)のいずれか1つに定義された変異または欠失を含むヌクレオチド配列；

(h) SEQ ID NO: 13～51のいずれか1つに示されたヌクレオチド配列を含む核酸配列；

(i) SEQ ID NO: 5～12のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列；

(j) (a)～(g)のいずれか1つに定義されたヌクレオチド配列と、または(h)のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつ(a)～(f)のいずれか1つに定義された変異を有するヌクレオチド配列；および

(k) 遺伝暗号の結果として(j)に定義された核酸配列と縮重性のある核酸配列。

【請求項2】

マウス、ラットまたはヒトに由来する、請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】

DNA、RNA、PNAまたはホスホロチオエートである、請求項1または2記載の核酸分子。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項5】

発現ベクター、遺伝子ターゲティングベクターおよび/または遺伝子導入ベクターである、請求項4記載のベクター。

【請求項6】

請求項4もしくは5記載のベクターによる形質転換を受けた、または請求項1～3のいずれか一項記載の核酸分子による形質転換を受けた、宿主。

【請求項7】

哺乳動物細胞、両生類細胞、魚類細胞、昆虫細胞、真菌細胞、植物細胞または細菌細胞である、請求項6記載の宿主。

【請求項8】

30

40

50

該哺乳動物細胞が、CHO細胞、HEK293細胞、COS-7細胞またはPC12細胞からなる群より選択される、請求項7記載の宿主。

【請求項9】

該両生類細胞が卵母細胞、好ましくはアフリカツメガエル卵母細胞である、請求項7記載の宿主。

【請求項10】

該卵母細胞がカエル卵母細胞である、請求項9記載の宿主。

【請求項11】

非ヒトトランスジェニック生物である、請求項6記載の宿主。

【請求項12】

該非ヒト生物が哺乳動物、両生類、魚類、昆虫、真菌または植物である、請求項11記載の宿主。

10

【請求項13】

請求項1(b)または1(d)記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドを生産するための方法であって、請求項6~11のいずれか一項記載の宿主を培養/飼育する段階、および生産されたポリペプチドを単離する段階を含む方法。

【請求項14】

請求項1(b)もしくは1(d)記載の核酸分子によってコードされる、または請求項13記載の方法によって生産される、ポリペプチド。

【請求項15】

請求項14記載のポリペプチドを特異的に対象とする抗体であって、以下のものからなる群より選択されるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rにおける変異によって生じたおよび/または形成されたエピトープと特異的に反応する抗体：

20

(i) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドによって特異的に提示されるエピトープであって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置117、150、186、191、270、568または578に対応するR(Arg)、G(Gly)、E(Glu)、L(Leu)、R(Arg)、I(Ile)またはR(Arg)残基が別のアミノ酸残基によって置換されているエピトープ；および

(ii) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドによって特異的に提示されるエピトープであって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置488~494に対応するアミノ酸が欠失しているエピトープ。

30

【請求項16】

モノクローナル抗体である、請求項15記載の抗体。

【請求項17】

請求項1~3のいずれか一項記載の核酸分子と、または請求項14記載のポリペプチドと特異的に結合するアプタマー。

【請求項18】

請求項1~3のいずれか一項に定義された核酸分子を特異的に増幅しうるプライマーまたはプライマー対。

40

【請求項19】

SEQ ID NO：52~111からなる群より選択される、請求項18記載のプライマーまたはプライマー対。

【請求項20】

請求項1~3のいずれか一項記載の核酸分子、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項14記載のポリペプチド、請求項15もしくは16記載の抗体、請求項17記載のアプタマー、および/または請求項18もしくは19記載のプライマーもしくはプライマー対を含む、組成物。

【請求項21】

診断用組成物である、請求項20記載の組成物。

50

【請求項 2 2】

任意に、検出のために適した手段をさらに含む、請求項21記載の診断用組成物。

【請求項 2 3】

情動障害の検出のための診断用組成物の調製を目的とする、請求項1～3のいずれか一項記載の核酸分子、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項14記載のポリペプチド、請求項15もしくは16記載の抗体、請求項17記載のアプタマー、および/または請求項18もしくは19記載のプライマーもしくはプライマー対の使用法。

【請求項 2 4】

情動障害または情動障害に対する感受性を診断する方法であって、個体から入手した試料において、該個体の細胞で発現されたP2XR7タンパク質が非機能性であるか否か、野生型P2XR7タンパク質と比較してATPゲート機構の変化を示すか否か、または非罹患個体のP2XR7タンパク質レベルと比較して過剰発現もしくは低発現されるか否かを判定する段階を含む方法。

10

【請求項 2 5】

情動障害または情動障害に対する感受性を診断するための方法であって、個体から入手した試料において、P2XR7遺伝子配列またはそのコードされるタンパク質が、野生型P2XR7配列と比較して変異を含むか否かを判定する段階を含む方法。

【請求項 2 6】

該変異が、請求項1に定義された変異である、ならびに/または、「P2XR7の領域」欄に置換もしくは欠失が起こるP2XR7ゲノムヌクレオチド配列の領域を、表Cの「ヌクレオチド」欄に別のヌクレオチドによって置換されるヌクレオチドもしくは欠失しているヌクレオチドを、および表Cの「野生型における位置」欄にSEQ ID NO: 1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2XR7のヌクレオチド配列中の対応する位置を示している、以下の表Cより選択されるヌクレオチド置換もしくは欠失である、請求項25記載の方法。

20

【表 C】

P2XR7 の領域	ヌクレオチド	野生型における位置
5'UTR	T	362
5'UTR	T	532
5'UTR	A	1100
5'UTR	A	1122
5'UTR	C	1171
5'UTR	T	1351
5'UTR	G	1702
5'UTR	T	1731
5'UTR	C	1860
5'UTR	C	2162
5'UTR	C	2238
5'UTR	A	2373
5'UTR	G	2569
5'UTR	G	2702
イントロン 1	G	3166
イントロン 1	C	24778
イントロン 1	C	24830
エクソン 2	T	24942
エクソン 3	C	26188
エクソン 3	A	26308

30

40

エクソン3	G	26422
イントロン4	G	32394
イントロン4	T	32434
エクソン5	G	32493
エクソン5	G	32506
エクソン5	C	32507
エクソン5	C	32548
イントロン5	A	32783
イントロン5	T	35309
イントロン5	C	35374
イントロン5	A	35378
エクソン6	G	35438
エクソン6	T	35454
イントロン6	T	35549
イントロン6	G	35641
イントロン6	A	35725
イントロン6	T	36001
イントロン6	A	36064
イントロン6	GTTTの欠失	36091から36094まで
イントロン6	C	36108
イントロン7	C	36374
イントロン7	G	36378
イントロン7	T	36387
イントロン7	G	36398
イントロン7	C	37439
イントロン7	T	37513
エクソン8	C	37604
エクソン8	G	37605
エクソン8	G	37623
エクソン8	C	37633
イントロン9	C	47214
エクソン11	G	47383
エクソン11	C	47411
イントロン11	T	47563
イントロン12	C	54307
イントロン12	G	54308
エクソン13	C	54399
エクソン13	A	54480
エクソン13	C	54523
エクソン13	CCCTGAGAGCCACAGGTGCCT の欠失	54562から54582まで
エクソン13	A	54588
エクソン13	C	54664
エクソン13	G	54703
エクソン13	A	54804
エクソン13	G	54834
エクソン13	G	54847

10

20

30

40

3'UTR	G	54925
3'UTR	C	55169
3'UTR	A	55170
3'UTR	A	55171
3'UTR	C	55917

【請求項 27】

ATP感受性イオンチャンネルP2X7R遺伝子における変異の存在がPCR法または免疫学的方法によって判定される、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

薬学的組成物である、請求項20記載の組成物。

【請求項 29】

任意に、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項28記載の薬学的組成物。

【請求項 30】

情動障害を治療する方法であって、請求項1～3のいずれか一項に定義された核酸分子の治療的有効量、または請求項14記載のポリペプチドの治療的有効量を、該障害に罹患した対象に対して投与する段階を含む方法。

【請求項 31】

情動障害の治療のための薬学的組成物の調製を目的とする、請求項1～3のいずれか一項記載の核酸分子、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項14記載のポリペプチド、請求項15もしくは16記載の抗体、および/または請求項17記載のアプタマーの使用法。

【請求項 32】

機能性ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする、以下のものからなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む薬学的組成物：

(a) SEQ ID NO：3または4に示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO：1または2に示されたヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列；

(c) (a)または(b)のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列；
および

(d) 遺伝暗号の結果として(c)のヌクレオチド配列と縮重しているヌクレオチド配列。

【請求項 33】

細胞に対するその投与が細胞におけるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の増大を引き起こすような化合物を含む、または細胞におけるその発現もしくは細胞に対するその投与が細胞におけるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の増大を引き起こすような核酸分子を含む、薬学的組成物。

【請求項 34】

情動障害を治療する方法であって、請求項32もしくは33に定義された核酸分子の治療的有効量、またはそのコードされるポリペプチドの治療的有効量を、該障害に罹患した対象に対して投与する段階を含む方法。

【請求項 35】

情動障害を治療するための薬学的組成物の調製を目的とする、請求項32または33に定義された核酸分子の使用法。

【請求項 36】

情動障害を治療するための薬学的組成物の調製を目的とする、P2X7R活性の調節因子(modulator)の使用法。

【請求項 37】

該調節因子が作動薬である、請求項36記載の使用法。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

該作動薬が、ATP、ATP-4およびBzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₁₅O₁₅P₃)) からなる群より選択される、請求項37記載の使用法。

【請求項39】

情動障害を治療するための薬学的組成物の調製を目的とする、テニダップ (tenidap) (C₁₅H₁₁ClN₂O₂S) またはその誘導体または3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの使用法。

【請求項40】

該薬学的組成物が任意に、 β -アドレナリン受容体調節因子をさらに含む、請求項35~39のいずれか一項記載の使用、または請求項34記載の使用法。

【請求項41】

該 β -アドレナリン受容体調節因子が、DL-プロプラノロール、D-プロプラノロールおよびラベタロール (labetolol) からなる群より選択される β -アドレナリン受容体拮抗薬である、請求項40記載の使用法または方法。

【請求項42】

該情動障害が、大うつ病、全般性不安障害および双極性障害からなる群より選択される、請求項23、30もしくは35~41のいずれか一項記載の使用法、または請求項24~27もしくは34のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

該大うつ病が、大うつ病、気分変調、非定型的うつ病、月経前不快気分障害および季節性情動障害からなる群より選択される、請求項42記載の使用法または方法。

【請求項44】

該全般性不安障害が、パニック障害、恐怖症、広場恐怖症、対人恐怖症、特定の恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、分離不安障害、躁病、軽躁病および気分循環性障害からなる群より選択される、請求項42記載の使用法または方法。

【請求項45】

該双極性障害が双極性障害I型または双極性障害II型である、請求項42記載の使用法または方法。

【請求項46】

請求項1~3のいずれか一項記載の核酸分子、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項6~11のいずれか一項記載の宿主、請求項14記載のポリペプチド、請求項15もしくは16記載の抗体、請求項17記載のアプタマー、および/または請求項18もしくは19記載のプライマーもしくはプライマー対を含む、キット。

【請求項47】

請求項14記載のポリペプチドと特異的に相互作用しうる化合物を同定するための方法であって、

(a) 請求項14記載のポリペプチドを、検査しようとする化合物または化合物の候補混合物と接触させる段階；および

(b) 該化合物または化合物の候補混合物が該ポリペプチドと特異的に相互作用しうるか否かを判定する段階、

を含む方法。

【請求項48】

請求項14記載のポリペプチドの特性を変化させうる化合物の特性決定のための方法であって、

(a) 請求項14記載のポリペプチドを化合物または候補混合物と接触させる段階；および

(b) 化合物または候補混合物が請求項14記載のポリペプチドの特性を変化させるか否かを判定する段階、

を含む方法。

【請求項49】

請求項14記載のポリペプチドと相互作用しうる化合物に関するスクリーニングの方法で

10

20

30

40

50

あって、

(a) 請求項14記載のポリペプチドを化合物または化合物の候補混合物と接触させる段階；

(b) 応答を測定および/または検出する段階；ならびに

(c) 該応答を該候補分子の非存在下で測定した標準的な応答と比較する段階、を含む方法。

【請求項50】

薬学的組成物の製造のための方法であって、請求項47～49のいずれか一項記載の方法の諸段階を含む上に、該同定された、特性決定された、および/またはスクリーニングされた分子の誘導体を生成するさらなる段階をさらに含む方法。

10

【請求項51】

薬学的組成物の製造のための方法であって、請求項47～50のいずれか一項記載の方法の諸段階を含む上に、同定された、特性決定された、スクリーニングされた、および/または誘導体化された分子を薬学的に許容される形態へと製剤化する段階を含む方法。

【請求項52】

製造しようとする薬学的組成物が、神経保護物質、向知性物質、プリリアントブルー、ピペリジンまたはそのピペラジン誘導体、アダマンタン誘導体、置換型フェニル化合物、酸化ATP、2-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸、3-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸または -アドレナリン受容体調節因子をさらに含む、請求項51記載の方法。

20

【請求項53】

該化合物または化合物の候補混合物が、変化したATP感受性イオンチャンネルP2X7Rに対する拮抗薬、部分的拮抗薬、部分的作動薬および/または作動薬を含む、請求項47～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項54】

個体の情動障害を診断するための方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からDNAを単離する段階；

(b) P2X7R遺伝子のヌクレオチド組成のすべてまたは部分を決定する段階；および

(c) P2X7Rの該ヌクレオチド組成を1つまたは複数の多型、変異または対立遺伝子多様性に関して分析する段階、

30

を含む方法。

【請求項55】

個体の情動障害を診断するための方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からRNAを単離する段階；

(b) 該RNAをcDNAに変換する段階；

(c) P2X7R遺伝子のヌクレオチド組成のすべてまたは部分を決定する段階；および

(d) P2X7Rの該ヌクレオチド組成を1つまたは複数の多型、変異または対立遺伝子多様性に関して分析する段階、

を含む方法。

40

【請求項56】

個体の情動障害を診断するための方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からRNAまたはタンパク質を単離する段階；

(b) P2X7R RNAまたはタンパク質のレベルを決定する段階；および

(c) P2X7R RNAまたはタンパク質のレベルを、情動障害に罹患していない正常个体による対応するレベルと比較する段階、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、情動障害を診断することを可能にする、5'UTR領域もしくは3'UTR領域における変異、エクソン3、5、6、8もしくは13またはイントロン1、3、4、5、6、7、9、11もしくは12における変異、またはエクソン13における欠失を含む、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸分子、好ましくはゲノム配列に関する。本発明はさらに、前記核酸分子によってコードされるポリペプチド、前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞、さらには前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを生産するための方法にも関する。本発明はまた、前記核酸分子によってコードされるポリペプチドを特異的に対象とする抗体、および前記核酸分子と特異的に結合するアプタマーも提供する。

【0002】

加えて、前記核酸分子を選択的に増幅するためのプライマー、さらにはキット、組成物、特に前記核酸分子を含む薬学的組成物および診断用組成物、ベクター、ポリペプチド、アプタマー、抗体ならびに/またはプライマーも本発明において提供される。さらに、本発明は、非機能性P2X7Rタンパク質、P2X7Rタンパク質のATPゲート機構の変化、P2X7Rタンパク質の過剰発現もしくは低発現に伴う、または前述の核酸分子もしくはそれらによってコードされるポリペプチドのいずれかの存在に伴う情動障害を診断するための方法にも関する。加えて、本発明は、機能性または非機能性のATP感受性イオンチャンネルP2X7Rを用いて情動障害を治療するための用法および方法にも関する。本発明はまた、情動障害を治療するためのP2X7R活性のモジュレーターの用法にも関する。

【0003】

さらに、本発明はまた、本発明のポリペプチドと特異的に相互作用すること、またはその特性を変化させることが可能な化合物の同定および特徴付けのための方法、ならびに薬学的組成物の製造のための方法にも関する。

【背景技術】

【0004】

医師を受診する人々のうち最大10%は情動障害（行動障害、気分障害としても知られる）に罹患している。しかし、ほとんどの症例は診断されていないか適切に治療されていない。情動障害には例えば、うつ病、不安および双極性障害が含まれる。これらの疾患は文献に詳細に記載されている；例えば、「精神障害の診断と統計の手引き・第四版改訂版（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition Text Revision）」（DMS-IV-TR）、American Psychiatric Press, 2000（非特許文献1）を参照されたい。

【0005】

うつ病は単極性情動障害としても知られ、絶え間ない絶望感、無力感、罪悪感および不安をもたらす、気分の落ち込み、活力喪失、興味喪失、身体疾患の感覚、集中力不足、食欲障害、睡眠障害ならびに身体的および精神的な機能の低下といった症状の組み合わせを特徴とする。本疾患の主なサブタイプには、大うつ病、気分変調（比較的軽いうつ病）および非定型的うつ病がある。その他の重要な型のうつ病には、月経前不快気分障害および季節性情動障害がある。うつ病の現在の治療法は、心理療法、抗うつ薬またはその両方の組み合わせからなる。ほとんどの抗うつ薬は、神経伝達物質セロトニンおよび/もしくはノルエピネフリンの輸送、または酵素であるモノアミンオキシダーゼの活性を標的としている。これらには以下のものが含まれる：選択的セロトニン再取り込み阻害薬（例えば、フルオキセチン、パロキセチン、セルトラリン、フルボキサミン）、三環系抗うつ薬（例えば、アミトリプチリン、イミプラミン、デシプラミン、ノルトリプチリン）、モノアミンオキシダーゼ阻害薬（例えば、フェネルジン、イソカルボキサジド、トラニルシプロミン）、および、ミルタザピン、レボキセチン、ネファゾドンなどの人工的に設計された（designer）抗うつ薬。しかし、既存の抗うつ薬はすべて、反応までの潜時が長い、ノンレスポンスの率が高い、望ましくない副作用といった欠点がある（Holsboer Biol. Psychol. 57 (2001), 47-65（非特許文献2））。このため、医学界には、改良された薬理学的プロフィールを有する新たな抗うつ薬に対する需要がある（Baldwin Hum. Psychopharmac

10

20

30

40

50

ol. Clin. Exp. 16 (2001), S93-S99 (非特許文献3))。

【0006】

不安障害は、憂慮感、不安定感または恐怖感を特徴とする、過度または不適切に興奮した状態として定義される。これらは、その症状の重症度および持続期間ならびに具体的な情動的特徴に従って分類される。そのカテゴリーには以下のものが含まれる：(1) 全般性不安障害、(2) パニック障害、(3) 恐怖症、(4) 強迫性障害、(5) 心的外傷後ストレス障害、および(6) 分離不安障害。ほとんどの不安障害に対する標準的な治療法は、認知行動療法と抗うつ薬療法との組み合わせである。そのほかの薬物には、ベンゾジアゼピンおよびブスピロンが含まれる。

【0007】

双極性障害は、躁うつ病としても知られ、躁病(すなわち、過大な多幸感、易刺激性を含む、気分高揚)の期間とうつ病の期間との間での気分変動を特徴とする。双極性障害は症状の重症度に従って分類される。双極性障害I型と診断される患者は、躁病性または混合型のエピソードを起こし、大うつ病は伴う場合も伴わない場合もある。双極性障害II型では、患者は軽躁病のエピソードおよび大うつ病のエピソードを有する。軽躁病の場合には、躁病の症状(多幸感または易刺激性)がより軽度の形態として現れ、持続期間もより短い。双極性障害の治療に用いられる現在の薬剤は、リチウム、バルプロ酸塩およびラモトリジン(これは神経伝達物質グルタミン酸の放出を誘発する)である。抗うつ薬の場合と同じく、これらが効果を現すには数週間かかる上、望ましくない副作用が起こる恐れもあり、例えば、高レベルの血中リチウムは致死的な恐れがある。

【0008】

有力な証拠により、情動障害は生物学的疾患であることが示唆されている。しかし、一般的な医師が確定診断を下すために用いる臨床検査または他の手法は存在しない。その代わりに、特別に訓練された医師または精神科医が、併せて起こる一群の症状に基づいて疾患を診断しなければならない。このプロセスはしばしば、時間と手間がかかり、患者が現在体験している症状ならびに患者が過去に有していた症状に関する面密な病歴を医師が得るために数回の受診を必要とする。このため、医学界では情動障害の正確な診断のための容易かつ有効な方法には大きな関心がある(Wittchen et al., J. Clin. Psychiatry 62, suppl. 26 (2001), 23-28 (非特許文献4))。

【0009】

情動障害に罹患する患者のほとんどは家系に前例があり、一卵性双生児の研究からは遺伝要素の強さが示唆されている。例えば、コスタリカ中部溪谷地の孤立集団の遺伝子マッピングにより、染色体18q22-q23に重症双極性障害の遺伝子座が示唆されている(Freimer et al., Nature Genetics 12 (1996), 436-441 (非特許文献5))。さらに、旧派アーミッシュ(Old Order Amish) 集団に対して行われた遺伝学的研究からは、染色体6、13および15上にある遺伝子が双極性情動障害の感受性に寄与する可能性が示唆されている(Gi nns et al., Nature Genetics 12 (1996), 431-435 (非特許文献6))。最近、ケベックのSaguenay / Lac-St-Jean地域で見いだされた均一集団におけるゲノム全域の検索により、染色体12q23-q24上に双極性障害にかかわる重要な遺伝子座が存在することが示唆された(Morissette et al., Am. J. Med. Genet.(Neuropsychiatr. Genet.) 88 (1999), 567-587 (非特許文献7))。この研究では染色体5および21上にも感受性遺伝子座が発見された。他の複数のグループが、12q23の領域における連鎖に関して弱い証拠を報告している(Kelsoe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 585-590 (非特許文献8) ; Sklar, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3 (2002), 371-413 (非特許文献9))。以上の諸研究で言及された種々の遺伝子座(例えば、染色体5、6、12、13、15、18、21との関連性)から判断して、情動障害に関する明確な遺伝的関連性はまだ発見されていないものがあると考えられる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】「精神障害の診断と統計の手引き・第四版改訂版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition Text Revision)」(DMS-IV-TR)、American Psychiatric Press, 2000

【非特許文献2】Holsboer Biol. Psychol. 57 (2001), 47-65

【非特許文献3】Baldwin Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp. 16 (2001), S93-S99

【非特許文献4】Wittchen et al., J. Clin. Psychiatry 62, suppl. 26 (2001), 23-28

【非特許文献5】Freimer et al., Nature Genetics 12 (1996), 436-441

【非特許文献6】Ginns et al., Nature Genetics 12 (1996), 431-435

【非特許文献7】Morissette et al., Am. J. Med. Genet.(Neuropsychiatr. Genet.) 88 (1999), 567-587

【非特許文献8】Kelsoe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 585-590

【非特許文献9】Sklar, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3 (2002), 371-413

【発明の概要】

【0011】

このように、いくつかの遺伝子が上記のように情動障害と関連性があると推定されているが、明らかな相関はこれまで示されていない。情動障害に対しては適切な薬物療法も分子レベルでの診断も得られていないため、あらゆる領域にわたる情動障害がその変異によって引き起こされる遺伝子を同定すること、ならびに情動障害の診断および治療のための医薬品および方法を提供することに関しては需要がある。

【0012】

このため、本発明の基礎をなす技術的課題は、情動障害の診断および治療のための手段および方法を提供することである。

【0013】

前記技術的課題に対する解決は、特許請求の範囲に記述された態様を提供することによって成し遂げられる。

【0014】

したがって、本発明は、以下のものからなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子に関する：

(a) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO: 1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのゲノム配列の位置362、532、1100、1122、1171または1702に対応する、5'UTR領域内の変異を含むゲノムヌクレオチド配列であって、前記位置で前記ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

(b) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列であって、以下の表Aの「エクソン」欄に示されたエクソンにおいて、SEQ ID NO: 3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列の表Aの「野生型における位置」欄に示された位置に対応する表Aの「アミノ酸残基」欄に示されたアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基によって置換されている核酸配列；

【表A】

エクソン	アミノ酸残基	野生型における位置
エクソン3	R (Arg)	117
エクソン5	G (Gly)	150
エクソン6	E (Glu)	186
エクソン6	L (Leu)	191
エクソン8	R (Arg)	270
エクソン13	I (Ile)	568
エクソン13	R (Arg)	578

(c) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO: 1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の位置32548または位置37633に対

10

20

30

40

50

応する、エクソン5または8内の変異を含むヌクレオチド配列であって、前記位置で前記ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているヌクレオチド配列；

(d) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列であって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置488～494に対応するアミノ酸が欠失している核酸配列；

(e) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードするゲノムヌクレオチド配列であって、以下の表Bの「イントロン」欄に示されたイントロンにおいて、SEQ ID NO：1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の表Bの「野生型における位置」欄に示された位置に対応する表Bの「置換されるヌクレオチド」欄に示されたヌクレオチドが、別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

【表 B】

イントロン	置換されるヌクレオチド	野生型における位置
イントロン1	G	3166
イントロン1	C	24778
イントロン1	C	24830
イントロン3	A	26308
イントロン3	G	26422
イントロン4	G	32394
イントロン4	T	32434
イントロン5	A	32783
イントロン6	G	35641
イントロン6	A	35725
イントロン6	T	36001
イントロン7	G	36378
イントロン7	T	36387
イントロン7	G	36398
イントロン9	C	47214
イントロン11	T	47563
イントロン12	C	54307
イントロン12	G	54308

(f) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードし、かつSEQ ID NO：1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列の位置55169、55170、55171、55917または54925に対応する、3'UTR領域内の変異を含むゲノムヌクレオチド配列であって、前記位置で前記ヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されているゲノムヌクレオチド配列；

(g) 少なくとも20または21ヌクレオチドを含み、かつ(a)～(f)のいずれか1つに定義された変異または欠失を含むヌクレオチド配列；

(h) SEQ ID NO：13～51のいずれか1つに示されたヌクレオチド配列を含む核酸配列；

(i) SEQ ID NO：5～12のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列；

(j) (a)～(g)のいずれか1つに定義されたヌクレオチド配列と、または(h)のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつ(a)～(f)のいずれか1つに定義された変異を有するヌクレオチド配列；および

(k) 遺伝暗号の結果として(j)に定義された核酸配列と縮重性のある核酸配列。

【0015】

驚いたことに、ATP感受性イオンチャンネルP2X7RをコードするP2X7R遺伝子における変異が、あらゆる領域にわたる情動障害を引き起こしうることが見いだされた。P2X7R遺伝子の5'UTRにおける6種類の変異、P2X7R遺伝子のエクソン3、5、6、8および13における7種類の変異（これらはSEQ ID NO：3または4に示されたP2X7Rの野生型配列における対応するアミノ酸のアミノ酸置換を引き起こす）、ならびに前記遺伝子のエクソン5および8にお

10

20

30

40

50

る2種類の変異（それぞれ1つのヌクレオチドの別のヌクレオチドによる置換を引き起こす）、前記遺伝子のエクソン13におけるヌクレオチドの欠失、イントロン1、3、4、5、6、7、9、11および12における18種類の変異、ならびにP2X7R遺伝子の3'UTRにおける5種類の変異が、情動障害の罹患がみられる血縁関係のない41家系における情動の状態と共分離することが同定された。「情動障害」という用語は、本発明の文脈において用いられる場合、うつ病、不安、単極性障害、双極性障害I型、双極性障害II型、躁病、注意欠陥多動障害、薬物乱用、および個体の正常な行動または気分に影響を及ぼす任意の他の障害を非制限的に含むことを意味する。

【0016】

各々の変異は、以下の実施例に示されたような情動障害の説明となる変化を引き起こしうる。

【0017】

P2X7Rは、P2Xイオンチャンネルファミリーに属するATP感受性イオンチャンネルである。その遺伝子は、P2Xファミリーの他のメンバーとの配列相同性により、ラット脳から最初に単離され（Surprenant et al., (1996), 272, 735-738; Genbankアクセッション番号NM_019256）、その後ヒト単球ライブラリー（Rassendren et al., J. Biol. Chem. 272 (1997), 5482-5486; Genbankアクセッション番号NM_002562、Y09561）から単離された。その後、P2X7Rが、マスト細胞およびマクロファージに対するATPの透過作用を媒介する未同定のP2Z受容体に対応することが判明した（Dahlgvist and Diamant Acta Physiol. Scand. 34 (1974), 368-384; Steinberg and Silverstein J. Biol. Chem. 262 (1987), 3118-3122; Gordon Biochem. J. 233 (1986), 309-319)。P2X7Rには疎水性膜貫通ドメインが2つと細胞外ループが1つあり、膜貫通型イオンチャンネルを形成する。P2X7受容体はホモオリゴマー形態としてのみ機能するように思われ、その他のP2XホモマーおよびP2Xヘテロマーとは顕著に異なる薬理学的プロファイルを有するように思われる（North and Surprenant, Annual Rev. Pharmacology Toxicology 40 (2000), 563-580）。P2X7Rが活性化に至るには1mMを超えるレベルのATPを必要とするが、他のP2X受容体は100 μM以下のATP濃度で活性化する（Steinberg et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 8884-8888; Greenberg et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 10337-10343）32）。P2X受容体はいずれも連結後に非選択的チャンネル様の性質を示すが、P2X7Rによって形成されるチャンネルは、最大900ダルトンの分子の通過を可能にする孔へと容易に変形することができる（Virginio et al., J. Physiol. 519 (1999), 335-346）。

【0018】

P2X7Rは造血細胞、マスト細胞およびマクロファージで発現され（Surprenant et al., Science 272 (1996), 3118-3122）、そこで四量体または六量体の形態として構成される（Kim et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 23262-23267）。P2X7Rは特に免疫機能および炎症反応の調節に関与する。マクロファージにおけるATPによるP2X7Rの活性化は、T細胞の分裂誘発刺激（Baricordi et al., Blood 87 (1996), 682-690）、インターロイキン-1などのサイトカインの放出（Griffiths et al., J. Immunol. 154 (1995), 2821-2828）およびマクロファージ多核体（polykarion）の形成（Falzoni et al., J. Clin. Invest. 95 (1995), 1207-1216）を伴う。ATPによるP2X7Rの刺激はまた、大量の膜貫通イオン流（特にCa²⁺およびNa⁺の流入ならびにK⁺の流出）および非選択的な原形質膜孔の形成を誘発することにより、細胞死も引き起こしうる（Di Virgilio et al., Cell Death Differ. 5 (1998), 191-199）。

【0019】

脳ではP2X7Rは当初、ニューロンではなくミクログリア（脳の常在性マクロファージ）および上皮細胞に限局していると考えられており（Collo et al., Neuropharmacology 36 (1997), 1277-1283）、これは神経変性におけるP2X7Rの役割を示唆するとされた。しかし、P2X7Rはそれ以来、ラット網膜のニューロン（Brandle et al., Brain Research Molecular Brain Res. 62 (1998), 106-109）、蝸牛神経節細胞（Brandle et al., Neuroscience Letters 273 (1999), 105-108）ならびに脳幹および脊髄の全体にわたるシナプス前終

10

20

30

40

50

末ニューロン (Deuchards et al., J. Neurosci. 21 (2001), 7143-7152) でも発見されている。また、その後の研究により、P2X7Rが、海馬のニューロンにおけるグルタミン酸およびGABAなどの神経伝達物質の放出を調節することも示唆されている (Armstrong et al., J. Neuroscience 22 (2002), 5938-5945; Sperlagh et al., J. Neurochem. 81 (2002), 1196-1211)。脳のグリア細胞およびアストロサイトにおけるP2X7Rの構成は単量体であるように思われる (Kim et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 23262-23267)。

【 0 0 2 0 】

P2X7Rの作動薬および拮抗薬はいくつか同定されている。プリリアントブルー (Jiang et al., Mol. Pharmacol. 58 (2000), 82-88)、イソキノリン1-[N,0-Bis(5-イソキノリンスルホニル)-N-メチル-L-チロシル]-4-フェニルピペラジンおよびN-[1-[Nメチル-p-(5イソキノリンスルホニル)ベンジル]-2-(4-フェニルピペラジン)エチル]-5-イソキノリンスルホンアミド (Humphreys et al., Mol. Pharmacol., 54 (1998), 22-32)、アダマンタン誘導体 (WO 99/29660号、WO 99/29661号、WO 00/61569号、WO 01/42194号、WO 01/44170号、WO 01/44213号)、置換型フェニル化合物 (WO 00/71529号)、ピペリジン誘導体およびピペラジン誘導体 (WO 01/46200号) はP2X7Rのアンタゴニストであり、一方、酸化ATP (oATP) はこの受容体の不可逆的阻害薬として作用する (Chen et al., J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203)。これらのアンタゴニストのいくつかは現在、炎症性疾患、免疫疾患および冠血管疾患の治療に関して評価中である。BzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) は、P2X7Rの作動薬として作用する (North and Surprenant, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580)。WO 99/55901号は、P2X2、P2X3、P2X4、P2X5、P2X6およびP2X7からなる群より選択される哺乳動物プリン受容体の活性を調節する化合物を同定するための方法を記載しており、てんかん、うつ病および加齢性変性疾患などの行動障害の治療法において前記プリン受容体が役割を果たす可能性を示唆している。

【 0 0 2 1 】

P2X7Rを欠失した変異マウスは健康で妊孕性があり、表面上明らかな表現型を示さない。しかし、野生型の対応物と比較して、P2X7R^{-/-}動物由来のLPS活性化腹腔マクロファージは、ATPで刺激しても成熟インターロイキン-1 (IL-1) を産生することができず、このことは腹腔マクロファージがATPに反応してIL-1を放出する能力を有さないことを示唆する (Solle et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 125-132)。P2X7R^{-/-}マウスの詳細な行動試験は実施されていない。ヒトでは、Glu-496からAlaへの多型がP2X7機能の喪失を招き (Gu et al., J. Biol. Chem. 276 (2001), 11135-11142)、これはB細胞慢性リンパ球性白血病に伴ってみられる (Thunberg et al., The Lancet 360 (2002), 1935-1939)。P2X7Rのプロモーター領域およびコード領域と推定される領域内にある、そのほかの多型も報告されている (Liet al., FEBS Lett. 531 (2002), 127-131; EP 1199372)。

【 0 0 2 2 】

P2X7Rに関する文献は数多いが、情動障害における役割は、先行技術において、これまで示唆されたことも暗に指摘されたこともない。

【 0 0 2 3 】

本発明を詳細に開示する前に、本発明が、本明細書に記載された特定の方法、手順、細胞系、ベクターおよび試薬には限定されず、それらは異なってもよいことが理解される必要がある。また、本明細書で用いる用語は特定の態様を説明することのみを目的としており、本発明の範囲を制限することを意図したものではなく、それらは添付する特許請求の範囲のみによって制限されることも理解される必要がある。別に規定する場合を除き、すべての科学技術用語は、当業者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。

【 0 0 2 4 】

好ましくは、本明細書に用いられる用語は、「バイオテクノロジー用語の多言語辞典：(IUPAC勧告)(A multilingual glossary of biotechnological terms):(IUPAC Recommendations)」、Leuenberger H.G.W, Nagel, B. and Kolbl, H. eds.(1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland)に記載された通りに定義される。本明細書

およびそれに続く特許請求の範囲の全体を通じて、文脈で別のものを要求しない限り、「含む (comprise)」という用語、または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」などの変形物は、言及した要素または整数または要素もしくは整数の群を含むものの、他の要素または整数または要素もしくは整数の群を除外しないことを意味するものと理解されたい。

【0025】

本明細書の本文の全体を通じて、いくつかの文書を引用している。本明細書に引用する文書(すべての特許、特許出願、学術発行物、製造者の仕様書、指示書などを含む)は、前記のものも下記のものも、それらの全体が参照として本明細書に組み入れられる。本明細書において、引用される文書の任意のすべてが本発明に対する真の先行技術であることを認めるものではない。本明細書中のいかなる記載も、本発明者らが先行発明によるこの

10

【0026】

本明細書および添付する請求の範囲において用いる場合、単数形の「1つの(a)」 「1つの(an)」および「その(the)」は、その文脈で明らかに別の指示がなされない限り、複数のものに関する言及も含むことに留意されたい。したがって、例えば、「1つの試薬」に対する言及は複数のこのような試薬を含み、「その方法」に対する言及は、本明細書に記載した方法を改変または代替するものとなりうる、当業者に知られた等価な工程および方法に関する言及を含む。

【0027】

本発明によれば、「核酸配列」という用語は、核酸分子を構成するプリン塩基およびピリミジン塩基を含む塩基の配列のことを意味し、この際、前記塩基は核酸分子の一次構造を表す。当業者には容易に理解されるであろうが、核酸配列には、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれもの、DNA、cDNA、ゲノムDNA、RNA、合形成態および混在性重合体が含まれ、これらが非天然性または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含んでもよい。

20

【0028】

本明細書で用いる場合、「ポリペプチド」という用語は、任意の長さのアミノ酸鎖を含み、アミノ酸残基が共有ペプチド結合によって連結されている、ペプチド、タンパク質またはポリペプチドのことを意味する。しかし、アミノ酸および/またはペプチド結合が機能的類似体によって置換されている、このようなタンパク質/ポリペプチドのペプチド模倣物、さらには遺伝子によりコードされる20種類のアミノ酸以外のもの、例えばセレノシステインなども本発明に含まれる。ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質をポリペプチドと呼んでもよい。ポリペプチドおよびタンパク質という用語は本明細書においてしばしば互換的に用いられる。ポリペプチドという用語はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化といったポリペプチドの修飾物のことも指し、これらは除外されない。このような修飾物は、基本的な教科書、より詳細なモノグラフ、さらには大部にわたる研究文献に詳細に記載されている。

30

【0029】

本発明に従って用いられる「位置」という用語は、本明細書に示されたアミノ酸配列の内部でのアミノ酸の位置、または本明細書に示された核酸配列の内部でのヌクレオチドの位置のいずれかを意味する。

40

【0030】

「ATP感受性イオンチャンネルP2X7R」という用語は、本発明によれば、P2Xイオンチャンネル型受容体ファミリーの1つのメンバーとして分類しうるポリペプチドのことを表す。これらはプリン作動性受容体としても知られている。P2X受容体はリガンド感受性イオンチャンネルである。これらの受容体のリガンドはATPであることもあれば、ならびに/または別の天然ヌクレオチド(例えば、ADP、UTPおよびUDPなど)もしくは合成ヌクレオチド(例えば、2-メチルチオATPなど)のこともある。分類のための基準は以下の通りである:(1)ファミリー内または異なる種間での39%を上回る配列相同性;(2)イオン伝導に關与するシグナル伝達機構(Khakh et al., Pharmacol Rev. 253 (2001), 107-18)

50

。したがって、「ATP感受性イオンチャンネルP2X7R」という用語は、「イオンチャンネル型受容体」または「プリン作動性受容体」という用語と互換的である。好ましくは、「ATP感受性イオンチャンネルP2X7R」という用語は、1つまたは複数の構造的および/または機能的特徴、好ましくは上記のものに基づいて、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rとして分類されるポリペプチドのことを表す。構造的特徴とは、ポリペプチドをP2X7Rタンパク質として分類することを可能にする、ある種の構造的性質のことを指す。このような性質の一つはアミノ酸配列である。本発明の文脈において、ポリペプチドは、それがそれ自体の長さの全体にわたって、SEQ ID NO: 3または4に示されたヒトP2X7Rタンパク質のアミノ酸配列に対してある程度の配列同一性を示すならば、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rとして分類される。この配列同一性の程度は少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である。特に好ましくは、配列同一性の程度は少なくとも65%である。

10

【0031】

さらに、P2X7Rタンパク質の構造的特徴には2つの疎水性膜貫通ドメインと1つの細胞外があり、これらはプログラムTMPRED (Hofmann Biol. Chem. 347 (1993), 166) またはTMHMM (Krogh J. Mol. Bio. 305 (2001), 567-580) を用いて解析することができる。さらに、P2X7Rは、単一のポリペプチド、二量体、三量体などのいずれとして存在してもよい。

【0032】

したがって、本発明の文脈において、タンパク質は、好ましくは、それが上述した構造的特徴の少なくとも1つを示すならば、P2X7Rタンパク質として分類される。機能的特徴とは、P2X7Rタンパク質の生物活性と関連する性質のことを指す。詳細には、P2X7Rは、カルシウムイオンおよびナトリウムイオンの細胞外溶液から細胞内溶液への通過を可能にするとともに、カリウムイオンの細胞内から細胞外溶液への通過を可能にする、ATP感受性イオンチャンネルのことである。さらに、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rは、自然下でホモオリゴマー形態をとる。P2X7R受容体タンパク質の特徴は、本明細書で以下に述べるようにして決定することができる。「ATP感受性イオンチャンネルP2X7R」という用語には、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの機能的形態および非機能的形態が含まれる。機能的ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rとは、当技術分野で公知の方法によって測定しうる上述の機能的特徴の少なくとも1つを有するP2X7Rタンパク質のことであると解釈される。非機能的ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rとは、上記の構造的特徴のためにP2X7Rタンパク質として分類することはできるが、上記のP2X7Rタンパク質の機能的特徴の少なくとも1つ、好ましくはすべてを喪失しているタンパク質のことである。P2X7Rタンパク質が非機能的であることは、例えば、カルシウムイオンおよびナトリウムイオンが細胞内に流入しうるか否か、またはカリウムイオンが細胞から流出しうるか否かを測定することによって判定しうる。したがって、細胞のカルシウムおよび/もしくはナトリウムの流入または流出のいずれかを測定することによって、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rにおける変異の存在を判定することができる。P2X7R遺伝子に変異を有する細胞は、野生型P2X7Rタンパク質を有する細胞と比較して、イオンの流入および/または流出の変化を示す。

20

30

【0033】

さらに、P2X7Rが機能的であるか非機能的である（例えば、変化している）かを判定するために用いる方法にはさまざまなものがある。一つの方法は、ATPにより誘導される、細胞（例えば、個体から単離した細胞）へのエチジウム取り込みの速度を測定することからなる。エチジウムは、ATPによって孔形成が活性化された場合に、P2X7Rの孔を通して細胞内に取り込まれる。続いて、細胞をATPの添加下または非添加下でエチジウムの存在下にてインキュベートし、その後それらをフローサイトメトリーによって分析する。エチジウム蛍光を測定し、ATPの有無間で比較する。P2X7Rの活性が相対的に低いならば、ATPによって誘導されるエチジウム蛍光は対照細胞におけるよりも低いと考えられる。この種の方法が、白血病患者から単離したBリンパ球およびTリンパ球におけるP2X7R活性を検証するために用いられている (Wiley et al., Lancet 359 (2002), 1114-1119)。手短に

40

50

述べると、単離した細胞を1mlのHepes緩衝塩化カリウム、37℃中で連続攪拌しながらインキュベートする。続いてエチジウムを濃度25mol/lとして添加し、その40秒後に10μlの100mmol/l ATP保存液を添加する。細胞を、Coulter Eliteフローサイトメーター (Coulter, Hiialeah, FL) を488nmのアルゴンレーザー励起によって用いるフローサイトメトリーにより、1,000イベント/sで分析する。放出蛍光を590nmロングパスフィルターを用いて収集する。連続して5s間隔でゲート処理された各部分集団に対する線形平均チャンネル蛍光強度をWin-MDIソフトウェア (Joseph Trotter, バージョン2.7) を用いて解析し、時間に対してプロットした。

【0034】

P2X7R活性を決定するためのもう1つの方法は、カルシウムと結合した時にのみ発光する蛍光色素とともにインキュベートした単離細胞へのカルシウム流入を測定することである。細胞には色素を投入する必要がある、その後にカルシウム流入を誘発する必要がある。このような色素の例には、Fura-2、カルシウムグリーン、カルシウムオレンジ、カルシウムクリムゾン (いずれもMolecular Probes社から入手可能)。カルシウム輸送を測定するための方法は当技術分野で周知である；例えば、Takahashi et al., *Physiol Rev.* 79 (1999), 1089-1125を参照されたい。さらに、細胞へのカルシウム流入は膜電位の変化を生じさせる。この変化は、電気生理学的手法 (パッチクランプ法) により、または電位変化に対する感受性のある色素を用いることにより、測定することができる。このような方法も当技術分野で周知であり、例えば、Gonzalez et al., *DDT* 4 (1999), 431-439; Gonzalez and Tsien, *Chemistry & Biology* 4 (1997), 269-277; Gonzalez and Tsien, *Biophysical Journal* 69 (1995), 1272-1280。

【0035】

さらにもう1つの方法は、¹³³Ba²¹の取り込みを測定することである。Ba²¹はCa²¹の優れた代用物であり、ひとたび細胞内に入ると輸送性ATPアーゼによるポンプ作用も隔離作用も受けない。Ba²¹の取り込みは、¹³³BaCl₂ (最終濃度0.2mM) を用いて60sにわたって測定することができる。時点0で、¹³³Ba²¹の予熱した保存液 (0.4mMおよび1μCi/ml) を、予熱した単離細胞 (150mM KCl、HEPES (pH 7.4) 中、37℃) に対して同容積で添加する。ATP (1mM) を、¹³³Ba²¹同位体の10分前またはそれと同時に添加する。0.8mlのアリコートをして0~60sの複数の時点で採取し、250μlの油性混合物 (ジ-n-ブチルフタレートおよびジ-イソ-オクチルフタレート、7:3 vol/vol) の上にあらかじめ重層させた0.2mlの氷冷50mM MgCl₂ (KCl-HEPES培地中) と直ちに混合し、続いて8,000gで30s遠心する。上清および油分を吸引し、細胞ペレットをWallac Wizard 3自動ガンマカウンターまたは任意の他の適した線測定装置でカウントする。

【0036】

本発明は、P2X7R遺伝子におけるさまざまな種類の変異が情動障害の発生と結びついているという発見に基づく。第1のタイプの変異は、5'UTRにおける変異である。このような変異の例は、SEQ ID NO: 1に記された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのゲノム配列の位置362、532、1100、1122、1171または1702に対応する位置での単一ヌクレオチド置換である。

【0037】

本明細書で述べるヌクレオチド配列に関する位置とは、SEQ ID NO: 1に示された配列のことを指す。この配列は、ATP感受性イオンチャンネルP2X7RをコードするP2X7R遺伝子の核酸配列を表している。当業者は、配列のアラインメントを行うことにより、SEQ ID NO: 1における位置に対応するゲノム配列中の位置を同定することが可能である。さらに、本明細書における下記のSEQ ID NO: 1には、エクソンおよびイントロンの正確な場所が示されている。加えて、当業者は、SEQ ID NO: 1と、P2X7R遺伝子のcDNA配列を示しているSEQ ID NO: 2とを比較することにより、P2X7R遺伝子のエクソンおよびイントロンを同定することができる。

【0038】

好ましくは、SEQ ID NO: 1に示されたP2X7R遺伝子のゲノム配列の5'UTRにおける位置36

10

20

30

40

50

2で、チミン (T) が別のヌクレオチド、好ましくはプリン塩基によって置換される。より好ましくは、前記位置で前記チミジンはピリミジン塩基によって置換される。特に好ましくは、前記チミンはシトシン (C) によって置換される。

【 0 0 3 9 】

SEQ ID NO : 1に示されたP2X7R遺伝子のゲノム配列の5'UTRにおける位置532で、チミン (T) が別のヌクレオチド、好ましくはピリミジン塩基によって置換されることが好ましい。より好ましくは、前記位置で前記チミンはプリン塩基によって置換される。特に好ましくは、前記チミジンはグアニン (G) によって置換される。

【 0 0 4 0 】

P2X7R遺伝子のゲノム配列の5'UTRにおけるそれぞれ位置1100および1122にあるアデニン (A) 残基が、好ましくはピリミジン塩基によって置換されることが好ましい。より好ましくは、前記アデニンはプリン塩基によって置換され、特に好ましくは前記アデニンはグアニン (G) によって置換される。

10

【 0 0 4 1 】

SEQ ID NO : 1に示されたP2X7R遺伝子のゲノム配列の5'UTRにおける位置1171で、シチジン (C) が別のヌクレオチド、好ましくはピリミジン塩基によって置換される。より好ましくは、前記シチジンはプリン塩基によって置換され、さらにより好ましくは、前記シチジンはグアニン (G) によって置換される。

【 0 0 4 2 】

SEQ ID NO : 1に示された遺伝子P2X7Rのゲノム配列の5'UTRにおける位置1702にあるグアニンは、別のヌクレオチド、好ましくはピリミジン塩基によって置換される。より好ましくは、前記グアニンはプリン塩基によって置換され、特に好ましくはそれはアデニン (A) によって置換される。

20

【 0 0 4 3 】

P2X7R遺伝子に見いだされた第2のタイプの変異は、対応するアミノ酸配列におけるアミノ酸置換を引き起こす、エクソンにおける変異である。これらには、前記の項目 (b) に列記された変異がある。この文脈において、「野生型における位置」欄に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置Xに対応する、表Aの「アミノ酸残基」欄に示されたアミノ酸残基」という用語は、以下の意味を有する：当該のアミノ酸残基が、前記アミノ酸残基が内部に存在する配列とSEQ ID NO : 3または4のアミノ酸配列との比較および
アラインメントを行った場合に、SEQ ID NO : 3または4の配列における位置Xに位置すると
考えられること。SEQ ID NO : 3または4に示されたアミノ酸配列は、ヒトP2X7R遺伝子のア
ミノ酸配列であり、本発明において参照配列として用いられる。

30

【 0 0 4 4 】

ある所定のP2X7R配列における、あるアミノ酸残基またはヌクレオチド残基が、SEQ ID NO : 1、3または4のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列における特定の位置に対応するか否かを判定する目的に、当業者は、当技術分野で周知の手段および方法、例えば、手作業による、または「ハイブリダイゼーション」および「相同性の程度」という用語の定義に関連して以下でさらに述べるものなどのコンピュータプログラムを用いることによるア
ラインメントを用いることができる。

40

【 0 0 4 5 】

例えば、BLAST2.0 (これはBasic Local Alignment Search Toolの略語である) (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) は、局所配列アラインメントに関する検索のために用いることができる。BLASTは、配列類似性を決定するためのヌクレオチドおよびアミノ酸配列のアラインメントを行う。アラインメントの局所的な性質のため、BLASTは完全一致の判定および類似した配列の同定に特に有用である。BLASTアルゴリズムの出力の基本的な単位はハイスコアリングセグメントペア (High-scoring Segment Pair) (HSP) である。HSPは、アラインメントが局所的に最大である、またはアラインメントスコアがユーザにより設定された閾値もしくはカットオフスコアを満たすかそれを

50

上回る、任意ではあるが等しい長さの2つの配列フラグメントからなる。BLASTアプローチとは、クエリー配列とデータベース配列との間のHSPを探索し、見いだされた一致の統計学的有意性を評価して、ユーザが選択した有意性の閾値を満たすような一致のみを報告することである。パラメータ-Eはデータベース配列の一致を報告するための統計学的に有意な閾値を定める。Eは全データベース検索の状況下でのHSP（またはHSPのセット）の偶発的出現率の期待度数の上限と解釈される。その一致がEを満たすすべてのデータベース配列がプログラムの出力に報告される。

【 0 0 4 6 】

BLAST (Altschul (1997), 前記引用箇所 ; Altschul (1993), 前記引用箇所 ; Altschul (1990), 前記引用箇所) を用いる類似のコンピュータ手法は、GenBankまたはEMBLなどのヌクレオチドデータベースにおける同一分子または関連分子に関する検索のために用いられる。この解析は、膜を用いる多数回のハイブリダイゼーションよりもはるかに迅速である。加えて、コンピュータ検索を、何らかの特定の一致が完全一致であるか類似したものであるかを判定するように変更することもできる。検索の基礎は、以下の通りに定義される積スコア：

10

% 配列同一性 x % 最高BLASTスコア

100

であり、これは2つの配列間の類似性の程度および配列一致の長さの両方を考慮に入れている。例えば、積スコアが40の場合には、一致は1~2%内の誤り率で完全一致であると考えられる；70の場合には、一致は完全一致であると考えられる。類似性のある分子は通常、15~40の積スコアを示すものを選択することによって同定されるが、より低いスコアでも関連性のある分子が同定される場合もある。

20

【 0 0 4 7 】

上述したように、P2X7R遺伝子において同定された変異の第2の群は、アミノ酸置換を引き起こす、P2X7R遺伝子のエクソンにおける変異である。この点に関して、SEQ ID NO 2はP2X7R遺伝子のcDNA配列を示している。エクソン3における、SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの対応する野生型アミノ酸配列の位置117で、アルギニン (R) 残基が別のアミノ酸残基によって、好ましくは脂肪族、酸性または塩基性のアミノ酸残基によって置換される。より好ましくは芳香族アミノ酸残基によって置換され、これは特に好ましくはトリプトファン (W) である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 5に示されている。

30

【 0 0 4 8 】

エクソン5における、SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸配列の位置150で、グリシン (G) 残基が別のアミノ酸残基によって、好ましくは脂肪族、芳香族または酸性のアミノ酸残基によって置換される。より好ましくは塩基性アミノ酸残基によって、特に好ましくはアルギニン (R) によって置換される。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 6に示されている。

【 0 0 4 9 】

SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸配列のエクソン6における位置186で、グルタミン酸残基 (E) が別のアミノ酸残基によって、好ましくは脂肪族、芳香族または酸性のアミノ酸残基によって置換される。より好ましくは、前記グルタミン酸は塩基性アミノ酸残基によって置換され、これは特に好ましくはリジン (K) である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 7に示されている。

40

【 0 0 5 0 】

SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸配列のエクソン6における、位置191で、ロイシン残基 (L) が別のアミノ酸残基によって置換される。前記アミノ酸残基は好ましくは脂肪族、酸性または塩基性のアミノ酸残基である。より好ましくは、前記アミノ酸残基は芳香族アミノ酸残基であり、特に好ましくはプロリン (P) である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 8に示されている。

50

【 0 0 5 1 】

SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸配列のエクソン8における、位置270で、アルギニン残基 (R) が別のアミノ酸残基によって置換される。前記アミノ酸残基は好ましくは芳香族、酸性または塩基性のアミノ酸残基である。より好ましくは、前記アミノ酸残基は脂肪族アミノ酸残基、特に好ましくはシステイン (C) である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 9に示されている。

【 0 0 5 2 】

SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸残基のエクソン13における位置568で、イソロイシン (I) 残基が別のアミノ酸残基によって置換される。より好ましくは、前記イソロイシンは芳香族、塩基性または酸性のアミノ酸残基によって置換される。さらにより好ましくは、前記イソロイシンは脂肪族アミノ酸残基によって置換され、これは特に好ましくはアスパラギン (N) である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 10に示されている。

10

【 0 0 5 3 】

エクソン13では、SEQ ID NO : 3または4に示されたP2X7Rの野生型アミノ酸配列における位置578で、アルギニン残基 (R) が別のアミノ酸残基によって置換される。前記アミノ酸残基は好ましくは芳香族、酸性または塩基性のアミノ酸残基である。より好ましくはこれは脂肪族アミノ酸残基であり、特に好ましくはこれはグルタミン (Q) 残基である。その結果生じるポリペプチドはSEQ ID NO : 12に示されている。

【 0 0 5 4 】

P2X7R遺伝子のエクソンにおける上述の変異は、単一コドンの変異を引き起こす可能性のある、例えば、化学的および/もしくは物理的手段によって、または複製複合体の誤りに引き続いて細胞の修復機構が働かないことによって起こる、点変異に起因して生じると想定されている。考えられる点変異の種類には、トランジション、すなわちプリン塩基またはピリミジン塩基の別のプリン塩基またはピリミジン塩基への変化 (例えば、アデニンからグアニン、またはチミジンからシトシン)、またはトランスバージョン、すなわちプリン塩基またはピリミジン塩基の別のピリミジン塩基またはプリン塩基への変化 (例えば、アデニンからチミジン、またはグアニンからシトシン) がある。さらに、点変異は1つまたは複数のヌクレオチドの挿入または欠失によっても引き起こされる。

20

【 0 0 5 5 】

本明細書における上記および下記のようなアミノ酸の置換を引き起こす変異は、以下の表1に示されている。

30

【 0 0 5 6 】

P2X7R遺伝子における変異の第3の群は、SEQ ID NO : 1に示されたP2X7R遺伝子のエクソン5および8にあること、およびサイレント性であること、すなわち、それらがアミノ酸変化を引き起こさないことが同定されている。詳細には、SEQ ID NO : 1に示された野生型ゲノム配列P2X7R遺伝子のエクソン5における位置32548で、シチジン残基が別のヌクレオチドによって置換される。前記ヌクレオチドは好ましくはピリミジン塩基であり、特に好ましくはチミンである。P2X7R遺伝子のエクソン5における位置32548でのシチジン残基の別のヌクレオチドによる交換は、好ましくはアミノ酸システインの別のアミノ酸残基による置換を引き起こさない。

40

【 0 0 5 7 】

SEQ ID NO : 1に示された野生型P2X7R遺伝子のエクソン8における、位置37633で、シチジン残基が別のヌクレオチド残基によって置換される。前記ヌクレオチド残基は好ましくはピリミジン塩基であり、特に好ましくはチミンである。この置換のために、位置37633で置換が起こったそれぞれのコドンによってコードされるアミノ酸アスパラギン酸 (D) が、別のアミノ酸残基によって置換されないことが好ましい。

【 0 0 5 8 】

SEQ ID NO : 1に示された野生型P2X7R遺伝子のエクソン5および8のそれぞれにおける位置32548および37633での上述の変異は、いわゆるサイレント変異を引き起こす、トリプレ

50

ットコドンの第3の位置、すなわち、ゆらぎ塩基での変異である。サイレント変異は通常、遺伝暗号の縮重性のため、すなわち64通りのトリプレットが全部で20種類の天然アミノ酸をコードするために、アミノ酸の変化を引き起こさない。しかし、前記サイレント変異は、新たに生じたコドンが生物体のコドン用法に十分に適合しないと考えられる限りにおいて、それぞれのアミノ酸をコードするコドンにおける変化を引き起こす。すなわち、新たに生じたコドンは「古い」コドンと同じ効率ではリボソームによって翻訳されない。これは、対応するポリペプチドの量の不十分さを引き起こして、異なる表現型の原因となる可能性がある。

【0059】

上記の項目(d)に記載されたP2X7R遺伝子における変異の第4の群は、SEQ ID NO:3または4に示された野生型P2X7Rアミノ酸配列の位置488~494に対応する7アミノ酸の欠失である。したがって、本発明はまた、SEQ ID NO:3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置488~494に対応するアミノ酸が欠失しているP2X7Rタンパク質をコードする核酸配列にも関する。このことは、本発明によれば、SEQ ID NO:3または4に示された対応する野生型アミノ酸配列のアミノ酸位置488~494を包含するフラグメントが欠失し、その結果、短縮したポリペプチドが生じることを意味する。このような短縮したポリペプチドの一例はSEQ ID NO:11に示されている。本明細書に記載したこのタイプの変異は、好ましくは、非機能性ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする。本発明において、SEQ ID NO:3または4に示された野生型アミノ酸配列のアミノ酸488~494を包含するフラグメントの欠失は、エクソン13における欠失の結果である。SEQ ID NO:11に示された、その結果生じるタンパク質は、SEQ ID NO:3または4に示された対応する野生型アミノ酸配列のアミノ酸488~494を欠き、このため、SEQ ID NO:11に示された欠失型ポリペプチドのアミノ酸位置494は、SEQ ID NO:3または4に示された野生型アミノ酸配列のアミノ酸位置502に対応する。好ましくは、本発明の核酸配列は、SEQ ID NO:3または4の位置488~494に対応するアミノ酸が正確に欠失しているP2X7Rポリペプチドをコードする。しかし、SEQ ID NO:3または4に示されたP2X7Rアミノ酸配列の内部のより多数またはより少数のアミノ酸が、例えば、P2X7Rをコードする核酸分子のヌクレオチドの非定型的スプライシングもしくは欠失、または誤った翻訳後プロセスのために欠失している変異体も、そのP2X7R ATP感受性イオンチャンネルが非機能性である限り、含まれる。例えば、アミノ酸位置488の前方のさらなるアミノ酸もしくはアミノ酸位置494の後方のアミノ酸が欠失していること、またはより少数のアミノ酸が欠失していることも可能である。好ましくは、少なくとも1つの、より好ましくは少なくとも2つの、さらにより好ましくは少なくとも3つの、最も好ましくは少なくとも5つのアミノ酸残基が、SEQ ID NO:3または4のアミノ酸残基488に対応する位置の上流、および/またはアミノ酸残基494に対応する位置の下流でさらに欠失している。

【0060】

しかし、SEQ ID NO:3もしくは4のアミノ酸残基488に対応する位置の上流、またはSEQ ID NO:3もしくは4のアミノ酸残基494に対応する位置の下流でさらに欠失しているアミノ酸残基は、20を上回らないこと、好ましくは15を上回らないこと、さらにより好ましくは10を上回らないこと、最も好ましくは7を上回らないことが好ましい。

【0061】

変異のもう1つの群(前記の項目(e)で言及)は、SEQ ID NO:1に示されたP2X7Rの野生型ゲノム配列のイントロン1、3、4、5、6、7、9、11または12に存在する。前記イントロンにおける前記変異は、上記の表Bおよび以下の表1に示されたような点変異である。

【0062】

表B中の「野生型における位置」欄に示された、または表1中の「多型」欄に示された各々の位置には、別のヌクレオチド残基によって置換される、各々のイントロンにおけるヌクレオチド残基の位置が示されている。したがって、「表Bの「野生型における位置」欄に示された位置に対応する表Bの「置換されるヌクレオチド」欄に示された位置に対応する表Bの「イントロン」欄に示されたヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換され

10

20

30

40

50

る」という用語は、P2X7Rをコードする配列中のヌクレオチド残基が、P2X7R配列とSEQ ID NO:1の配列との比較およびアラインメントを行った場合に、SEQ ID NO:1における位置Yに位置すると考えられることを意味する。各々の位置にあるヌクレオチドがアデニンまたはグアニンなどのプリン塩基である場合には、トランジションのためにそれが別のプリン塩基に置換されることが好ましい。例えば、アデニンがグアニンによって置換され、またはグアニンがアデニンによって置換される。各々の位置にあるヌクレオチドがピリミジン塩基である場合には、トランジションのためにそれが別のピリミジン塩基によって置換されることが好ましい。例えば、チミンがシチジンによって置換され、シチジンがチミンによって置換される。

【0063】

10

また、トランスポージョンのためにプリン塩基がピリミジン塩基によって置換されること、またはその反対も好ましい。例えば、アデニンがチミンによって置換され、グアニンがシチジンによって置換される。特に好ましくは、SEQ ID NO:1に示されたP2X7R遺伝子のイントロン1、3、4、5、6、7、9、11または12における前記ヌクレオチドは、以下の表1の「多型」欄に示されたヌクレオチドによって置換される。

【0064】

同定された変異の最後の群は、SEQ ID NO:1に示された野生型P2X7R遺伝子の3'UTRに存在する変異に関する。これらの変異は、SEQ ID NO:1に示された野生型P2X7R遺伝子のそれぞれ位置54925、55169、55170、55171または55917で見いだされた。

【0065】

20

位置54925では、グアニン残基が別のヌクレオチドによって置換されることが見いだされた。好ましくは、前記グアニン残基はピリミジン塩基によって置換され、より好ましくはプリン塩基によって、特に好ましくはアデニンによって置換される。

【0066】

位置55169では、シチジン残基が別のヌクレオチドによって、好ましくはピリミジン塩基によって置換される。より好ましくは、これはプリン塩基によって置換され、特に好ましくは、これはアデニンによって置換される。

【0067】

位置55170および55171では、アデニン残基が別のヌクレオチド残基によって、好ましくはプリン塩基によって置換される。より好ましくは、前記アデニン残基はピリミジン塩基によって置換され、特に好ましくは前記アデニン残基はシチジン残基によって置換される。また、位置55917で、シチジン残基が別のヌクレオチドによって置換されることも見いだされた。好ましくは、前記ヌクレオチド残基はプリン塩基であり、より好ましくはピリミジン塩基であり、特に好ましくはチミンである。

30

【0068】

以上から明らかかなように、同定された変異のすべてがエクソン内に位置するわけでもなく、アミノ酸配列の変化を引き起こすわけでもない。一部の変異は、5'UTR、3'UTRまたはイントロンに位置する。

【0069】

プロモーター領域およびエンハンサー領域内の多型は、転写を調節することによって遺伝子機能に影響を及ぼす可能性があり、特にそれらがDNA結合タンパク質の認識部位に位置する場合にはそうであることが知られている (Fishman et al., J. Clin. Invest. 102 (1998), 1369-1376)。本発明で用いる「多型」という用語は、単一のヌクレオチド置換、ヌクレオチド挿入およびヌクレオチド欠失のことを意味し、挿入および欠失の場合には、遺伝子の1つの位置での1つまたは複数のヌクレオチドの挿入または欠失、および発現タンパク質における対応する変化が含まれる。遺伝子の5'非翻訳領域(5'UTR)における多型は、タンパク質が翻訳される効率に影響を及ぼす可能性がある。この代表的な例はc-myc遺伝子にあり、そこではリボソーム内部進入部位を作り出すC-G SNPとc-myc翻訳の効率増大および骨髄腫との関連性がみられる (Chappell et al., Oncogene 19 (2000), 4437-4440)。3'UTRにおける多型は、RNAの二次構造を変化させることによって遺伝子機能に影響

40

50

響を及ぼす可能性、およびRNA分解を調節するタンパク質と結合するRNA中のモチーフに影響を及ぼすことによって翻訳の効率に影響を及ぼす可能性がある。イントロン内部の多型は、RNAスプライシングに影響を及ぼして異常ポリペプチドを生じさせることによって遺伝子機能に影響を及ぼす可能性がある。イントロン多型が遺伝子機能に影響を及ぼしうるもう1つの様式は、それらがイントロン内部の調節モチーフに影響を及ぼす場合である。その例には、COLIA1遺伝子のイントロン1内部のSp1結合部位多型 (Mann et al., J. Clin. Invest 107 (2001), 899-907) およびIL-1Ra遺伝子内部の反復配列多型がある (Keen et al., Bone 23 (1998), 367-371)。イントロンSNPと遺伝子機能との関係に関するさらに別の例は、Caceres and Kornblihtt, Trends Genet. 4 (2002), 186-93に記載されている。本文の52ページ第30行から53ページ第51行までの実施例4は、本出願で開示される3種類

10

【0070】

以上に記した核酸配列は、少なくとも56580ヌクレオチド、好ましくは少なくとも10000ヌクレオチド、少なくとも5000ヌクレオチド、少なくとも1000ヌクレオチド、少なくとも500ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチドを含みうる。より好ましくは、前記核酸配列は少なくとも50ヌクレオチドを含み、特に好ましくはそれらは以上に記した変異または欠失を含む少なくとも20または21ヌクレオチドを含む。最も好ましくは、このような核酸配列はSEQ ID NO: 13~51のいずれかに示された配列を有する。

【0071】

SEQ ID NO: 3または4に示されたP2X7R野生型ポリペプチドの対応するアミノ酸配列の置換を引き起こすエクソンにおける変異を含む上記の核酸配列は、SEQ ID NO: 5~10および12に示されたポリペプチドをコードする。

20

【0072】

さらに、SEQ ID NO: 3または4に示された野生型P2X7Rポリペプチドの完全長ポリペプチドと比較して短縮したポリペプチドを引き起こす欠失を含む上記の核酸配列は、SEQ ID NO: 11に示されている。

【0073】

本発明はまた、上記の核酸分子の1つとハイブリダイズし、以上に記した変異を示す核酸分子にも関する。

30

【0074】

本発明に従って用いられる「ハイブリダイズする」という用語は、ストリンジェントな条件または非ストリンジェント条件のいずれの下でのハイブリダイゼーションに関する。そのほかに指定がなければ、条件は好ましくは非ストリンジェントである。前記ハイブリダイゼーション条件は、例えば、Sambrook, Russell「分子クローニング、実験マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.(2001) ; Ausubel「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.(1989)またはHiggins and Hames (Eds.)「核酸ハイブリダイゼーション、実践的アプローチ (Nucleic acid hybridization, a practical approach)」、IRL Press Oxford, Washington DC,(1985)に記載された従来のプロトコルに従って設定することができる。条件の設定は当業者の技能の範囲に十分に含まれ、当技術分野で記載されたプロトコルに従って確定することができる。すなわち、特異的にハイブリダイズする配列のみの検出には通常、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 65°C などのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件および洗浄条件が必要と考えられる。相同配列または厳密に相補的ではない配列の検出のための非ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、 $6 \times \text{SSC}$ 、 1% SDS、 65°C に設定することができる。周知のように、プローブの長さおよび決定しようとする核酸の組成は、ハイブリダイゼーション条件のさらなるパラメーターである。ハイブリダイゼーション実験におけるバックグラウンドを抑制するために代替的なブロッキング試薬を含めること、および/またはそれを代わりに用いることにより、以上の条件の変形物を実現しうる

40

50

ことに留意されたい。典型的なブロッキング試薬には、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の商標登録された配合物が含まれる。特定のブロッキング試薬を含めることにより、適合性の問題のために上記のハイブリダイゼーション条件の変更が必要になる場合がある。ハイブリダイズする核酸分子には、上記の分子のフラグメントも含まれる。このようなフラグメントは、非機能性ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rまたはその非機能性フラグメントをコードし、しかも長さが少なくとも12ヌクレオチド、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも21ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも30ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも60ヌクレオチドである核酸配列であってよい。さらに、前述の核酸分子のいずれかとハイブリダイズする核酸分子には、これらの分子の相補的フラグメント、誘導体および対立遺伝子変種も含まれる。さらに、ハイブリダイゼーション複合体とは、相補的なG塩基とC塩基との間および相補的なA塩基とT塩基との間の水素結合の形成による、2つの核酸配列間の複合体のことを指す；これらの水素結合は塩基スタッキング相互作用によってさらに安定化することができる。2つの相補的核酸配列は逆平行の配置で水素結合を形成する。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中で形成されてもよく（例えば、ロット分析またはロット分析）、または溶液中に存在する一方の核酸配列と固体支持体（例えば、細胞などが固定された、膜、フィルター、チップ、ピンまたはスライドガラスなど）上に固定化されたもう一方の核酸配列との間で形成されてもよい。相補的または相補性という用語は、塩基対合による、許容される塩および温度の条件下でのポリヌクレオチドの天然の結合のことを指す。例えば、配列「A-G-T」は相補的配列「T-C-A」と結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、一部の核酸のみが結合するというように「部分的」でもよく、または一本鎖分子の間に全体にわたる相互性が存在する場合のように完全であってもよい。核酸鎖の間の相補性の程度は、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率および強度に大きな影響を及ぼす。これは、核酸鎖の間の結合に依存的である増幅反応では特に重要である。

10

20

【0075】

「ハイブリダイズする配列」という用語は、好ましくは、記載された変異を有するP2X7Rタンパク質をコードする上記の核酸配列に対して、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、特に好ましくは少なくとも80%、さらに特に好ましくは少なくとも90%、さらになお特に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも97%の同一性を示す配列のことを指す。さらに、「ハイブリダイズする配列」という用語は、好ましくは、以上に記したようなP2X7R変異体のアミノ酸配列に対して、少なくとも40%の配列同一性、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、特に好ましくは少なくとも80%、さらに特に好ましくは少なくとも90%、さらになお特に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも97%の同一性を有するP2X7Rタンパク質をコードする配列のことを指す。

30

【0076】

本発明によれば、2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一な」または「一致度 (percent identity)」という用語は、一定の比較域にわたって、または当技術分野で知られた配列比較アルゴリズムを用いるかもしくは手作業によるアラインメントおよび目視検査によって定められた指定領域にわたって、最大の対応関係が得られるように比較およびアラインメントを行った場合に、同じである、または同じアミノ酸残基もしくはヌクレオチドが指定された比率である（例えば、60%または65%の同一性、好ましくは70~95%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性）、2つまたはそれ以上の配列または部分配列のことを指す。例えば、60%~95%またはそれを上回る配列同一性を有する配列は、実質的に同一であるとみなされる。このような定義は、被験配列の相補物に対しても適用される。好ましくは、記載される同一性は、少なくとも約15~25アミノ酸長もしくはヌクレオチド長の領域にわたって、より好ましくは50~100アミノ酸長もしくはヌクレオチド長の領域にわたって存在する。当業者は、例えば、当技術分

40

50

野で知られたCLUSTALWコンピュータプログラム (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) またはFASTDB (Brutla, Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245)などを基盤とするアルゴリズムを用いて、配列間の同一性をいかにして決定するかを把握していると考えられる。

【0077】

FASTDBアルゴリズムは通常、計算に際して、配列中の内部の一致しない欠失または付加、すなわちギャップを考慮に入れないが、一致度の過大評価を避ける目的でこれを手入力で補正することはできる。しかし、CLUSTALWは、同一性の計算に際して、配列ギャップを考慮に入れる。当業者がBLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズム (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402)を利用することもできる。核酸配列に対するBLASTNプログラムは、デフォルトとしてワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=4、および両方の鎖の比較を用いる。アミノ酸配列に対して、BLASTPプログラムは、デフォルトとしてワード長 (W) 3および期待値 (E) 10を用いる。BLOSUM62スコア行列 (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915)は、アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=4、および両方の鎖の比較を用いる。

10

【0078】

さらに、本発明はまた、上記のハイブリダイズする分子の配列と比較して縮重性がある核酸分子配列にも関する。本発明に従って用いる場合、「遺伝暗号の結果として縮重性がある」という用語は、遺伝暗号の冗長性のために、異なるヌクレオチド配列が同一のアミノ酸をコードすることを意味する。

20

【0079】

本発明はまた、上記の変異または欠失の1つまたは複数を含む核酸分子にも関する。

【0080】

本発明による核酸分子は、対応するP2X7R ATP感受性イオンチャンネルをコードする任意の生物体に由来しうる。例えば、P2X7R ATP感受性イオンチャンネルは、さまざまな生物体、例えば、ラット (Suprenant (1996), 前記引用箇所を参照)、マウス (Genbankアクセッション番号AJ 489297)、アフリカツメガエル (Genbankアクセッション番号AJ 345114)、ニワトリ (Genbankアクセッション番号BM 491404) またはウシ (Genbankアクセッション番号AF 083073) で報告されている。1つの好ましい態様において、本発明の核酸分子は脊椎動物、好ましくは哺乳動物に由来し、さらにより好ましくは核酸分子はウサギまたはモルモットに由来し、最も好ましくは核酸はマウス、ラットまたはヒトに由来する。

30

【0081】

本発明による核酸分子は、任意の種類核酸、例えば、DNA、RNAまたはPNA (ペプチド核酸) であってよい。

【0082】

本発明の目的において、ペプチド核酸 (PNA) はポリアミド型のDNA類似体であり、アデニン、グアニン、チミンおよびシトシンに関するモノマー単位が販売されている (Perceptive Biosystems)。DNAの特定の構成要素、例えばリン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体がPNAには存在しない。Nielsen et al., Science 254: 1497 (1991); およびEgholm et al., Nature 365: 666 (1993)に開示されているように、PNAは相補的DNA鎖と特異的かつ強固に結合し、ヌクレアーゼによる分解を受けない。事実、PNAはDNAそれ自体よりもDNAに対して強固に結合する。これはおそらく、2本の鎖の間に静電反発力が生じない上に、ポリアミド骨格がより柔軟であるためと考えられる。この理由から、PNA/DNA二重鎖はDNA/DNA二重鎖よりも広範囲のストリンジェンシー条件下で結合し、このため多様なハイブリダイゼーションを行うことが容易になる。結合性が強いため、DNAの場合よりも短いプローブを用いることが可能である。さらに、PNA/DNA 15-merにおける単一のミスマッチは融解点 (T.sub.m) を8 ~ 20 低下させるが、これに対してDNA/DNA 15-mer二重鎖では4 ~ 16 であることから、PNA/DNAハイブリダイゼーションを用いる方が単一塩基ミスマッチが突き止められる可能性も高い。また、PNAに荷電基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションを低イオン強度で行い、および分析時の塩による干渉

40

50

を軽減しうることを意味する。

【0083】

DNAは例えばcDNAであってよい。1つの好ましい態様において、それはゲノムDNAである。RNAは例えばmRNAであってよい。核酸分子は天然性、合成性もしくは半合成性のいずれでもよく、またはそれはペプチド核酸 (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500) もしくはホスホリチオエートといった誘導體であってよい。さらに、核酸分子は、前述の核酸分子のいずれかを単独または組み合わせとして含む、組換え法によって作製されたキメラ核酸分子であってよい。

【0084】

好ましくは、本発明の核酸分子はベクターの部分である。このため、本発明はもう一つの態様において、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。このようなベクターは例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、または遺伝子工学などにおいて従来用いられている別のベクターであってよく、適した宿主細胞内および適した条件下での前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などのさらなる遺伝子を含みうる。

10

【0085】

本発明の核酸分子は、いくつかの市販のベクターに挿入することができる。その非制限的な例には、哺乳動物細胞との適合性のあるプラスミドベクター、例えば、pUC、pBluescript (Stratagene)、pET (Novagen)、pREP (Invitrogen)、pCRTopo (Invitrogen)、pcDNA3 (Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen)、pMC1 neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2neo、pBPV-1、pdBPVMMne0、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pUCTag、pLZD35、pLXINおよびpSIR (Clontech) およびpIRES-EGFP (Clontech) が含まれる。pBlueBac、BacPaczバキュロウイルス発現システム (CLONTECH) およびMaxBacTMバキュロウイルス発現システム、昆虫細胞およびプロトコール (Invitrogen) などのバキュロウイルスベクターが市販されており、これらを生物活性タンパク質を高収量で産生させるために用いることもできる (Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, 「バキュロウイルス発現ベクター: 実験マニュアル (Baculovirus Vectors: A Laboratory Manual)」, p.127も参照されたい)。さらに、pcDNA2などの原核生物ベクター; およびpYes2などの酵母ベクターも、本発明とともに用いるのに適した他のベクターの非制限的な例である。ベクターの改変法に関しては、Sambrook and Russel (2001), 前記引用箇所を参照されたい。ベクターは、クローニングまたは発現のための1つまたは複数の複製システムおよび遺伝システム、宿主における選択のための1つまたは複数マーカー (例えば、抗生物質耐性)、ならびに1つまたは複数の発現カセットを含むことができる。

20

30

【0086】

ベクター中に挿入されるコード配列は、標準的な方法によって合成すること、天然物から単離すること、またはハイブリッド体として調製することができる。コード配列と転写調節エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサーおよび/またはインシュレーター) との、および/または他のアミノ酸をコードする配列との連結は、確立された方法を用いて行うことができる。

40

【0087】

さらに、ベクターが本発明の核酸配列に加えて、適した宿主におけるコード領域の適切な発現を可能にする発現制御エレメントを含んでもよい。このような制御エレメントは当業者に公知であり、これにはプロモーター、翻訳開始コドン、ベクターにインサートを導入するための翻訳・挿入部位またはリボソーム内部進入部位 (IRES) が含まれうる (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476)。好ましくは、本発明の核酸分子は、真核細胞または原核細胞における発現を可能にする前記発現制御配列と機能的に結合している。この文脈において特に好ましいものは、神経細胞および/または神経組織に由来する細胞における正しい発現を可能にする制御配列である。

【0088】

50

真核細胞および原核細胞における発現を確実に行わせる制御エレメントは当業者に周知である。上述したように、それらは通常、転写の開始を確実に行わせる調節配列を含んでおり、転写の終結および転写物の安定化を確実に行わせるポリAシグナルを任意に含んでもよい。そのほかの調節エレメントには、転写エンハンサーならびに翻訳エンハンサー、ならびに/または天然に随伴するもしくは異種性のプロモーター領域が含まれうる。例えば哺乳動物宿主細胞における発現を可能にする、考えられる調節エレメントには、CMV-HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40、RSV-プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、ヒト伸長因子1 -プロモーター、CMVエンハンサー、CaM-キナーゼプロモーターまたはSV40-エンハンサーが含まれる。

【0089】

例えば神経組織および/またはそれに由来する細胞における発現のためには、ヒトニューロフィラメントLの最小プロモーター配列（Charron, J. Biol. Chem. 270 (1995), 25739-25745）のようないくつかの調節配列が当技術分野で周知である。原核細胞における発現のためには、例えば、tac-lac-プロモーター、lacUV5プロモーターまたはtrpプロモーターを含む、多数のプロモーターが記載されている。転写開始を担うエレメントに加えて、このような調節エレメントには、ポリヌクレオチドの下流にある転写終結シグナル、例えば、SV40-ポリ-A部位またはtk-ポリ-A部位も含まれうる。この文脈においては、Okayama-Berg cDNA発現ベクター-pcDV1（Pharmacia）、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3（Invitrogen、これは特に添付した実施例で用いている）、pSPORT1（GIBCO BRL）またはpGEMHE（Promega）または原核発現ベクター（例えば、gt11）などの適した発現ベクターが当技術分野で周知である。

【0090】

本発明による発現ベクターは、本発明の核酸およびタンパク質の複製を少なくとも導くことができ、好ましくは発現を導くことができる。適した複製起点には、例えば、Col E1、SV40ウイルス、M13の複製起点が含まれる。適したプロモーターには、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、lacZプロモーター、gai10プロモーターおよびオートグラフィア核多角体病ウイルス（AcMNPV）多角体プロモーターが含まれる。適した終結配列には、例えば、ウシ成長ホルモン、SV40、lacZおよびAcMNPV多角体ポリアデニル化シグナルが含まれる。選択マーカーの例には、ネオマイシン、アンピシリンおよびハイグロマイシンに対する耐性などが含まれる。特別に設計されたベクターは、細菌細胞-酵母細胞または細菌細胞-動物細胞または細菌細胞-真菌細胞または細菌細胞-無脊椎動物細胞といった、異なる宿主細胞間でのDNAシャトリングを可能にする。

【0091】

ベクターは、本発明の核酸分子に加えて、分泌シグナルをコードする核酸配列をさらに含みうる。このような配列は当業者に周知である。さらに、用いる発現系によっては、発現されたポリペプチドを細胞内区画へと導くことができるリーダー配列を本発明の核酸分子のコード配列に付加してもよく、これらは当技術分野で周知である。リーダー配列は、翻訳配列、開始配列および終結配列と、好ましくは、翻訳されたタンパク質またはその部分の分泌、特に細胞膜外への分泌を導きうるリーダー配列と、適切な様相で組み合わせられる。任意には、異種配列は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定化または精製の簡易化をもたらす、C末端またはN末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードしうる。ひとたびベクターが適切な宿主に組み入れられたところで、宿主をヌクレオチド配列の高レベル発現のために適した条件下に保ち、必要に応じて、本発明のタンパク質、抗原フラグメントまたは融合タンパク質の収集および精製をその後に行ってもよい。当然ながら、ベクターが病原生物由来の調節領域を含むこともできる。

【0092】

さらに、前記ベクターが、発現ベクター以外に、遺伝子導入および/または遺伝子ターゲティングベクターであってもよい。エクスピボまたはインピボの技法によって細胞に治療用遺伝子（例えば、ワクチン接種用）を導入することに基づく遺伝子治療は、遺伝子導入の最も重要な用途の1つである。適したベクター、ベクター系およびインピトロまたは

10

20

30

40

50

インビボでの遺伝子治療のための方法は文献に記載されており、これらは当業者に公知である；例えば、Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539；Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919；Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813、Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374；Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086；Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716；WO 94 / 29469号；WO 97 / 00957号；Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640またはVerma, *Nature* 389 (1997), 239-242およびそれらに引用された参考文献を参照されたい。本明細書で以上に記載した本発明の核酸分子およびベクターは、細胞への直接導入用に設計してもよく、またはリポソームもしくはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）を介した導入用に設計してもよい。さらに、パキウウイルス系、またはワクシニアウイルスもしくはセムリキ森林ウイルスに基づく系を、本発明の核酸分子に関する真核生物発現系として用いることもできる。組換え生産に加えて、本発明のタンパク質、融合タンパク質または抗原フラグメントの断片を、固相法を用いる直接ペプチド合成によって製造することもできる（Stewart et al. (1969) 「固相ペプチド合成 (Solid Phase Peptide Synthesis)」；Freeman Co., San Francisco；Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963), 2149-2154を参照）。インビトロでのタンパク質合成は、手作業を用いて行っても自動化によって行ってもよい。自動合成は、例えば、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City CA) を製造元により提供された指示に従って用いて行うことができる。さまざまな断片を別々に化学合成し、化学的手法を用いて組み合わせて完全長分子を製造してもよい。

10

20

【0093】

本発明はさらに、本発明のベクターによる形質転換を受けた宿主、または本発明の核酸分子を含む宿主にも関する。前記宿主は、細胞内にそれが存在すると本発明のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の発現が媒介される前記ベクターもしくはヌクレオチド配列を宿主細胞に導入すること、または、ヌクレオチド配列および/もしくはコードされるポリペプチドが宿主細胞にとって外来性である本発明によるヌクレオチド配列もしくはベクターを含めることによって作製することができる。

【0094】

「外来性である」とは、ヌクレオチド配列および/またはコードされるポリペプチドが、宿主に対して異種であること（これは異なるゲノム背景を有する細胞または生物体由来することを意味する）、または宿主に対して同種であるものの、前記ヌクレオチド配列の天然の対応物とは異なるゲノム環境に位置することのいずれかを意味する。このことは、ヌクレオチド配列が宿主に対して同種であるならば、それは前記宿主のゲノム中のその天然の位置には位置しないこと、特にそれが異なる遺伝子に取り囲まれていることを意味する。この場合、ヌクレオチド配列はそれ自体のプロモーターの制御下にあってもよく、または異種プロモーターの制御下にあってもよい。導入された核酸分子またはベクターの位置は、当業者に周知の方法、例えばサザンプロット法を用いることによって、当業者により決定可能である。宿主内に存在する本発明によるベクターまたはヌクレオチド配列は、宿主のゲノムに組み込まれてもよく、または染色体外に何らかの形態で維持されてもよい。この点に関して、本発明のヌクレオチド配列を相同組換えによる変異型遺伝子の復元または作製のために用いることも理解されるであろう。

30

40

【0095】

前記宿主は任意の原核細胞または真核細胞であってよい。適した原核/細菌細胞は、クローニングのために一般に用いられているもの、例えば、大腸菌 (*E. coli*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、霊菌 (*Serratia marcescens*) または枯草菌 (*Bacillus subtilis*) である。前記真核生物宿主は、哺乳動物細胞、両生類細胞、魚類細胞、昆虫細胞、真菌細胞、植物細胞または細菌細胞であってよい（例えば、大腸菌 HB101、DH5a、XL1 Blue、Y1090 および JM101 株）。組換え真核宿主細胞が好ましい。真核宿主細胞の例には、酵母、例えば出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス-ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) またはピキア

50

-パストリス (*Pichia pastoris*) の細胞、ヒト、ウシ、ブタ、サルおよび齧歯類に由来する細胞系、ならびに昆虫細胞 (これにはスポドプテラ-フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 昆虫細胞およびショウジョウバエ由来の昆虫細胞が非制限的に含まれる) およびゼブラフィッシュ細胞が非制限的に含まれる。使用に適し、市販されている哺乳動物種由来の細胞系には、L細胞、CV-1細胞、COS-1細胞 (ATCC CRL 1650)、COS-7細胞 (ATCC CRL 1651)、HeLa細胞 (ATCC CCL 2)、C1271 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) およびMRC-5 (ATCC CCL 171) が非制限的に含まれる。

【0096】

1つの特に好ましい態様において、前記哺乳動物細胞は、神経細胞および/または培養細胞 (特にHEK 293 (ヒト胎児腎臓) 細胞、CHO、HeLa、NIH3T3、BHK、PC12細胞のようなもの)、または好ましくは哺乳動物に由来し、より好ましくはヒトに由来する神経幹細胞である。もう1つのより好ましい態様において、前記両生類細胞は卵母細胞である。さらにより好ましい態様において、前記卵母細胞はカエル卵母細胞であり、特に好ましくはアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞である。

【0097】

1つのより好ましい態様において、本発明による宿主は非ヒトトランスジェニック生物である。前記非ヒト生物は、哺乳動物、両生類、魚類、昆虫、真菌または植物であってよい。特に好ましい非ヒトトランスジェニック動物は、ショウジョウバエ種、セノラブディティスエレガンス (*Caenorhabditis elegans*)、アフリカツメガエル種、ゼブラフィッシュ、スポドプテラ-フルギペルダ、オートグラファ-カリフォルニカ (*Autographa californica*)、マウスおよびラットである。トランスジェニック植物には、コムギ、タバコ、パセリおよびアラビドプシスが非制限的に含まれる。トランスジェニック真菌も当技術分野で周知であり、これには特に、分裂酵母および出芽酵母のような酵母、またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アカパンカビ属 (*Neurospora*) もしくは黒穂菌属 (*Ustilago*) もしくはピキア (*Pichia*) 属が含まれる。

【0098】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の核酸分子によってコードされるポリペプチドを生産するための方法であって、本発明の宿主を培養/飼育する段階、および生産されたポリペプチドを単離する段階を含む方法に関する。当技術分野には、ポリペプチドを適切な宿主に生産させるために適した方法が数多く存在する。宿主が単細胞生物または哺乳動物細胞もしくは昆虫細胞である場合には、当業者はさまざまな培養条件を顧みることができ、必要以上の作業負担を伴わずにそれらをさらに最適化することができる。確立された技法により、生産されたタンパク質を培養液または単離された (生体) 膜から採取することが好都合である。さらに、生産されたポリペプチドを宿主細胞から直接単離することもできる。前記宿主細胞は、宿主生物の一部であってもその一部に由来してもよく、例えば前記宿主細胞は動物のCNSの一部または植物の採取可能な部分であってもよい。さらに、生産されたポリペプチドを前記宿主以来の液体、例えば血液、乳または脳脊髄液から単離してもよい。

【0099】

加えて、本発明は、本発明の核酸分子によってコードされる、または本発明の方法によって生産される、SEQ ID NO: 5~12に示されたポリペプチドにも関する。本発明のポリペプチドは、したがって、微生物学的方法によって、またはトランスジェニック哺乳動物によって生産させることができる。また、本発明のポリペプチドをトランスジェニック植物から回収することも想定している。または、本発明のポリペプチドを合成的または半合成的に製造することもできる。

【0100】

例えば、Houghton Proc. Natl. Acad. Sci. USA (82) (1985), 5131-5135によって記載された固相手順などの化学合成を用いることができる。もう1つの方法は、mRNAのインビトロ翻訳である。1つの好ましい方法は、上記のような宿主細胞におけるタンパク質の組換え生産を伴う。例えば、本発明によるヌクレオチド配列のいずれか1つの全体または

10

20

30

40

50

部分を含むヌクレオチド酸配列をPCRによって合成し、発現ベクターに挿入して、宿主細胞をその発現ベクターを用いて形質転換させることができる。その後、宿主細胞を培養して所望のポリペプチドを生産させ、それを単離および精製する。タンパク質の単離および精製は、いくつかの既知の技法のいずれかを用いて達成することができる；これには例えば、非制限的には、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびアフィニティマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、逆相HPLC、調製用ディスクゲル電気泳動がある。さらに、無細胞翻訳系を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。本発明に従って用いるために適した無細胞発現系には、ウサギ網状赤血球溶解液、コムギ麦芽抽出物、イヌ臍臓ミクロソーム膜、大腸菌S30抽出物、およびTNT-システム（Promega）などの共役型転写／翻訳系が含まれる。これらの系は、コード領域および適切なプロモーターエレメントを含むクローニングベクター、DNAフラグメントまたはRNA配列を添加すると、組換えポリペプチドまたはペプチドの発現を可能にする。前述したように、タンパク質の単離／精製法では、従来の方法を用いた本発明のタンパク質の修飾が必要なことがある。例えば、ニッケルカラムによる精製が可能のように、ヒスチジンタグをタンパク質に付加することができる。その他の修飾には、活性を上昇もしくは低下させるもの、より高レベルのタンパク質生産を可能にするもの、またはタンパク質の精製を簡便にするものが考えられる。

10

20

30

40

50

【0101】

さらにもう1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に対象とする抗体であって、以下のものからなる群より選択されるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rにおける変異によって生じたおよび／または形成されたエピトープと特異的に反応する抗体に関する：

(i) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドによって特異的に提示されるエピトープであって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置117、150、186、191、270、568または578に対応するR (Arg)、G (Gly)、E (Glu)、L (Leu)、R (Arg)、I (Ile) またはR (Arg) 残基が別のアミノ酸残基によって置換されているエピトープ；および

(ii) ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのアミノ酸配列を有するポリペプチドによって特異的に提示されるエピトープであって、SEQ ID NO：3または4に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの位置488～494に対応するアミノ酸が欠失しているエピトープ。

【0102】

(i) および (ii) の好ましい態様に関連して、核酸分子に関しても上記と同じことが成り立つ。この文脈における「特異的に」という用語は、抗体が変異型P2X7Rタンパク質とは反応するが、野生型P2X7Rタンパク質とは反応しないことを意味する。好ましくは、この用語は、このような抗体が他の変異型P2X7Rタンパク質、特に本明細書に記載されたものと結合しないことも意味する。抗体が以上に定義したように特異的に反応するか否かは、特に、前記抗体と野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7R（またはそのサブユニットまたはフラグメント）との反応を前記抗体と本発明の変異型P2X7Rポリペプチドとの反応と比較することにより、容易に検証することができる。

【0103】

本発明の抗体は、例えば、ポリクローナル性でもモノクローナル性でもありうる。「抗体」という用語には、結合特異性を依然として保っているその誘導体またはフラグメントも含まれる。抗体の生産のための技法は当技術分野で周知であり、例えば、Harlow and Lane「抗体、実験マニュアル (Antibodies, Laboratory Manual)」、CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載されている。これらの抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫沈降および免疫局在化のため、ならびにこのようなポリペプチドの存在のモニタリングのために用いることができる（例えば、組換え生物における、または診断において）。それらをまた、本発明によるタンパク質と相互作用する化合物の同定のために用いることもできる（本明細書の以下に述べるように）。例えば、BIAcoreシステムに用いられて

いるような表面プラズモン共鳴を、本発明のポリペプチドのエピトープと結合するファージ抗体の効率を高める目的で用いることができる (Schier, Human Antibodies ハイブリドーマ 7 (1996), 97-105 ; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。

【0104】

本発明はさらに、キメラ抗体、一本鎖抗体およびヒト化抗体、さらには、特にFabフラグメントのような抗体フラグメントも含む。抗体フラグメントまたは誘導体には、F(ab')₂フラグメント、FvフラグメントまたはscFvフラグメントがさらに含まれる；例えば、Harlow and Lane, 前記引用箇所を参照のこと。さまざまな手順が当技術分野で周知であり、これらをこの種の抗体および/またはフラグメントの生産のために用いることができる。すなわち、ペプチド模倣の手法によって(抗体)誘導体を製造することができる。さらに、一本鎖抗体の生産に関して記載された技法(特に米国特許第4,946,778号を参照)を、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体の生産のために適合させることができる。また、トランスジェニック動物を用いて本発明のポリペプチドに対するヒト化抗体を発現させることもできる。最も好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体の調製のためには、連続継代細胞系培養物により産生される抗体が得られる任意の技法を用いることができる。このような技法の例には、ハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 495-497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72)およびヒトモノクローナル抗体の生産のためのEBVハイブリドーマ法(Cole et al., 「モノクローナル抗体および癌治療(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)」、Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96)が含まれる。一本鎖抗体の生産を記載している技法(例えば、米国特許第4,946,778号)は、上記の免疫原性ポリペプチドに対する一本鎖抗体の生産のために適合させることができる。さらに、トランスジェニックマウスを用いて、前記免疫原性ポリペプチドを対象とするヒト化抗体を発現させてもよい。抗体/抗体構築物ならびに抗体フラグメントまたは誘導体が本発明に従って用いられること、または細胞内で発現させうることが特に好ましい。これは特に、対応するタンパク質性分子の直接注入により、またはそれをコードする核酸分子の注入により、実現することができる。さらに、遺伝子治療アプローチも想定されている。したがって、本発明の文脈において、「抗体分子」という用語は、完全な免疫グロブリン分子のほか、このような免疫グロブリン分子の部分にも関する。さらに、この用語は、以上に考察したように、キメラ抗体およびヒト化抗体のような修飾および/または改変された抗体分子にも関する。この用語はまた、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、ならびに組換え的または合成的に生成/合成された抗体にも関する。この用語はまた、完全な抗体のほか、分離された軽鎖および重鎖、Fab、Fab/c、Fv、Fab'、F(ab')₂のようなその抗体フラグメントにも関する。「抗体分子」という用語はまた、二価抗体、および一本鎖Fvs(scFv)または抗体融合タンパク質のような抗体構築物にも関する。本発明の文脈において、「抗体」という用語は、細胞で発現されうる抗体構築物、例えば、特にウイルスまたはベクターを介したトランスフェクションおよび/または形質導入を行える抗体構築物を含むと想定されている。このような抗体構築物は本発明のポリペプチドを特異的に認識することが特に想定される。さらに、前記抗体構築物が遺伝子治療アプローチに用いられることも想定されている。

【0105】

本発明はまた、本発明によるポリペプチドと特異的に結合するアダプターであって、本発明のポリペプチドのエピトープと反応するアダプターにも関する。本発明はさらに、本発明による対応する核酸分子を特異的に対象とするアダプターにも関する。

【0106】

本発明によれば、「アダプター」という用語は、標的分子と結合する核酸分子のことを意味する。アダプターには一般に、RNA、一本鎖DNA、修飾RNAまたは修飾DNA分子が含まれる。アダプターの調製は当技術分野で周知であり、これには特に、結合側を同定するためのコンビナトリアルRNAライブラリーの使用が含まれうる(Gold Ann. Rev. Biochem. 64 (1995), 763-797)。

10

20

30

40

50

【0107】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子を特異的に増幅しうるプライマーまたはプライマー対にも関する。「プライマー」という用語は、本発明で用いられる場合、本出願の核酸分子をアニーリングさせることができ、それによって増幅の出発点としての役割を果たしうる一本鎖核酸分子のことを意味する。前記用語には、本発明の核酸分子の鎖の一方の領域に対して相補的なオリゴリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドも含まれる。本発明によれば、「プライマー対」という用語は、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅が可能ないように、核酸分子の相補的領域に対して、互いに向かって逆方向にあるプライマー対のことを意味する。

【0108】

「増幅すること」という用語は、指定されたヌクレオチド配列の反復複製のことを指し、これは前記指定ヌクレオチド配列の量の増加をもたらすとともに、多数の同一または本質的に同一な（すなわち、同一性が少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、さらにより好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも99.5%、例えば99.9%である）核酸分子またはその部分の生成を可能にする。この種の方法は当技術分野で十分に確立されている；Sambrook et al.「分子クローニング、実験マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）」、2nd edition 1989, CSH Press, Cold Spring Harborを参照のこと。これらには、好ましい増幅法の例をいくつか挙げると、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびその変法、リガーゼ連鎖反応（LCR）がある。

【0109】

プライマーの文脈において用いる場合、「特異的に」という用語は、本明細書に上述した核酸分子のみが増幅され、SEQ ID NO:1に示された野生型P2X7R ATP感受性受容体をコードする核酸分子は増幅されないことを意味する。したがって、本発明によるプライマーは、好ましくは、この分子に特有であって野生型P2X7Rコード配列には存在しない本発明の核酸分子の領域と結合するプライマーであり、すなわち、本プライマーは上記の変異のいずれかが起こる領域と結合する。本発明によるプライマー対に関しては、対のプライマーの一方が上記の意味で特異的であることも、または対のプライマーの両方が特異的であることも可能である。いずれの場合にも、このようなプライマー対の使用により、野生型P2X7Rコード配列ではなく、本明細書に上述した本発明の変異体の特異的に増幅することが可能になると考えられる。

【0110】

プライマーの3'-OH末端は、ポリメラーゼによって用いられ、ヌクレオチドの連続取り込みによって伸長される。本発明のプライマーまたはプライマー対は、例えば、当業者に公知の方法に従った、テンプレートRNAに対するプライマー伸長実験に用いることができる。好ましくは、本発明のプライマーまたはプライマー対は、テンプレートRNAまたはテンプレートDNAに対する、好ましくはcDNAまたはゲノムDNAに対する増幅反応のために用いられる。「テンプレートDNA」または「テンプレートRNA」という用語は、以上に定義した標的ヌクレオチド配列を含む、任意の源またはヌクレオチド組成を有するDNA分子もしくはRNA分子またはそれらのフラグメントのことを指す。プライマーまたはプライマー対を、当技術分野で知られたハイブリダイゼーション実験のために用いることもできる。好ましくは、プライマーまたはプライマー対は、本発明の核酸分子の配列に対応する配列を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応に用いられることが知られている。プライマーの長さは種々のパラメーターに由来することが知られている（Gillam, Gene 8 (1979), 81-97 ; Innis, 「PCRプロトコール：方法および応用の手引き（PCR Protocols: A guide to methods and applications）」、Academic Press, San Diego, USA (1990)）。好ましくは、プライマーは、標的ヌクレオチド配列の特定領域のみとハイブリダイズまたは結合すべきである。標的ヌクレオチド配列の1つの領域のみと統計的にハイブリダイズするプライマーの長さは、以下の式によって算出可能である： $(1/4)^x$ （ここでxはプライマーの長さである）。例えば、37kbの配列上に1回のみ統計的に結合するためにはヘプタヌクレオチドまたはオクタヌクレオチドで十分であると考えられる。しかし、相補的テンプレート

10

20

30

40

50

鎖と完全一致するプライマーの長さは少なくとも9塩基対でなければならず、そうでなければ安定な二本鎖は生じないことが知られている (Goulian, Biochemistry 12 (1973), 2893-2901)。また、本発明の核酸分子を増幅しうるプライマーを設計するためにコンピュータに基づくアルゴリズムを用いることも想定されている。好ましくは、本発明のプライマーは、少なくとも10ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも12ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、特に好ましくは少なくとも18ヌクレオチド長、さらになお特に好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも25ヌクレオチド長である。しかし、本発明を、さらに短いまたは長いプライマーを用いて実施することもできる。

【0111】

また、プライマーまたはプライマー対を標識することも想定されている。標識は例えば、³²P、³³Pまたは³⁵Sなどの放射性標識であってよい。本発明の1つの好ましい態様において、標識は非放射性標識、例えば、ジゴキシゲニン、ピオチンおよび蛍光色素または色素である。

【0112】

もう1つの好ましい態様において、前記プライマーはSEQ ID NO: 52~111からなる群より選択される。

【0113】

さらにもう1つの態様において、本発明は、本発明の核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体、アダプターおよび/またはプライマーもしくはプライマー対を含む組成物に関する。「組成物」という用語は、本発明に従って用いる場合、本発明の核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体および/またはプライマーもしくはプライマー対を少なくとも1つ含む組成物のことを指す。これは、任意には、本発明の構成要素の特性を改変し、それによって例えば、それらの機能を抑制、ブロック、調節および/または活性化することができる、神経保護作用、向知性作用、抗うつ作用および/または細胞保護作用（これについては以下でも述べる）を有するさらなる分子を含んでもよい。組成物は固体、液体または気体の形態であってよく、特に粉末、錠剤、溶液またはエアロゾルの形態であってよい。

【0114】

1つの好ましい態様において、本発明による組成物は診断用組成物であり、これは任意に、検出のために適した手段をさらに含む。上記のように、本発明は、P2X7Rタンパク質における変異が情動障害と結びついているという驚くべき発見に基づく。このため、この知識により、今や、情動障害を容易なやり方で診断することが可能である。診断用組成物は、本発明の前述の化合物を少なくとも1つ含む。診断用組成物は特に、本発明の核酸および/またはポリペプチドの存在および/または発現を判定するための方法のために用いることができる。これは例えば、個体の遺伝物質における対応する遺伝子の存在または対応するmRNAの存在を検出することによって行うことができ、これは前記個体由来の細胞からのDNAまたはRNAの単離、そのようにして得られたDNAまたはRNAを上記の核酸プローブとハイブリダイズ条件下で接触させること、およびプローブとハイブリダイズしたmRNAの存在を検出することを含む。または、診断用組成物を、PCRによって本発明の核酸分子の存在を検出するために用いることもできる。さらに、本発明のポリペプチドを、当技術分野で公知の方法を用いて検出することもでき、これには特に、RIA、FIA、ELISA、FACSまたはウエスタンブロット法などの免疫学的方法が含まれる。

【0115】

さらに、本発明の診断用組成物は、特に、本発明のポリペプチドの発現と関連性のある疾患の有病率、発症または進行を検出するのに有用な可能性がある。したがって、本発明の診断用組成物は、特に、本明細書で以上に定義した情動障害の有病率、発症または疾患状態を評価するために用いることができる。また、本発明の診断用組成物は疾患の病期の識別にも有用な可能性があると考えている。

【0116】

10

20

30

40

50

診断用組成物は、任意に、検出のために適した手段を含む。例えば、上記の核酸分子、ベクター、宿主、抗体、アプタマー、ポリペプチドは、それらを液相中でまたは固相担体に結合させて利用するイムノアッセイにおける使用のために適している。よく知られた担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリビニルイオン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが含まれる。本発明の目的において、担体の性質は可溶性または不溶性のいずれでもありうる。

【0117】

固相担体は当業者に公知であり、これにはポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンのチップおよび表面、ニトロセルロース片、膜、シート、デュラサイト、および反応トレイのウェル、プラスチックチューブまたは他の試験管の壁が含まれうる。核酸分子、ベクター、宿主、抗体、アプタマー、ポリペプチドなどを固相上に固定化するために適した方法には、イオン性、疎水性、共有結合性の相互作用または(化学的)架橋などが非制限的に含まれる。本発明の前記化合物を用いるイムノアッセイの例には、直接的または間接的な形式での、競合的および非競合的なイムノアッセイがある。一般的に用いられる検出アッセイには、放射性同位体法または非放射性同位体法が含まれうる。このようなイムノアッセイの例には、ラジオイムノアッセイ(RIA)、サンドイッチアッセイ(免疫測定アッセイ)およびノーザンまたはサザンブロットアッセイがある。さらに、これらの検出方法には、特に、IRMA(免疫放射測定アッセイ)、EIA(酵素免疫アッセイ)、ELISA(固相酵素免疫アッセイ)、FIA(蛍光免疫アッセイ)およびCLIA(化学発光免疫アッセイ)が含まれる。さらに、本発明の診断用化合物を、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)アッセイのような技法に用いることもできる。

【0118】

適切な標識および標識化のための方法は当業者に公知である。本発明に用いる標識のタイプの例には、特に、蛍光色素(フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドなど)、酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、放射性同位体(^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S または ^{125}I など)、ビオチン、ジゴキシゲニン、コロイド金属、化学発光性または生物発光性化合物(ジオキセタン、ルミノールまたはアクリジニウムなど)が含まれる。

【0119】

さまざまな技法を生体分子の標識のために用いることができ、それらは当業者に周知であって本発明の範囲に含まれると考えられ、これには特に、酵素またはビオチニル基の共有結合、リン酸化、ビオチン化、ランダムプライミング法、ニックトランスレーション、末端標識(ターミナルトランスフェラーゼを用いる)が含まれる。このような技法は、例えば、Tiissen, 「酵素免疫アッセイの実践および理論(Practice and theory of enzyme immunoassays)」、Burden and von Knippenburg (Eds), Volume 15 (1985); 「分子生物学における基本的方法(Basic methods in molecular biology)」、Davis LG, Dimer MD, Battey Elsevier (1990); Mayer (Eds) 「細胞生物学および分子生物学における免疫化学的方法(Immunochemical methods in cell and molecular biology)」、Academic Press, London (1987); または「酵素学における方法(Methods in Enzymology)」シリーズ、Academic Press, Incに記載されている。

【0120】

検出方法には、オートラジオグラフィ、蛍光顕微鏡検査、直接的および間接的酵素反応などが非制限的に含まれる。

【0121】

前記診断用組成物は、生物試料および/もしくは医学試料における本発明の核酸分子の存在および/もしくは存在量を検出するための、ならびに/またはこのような核酸分子の発現を検出するための方法のために用いることができる(例えば、mRNAまたは発現されたポリペプチドを測定することにより)。さらに、前記診断用組成物を、特にP2X7R ATP感

10

20

30

40

50

受性イオンチャンネルに対する特異的拮抗薬または作動薬の検出のために（本明細書の以下を参照）、本発明の方法に用いることもできる。

【0122】

さらにもう1つの態様において、本発明は、情動障害または情動障害に対する感受性を診断する方法であって、個体から入手した試料において、前記個体の細胞で発現されたP2X7Rタンパク質が非機能性であるか否か、野生型P2X7Rタンパク質と比較してATPゲート機構の変化を示すか否か、または非罹患個体のP2X7Rタンパク質レベルと比較して過剰発現もしくは低発現されるか否かを判定する段階を含む方法を提供する。

【0123】

「P2X7Rタンパク質レベルと比較して過剰発現または低発現される」という用語は、本発明の文脈において、P2X7Rタンパク質レベルが健常個体、情動障害に罹患していない個体のP2X7Rレベルよりも高いまたは低いことを意味する。過剰発現は例えば、RNA-ポリメラーゼIIの活性上昇に起因する転写速度増大によって引き起こされるP2X7R mRNAの量の増加の結果として起こる。mRNAのその量は翻訳の増大を引き起こし、そのためP2X7Rのタンパク質レベルの上昇を引き起こすと考えられる。また、P2X7Rタンパク質の量の増加が、タンパク質の安定性の増大によって引き起こされる可能性もある。P2X7Rタンパク質の低発現は、P2X7R遺伝子の転写速度が低く、そのために不十分な量のP2X7R mRNAから少量のP2X7Rタンパク質しか生じないことに起因する可能性がある。もう1つの理由は、P2X7Rタンパク質が不安定であり、そのため野生型タンパク質レベルと同程度の量では存在しないというものである。

【0124】

P2X7Rタンパク質の低発現または過剰発現は、当業者に周知の方法によって判定することができる。これらには、mRNAの量を決定するための方法、またはタンパク質の量および/もしくは活性を決定するための方法が非制限的に含まれる。その例には、ノーザンブロット分析または免疫を利用する技法、例えばウエスタンブロット法などがある。

【0125】

「非機能的」とは、P2X7Rタンパク質が、本明細書に上述した野生型P2X7Rタンパク質によって示される少なくとも1つの機能特性を喪失していることを意味する。好ましくは、「非機能的」は、P2X7Rタンパク質がもはやチャンネルとしては機能しないことを意味する。非機能性は例えば、個体に存在する一方の対立遺伝子が、非機能性二量体を生じるP2X7Rタンパク質をコードする（ドミナントネガティブ変異）という事実によって引き起こされる。個体におけるP2X7Rタンパク質が機能的であるか非機能的であるかは、以上の本明細書および実施例に記載された方法によって判定することができる。

【0126】

「変化したATPゲート機構」とは、それぞれのP2X7Rタンパク質が野生型P2X7Rタンパク質とは異なる様式でATPと反応することを意味する。これは、添付の実施例に記載したように、または本明細書で以上に述べたようにして判定することができる。

【0127】

診断の状況においては、P2X7Rの活性だけでなく、発現の量にも診断的な価値がある可能性がある。例えば、ある多型がRNA安定性または翻訳効率に影響を及ぼすならば、これは海馬だけでなく血中においてもP2X7タンパク質の発現低下を引き起こす可能性がある。したがって、血液細胞におけるウエスタンブロット法によって検出されるP2X7がより少量であることをうつ病と関連づけられる可能性も推測しうる。

【0128】

本発明のもう1つの面は、情動障害または情動障害に対する感受性を診断するための方法であって、個体から入手した試料において、P2X7R遺伝子配列またはそのコードされるタンパク質が、野生型P2X7R配列と比較して変異を含むか否かを判定する段階を含む方法である。

【0129】

本発明の1つの好ましい態様は、変異が、以上に定義したP2X7R配列における変異、なら

10

20

30

40

50

びに/または、「P2X7Rの領域」欄に置換もしくは欠失が起こるP2X7Rゲノムヌクレオチド配列の領域を、表Cの「ヌクレオチド」欄に別のヌクレオチドによって置換されるヌクレオチドもしくは欠失しているヌクレオチドを、および表Cの「野生型における位置」欄にSEQ ID NO:1に示された野生型ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rのヌクレオチド配列中の対応する位置を示している、以下の表Cより選択されるヌクレオチド置換もしくは欠失であるような方法である。

【表C】

P2X7R の領域	ヌクレオチド	野生型における位置
5'UTR	T	362
5'UTR	T	532
5'UTR	A	1100
5'UTR	A	1122
5'UTR	C	1171
5'UTR	T	1351
5'UTR	G	1702
5'UTR	T	1731
5'UTR	C	1860
5'UTR	C	2162
5'UTR	C	2238
5'UTR	A	2373
5'UTR	G	2569
5'UTR	G	2702
イントロン1	G	3166
イントロン1	C	24778
イントロン1	C	24830
エクソン2	T	24942
エクソン3	C	26188
エクソン3	A	26308
エクソン3	G	26422
イントロン4	G	32394
イントロン4	T	32434
エクソン5	G	32493
エクソン5	G	32506

10

20

30

エクソン 5	C	32507
エクソン 5	C	32548
イントロン 5	A	32783
イントロン 5	T	35309
イントロン 5	C	35374
イントロン 5	A	35378
エクソン 6	G	35438
エクソン 6	T	35454
イントロン 6	T	35549
イントロン 6	G	35641
イントロン 6	A	35725
イントロン 6	T	36001
イントロン 6	A	36064
イントロン 6	GTTT の欠失	36091から36094まで
イントロン 6	C	36108
イントロン 7	C	36374
イントロン 7	G	36378
イントロン 7	T	36387
イントロン 7	G	36398
イントロン 7	C	37439
イントロン 7	T	37513
エクソン 8	C	37604
エクソン 8	G	37605
エクソン 8	G	37623
エクソン 8	C	37633
イントロン 9	C	47214
エクソン 11	G	47383
エクソン 11	C	47411
イントロン 11	T	47563
イントロン 12	C	54307
イントロン 12	G	54308
エクソン 13	C	54399
エクソン 13	A	54480
エクソン 13	C	54523
エクソン 13	CCCTGAGAGCCACAGGTGCCT の欠失	54562 から 54582 まで
エクソン 13	A	54588
エクソン 13	C	54664
エクソン 13	G	54703
エクソン 13	A	54804
エクソン 13	G	54834
エクソン 13	G	54847
3'UTR	G	54925
3'UTR	C	55169
3'UTR	A	55170
3'UTR	A	55171
3'UTR	C	55917

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

以上に指摘したように、別のヌクレオチドによって置換される各々のヌクレオチドがプリン塩基である場合には、それは別のプリン塩基によって置換されることが好ましい。それがピリミジン塩基である場合には、それは別のピリミジン塩基によって置換されること

が好ましい。また、プリン塩基がピリミジン塩基によって置換されること、およびピリミジン塩基がプリン塩基によって置換されることも好ましい。最も好ましくは、表Cに示されたヌクレオチドは、以下の表12中の各々の位置に示されたヌクレオチドによって置換される（実施例3参照）。

【0131】

1つの好ましい態様において、本発明は、ATP感受性イオンチャンネルP2X7R遺伝子における変異の存在が、本明細書の以下および添付した実施例に記載したようにPCR、免疫学的方法および/または電気生理学的方法によって判定される方法に用いるために設計された診断用組成物に関する。さらに、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rにおける変異の存在を上記のように判定することも可能である。

10

【0132】

さらにもう1つの面において、本発明は、情動障害の検出のための診断用組成物の調製を目的とする、本発明の核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体、アダプターおよび/またはプライマーもしくはプライマー対の用法に関する。

【0133】

また、本発明が、個体の情動障害を診断する方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からDNAを単離する段階；

(b) P2X7R遺伝子のヌクレオチド組成のすべてまたは部分を決定する段階；および

(c) P2X7Rの前記ヌクレオチド組成を1つまたは複数の多型、変異または対立遺伝子多様性に関して分析する段階、

20

を含む方法に関することも想定されている。

【0134】

「遺伝子」という用語は、プロモーター配列、エンハンサー配列、イントロン配列、エクソン配列、コード領域、5'非翻訳領域(5'UTR)、3'非翻訳領域(3'UTR)およびスプライスバリエーションを含む、タンパク質の産生にかかわるヌクレオチド配列のことを意味する。

【0135】

記載した方法の1つの好ましい態様において、個体は哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。さらに、細胞は好ましくは皮膚、血液、尿または脳脊髄液に由来する。

【0136】

本発明の方法は、P2X7R遺伝子に対応する遺伝マーカーの組成に従った情動障害の診断を可能にする。添付の実施例によって示されているように、P2X7Rにおける多型は情動障害に罹患した患者と遺伝的な結びつきがある。

30

【0137】

本発明のこの態様によれば、情動障害の診断は、例えば、個体から細胞を単離すること、および前記細胞からゲノムDNAを単離することによって行いうる。このような細胞は体液、皮膚、毛、生検試料およびその他の源から収集することができる。血液、尿および脳脊髄液などの体液からの細胞の収集および分析は当技術分野で周知である；例えば、Roda k, 「血液学：臨床的原理および応用 (Haematology: Clinical Principles & Applications)」、second ed., WB Saunders Co, 2002; Brunzel, 「尿・体液分析の基礎 (Fundamentals of Urine and Body Fluids Analysis)」、WB Saunders Co, 1994; Herndon and Brumback (Ed.), 「脳脊髄液 (Cerebrospinal Fluid)」、Kluwer Academic Pub., 1989を参照されたい。さらに、DNA単離のための方法は当技術分野で詳細に記載されている；例えば、Sambrook et al., 「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001を参照されたい。

40

【0138】

ひとたびDNAが単離されれば、遺伝物質をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅する目的で、P2X7R遺伝子座にまたがる種々のオリゴヌクレオチドプライマーを設計することもできる。前記オリゴヌクレオチドプライマーの設計、合成、生産のため、およびPCR

50

増幅を行うための従来の方法は標準的な教本に記載されており、例えば、Agrawal(Ed.), 「オリゴヌクレオチドおよび類似体に関するプロトコール：合成および特性 (Protocols for Oligonucleotide and Analogs: Synthesis and Properties) (Methods in Molecular Biology, 20)」、Humana Press, 1993; Innis et al.(Ed.), 「PCRの応用：機能的ゲノム学のためのプロトコール (PCR Applications: Protocols for Functional Genomics)」、Academic Press, 1999; Chen and Janes(Ed.), 「PCRクローニングプロトコール：分子クローニングから遺伝学へ (PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic)」、2nd edition, Humana Press, 2002を参照されたい。P2X7R多型の検出用のプライマーは、SEQ ID NO: 52~SEQ ID NO: 111にも提示されているが、これらには限定されない。ひとたびDNAが増幅されれば、シーケンシング法によってヌクレオチド構造を分析し、正常なP2X7R DNAと比較することができる。シーケンシングは分子生物学の当業者が手作業で行ってもよく、または自動シーケンシング装置によって行ってもよい。これらの手順は当技術分野で一般的であり、例えば、Adams et al.(Ed.), 「自動化DNAシーケンシングおよび分析 (Automated DNA Sequencing and Analysis)」、Academic Press, 1994; Alphey, 「DNAシーケンシング：実験方法からバイオインフォマティクスまで (DNA Sequencing: From Experimental Methods to Bioinformatics)」、Springer Verlag Publishing, 1997を参照されたい。

10

【0139】

P2X7Rにおける多型の検出および分析を、増幅不応性変異システム (ARMSTM)、増幅不応性変異システム-線状伸長 (ALEXTM)、一本鎖DNA高次構造多型 (SSCP)、ヘテロ二本鎖分析、PCR-SSCP、自動DNAシーケンサーにおける蛍光SSCP、変性勾配ゲル電気泳動、RNアーゼ保護アッセイ、配列特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによる変異の検出、化学的切断法、酵素ミスマッチ切断法、切断フラグメント長法、DNAチップ上での対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、および当技術分野で公知のその他のこのような方法を用いて行うこともでき、これらについては例えば、Nollau et al, Clin. Chem. 43 (1997), 1114-1128; Burczak and Mardis (Ed.), 「多型の検出および分析の技法 (Polymorphism Detection & Analysis Techniques)」、Eaton Pub Co, 2000; Cotton et al.(Ed.), 「変異検出：実践的アプローチ (Mutation Detection: A Practical Approach)」、Irl Press, 1998; Taylor (Ed.), 「DNAにおける変異および多型の検出のための実験方法 (Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA)」、CRC Press, 1997を参照されたい。

20

30

【0140】

本発明はまた、個体における情動障害を診断する方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からRNAを単離する段階；

(b) RNAをcDNAに変換する段階；

(c) そのようにして得られたcDNAのヌクレオチド組成のすべてまたは部分を決定する段階；および

(d) 前記ヌクレオチド組成を1つまたは複数の多型、変異または対立遺伝子多様性に関して分析する段階、

を含む方法にも関する。

40

【0141】

好ましい態様に関しては、すでに以上に述べたものと同じことが成り立つ。

【0142】

P2X7R RNAにおける多型の検出および分析は、上記の方法に従って行うことができる。

【0143】

本発明はまた、個体における情動障害を診断するための方法であって、

(a) 個体から入手した細胞からRNAまたはタンパク質を単離する段階；

(b) P2X7R RNAまたはタンパク質のレベルを決定する段階；および

(c) P2X7R RNAまたはタンパク質のレベルを、情動障害に罹患していない正常個体による対応するレベルと比較する段階、

50

を含む方法にも関する。

【0144】

好ましい態様に関しては、すでに以上に述べたものと同じことが適用される。

【0145】

添付の実施例によって示されているように、P2X7Rの発現またはタンパク質レベルと情動障害との間には関連性が存在する。本発明のこの態様およびその他の態様は、本明細書の開示に鑑みて、当業者には容易に想起されると考えられる。

【0146】

本発明のもう1つの面によれば、ヒトP2X7R遺伝子の少なくとも20塩基を含み、しかも以下のいずれかより選択される変異または多型を含むポリヌクレオチドが提供される：

10

(表1) ヒトP2X7Rにおける新規多型

P2X7 における領域	多型	タンパク質の 改変
5'UTR	362 T-C	
5'UTR	532 T-G	
5'UTR	1100 A-G	
5'UTR	1122 A-G	
5'UTR	1171 C-G	
5'UTR	1702 G-A	
イントロン01	3166 G-C	
イントロン01	24778 C-T	
イントロン01	24830 6C-T	
エクソン03	26188 C-T	Arg117Trp

20

イントロン03	26308 A-G	
イントロン03	26422 G-A	
イントロン04	32394 G-A	
イントロン04	32434 T-C	
エクソン05	32493 G-A	Gly150Arg
エクソン05	32548 C-T	サイレント Cys168
イントロン05	32783 A-C	
エクソン06	35438 G-A	Glu186Lys
エクソン06	35454 T-C	Leu191Pro
イントロン06	35641 G-C	
イントロン06	35725 A-C	
イントロン06	36001 T-G	
イントロン07	36378 G-A	
イントロン07	36387 T-A	
イントロン07	36398 G-C	
エクソン08	37604 C-T	Arg270Cys
エクソン08	37633 C-T	サイレント Asp279
イントロン09	47214 C-T	
イントロン11	47563 T-C	
イントロン12	54307 C-T	
イントロン12	54308 G-A	
エクソン13	54562-54582 CCCTGAGA GCCACAGGTGCCT の欠失	7aa の欠失 488 から 494 まで (PESHRL)
エクソン13	54804 A-T	Ile568Asn
エクソン13	54834 G-A	Arg578Gln
3'UTR	55169 C-A	
3'UTR	55170 A-C	
3'UTR	55171 A-C	
3'UTR	55917 C-T	
3'UTR	54925 G-A	

10

20

30

40

【 0 1 4 7 】

これらの多型は観察された位置および多様性を記載している。多型の位置および番号は、SEQ ID No 1に定められたヒトP2X7R遺伝子に対応する。SNP増幅およびシーケンシングのために用いたプライマーは表1aに示されており、SEQ ID NO : 52 ~ SEQ ID NO : 111に列記されている。

(表1a) SNP増幅およびシーケンシングのためのプライマー配列

プライマーの名称	向き	配列	開始	終了
P2RX7_01.for	センス	cgtaggacttggcgcttct	2785	2803
P2RX7_01.rev	アンチセンス	gagcacgtctcagattcgaaa	3224	3244
P2RX7_02.for	センス	ccatgaggcaggtatgactattc	24665	24687
P2RX7_02.rev	アンチセンス	ctcctggatctcaccagtt	25168	25187
P2RX7_03.for	センス	ctcgtccagctttgatattaagc	25966	25988
P2RX7_03.rev	アンチセンス	ggccctagtgtctagaaccaga	26426	26447
P2RX7_04.for	センス	attcatccgtcagtgcc	30794	30811
P2RX7_04.rev	アンチセンス	gccatgtgaattttctaccgat	31277	31298
P2RX7_05.for	センス	ttcgttggtggttaggatggg	32314	32333
P2RX7_05.rev	アンチセンス	caaggatgctcagggtagtagc	32805	32826
P2RX7_06.for	センス	cactagggttgctgtatccatttct	35277	35301
P2RX7_06.rev	アンチセンス	gcaactgtgtgagagcttgg	35731	35750
P2RX7_07.for	センス	tcaaccctggtccagtggtg	35950	35968
P2RX7_07.rev	アンチセンス	caccaagtagctctcactcataagg	36424	36448
P2RX7_08.for	センス	caataacactgtgctgagttaggt	37380	37403
P2RX7_08.rev	アンチセンス	catcttgttgcccttggaaacc	37750	37770
P2RX7_09.for	センス	gtgagtggtaatcctgctactgc	45321	45343
P2RX7_09.rev	アンチセンス	aggcccactcctgtactcg	45743	45761
P2RX7_10_11.for	センス	ccaagtcacagcatgaggc	47119	47137
P2RX7_10_11.rev	アンチセンス	accagcgcagctatccac	47632	47649
P2RX7_12.for	センス	aagcatgggggttccatttc	50252	50268
P2RX7_12.rev	アンチセンス	gcataaaagggactcctgctagta	50691	50714
P2RX7_13a.for	センス	gcttacagaacacatgcatgg	54232	54252
P2RX7_13a.rev	アンチセンス	gcacctgtaggcacagtgc	54739	54757
P2RX7_13b.for	センス	atcaccacctcagagctgttc	54620	54640
P2RX7_13b.rev	アンチセンス	gttaacatggctactgcagcc	55203	55223
P2XR7_13d.for	センス	gcttagaaaggaggcgactcc	54484	54504
P2XR7_Pro13.for	センス	ttgtgacatttgcaaggctgcc	2617	2638
P2XR7_Pro7.rev	アンチセンス	tctgaagctctgctcctgag	1955	1974
P2XR7_Pro8.rev	アンチセンス	ctcaccttctggcttccagt	1611	1630
P2XR7_Pro9.for	センス	cttaccactcccaggactaa	1496	1515
P2XR7_Pro10.for	センス	gtctgcctggtcactgccat	1149	1168
P2XR7_Pro1.for	センス	cagagaccttcagaaacttcg	1841	1861
P2XR7_Pro2.rev	アンチセンス	agatcaccagggacacagtg	2261	2280
P2XR7_Pro3.for	センス	ctcaactccactttcctcgg	2133	2152
P2XR7_Pro4.rev	アンチセンス	cctttcacttttttggctctcatg	2655	2677
P2XR7_Pro5.for	センス	gggagaattctgaaaatgcc	2691	2711
P2XR7_Pro6.rev	アンチセンス	ggaccagagctctactcttc	2951	2970
P2XR7_Pro11.for	センス	aggctcatagatcgacctgcc	2296	2315
P2XR7_Pro12.rev	アンチセンス	aagaagcgccaagtcctacg	2785	2804
P2XR7_Pro14.for	センス	gcaatccagactgaagttgac	2051	2071
P2XR7_Pro15.rev	アンチセンス	actctggtctgcagttgggtg	2428	2447
P2XR7_Pro21.for	センス	cctttaaaatcagagaccttcaga	1831	1854
P2XR7_Pro22.for	センス	gccatcctctgaacacat	2708	2727
P2XR7_3UTR10.for	センス	cccttgggaactcttgctatcg	55804	55824
P2XR7_3UTR1.for	センス	ggcagtacagtggttcaaga	54858	54878
P2XR7_3UTR2.rev	アンチセンス	gtgggacagtttgctgtgcct	55150	55170

10

20

30

40

P2XR7_3UTR3.for	センス	gagtccttaccaatagcagg	55183	55202
P2XR7_3UTR4.rev	アンチセンス	gtcaaagaatttggccacc	55643	55663
P2XR7_3UTR5.for	センス	catgaactgtcttttaatgtgtaaag	55515	55540
P2XR7_3UTR6.rev	アンチセンス	gagatagcggtttcacccatggtg	55955	55976
P2XR7_3UTR7.for	センス	aattagctgggcatggtgcg	55992	56011
P2XR7_3UTR8.rev	アンチセンス	ttgagatggagtctcgctctg	56122	56140
P2XR7_3UTR9.rev	アンチセンス	cactgtccacgtgactgctt	56208	56227
P2RX7_11.For	センス	tcctacttcgggtctggtaagagatt	47281	47305
P2RX7_11.Rev	アンチセンス	gggcctaattttcgtgcat	47591	47609
P2RX7_13G.For	センス	aagaacctagaacctgagggctt	54333	54355
P2RX7_13G.Rev	アンチセンス	ttgagatgggagggcagctt	54541	54559
P2RX7_13H.For	センス	ttcggctcccaggacat	54773	54789
P2RX7_13H.Rev	アンチセンス	cacagagctttgcaggtgaa	55248	55267

10

【 0 1 4 8 】

本発明のもう1つの面は、P2X7R多型に対応する特異的なオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含む、情動障害に対する診断用キットの形態にある。診断用キットは、本発明の方法に用いるための適したパッケージおよび指示書を含みうる。前記キットがさらに、適切な緩衝液、ならびに逆転写酵素および耐熱性ポリメラーゼなどの酵素を含んでもよい。

20

【 0 1 4 9 】

本発明の1つの好ましい態様において、診断はマウス、ラットまたはヒトに対して行うことができる。本発明は一般にインビトロで、例えば、個体から入手した細胞またはその他の材料を用いて適用される。しかし、それを生きた個体または死後に適用することも可能である。

【 0 1 5 0 】

本発明の態様によれば、情動障害の診断に続いて、抗うつ薬の処方または投与を行ってもよい。抗うつ薬の投与および投与量は患者に応じて異なる可能性があり、これらは医学の技術分野で周知であり、例えば、Benkert and Hiipius, 「精神科薬物療法の手引き (Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie)」、Springer Verlag Publishing, 2000; Albers, 「精神科薬剤ハンドブック: 2001-2002版 (Handbook of Psychiatric Drugs: 2001-2002 Edition)」、Current Clinical Strategies Publishing, 2000を参照されたい。好ましい例には、以下のものが含まれる: 1日当たり5mg~80mg、好ましくは20mg、フルオキセチン; 1日当たり5mg~50mg、好ましくは20mg、パロキセチン; 1日当たり5mg~200mg、好ましくは50mg、セルトラリン; 1日当たり5mg~300mg、好ましくは100mg、フルボキサミン; 1日当たり5mgおよび100mg、好ましくは30mg、ミルタザピン; 4mg~50mg、好ましくは8mg、レボキセチン; 1日当たり5mg~600mg、好ましくは200mg、ネファゾドン; 1日当たり450mg~1800mg、好ましくは900mg、炭酸リチウム。

30

【 0 1 5 1 】

P2X7Rタンパク質はまた、薬剤の有効性および/もしくは投薬設定 (dosing) または患者が薬剤に反応する可能性をモニターするためにも有用である。したがって、さらにもう1つの態様において、本発明は、薬剤、例えば抗うつ薬の有効性および/もしくは投薬設定、ならびに/または患者が前記薬剤に反応する可能性をモニターするための方法であって、各々の薬剤の投与の前および後の患者におけるP2X7Rタンパク質の発現および/または活性のレベルを決定することを含む方法に関する。以下の実施例で提示するように、抗うつ薬の投与はP2X7R活性のアップレギュレーションをもたらす。ヒトにおいて、P2X7R活性は、P2X7Rに対する放射標識リガンドトレーサーを用いるポジトロン放射断層撮影法 (PET) または単光子放射コンピュータ断層撮影法 (SPECT) によってモニターすることができる。P2X7Rリガンドの例としては、ATP、拮抗薬結合P2X7R、作動薬結合P2X7R、またはヒトP2X7R遺伝子の少なくとも20塩基を含む短いポリヌクレオチドが可能であるが、これら

40

50

には限定されない。P2X7R活性、膜分布または発現レベルの変化は、抗うつ薬の活性および効力を反映すると考えられる。PET分析のための方法および技法は当技術分野で周知であり、例えば、Paans and Vaalburg, *Curr. Pharmac. Design* 6 (2000), 1583-1591; van Waarde, *Curr. Pharmac. Design*. 6 (2000), 1593-1610; Paans et al, *Methods* 27 (2002), 195-207; Passchier et al., *Methods* 27 (2002), 278-286; Laruelle et al., *Methods* 27 (2002), 287-299を参照されたい。

【0152】

本発明によれば、「試料」という用語は、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはそれらの部分を含む、個体、細胞系、組織培養物またはその他の源から入手した任意の生物試料のことを意図している。指摘したように、生物試料には、本発明のポリヌクレオチドを発現することが判明している体液（血液、血清、血漿、尿、関節液および髄液）および組織源が含まれる。生検組織および体液を哺乳動物から入手するための方法は当技術分野で周知である。ゲノムDNA、mRNAまたはタンパク質を含む生物試料が、源としては好ましい。

10

【0153】

本明細書に上述したように、P2X7Rをコードする遺伝子の変異はDNAレベルまたはmRNAレベルで起こることが可能であり、P2X7Rの発現の変化、または本明細書に記載した野生型P2X7R ATP感受性イオンチャンネルと比較して機能の変化もしくは機能の喪失を示すP2X7R ATP感受性イオンチャンネルの発現をもたらす可能性がある。このため、ATP感受性イオンチャンネルP2X7R遺伝子が本明細書に上述した変異を示すか否かを判定するためには、DNAレベル、RNAレベルまたはタンパク質レベルでのさまざまな方法が存在する。したがって、mRNA、cDNA、DNAおよびゲノムDNAは、以下に述べる方法に用いるのに好ましい核酸分子である。また、本明細書に記載したP2X7R ATP感受性イオンチャンネルタンパク質における変異を判定しようとする場合には、ポリペプチドまたはそれらの断片も好ましい。

20

【0154】

好ましくは、SEQ ID NO: 3または4に示された対応する野生型P2X7Rアミノ酸配列の、表1に示された位置での、別のアミノ酸によるアミノ酸残基の置換を引き起こす点変異は、PCRによって判定することができる。前記PCRに続いて、点変異のために、野生型ヌクレオチド配列には存在しない制限エンドヌクレアーゼの認識部位が生じたか否か、または野生型P2X7Rには存在しない制限酵素の認識部位が生成されたか否かについて、制限断片長多型（RFLP）分析を行う。より好ましくは、前記変異は、それぞれの位置で対応する野生型アミノ酸をコードする野生型ヌクレオチド配列のみの増幅を可能にし、対応する位置で異なるアミノ酸残基をコードする核酸分子のヌクレオチド配列は増幅しないプライマーおよび条件を用いるPCRによって判定することができる。野生型ヌクレオチド配列が存在する場合には増幅されず、それぞれの位置で別のアミノ酸残基がコードされている場合にのみ増幅を可能にするプライマーおよび条件を用いて変異を判定するためにPCRを行うことがさらにより好ましい。特に好ましいのは、少なくとも、SEQ ID NO: 1の位置に対応するアミノ酸残基をコードするヌクレオチド残基を含む断片の増幅を可能にする条件下でPCRおよびプライマーを用いる方法である。

30

【0155】

前記PCRに続いて、例えば、シーケンシングおよび/または一本鎖DNA高次構造分析（SSCA）を行う。前記断片は、好ましくは少なくとも25ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも75ヌクレオチド長、特に好ましくは少なくとも100ヌクレオチド長、さらに特に好ましくは少なくとも200ヌクレオチド長、さらにまた特に好ましくは少なくとも250ヌクレオチド長、さらになお特に好ましくは少なくとも300ヌクレオチド長、最も特に好ましくは少なくとも600ヌクレオチド長である。前記プライマーは、SEQ ID NO: 52~111に示されているように、好ましくは少なくとも12ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長、さらにより好ましくは少なくとも18ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも21ヌクレオチド長である。前記プライマーのアニーリングのための温度は、好ましくは少なくとも50、より好まし

40

50

くは少なくとも55、最も好ましくは少なくとも58である。変性のための温度は、好ましくは少なくとも95で、好ましくは少なくとも10秒、より好ましくは少なくとも20秒、さらにより好ましくは少なくとも30秒、最も好ましくは少なくとも60秒にわたる。しかし、増幅しようとする核酸配列の長さおよびG-C含有量によっては、変性のための温度はさらに低くても高くてもよい。アニーリングしたプライマーの伸長のための温度は、好ましくは少なくとも10秒、より好ましくは少なくとも20秒、さらにより好ましくは少なくとも30秒、最も好ましくは少なくとも60秒である。前述の条件を含むPCR反応が、以下の実施例の項で具体化されている。その後のシーケンシングおよび/またはSSCAは当技術分野で知られているように行う。好ましくは、PCR断片を10%ポリアクリルアミドゲルにより4

10

で分離する(室温も好ましい)。SSCAバンドシフトを示すPCR断片を上述したような条件下でプライマーを用いて増幅し、その後シーケンシングを行う。または、CLCN2遺伝子における変異が存在するか否かを判定する目的でゲノムDNAを直接シーケンシングすることも可能である。直接ゲノムシーケンシングのアプローチは、例えば、Horecka, Yeast 16 (2000), 967-970においてパン酵母に関して示されている。

【0156】

好ましくは、欠失は当技術分野で公知のハイブリダイゼーション法を用いて判定される。詳細には、SEQ ID NO:1に示された野生型ゲノムDNAのみとハイブリダイズし、SEQ ID NO:1のヌクレオチド54562~54582の間のフラグメントの欠失を含むヌクレオチド配列とはハイブリダイズしない、本明細書に上述したようなプライマーを設計する。同じく好ましいのは、全染色体、特に上述の欠失を有する染色体である染色体12q23-q24に関する判定のための蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)の方法である。さらにより好ましいのは、本明細書に記載したヌクレオチド残基の欠失を、プライマー対の一方のプライマーが前記欠失を含むゲノムDNAの領域の内部に位置しているPCRを用いることによって判定することである。好ましくは、前記欠失はSEQ ID NO:1に示されたヌクレオチド位置54562~54532にある。したがって、適切な条件下では、ゲノムDNAが前記欠失を含むならばPCR断片は生じないと考えられる。特に好ましい。欠失の上流または下流に位置するプライマーを用いるPCRを、前記欠失を判定するために用いることが特に好ましい。本明細書に上述したような適切な条件下では、SEQ ID NO:1に示された野生型ヌクレオチド配列のゲノムDNAのフラグメント、および好ましくはSEQ ID NO:1に示された位置54562~54582の間のヌクレオチドの欠失を含むヌクレオチド配列のフラグメントの両方が増幅され

20

30

ると考えられる。

【0157】

上記のP2X7R変異をタンパク質レベルで判定することも可能である。上記の変異のいくつかは短縮型のP2X7Rタンパク質を引き起こす。このため、これらの変異の存在を、例えばSDS PAGEにより、個体において発現されるP2X7Rタンパク質の長さまたは分子量を判定することによって判定することが考えられる。

【0158】

また、本明細書に記載したP2X7R ATP感受性チャンネルの変異を、本発明の抗体を用いることによって判定することも可能である。P2X7Rタンパク質の前記変異に対して特異的な前記抗体は、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイなどのアッセイ法によって特定されることが考えられる。古典的な免疫組織学的方法も好ましい。

40

【0159】

P2X7Rをコードする遺伝子および/または対応するタンパク質における変異が情動障害と結びついているという本発明に記載した発見は、P2X7Rタンパク質の機能喪失または機能不全が種々の形態の情動障害の原因であることを示す。このため、これらの変異の発見は、上記の変異が個体に存在するか否かを判定することによる情動障害の診断を可能にする。これはまた、P2X7Rをコードする遺伝子における変異の結果であることが診断された情動障害の治療法を開発することも可能にする。このような治療法は、例えば、非機能性または機能性の野生型P2X7Rタンパク質をコードする核酸分子を導入し、それによって前

50

記個体におけるP2X7R活性またはインピボでのP2X7R遺伝子の活性化もしくは抑制を回復させることを含みうる。この文脈における「活性化または抑制」は、遺伝子の発現が増強すること（活性化）または低下すること（抑制）のいずれかを意味する。発現の増強は、例えば、転写に対する活性化作用を有する適した化合物を用いることにより、転写開始の効率を高めることなどによって実現しうる。または、天然のプロモーターをより効率的なプロモーターに置き換えることによって増強を実現することもできる。

【0160】

抑制は、遺伝子の発現を抑制することにより、例えば、それぞれのプロモーターからの転写に適した化合物によって特異的に抑制することにより、またはプロモーターの効率を低下させることもしくは非機能性にするることにより、実現しうる。

10

【0161】

もう一つの態様において、本発明は薬学的組成物にも関する。本発明によれば、「薬学的組成物」という用語は、ATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする、以下のものからなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む組成物に関する：

(a) SEQ ID NO：3または4に示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO：1またはSEQ ID NO：2に示されたヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列；

(c) (a)または(b)のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列；
および

20

(d) 遺伝暗号の結果として(c)のヌクレオチド配列と縮重しているヌクレオチド配列。

【0162】

このような薬学的組成物は、機能的P2X7Rタンパク質をコードする核酸分子の治療的有効量、および、任意には、薬学的に許容される担体を含む。薬学的組成物は、本明細書に記載するような、生理的に許容される担体とともに患者に投与することができる。一つの具体的な態様において、「薬学的に許容される」という用語は、規制当局またはその他の一般に認知された薬局方により、動物における、特にヒトにおける使用に関して承認されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬がそれとともに投与される、希釈剤、アジュバント、添加剤または媒体のことを指す。このような薬学的担体は、水および油などの無菌液体であってよく、これには石油、動物、植物または合成物に由来するもの、例えばピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などが含まれる。薬学的組成物を静脈内に投与する場合には水が好ましい担体である。食塩液ならびにデキストロス水溶液およびグリセロール溶液を液体担体として用いることもでき、これは特に注射用溶液の場合にそうである。適した薬学的添加剤には、デンプン、グルコース、乳糖、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、ナトリウムイオン、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物はまた、必要に応じて、少量の湿潤剤または乳化剤またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、徐放性製剤の形態をとりうる。組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドなどの担体とともに坐薬として製剤化することができる。経口用製剤は、医薬品級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含みうる。適した薬学的担体の例は、「レミントン薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」にE.W. Martinによって記載されている。このような組成物は、好ましくは精製された形態にある、前述の化合物の治療的有効量を、患者に対する適切な投与用の形態が得られるような適した量の担体とともに含むと考えられる。製剤は投与様式に適合しているべきである。

30

40

【0163】

もう一つの好ましい態様において、組成物は、ヒトに対する静脈内投与用に適合化され

50

た薬学的組成物としてルーチン的な手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌の等張水性緩衝液中にある溶液である。必要であれば、組成物は、溶解補助剤、および、注射部位での痛みを軽減するためのリグノカインなどの局所麻酔薬を含んでもよい。成分は一般に、例えば、有効薬剤の量が表示されたアンプルまたは薬袋などの密閉封止容器内に凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、別々に供給されるか、または単位投薬式剤形として混合されて供給される。組成物を注入によって投与しようとする場合には、医薬品級の滅菌水または食塩液を含む輸液ボトルにそれを分けることができる。組成物が注射によって投与される場合には、成分を投与前に混合しうるように注射用の滅菌水または食塩液のアンプルを提供することができる。

【0164】

本発明の薬学的組成物は、中性または塩の形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するような陰イオンと形成されたもの、および、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するような陽イオンと形成されたものが含まれる。

【0165】

最適な用量範囲を特定するための一助として、任意に、インビトロアッセイを用いてもよい。製剤中に用いられる厳密な用量は投与経路および疾患または障害の重大性にも依存すると考えられ、医師の判断および各患者の状況に応じて判断されるべきである。有効量を、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿してもよい。好ましくは、薬学的組成物は直接に、またはアジュバントと配合された上で投与される。

【0166】

薬学的組成物は好ましくは、遺伝子治療における用途のために設計される。遺伝子治療の技法については本発明の核酸分子に関連してすでに上述しており、そこで言及したすべての事柄は薬学的組成物に関しても適用される。例えば、薬学的組成物中の核酸分子は、好ましくは、治療しようとする個体の細胞へのその導入、発現および/または安定的組み込みが可能となる形態にある。

【0167】

遺伝子治療のためには種々のウイルスベクターを利用することができ、これには例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、または好ましくはレトロウイルスなどのRNAウイルスがある。単一の外来遺伝子を挿入しうるレトロウイルスベクターには以下のものが非制限的に含まれる：モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーヴェイ肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV) およびラウス肉腫ウイルス (RSV)。数多くのそのほかのレトロウイルスベクターは複数の遺伝子を組み入れることもできる。これらのベクターはすべて、形質導入細胞の同定および作製が可能となるように、選択マーカーの遺伝子を導入すること、または組み入れることができる。機能性P2X7Rタンパク質をコードする関心対象のP2X7R配列を、例えば、特定の標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする別の遺伝子とともに、ウイルスベクターに挿入することにより、ベクターは標的的特異的となる。レトロウイルスベクターは、例えば、糖、糖脂質またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することにより、標的的特異的にすることができる。当業者は、挿入されたポリヌクレオチド配列を含むレトロウイルスベクターの標的的特異的送達を可能にする、レトロウイルスゲノム中に挿入可能な具体的なポリヌクレオチド配列を周知している、または必要以上の実験を行うことなく容易に確認しうると考えられる。

【0168】

組換えレトロウイルスは好ましくは欠損性であるため、それらが感染性ベクター粒子を生じるためには援助を必要とする。この援助は例えば、LTR内部の調節配列の制御下にあるレトロウイルスの構造遺伝子のすべてをコードするプラスミドを含むヘルパー細胞系を用いることによって得られる。これらのプラスミドは、パッケージング機構がキャプシド

10

20

30

40

50

形成のためにRNA転写物を認識することを可能にするヌクレオチド配列を欠いている。パッケージングシグナルの欠失を有するヘルパー細胞系には、例えば、w2、PA317およびPA12が非制限的に含まれる。これらの細胞系は、ゲノムがパッケージングされていないため、エンベピリオンを産生する。レトロウイルスベクターを、パッケージングシグナルは損なわれていないが構造遺伝子が関心対象の別の遺伝子によって置換されているこのような細胞に導入すると、ベクターのパッケージングおよびベクターピリオンの産生が可能である。または、NIH 3T3またはその他の組織培養細胞に対して、従来のリン酸カルシウムトランスフェクションにより、レトロウイルス構造遺伝子gag、polおよびenvをコードするプラスミドを直接トランスフェクトする。続いて、これらの細胞に、関心対象の遺伝子を含むベクタープラスミドをトランスフェクトする。その結果得られた細胞は培養液中にレトロウイルスベクターを放出する。P2X7Rポリヌクレオチド用のもう1つの標的指向性送達システムは、コロイド分散系である。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型乳濁液、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が含まれる。本発明の好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームは、インビトロおよびインビボでの送達媒体として有用な人工的膜小胞である。ことが示されている。大型単ラメラ小胞(LUV)はサイズが0.2~4.0 μ mの範囲であり、大型の高分子を含む水性緩衝液のかなりの割合を封入することができる。RNA、DNAおよび完全なピリオンを内部の水性部分に封入し、生物活性のある形態で細胞に送達することができる(Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981)。リポソームは、哺乳動物細胞のほかに植物細胞、酵母細胞および細菌細胞へのポリヌクレオチドの送達にも用いられている。リポソームが効率的な遺伝子導入媒体であるためには、以下の特性が存在すべきである：(1) 関心対象の遺伝子を、その生物活性を損なうことなく高効率で封入すること；(2) 非標的細胞と比較して標的細胞に対して選好的かつ高度に結合すること；(3) 小胞の水性内容物を標的細胞の細胞質に高効率で送達すること；および(4) 遺伝情報が正確かつ有効に発現されること(Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988)。リポソームの組成物は通常、リン脂質、特に相転移温度の高いリン脂質との配合物であり、通常はステロイド、特にコレステロールとの配合物である。その他のリン脂質またはその他の脂質を用いることもできる。リポソームの物理的特性はpH、イオン強度および二価イオンの存在に応じて異なる。リポソームの製造に有用な脂質には、ホスファチジル化合物(例えばホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミンなど)、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシドが含まれる。特に有用なのは、脂質部分が14~18個の炭素原子、特に16~18個の炭素原子を含み、しかも飽和性であるジアシルホスファチジルグリセロールである。リン脂質の例には、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが含まれる。リポソームのターゲティングは解剖学および機械的な要因に基づいて分類可能である。解剖学的な分類は、例えば、臓器特異的、細胞特異的およびオルガネラ特異的といった選択性のレベルに基づく。機械的ターゲティングは、それが受動的であるか能動的であるかに基づいて区別する。受動的ターゲティングは、洞様毛細血管を含む臓器内の網内系(RES)の細胞に分布するというリポソームの生来の傾向を利用する。

10

20

30

40

【0169】

もう1つの面において、本発明は、情動障害を治療する方法であって、本明細書に上述した機能性ATP感受性イオンチャンネルをコードするヌクレオチド配列を含む薬学的組成物の治療的有効量を、前記障害に罹患した対象に対して投与することを含む方法に関する。

【0170】

本発明の文脈において、「対象」という用語は、情動障害の治療を必要とする個体のことを意味する。好ましくは、対象は脊椎動物であり、さらにより好ましくは哺乳動物、特に好ましくはヒトである。

【0171】

50

「投与された」という用語は、個体に対する、機能性P2X7Rタンパク質をコードする前述の核酸分子の治療的有効量の投与のことを意味する。「治療的有効量」とは、投与の目的である効果を生じさせる用量のことを意味する。厳密な用量は治療の目的に応じて異なると考えられ、これは当業者が既知の技法を用いて確かめることができる。当技術分野で公知であり、上にも述べたように、全身送達または局所送達のいずれであるか、年齢、体重、全般的健康状態、性別、食事内容、投与時期、薬剤相互作用および疾患の重症度に応じて調整が必要な可能性があり、これは当業者によってルーチン的な実験によって確認されうると考えられる。

【0172】

本方法はヒトの治療法および獣医学的な用途の両方に適用可能である。所望の治療活性を有する本明細書に記載の化合物は、本明細書に記載したように、生理的に許容される担体中にある状態で患者に対して投与することができる。導入の様式に応じて、化合物は以下に述べるようなさまざまなやり方で製剤化することができる。製剤中の治療活性のある化合物の濃度は約0.1~100wt%の範囲でさまざまでありうる。薬剤は単独で投与してもよく、または他の治療薬と併用してもよい。

10

【0173】

薬学的組成物の投与は、以上に考察したようなさまざまなやり方で行うことができ、これには、経口、皮下、静脈内、動脈内、結節内、髄内、髄腔内、脳室内、鼻腔内、気管支内、経皮的、結節内、直腸内、腹腔内、筋肉内、肺内、腔内、直腸内または眼内が非制限的に含まれる。場合によっては、例えば、創傷および炎症の治療においては、薬剤候補を溶液の乾式噴霧として直接適用してもよい。

20

【0174】

投薬レジメンは担当医および臨床的要因によって決まると考えられる。医学の技術分野では周知であるように、任意の患者に対する投与量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与しようとする具体的な化合物、性別、投与の時期および経路、全般的健康状態、および同時併用投与するその他の薬剤を含む、多くの要因に依存する。典型的な投与量は、例えば、0.001~1000 μg の範囲でありうる；しかし、この例示的な範囲よりも少ないまたは多い用量も、特に前述の要因を考慮した上では想定される。

【0175】

投薬は好ましくは週1回行われるが、治療の進展時には投薬をはるかに長い間隔で行うこともでき、必要時にははるかに短い間隔で、例えば毎日行うこともできる。1つの好ましいケースでは、免疫応答を本明細書に上述した方法および当業者に公知のそのほかの方法を用いてモニターし、投薬の設定、例えば時期、量および/または組成を最適化する。投与量はさまざまであると考えられるが、DNAの静脈内投与のために好ましい投与量は、DNA分子の約 $10^6 \sim 10^{12}$ コピーと考えられる。レジメンが持続注入である場合には、それはそれぞれ体重1kgおよび1分間当たりで $1 \mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ 単位の範囲にあるべきである。進行状況は定期的な評価によってモニターすることができる。本発明の薬学的組成物は局所的にも全身的にも投与することができる。投与は好ましくは非経口的、例えば、静脈内であると考えられる。非経口投与用の製剤には、無菌の水性または非水性溶液、懸濁液および乳濁液が含まれる。非水性溶媒の例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えばオリーブ油など）および注射可能な有機酸エステル（オレイン酸エチルなど）が含まれる。水性担体には、食塩液および緩衝媒質を含む、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液または懸濁液が含まれる。非経口的媒体には、ナトリウムイオン溶液、リンゲルデキストロス液、デキストロスおよびナトリウムイオン、乳酸化リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内用媒体には、液体および栄養分の補充液、電解質補充液（リンゲルデキストロス液を基にしたものなど）などが含まれる。例えば、抗菌薬、抗酸化物質、キレート剤および不活性ガスなどの、保存料およびその他の添加剤が存在してもよい。

30

40

【0176】

また、薬学的組成物を併用療法アプローチに用いること、すなわち、他の医薬品または

50

薬剤、例えば情動障害を予防、治療または改善するための他の薬剤と同時投与することも想定される。

【0177】

本発明のもう1つの面は、細胞に対するその投与が細胞におけるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の低下もしくは増大を引き起こすような化合物を含む、または細胞におけるその発現もしくは細胞に対するその投与が細胞におけるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の低下もしくは増大を引き起こすような核酸分子を含む、薬学的組成物である。前記薬学的組成物は、上記のようにP2X7Rタンパク質の量または発現レベルが増大または低下している個体を治療するために有用な可能性がある。好ましくは、前記薬学的組成物は、細胞におけるATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の増大を引き起こす。

10

【0178】

細胞に対するその投与がATP感受性イオンチャンネルP2X7Rをコードする核酸の発現の低下を引き起こす、上述した薬学的組成物は、アンチセンス核酸、リボザイム、共抑制性核酸、iRNAまたはsiRNAであることが想定される。

【0179】

siRNAアプローチの1つは、例えば、Elbashir ((2001), Nature 411, 494-498)) に開示されている。また、本発明によれば、例えば、短鎖ヘアピンRNA (shRNA) を本発明に従って薬学的組成物として用いることも想定されている。遺伝子サイレンシングのためのshRNAアプローチは当技術分野で周知であり、これにはst (短鎖一過性) RNAの使用も含まれる；特に、Paddison (2002) Genes Dev. 16, 948-958を参照されたい。

20

【0180】

上述したように、遺伝子サイレンシングのためのアプローチは当技術分野で周知であり、これにはRNAiまたはsiRNAのような「RNA」アプローチが含まれる。このようなアプローチの使用が成功している例は、Paddison (2002) 前記引用箇所、Elbashir (2002) Methods 26, 199-213 ; Novina (2002) Mat. Med. June 3, 2002 ; Donze (2002) Nucl. Acids Res. 30, e46 ; Paul (2002) Nat. Biotech 20, 505-508 ; Lee (2002) Nat. Biotech. 20, 500-505 ; Miyagashi (2002) Nat. Biotech. 20, 497-500 ; Yu (2002) PNAS 99, 6047-6052 またはBrummelkamp (2002), Science 296, 550-553に示されている。これらのアプローチはベクターを利用したものでよく、例えば、特に、Yu (2002) 前記引用箇所 ; Miyagashi (2002) 前記引用箇所またはBrummelkamp (2002) 前記引用箇所に例示されているように、pSUPERベクターまたはRNA polIIIベクターを用いてもよい。

30

【0181】

P2X7R遺伝子の発現の低下を引き起こす化合物は、例えば、遺伝子の調節領域に対して作用し、それによって転写のレベルを低下させる化合物であってもよい。このような化合物は、本明細書の以下に述べる方法によって同定することができる。

【0182】

本発明はまた、情動障害を治療するための薬学的組成物の調製を目的とする、薬学的組成物に関連した本明細書に上述した機能性P2X7Rタンパク質をコードする核酸分子の使用法にも関する。

40

【0183】

さらに、本発明は、情動障害を治療する方法であって、本発明による核酸分子の治療的有効量または対応するコードされるポリペプチドの治療的有効量を前記障害に罹患した対象に対して投与することを含む方法にも関する。

【0184】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、特に本発明によるポリヌクレオチド、すなわち、本明細書に上述した変異および/または欠失を有するポリヌクレオチド、を含む薬学的組成物に関する。このような薬学的組成物は、例えば、本明細書に上述したようにして判定しうる、P2X7Rタンパク質の量が増加もしくは減少している個体、または活性の上昇もしくは低下を示すP2X7Rタンパク質を有する個体を治療するために有用な可能性が

50

ある。好ましくは、このような薬学的組成物は、本明細書に上述したようにして判定しうる、P2X7Rタンパク質の量が減少している個体、または活性の低下を示すP2X7Rタンパク質を有する個体を治療するために有用な可能性がある。例えば、前記薬学的組成物に含まれる非機能性または好ましくは機能亢進性のP2X7Rタンパク質は、本明細書に上述したような細胞に自然下で存在するP2X7R複合体に組み入れられることを想定している。また、遺伝子治療のための上記の技法を、必要な変更を加えて、本発明の核酸分子を用いて個体を治療するために用いることも想定している。

【0185】

考えられる投与様式および好ましい態様に関しては、以上に述べたものと同じことが適用される。

10

【0186】

さらに、本発明はまた、情動障害の治療のための薬学的組成物の調製を目的とする、本発明による核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体および/またはアプタマーの使用法も想定している。

【0187】

本発明のさらにもう1つの面は、情動障害の治療のための薬学的組成物の調製を目的とする、P2X7R活性または発現の調節因子の使用法に関する。本発明の文脈において、「調節因子」という用語は、直接的または間接的にP2X7Rの活性またはP2X7Rの発現を改変しうる、すなわち調節しうる、化合物、化合物の複合体、物質または物質の複合体のことを意味する。調節は例えばタンパク質レベルで起こりうる。詳細には、P2X7Rタンパク質が、活性が上昇または低下するように調節因子による干渉を受けてもよい。調節は核酸レベルでも起こりうる。すなわち、遺伝子がより高いまたは低い頻度で転写されて、より多いまたは少ないタンパク質が生じる。調節がRNAまたはタンパク質の安定性に影響を及ぼすことも可能である。P2X7Rの作動薬は不安および抑うつ性行動に関して選択されたマウスの症状を改善することが驚いたことに見いだされたため、情動障害の治療のための薬学的組成物の調製を目的とするP2X7R活性の調節因子は、好ましくは作動薬である。「作動薬」という用語は、受容体と相互作用して、その受容体に特徴的な生理的または薬理的な反応を惹起させることができる、作用因子または化合物のことを意味する。P2X7R作動薬の例には、ATP、ATP-4、BzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) およびテニダップ (tenidap) (5-クロロ-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-3-(2-チエニルカルボニル)-インドール-1-カルボキサミド、すなわち、C₁₅H₁₁ClN₂O₂S) またはそれらの誘導体が非制限的に含まれる。特に好ましくは、うつ病または不安を治療するために用いられる前記作動薬は、以下の実施例9で示しているようにBzATPである。

20

30

【0188】

P2X7Rの活性化はアポトーシスおよび細胞死をインビトロで誘導しうるということが報告されているが (Di Virginio et al., Cell Death Differ. 5 (1988), 191-199; Virginio et al., J. Physiol. 519 (1999), 335-346)、本出願は以下の実施例9において、不安および抑うつ性行動に関して選択されたマウスの脳に対するBzATPの投与により、対照マウスとBzATP投与マウスとの間にアポトーシス細胞の数に関して有意差がみられないことを示した。この結果は、P2X7Rの活性化がインビボで脳細胞死を引き起こさないこと、すなわちBzATPが情動障害の治療のための候補薬剤であることを示す。

40

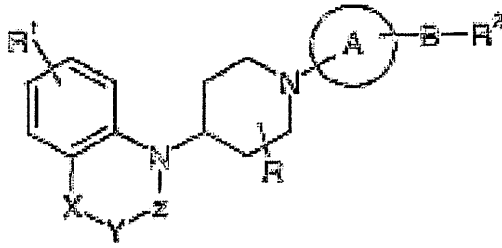
【0189】

前記調節因子が、例えば、WO 99/29660号、WO 99/29661号、WO 99/296896号、WO 00/61569号、WO 01/42194号、WO 01/44170号、WO 01/44213号、WO 00/71529号、WO 01/46200号に記載されたような、ピペリジンおよびピペラジン誘導体、アダマンタン誘導体、置換フェニル化合物、酸化ATP、2-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸および3-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸からなる群より選択されることも、さらに想定している。以下の化合物は、P2X7R活性の調節因子として用いることが同じく好ましい化合物を例示している。

【0190】

50

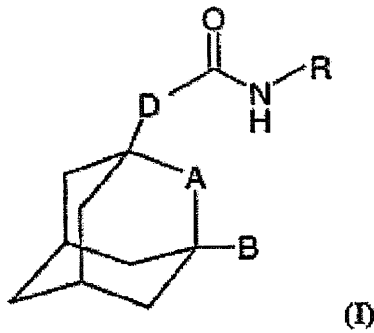
一般式：



式中、Aはフェニルであるか、またはO、NもしくはSより選択される1つもしくは2つのヘテロ原子を含む5員環もしくは6員環式の複素環であり；C₁₋₆アルキル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、アルキルアミノ、CF₃、SO₂Me、NHSO₂Meまたはシアノによって置換されてもよい；BはC=O、NHまたはSO₂である；XはC=O、CH(Me)、Oまたは(CH₂)_pであり、ここでpは0または1である；YはO、CH₂、NHまたはSである；ZはC=OまたはSO₂であり、ただし、ZがC=Oである場合にはYはO、CH₂またはSである；Rは水素またはC₁₋₆アルキルである；R¹は水素、ハロゲンである；R²はフェニルであってCO₂H、CO₂アルキル、CONH₂によって置換されてもよく、またはR²はフェニル、アルコキシフェニル、ピリジルもしくはフルオロフェニルにより置換されたOH、NHR³、NHCH(R⁴)(CHR⁵)_nR⁶、NH-R⁷-R⁸、SO₂NHアルキル、NHCOアルキル、NHSO₂アルキル、モルホリン、NR⁹R¹⁰、ピペラジンである；nは0、1または2である；R³は水素、二環式もしくは三環式の飽和環状系（窒素原子を含んでもよい）、ピペリジニル、アルキルピロリジン、エチニルシクロヘキシル、2つもしくは3つのヘテロ原子を含む5員環式の芳香族環、C₄₋₆シクロアルキル（アルキル、シアノまたはヒドロキシにより置換されてもよい）、またはC₁₋₈アルキル（アルキル鎖に酸素原子を含んでもよく、エチニル、シアノ、フルオロ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、チオアルキル、CO₂R¹¹もしくはCONH₂より選択される1つもしくは複数の置換基によって置換されてもよい）である；R⁴は水素またはアルキルであり、ヒドロキシまたはアルコキシによって置換されてもよい；R⁵は水素またはヒドロキシである；R⁶はCO₂R¹¹、NHCO₂R¹²、CONH₂、または酸素原子を含む5員環もしくは6員環式の飽和環、O、NもしくはSより選択される1つもしくは2つのヘテロ原子を含む5員環式の複素環、またはフェニルであり、アルキル、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシまたはニトロより選択される1つまたは複数の基によって置換されてもよい；R⁶はアルキルである；R⁷はシクロペンタン環である；R⁸はフェニルである；R⁹およびR¹⁰は独立に水素、ベンジル、アルケニル、シクロアルキル、アルキルであってヒドロキシ、アルコキシ、シアノ、ジアルキルアミノ、フェニル、ピリジルもしくはCO₂R¹¹によって置換されてもよく、またはR⁹およびR¹⁰は一体として5員環~7員環式の飽和性もしくは部分飽和性の環を形成する（これは別のヘテロ原子を含んでもよく、アルキル（鎖に酸素原子を含んでもよく、ヒドロキシにより置換されてもよい）、COアルキル、CO₂R¹¹、COR¹³R¹⁴、CHOまたはピペリジンより選択される1つまたは複数の基によって置換されてもよい）；R¹¹は水素またはアルキルである；R¹²はアルキルである；ならびに、R¹³およびR¹⁴は独立に水素もしくはアルキルである；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【0191】

一般式：



10

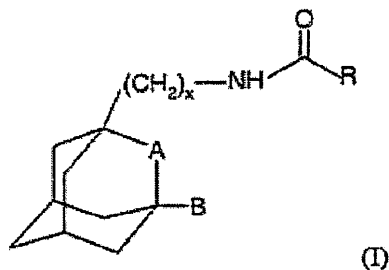
式中、Aは基CH₂または酸素原子を表す；Bは水素またはハロゲン原子を表す；Dは基CH₂、OCH₂、NHCH₂またはCH₂CH₂を表す；Rはフェニル、ベンゾチアゾリル、インドリル、インダゾリル、プリニル、ピリジル、ピリミジニルまたはチオフェニル基（これらはそれぞれ、ハロゲン原子またはシアノ、カルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、ハロ-C₁-C₆-アルキル、-N(R¹)C(=O)-R²、-C(O)-NR³R⁴、-NR⁵R⁶、C₃-C₈-シクロアルキル、3員環～8員環式のヘテロシクリル、C₃-C₈-シクロアルキルオキシ、C₁-C₆-アルキルカルボニル、フェノキシ、ベンジル、C₁-C₆-アルキルチオ、フェニルチオ、C₁-C₆-アルコキシカルボニル、C₁-C₅-アルキルスルフィニルもしくはC₁-C₆アルキルスルホニル基より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい）、またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₁-C₆-アルコキシ基（ハロゲン原子またはアミノ、カルボキシル、ヒドロキシル、C₁-C₆-アルコキシ、（ジ）C₁-C₆-アルキルアミノ、C₁-C₆-アルコキシカルボニル、イミダゾリル、モルホリニル、ピペリジニルまたはピロリジニル基より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい）を表す；R¹は水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R²はC₁-C₆-アルキルまたはC₃-C₈シクロアルキル基を表す；ならびに、R³、R⁴、R⁵およびR⁶はそれぞれ独立に水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈シクロアルキル基を表す；ただしAがCH₂でBがHでDがCH₂である場合にはRはフェニル、オルト-カルボキシフェニル、メチルフェニルまたはパラ-フェノキシフェニル基のいずれでもなく、AがCH₂であってDがCH₂またはCH₂CH₂であってRが置換フェニル基を表す場合には、存在する1つまたは複数の置換基は、アミノ、（ジ）C₁-C₆-アルキルアミノ、イミダゾリル、モルホリニル、ピペリジニルまたはピロリジニル基によって置換されたC₁-C₆-アルコキシ基をオルト位置には含まない；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

20

30

【0192】

一般式：

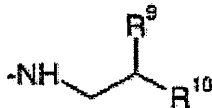
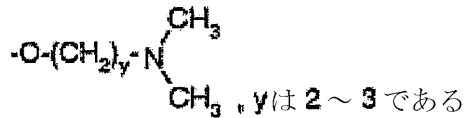
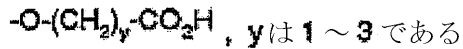


40

式中、Xは1または2を表す；Aは基CH₂または酸素原子を表す；Bは水素またはハロゲン原子を表す；Rはフェニル、ピリジル、インドリル、インダゾリル、ピリミジニルまたはチオフェニル基（これらはそれぞれ、ハロゲン原子またはアミノ、シアノ、カルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、C₁-C₆-アルキル、ハロ-C₁-C₆-アルキル、-N(R¹)C(=O)-R²、-C(O)NR³R⁴、-NR⁵R⁶、C₃-C₈-シクロアルキル、3員環～8員環式のヘテロシクリル、C₃-C₈-シクロアルキルオキシ、C₁-C₆アルキルカルボニル、C₁-C₆-アルコキシカルボニル、C₁-C₆-アルキルスルフィニルまたはC₁-C₆-アルキルスルホニル基より独立に選択される1つまたは複

50

数の置換基によって置換されてもよい)、またはC₁-C₆-アルコキシ、C₁-C₆-アルキルアミノ、フェノキシ、ベンジル、C₁-C₆-アルキルチオまたはフェニルチオ基がハロゲン原子またはアミノ、シアノ、カルボキシル、ヒドロキシル、ニトロ、1-ピロリジニル、1-ピペリジニル、C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-アルコキシ、(ジ)C₁-C₆-アルキルアミノ、ハロ-C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-アルコキシカルボニルまたは次の基のうち1つより独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい)を表す：



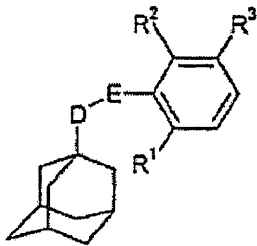
10

R¹は水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R²はC₁-C₆-アルキルまたはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R³およびR⁴はそれぞれ独立に水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R⁵は水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R⁶はC₃-C₈-シクロアルキル基を表し、しかもR⁵が水素原子でない場合にはさらにC₁-C₆-アルキル基も表す；R⁷は水素原子またはC₁-C₆-アルキルもしくはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R⁸はC₁-C₆-アルキルまたはC₃-C₈-シクロアルキル基を表す；R⁹は水素原子またはヒドロキシル基を表す；および、R¹⁰は、水素原子またはフェニルまたはイミダゾリル基を表す；ただし、Aが基CH₂を表してBが水素原子を表す場合にはRは非置換ピリジル基を表さず、Rが置換フェニル、インドリルまたはイミダゾリル基を表す場合には、存在する1つまたは複数の置換基はアミド、カルボキシル、(ジ)C₁-C₆-アルキルアミドまたはC₁-C₆-アルコキシカルボニル基をオルト位置には含まない；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

20

【0193】

一般式：



式中、DはCH₂またはCH₂CH₂を表す；EはC(O)NHまたはNHC(O)を表す；R¹およびR²はそれぞれ独立に水素もしくはハロゲン原子またはアミノ、ニトロ、C₁-C₆-アルキルもしくはトリフルオロメチル基を表す；R³は次の式の基を表す：

40



；

Xは酸素もしくはイオウ原子または基NH、SOもしくはSO₂を表す；Yは酸素もしくはイオウ原子または基NR¹¹、SOまたはSO₂を表す；Zは基-OH、-SH、-CO₂H、C₁-C₆-アルコキシ、C₁-C₆-アルキルチオ、C₁-C₆-アルキルスルフィニル、C₁-C₆-アルキルスルホニル、-NR⁶R⁷、-C(O)NR⁸R⁹、イミダゾリル、1-メチルイミダゾリル、-N(R¹⁰)C(O)-C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆

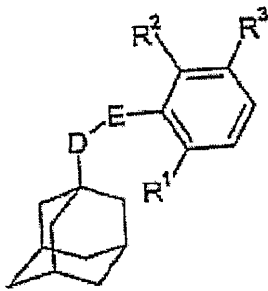
50

-アルキルカルボニルオキシ、 C_1-C_6 -アルコキシカルボニルオキシ、 $-OC(O)NR^{12}R^{13}$ 、 $-OCH_2OC(O)R^{14}OCHOC(O)OR^{15}$ または $-OC(O)OCH)R^{16}$ を表す； R^4 は C_2-C_6 -アルキル基を表す； R^5 は C_1-C_6 -アルキル基を表す； R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{12} および R^{13} はそれぞれ独立に水素原子または C_1-C_6 -アルキル基を表し、これは少なくとも1つのヒドロキシル基によって置換されてもよい； R^{11} は水素原子または C_1-C_6 -アルキル基を表し、これはヒドロキシルおよび C_1-C_6 -アルコキシから独立に選択される少なくとも1つの置換基によって置換されてもよい；ならびに、 R^{14} 、 R^{15} および R^{16} はそれぞれ独立に C_1-C_6 -アルキル基を表し、ただし (i) Eが $NEC(O)$ を表し、XがO、SまたはNHを表してYがOを表す場合にはZは $-NR^6R^7$ を表し、ここで R^6 は水素原子を表し、 R^7 は水素原子、または少なくとも1つのヒドロキシル基によって置換された C_1-C_6 -アルキル基を表す、かつ (ii) Eが $NHC(O)$ を表し、XがO、SまたはNHを表し、YがNHを表し、 R^5 が CH_2CH_2 を表す場合にはZはOHでもイミダゾリルでもない；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

10

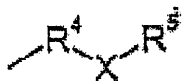
【0194】

一般式：



20

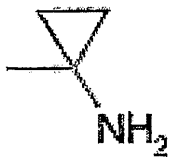
式中、Dは CH_2 または CH_2CH_2 を表す；Eは $C(O)NH$ または $NHC(O)$ を表す； R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素、ハロゲン、アミノ、ニトロ、 C_1-C_6 -アルキルまたはトリフルオロメチルを表すが、 R^1 および R^2 が同時に水素を表すことはない； R^3 は次の式の基を表す：



30

；

R^4 は C_1-C_6 -アルキル基を表す；Xは酸素もしくはイオウ原子または基 NR^{13} 、SOまたは SO_2 を表す； R^5 は水素を表す、または R^5 は C_1-C_6 -アルキルまたは C_2-C_6 -アルケニルを表し、これらはそれぞれ、ハロゲン、ヒドロキシル、(ジ) C_1-C_6 -アルキルアミノ、 $-Y-R^6$ 、



40

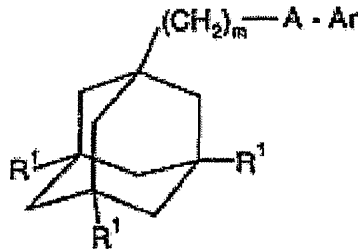
ならびに窒素、酸素およびイオウより独立に選択される1つ~4つのヘテロ原子を含む5員環または6員環式の芳香族複素環（この芳香族複素環はそれ自体がハロゲン、ヒドロキシルおよび C_1-C_6 -アルキルより選択される少なくとも1つの置換基によって置換されてもよい）より選択される少なくとも1つの置換基によって置換されてもよい；Yは酸素もしくはイオウ原子または基NH、SOまたは SO_2 を表す； R^6 は基 $-R^7Z$ を表し、ここで R^7 は C_2-C_6 -アルキル基を表し、Zは $-OH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NR^8R^9$ 、 $-C(O)NR^{10}R^{11}$ または $-N(R^{12})C(O)-C_1-C_6$ -アルキル基を表し、しかもYが酸素もしくはイオウ原子または基NHを表す場合には、 R^6 はさらに水素、 C_1-C_6 -アルキル、 C_1-C_6 -アルキルカルボニル、 C_1-C_6 -アルコキシカルボニル、 $-C(O)NR^{14}R^{15}$ 、 $-CH_2OC(O)R^{16}$ 、 $-CH_2OC(O)OR^{17}$ または $-C(O)OCH_2OR^{18}$ も表す； R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} はそれぞれ独立に水素原子または C_1-C_6 -アルキル基を表す； R^{13} は水素、 C_3-C_8 -

50

シクロアルキル、 C_3 - C_8 -シクロアルキルメチルを表す、または R^{13} は C_1 - C_6 -アルキル基を表し、これはヒドロキシルから C_1 - C_6 -アルコキシより選択される少なくとも1つの置換基によって置換されてもよい；ならびに、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 、 R^{17} および R^{18} はそれぞれ独立に C_1 - C_6 -アルキル基を表す；ただし、EがC(O)NHであってXがO、NHまたはN(C_1 - C_6 -アルキル)である場合には、 R^5 は水素原子および非置換 C_1 - C_6 -アルキル基以外である；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

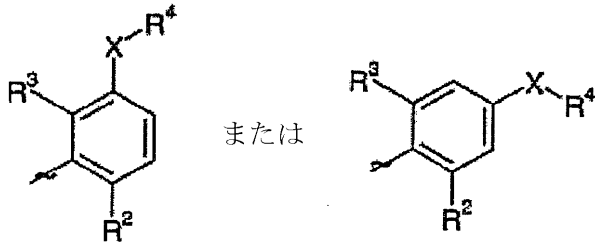
【0195】

一般式：



10

式中、 m は1、2または3を表す；各々の R^1 は独立に水素もしくはハロゲン原子を表す；AはC(O)NHまたはNHC(O)を表す；Arは基



20

を表す；

Xは結合、酸素原子または基CO、 $(CH_2)_{1-6}$ 、 $CH=$ 、 $(CH_2)_{1-6}O$ 、 $O(CH_2)_{1-6}$ 、 $O(CH_2)_{2-6}O$ 、 $O(CH_2)_{2-3}O(CH_2)_{1-3}$ 、 $CR^1(OH)$ 、 $(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}$ 、 $(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{2-3}O$ 、 NR^5 、 $(CH_2)_{1-6}NR^5$ 、 $NR^5(CH_2)_{1-6}$ 、 $(CH_2)_{1-3}NR^5(CH_2)_{1-3}$ 、 $O(CH_2)_{2-6}NR^5$ 、 $O(CH_2)_{2-3}NR^5(CH_2)_{1-3}$ 、 $(CH_2)_{1-3}NR^5(CH_2)_{2-3}O$ 、 $NR^5(CH_2)_{2-6}O$ 、 $NR^5(CH_2)_{2-3}O(CH_2)_{1-3}$ 、 $CONR^5$ 、 NR^5CO 、 $S(O)_n$ 、 $S(O)_nCH_2$ 、 $CH_2S(O)_n$ 、 SO_2NR^5 もしくは NR^5SO_2 を表す； n は0、1または2である； R^1 は水素原子または C_1 - C_6 -アルキル基を表す； R^2 および R^3 の一方はハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、ヒドロキシル、または(i) C_1 - C_6 -アルキル、これは少なくとも1つの C_3 - C_6 -シクロアルキルによって置換されてもよい、(ii) C_3 - C_8 -シクロアルキル、(iii) C_1 - C_6 -アルキルオキシ、これは少なくとも1つの C_3 - C_6 -シクロアルキルによって置換されてもよい、および(iv) C_3 - C_8 -シクロアルキルオキシより選択される基(これらの基のそれぞれは1つまたは複数のフッ素原子によって置換されてもよい)を表し、 R^2 および R^3 のもう一方は水素またはハロゲン原子を表す； R^4 は、1つまたは2つの窒素原子を含み、1つの酸素原子を含んでよい3員環~9員環式の飽和または不飽和脂肪族複素環系を表し、この複素環系はフッ素原子、ヒドロキシル、カルボキシル、シアノ、 C_1 - C_6 -アルキル、 C_1 - C_6 -ヒドロキシアルキル、 $-NR^6R^7$ 、 $-(CH_2)_rNR^6R^7$ および $CONR^6R^7$ より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよく、 r は1、2、3、4、5または6である； R^5 は水素原子または C_1 - C_6 -アルキルもしくは C_3 - C_8 -シクロアルキル基を表す； R^6 および R^7 はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_6 -アルキル、 C_2 - C_6 -ヒドロキシアルキルもしくは C_3 - C_8 -シクロアルキル基を表す、または R^6 および R^7 はそれらに結合した窒素原子と一体となって3員環~8員環の飽和複素環を形成する；ただし、(a) AがC(O)NHを表し、 R^4 が1つの窒素原子を含む非置換型の3員環~8員環の飽和脂肪族複素環系を表す場合には、Xは結合以外のものである、および(b) AがC(O)NHを表し、Xが基 $(CH_2)_{1-6}$ または $O(CH_2)_{1-6}$ を表す場合には、 R^4 は非置換イミダゾリル、非置換モルホリニル、非置換ピペリジニルまたは非置換ピロリジニル基のいずれも表

30

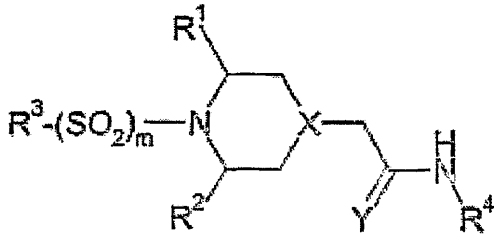
40

50

さない、および (c) AがNHC(O)を表し、 R^4 が1つの窒素原子を含む非置換型の3員環～8員環の飽和脂肪族複素環系を表す場合には、Xは結合以外のものである、および (d) AがNHC(O)を表し、Xが $O(CH_2)_{1-6}$ 、 $NH(CH_2)_{1-6}$ または SCH_2 を表す場合には、 R^4 は非置換1-ピペリジニルまたは非置換1-ピロリジニル基のいずれも表さない、および (e) AがNHC(O)を表し、Xが $O(CH_2)_{2-3}NH(CH_2)_2$ を表す場合には、 R^4 はイミダゾリル基を表さない；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

【0196】

一般式：



10

Xは窒素原子または基C(R^5)を表す；Yは酸素もしくはイオウ原子または基 NR^6 を表す； R^1 および R^2 はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_4 アルキル基を表すが、両方が同時に水素原子を表すことはない、または R^1 および R^2 は一体として基- CH_2ZCH_2 -を表す；Zは結合、酸素もしくはイオウ原子または基 CH_2 もしくは NR^7 を表す；mは0または1である； R^3 は5員環～10員環式の不飽和環系であり、これは窒素、酸素およびイオウより選択される1～4個の環ヘテロ原子を含んでよく、この環系はハロゲン、ニトロ、シアノ、 NR^8R^9 、 C_1 - C_4 -アルキル- $C(O)NH$ --、 $NHR^{12}C(O)$ --、 C_1 - C_4 -アルキル- SO_2 -、 C_1 - C_4 -アルキル- SO_2NH --、 C_1 - C_4 -アルキル- $NHSO_2$ -、 C_1 - C_4 -アルコキシおよび C_1 - C_4 -アルキル（1つまたは複数のフッ素原子によって置換されてもよい）より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい； R^4 はフェニルまたはピリミジニル基を表し、これらのそれぞれは、ハロゲン、 C_1 - C_4 -アルコキシ、 C_1 - C_4 -アルキルチオおよび C_1 - C_4 -アルキル（1つまたは複数のフッ素原子、フェニルまたはピリミジニル基によって置換されてもよく、これらはさらにハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、 C_1 - C_4 -アルキルチオ、 C_1 - C_4 -アルキル- NH --、 NHR^{13} - C_1 - C_4 -アルキル-、 C_1 - C_4 -アルキル- SO_2 -、 C_1 - C_4 -アルキル- SO_2NH --、 C_1 - C_4 -アルキル- $NHSO_2$ -、 C_1 - C_4 -アルキル- $C(O)NH$ --、 C_1 - C_4 -アルキル- $NHC(O)$ --、-D-G、 C_1 - C_4 -アルコキシ（ $NR^{14}R^{15}$ または R^{16} によって置換されてもよい）および C_1 - C_4 -アルキル（1つもしくは複数のフッ素原子または1つもしくは複数のヒドロキシル基によって置換されてもよい）より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい）より選択される置換基によってオルト位置で置換されているか、または、 R^4 は9員環または10員環式の不飽和二環系を表し、これは窒素、酸素およびイオウより独立に選択される1つ～4つの環ヘテロ原子を含んでよく、この二環系はハロゲン、オキソ、 C_1 - C_4 -アルキル、 C_1 - C_4 -アルコキシ、 C_1 - C_4 -アルキルチオおよび-- $NR^{10}R^{11}$ より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい；Dは酸素原子または基 $(CH_2)_n$ または CH_2NH を表す；nは1、2または3である；Gはピペラジニル、モルホリニルまたは2,5-ジアザピシクロ[2.2.1]ヘプチル基を表す、またはGはピペリジニル基（これはアミノによって置換されてもよい）を表す； R^5 は水素原子またはヒドロキシルもしくは C_1 - C_4 アルコキシ基を表す； R^6 は水素原子またはシアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_1 - C_4 -アルキルもしくは C_1 - C_4 -アルコキシ基を表す； R^7 、 R^8 および R^9 はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_4 -アルキル基を表す； R^{10} および R^{11} はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_4 -アルキル基を表す、または R^{10} および R^{11} はそれらに結合した窒素原子と一体となって、1つまたは2つの環窒素原子を含む5員環または6員環式の飽和複素環を形成する； R^{12} は水素原子または C_1 - C_4 -アルキル基（これはアミノによって置換されてもよい）を表す； R^{13} は水素原子または C_1 - C_4 -アルキル基（これはヒドロキシルによって置換されてもよい）を表す； R^{14} および R^{15} はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_4 -アルキル基（これはヒドロキシルによって置換されてもよい）を表す、または R^{14} およ

20

30

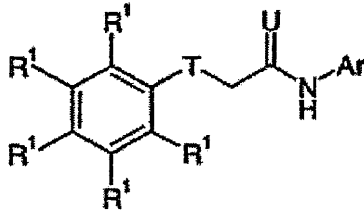
40

50

び R^{15} はそれらと結合した窒素原子と一体となって、1つまたは2つの環窒素原子を含む5員環または6員環式の飽和複素環を形成する；ならびに、 R^{16} は1-(C_1 - C_4 -アルキル)ピペリジニル基を表す；ただし、 m が0であり、 X がNであって Y が0である場合には、 R^4 は2-ベンゾチアゾリルを表さない；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

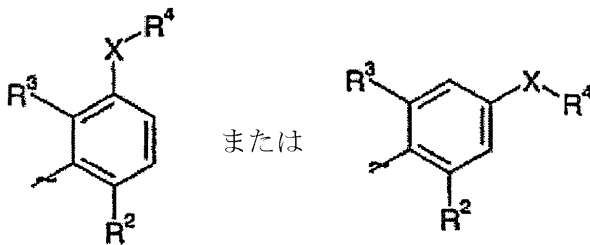
【0197】

一般式：



10

式中、各々の R^1 は独立に水素もしくはハロゲン原子またはトリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、 C_1 - C_6 -アルキルまたは C_1 - C_6 -アルコキシ基を表す； T は酸素原子または基NHを表す； U は酸素もしくはイオウ原子または基NHを表す； Ar は次の基を表す：



20

；
 X は結合、酸素原子または基 CO 、 CH_2 、 CH_2O 、 $O(CH_2)_m$ 、 CH_2OCH_2 、 NR^5 、 CH_2NR^5 、 NR^5CH_2 、 $C_2H_4NR^5CH_2$ 、 $CONR^5$ 、 $S(O)_n$ または SO_2NR^5 を表し、 m は1、2または3である； n は0、1または2である； R^2 および R^3 の一方はハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、ヒドロキシル、または C_1 - C_6 -アルキル（少なくとも1つの C_3 - C_6 -シクロアルキルによって置換されてもよい）、 C_3 - C_8 -シクロアルキル、 C_1 - C_6 -アルキルオキシ（少なくとも1つの C_3 - C_6 -シクロアルキルによって置換されてもよい）、 C_3 - C_8 -シクロアルキルオキシ、 $S(O)_pC_1$ - C_6 -アルキルまたは $S(O)_qC_3$ - C_8 -シクロアルキルより選択される基（これらの基のそれぞれは1つまたは複数のフッ素原子によって置換されてもよい）を表し、 R^2 および R^3 のもう一方は水素もしくはハロゲン原子またはメチル基を表す； p は0、1または2である； q は0、1または2である； R^4 はジ(C_{1-2} アルキル) $N(CH_2)_t$ （ここで t は0、1または2である）もしくはイミダゾリルを表す、または R^4 は1つもしくは2つの窒素原子を含む3員環～9員環式の飽和複素環を表し、この複素環系はフッ素原子、ヒドロキシル、 C_1 - C_6 -アルキル、アセチル、ヒドロキシ C_1 - C_6 -アルキル、 $-NR^6R^7$ 、 $-(CH_2)_rNR^6R^7$ 、 $-CONR^6R^7$ およびピリミジニルより独立に選択される1つもしくは複数の置換基によって置換されてもよい、または R^4 は $-NR^6R^7$ 、 $(CH_2)_rNR^6R^7$ 、 $-CONR^6R^7$ より独立に選択される1つもしくは複数の置換基によって置換されてもよい3員環～8員環式の飽和炭素環系を表し、この環系はフッ素原子、ヒドロキシルおよび C_1 - C_6 アルキルより独立に選択される1つまたは複数の置換基によってさらに置換されてもよい； r は1、2、3、4、5または6である； R^5 は水素原子または C_1 - C_6 -アルキルもしくは C_3 - C_8 シクロアルキル基を表す；ならびに、 R^6 および R^7 はそれぞれ独立に水素原子または C_1 - C_6 -アルキルもしくは C_3 - C_8 -シクロアルキル基を表す、または R^6 および R^7 はそれらに結合した窒素原子と一体となって3員環～8員環式の飽和複素環を形成する；ただし、 R^3 がシアノ基を表す場合には X は結合以外のものである；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

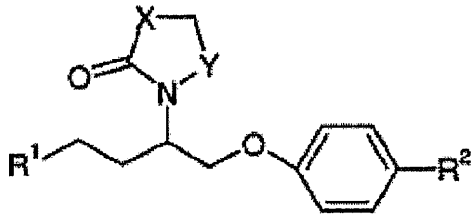
30

40

【0198】

一般式：

50



式中、Xは酸素もしくはイオウ原子または基NH、CH₂、CH₂CH₂もしくはOCH₂を表す；Yは基C H₂またはC=Oを表す；R¹はピリジルまたはピリミジニル基を表す；R²はフェニル、ピリジルまたはピリミジニル基を表し、これらのそれぞれは、ハロゲン原子またはアミノ、シアノ、ヒドロキシル、ニトロ、C₁-C₆-アルキル、ハロ-C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-アルコキシ、C₁-C₆-アルキルチオ、(ジ)C₁-C₆-アルキルアミノ、C₁-C₆-アルキルカルボニル、C₁-C₆-アルコキシカルボニル、C₁-C₆-アルキルスルフィニル、C₁-C₆-アルキルスルホニル、-N R³SO₂R⁴もしくは-SO₂NR⁵R⁶基、または基-Z-(CH₂)_p-Z-(CH₂)_q-H(ここで各々のZは独立に窒素または酸素原子を表し、pは2から5までの整数であり、qは0または1から5までの整数である)より独立に選択される1つまたは複数の置換基によって置換されてもよい；R³およびR⁴はそれぞれ独立に水素原子またはC₁-C₆-アルキル基を表す；ならびにR⁵およびR⁶はそれぞれ独立に水素原子またはC₁-C₆-アルキル基を表すか、それらに結合した窒素原子と一体となってピロリジニルまたはピペリジニル基を形成する；の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物。

10

20

【0199】

本発明のさらにもう1つの態様は、P2X7Rの活性を調節する作用因子、例えばP2X7Rの拮抗薬などを投与することによって、情動障害を治療するための方法を提供する。「拮抗薬」という用語は、別のものの生理的効果に対抗する作用因子または薬剤または化合物のことを意味する。P2X7R拮抗薬の例には、アダマンタン誘導体、イソキノリン類およびそれらの誘導体、置換フェニル化合物、ピペリジン誘導体、ピペラジン誘導体が非制限的に含まれる。P2X7R拮抗薬は当技術分野で記載されており、これには、Chen et al., Bioconjugate Chem. 13 (2002), 1100-1111；WO 99/29660号；WO 99/29661号；WO 99/296896号；WO 00/61569号；WO 01/42194号；WO 01/44170号；WO 01/44213号；WO 00/71529号；WO 01/46200号で見いだされた化合物が含まれる。また、P2X7R活性を、短鎖干渉RNA (siRNA) 分子および長い二本鎖RNA (dsRNA) などの(ただしこれらには限定されない)、RNAを利用する干渉機構および方法によって調節することもできる。

30

【0200】

P2X7Rの作動薬は不安および抑うつ性行動に関して選択されたマウスの症状を改善することが予想外のことに見いだされたため、本発明はさらにもう1つの態様において、P2X7Rの活性を調節する作用因子、例えばP2X7Rの作動薬などを投与することにより、不安および抑うつ性行動などの情動障害を治療するための方法に関する。さらに興味深かったのは、先行技術、例えば、WO 03/042190号、WO 03/042191号、WO 03/049353号またはUS 2004/0029841号によって、P2X7Rの拮抗薬は抗うつ効果を有することが教示されているにもかかわらず、それらは抗うつ効果を有しないという実施例10に示された本出願の所見である。WO 03/042190号、WO 03/042191号、WO 03/059353号またはUS 2004/0029841号は、P2X7R拮抗薬の組成物およびこれらの化合物を投与することによってP2X7Rを介する疾患を治療する方法を記載している。しかし、先行技術はP2X7Rと、例えばうつ病を治療することとの間をつないだかもしれないが、これはP2X7Rの拮抗薬を例えばうつ病の治療に用いなければならないことを意味する。したがって、拮抗薬が抗うつ効果を有さず、むしろP2X7Rの作動薬に抗うつ効果があるという本発明の所見は予想できなかったことであり、このため、さらに驚くべきことである。本出願はこのため、特に、例えばうつ病に対して治療上の利益を有する有効な医薬品の開発のための基盤を提供する。詳細には、P2X7Rの作動薬を含む前記医薬品は、情動障害を治療するのに、特に本明細書で言及した障害を治療するため、特にうつ病を治療するために有効である。P2X7R作動薬の例には、ATP、ATP-

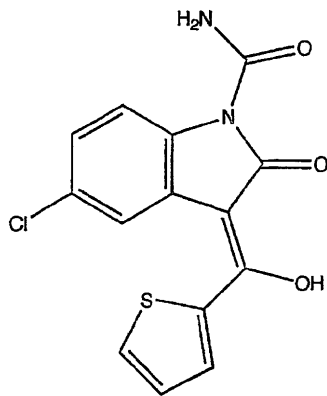
40

50

4およびBzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₅O₁₅ P₃)) が非制限的に含まれる。好ましくは、情動障害を治療するために用いられるP2X7R作動薬はBzATPである。より好ましくは、以下の実施例9に示されているように、BzATPはうつ病または不安を治療するために用いられる。

【0201】

本出願は、テニダップ (tenidap) と呼ばれる化合物またはその誘導体もP2X7Rの調節因子として機能し、このため情動障害を治療するために用いるという、もう1つの予想外の所見を提供する。これまでに、テニダップまたはその誘導体に関してはさまざまな医学的用途が記載されている。しかし、情動障害を治療するためのテニダップまたはその誘導体の使用法は先行技術では知られておらず示唆されてもいない。したがって、本出願は、情動障害の治療のための薬学的組成物の調製を目的とする、テニダップまたはその誘導体または3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの使用法に関する。当然ながら、テニダップまたはその誘導体または3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの治療的有効量を前記障害に罹患した対象に対して投与することを含む、情動障害の治療方法も想定している。以下の構造式



を有するテニダップ (5-クロロ-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-3-(2-チエニルカルボニル)-インドール-1-カルボキサミド、すなわち、C₁₅H₁₁ClN₂O₂S) および他の3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの組成物、ならびにそれらの抗炎症薬および鎮静薬として、ならびにシクロオキシゲナーゼ (Cox) およびリポキシゲナーゼ (5-LPO) 酵素の両方の阻害薬としての使用法は、US 4,556,672号に最初に開示された。当然ながら、さまざまな修飾、例えば、当技術分野で周知の側鎖基または原子をテニダップの組成物に対して加えることが可能である。

【0202】

テニダップの誘導体または3-置換-2-オキシインドール誘導体は、例えば、US 4,556,672号、US 4,658,037号、US 4,721,712号、US 5,290,802号、US 5,118,703号、US 5,270,331号、US 5,298,522号、US 5,086,186号、US 5,449,788号およびUS 5,795,902号に記載されている。テニダップおよびその他の3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの合成のための種々の工程は当技術分野で周知であり、例えば、US 4,652,658号、US 4,665,194号、US 4,952,703号、EP-B1 155 828号、WO 90 / 04393号、WO 94 / 07488号、WO 94 / 1706 1号、WO 95 / 20574号、WO 97 / 36895号、van Deurzen et al., J. Mol. Catal. B-Enzym., 2 (1996), 33-42; Porcs-Makkay and Simig, Org. Process. Res. Dev., 4 (2000), 10-16; Kumar et al. Org. Process. Res. Dev., 5 (2001), 61-64に記載されている。無水結晶型のテニダップのナトリウム塩はUS 5,036,099号およびWO 88 / 05656号に記載されている。テニダップの注射用組成物および直腸投与用の薬学的組成物はそれぞれEP-B1 5083 11号およびEP-B1 508310号に開示されている。また、テニダップまたはその誘導体を関節リウマチの治療のためにテトラサイクリン (US 5,308,839またはメトトレキサート (WO96 / 35419号)) と併用して投与しうることも先行技術に記載されている。テニダップおよびその他の3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの光分解の阻害はWO 96 / 33701号

に開示されている。

【0203】

テニダップまたはその誘導体およびその他の3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドのそのほかの用途は、以下に関して記載されている：哺乳動物におけるインターロイキン-1の生合成の阻害およびインターロイキン-1を介する障害の治療のため（US 4,861,794号）；好中球からのエラスターゼ放出の阻害のため（US 5,006,547号）；および哺乳動物におけるT細胞機能を抑制し、T細胞により媒介される全身型または臓器特異的な型の自己免疫障害を治療するため（US 4,853,409号；Dolhain et al. Scand. J. Immunol. 42 (1995), 686-693）。テニダップはアルツハイマー病の治療のためにも用いられている（WO 96/31209号、US 5,545,656号）。

10

【0204】

また、テニダップもしくはその誘導体またはその薬学的な塩基性塩が、哺乳動物において、コラゲナーゼの活性化を阻害すること、コラゲナーゼにより媒介される障害および疾患を治療すること、ならびにミエロペルオキシダーゼの活性を阻害することも示されている（US 5,008,283号）。テニダップは総血清コレステロール、LDLコレステロールおよびトリグリセリドを低下させることができ（US 5,122,534号）、虚血により誘発される心筋損傷およびサイトカインにより媒介される心筋傷害の治療のために用いられる（EP-B1 679396号）。しかし、前述の文書はいずれも、テニダップもしくはその誘導体または3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドの、例えば、うつ病などの情動障害を治療するための使用法は開示していない。

20

【0205】

Sanz et al. Eur. J. Pharmacol. 355 (1998), 235-244は、テニダップがP2X7受容体の活性を増大させることを示唆している。テニダップは、ATPレベルを上昇させること、またはP2X7に対するATPの作用を向上させることによって作用する可能性があることが示唆されている。ATPはP2X7Rの天然のリガンドである。したがって、調節因子はP2X7Rの活性または発現を直接的または間接的に調節するものとして定義されているため、テニダップまたはその誘導体は本明細書に記載したようなP2X7Rの調節因子である。P2X7Rの調節因子は情動障害の治療のために有用であるという本発明の教示を用いることにより、テニダップまたはその誘導体を、情動障害（その例は本明細書に記載されている）の治療のための薬学的組成物の調製を目的とするP2X7R活性の調節因子として用いることが想定される。薬学的組成物の調製、投与の様式などは以上および以下に記載されており、これらは必要な変更を加えて、薬学的組成物の調製のためのテニダップまたはその誘導体の使用法に対して適用される。さらに、本明細書に記載した情動障害を治療するための使用法および方法に関する態様も、必要な変更を加えて、情動障害を治療するためのテニダップもしくはその誘導体の使用法または対応する治療法に対して適用される。

30

【0206】

本出願はさらに、P2X7R活性の調節因子を、情動障害を治療するために任意の組み合わせで用いると想定している。例えば、BzATPおよびテニダップもしくはその誘導体または3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミドを、情動障害を治療するために、例えば同時にまたは連続投与によってともに用いることができる。

40

【0207】

1つの好ましい態様において、本明細書に記載した薬学的組成物は、本発明の成分の特性を変更させ、それによって例えば、これらの成分の起こりうる望ましくない、有害なまたは負の副作用を調節する、好ましくは阻止しうる、細胞保護作用を有するさらなる分子を任意に含む。このような起こりうる望ましくない、有害なまたは負の副作用の1つは、最終的にはアポトーシスを引き起こす、処理細胞の細胞膜における孔の形成である。したがって、前記のさらなる分子は、膜安定化作用を有する作動薬または拮抗薬を含む、 α -アドレナリン受容体調節因子のクラスに属する。作動薬および拮抗薬を含む α -アドレナリン受容体調節因子は、 α -アドレナリン受容体の作動薬または拮抗薬によって引き起こされる陽性変時反応、陽性変力反応、気管支拡張反応および血管拡張反応を低下または増

50

大させる化合物である。この反応の低下または増大の大きさは、既存の交感神経緊張性および受容体部位に到達する β -アドレナリン受容体遮断薬の濃度に比例する。したがって、本発明の文脈において β -アドレナリン受容体調節因子は拮抗薬または作動薬である。

β -アドレナリン受容体の拮抗薬または作動薬の活性は当技術分野で周知のようにして決定することができる。 β -アドレナリン受容体の活性は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における環状アデノシン-リン酸 (cAMP) の濃度を測定することによって決定しうる。CHO細胞には、CMVプロモーターまたは任意の他の適したプロモーターエレメントの制御下にある、ヒト β_1 -、 β_2 -または β_3 -アドレナリン受容体をコードするcDNAを一意的にトランスフェクトすることができる。細胞のトランスフェクションは標準的な細胞トランスフェクション法を用いて行われ、これは例えば、Joyner「遺伝子ターゲティング：実践的アプローチ (Gene Targeting: A Practical Approach)」、Oxford University Press, New York, 1993を参照されたい。続いて、 β -アドレナリン遺伝子のいずれかを過剰発現する細胞を、American Type Culture Collectionの細胞系およびハイブリドーマのカタログ (Catalogue of Cell Lines and Hybridomas)、Seventh Edition, 1992、p.36、ATC C CCL 61 CHO-K1に記載された手順に従って、10% ウシ胎仔血清、500mg/ml Geneticin、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシンおよび250ng/mlファンギゾンを含むハムF12培地 (Gibco BRL) 中で集密に達するまで増殖させる。 β -アドレナリン調節性化合物は、DMSO (0.1% DMSO、最終濃度) 中の10mM保存液として調製し、ハムF12培地で希釈した上で、ホスホジエステラーゼ活性を阻害するための 10^{-3} Mイソブチルメチルキサンチンとともに、細胞に 10^{-10} ~ 10^{-5} Mとして添加する。続いて培地および細胞を37 °Cで5分間インキュベートする。この期間の終了時に培地を吸引し、細胞を0.01N HCl中で溶解させる。続いて細胞のcAMP含有量を、New England Nuclear社 (Burlington, Mass.) のキットを用いるラジオイムノアッセイ (RIA) によって決定することができる。cAMPの細胞含有量と β -アドレナリン受容体の活性化 / 阻害との間には直接的な相関が存在する。 β -アドレナリン受容体の活性を決定するための他の方法は当技術分野で詳細に記載されており、例えば、Vansal and Feller, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19 (1999) 853-863 ; Durocher et al., Anal. Biochem. 284 (2000) 316-326を参照されたい。

【0208】

β -アドレナリン受容体調節因子の定義を満たす化合物の例には、既知の β -アドレナリン受容体拮抗薬、例えば、チモロール、ソタロール、エスモロール、カテオロール (catechol)、プロプラノロール、ベタキソロール、ペンブトロール、メトプロロール、アセブトロール、アテノロール、メトプロロール、ピンドロールおよびピソプロロールならびにそれらの塩、水和物、溶媒和物および内部にそれらが存在しうる任意の結晶形態が非制限的に含まれる。 β -アドレナリン受容体遮断薬のそのほかの例は、US 5,776,930号に記載されている。 β -アドレナリン受容体拮抗薬の好ましい例には、DL-プロプラノロール、D-プロプラノロールおよびラベトロールがある。DL-プロプラノロールおよびラベトロールは膜安定化作用を有する β -アドレナリン受容体拮抗薬であり、一方、D-プロプラノロールは β -アドレナリン遮断活性がわずかしかない光学異性体である。情動障害を治療するための本発明の薬学的組成物に β -アドレナリン受容体拮抗薬または作動薬を任意に添加することは、P2X7R作動薬を投与する状況において有用な可能性がある。その理由は、先行技術において、作動薬によるP2X7Rの活性化が、細胞膜内部の孔の形成を誘発することによって細胞死をもたらす可能性が示唆されているためである。しかし、本出願の実施例9に示されているように、先行技術によってP2X7R作動薬に関して記載されている孔形成活性効果は、極めてわずかな細胞で観察されているに過ぎない。最近、Alzola et al., Cell Signal. 13 (2001), 465-473は、濃度10 ~ 300 μ MのDL-プロプラノロール、D-プロプラノロールまたはラベトロールが、P2X7Rの陽イオンチャンネル活性の開口性に影響を及ぼすことなく、P2X7Rの孔形成活性を阻害しうることを示した。FR 2768626号により、 β -アドレナリン調節因子、例えば作動薬がアポトーシス阻害薬として有用であることも判明している。したがって、本発明の1つの好ましい態様においては、拮抗薬または作動薬を含む β -アドレナリン受容体調節因子が、情動障害の治療のためにP2X7R作動薬と併用して投

10

20

30

40

50

与される。前記 - アドレナリン受容体拮抗薬または作動薬は濃度10~300 μ Mで投与されることが好ましい。

【0209】

本発明に従って用いるためのP2X7R調節因子の投与量、薬剤調製および送達は、当技術分野にみられる方法に従った従来の様式で、1つまたは複数の生理的担体または添加剤を用いて策定することができ、これについては例えば、Ansel et al., 「医薬品の剤形および薬物送達システム (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)」、7th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999を参照されたい。すなわち、P2X7R調節因子ならびにその生理的に許容される塩および溶媒和物は、吸入、吹送（口または鼻のいずれかを介する）、経口、口腔内、非経口的または直腸投与による投与用に製剤化することができる。

10

【0210】

経口投与の場合、P2X7調節因子の薬学的組成物は、例えば、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンブまたはグリコール酸デンブナトリウム）または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤を用いる従来の方法によって調製される錠剤またはカプセル剤の形態をとる。経口投与のための液体製剤は、例えば、溶液、シロップ剤または懸濁液の形態をとることができ、または使用前に水もしくは他の適した溶媒と構成するための乾燥製品として提供することもできる。このような液体製剤は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用油）、乳濁剤（例えば、レシチンまたはアラビアゴム）、非水溶媒（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分画された植物油）および防腐剤（例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシベンゼン、またはソルビン酸）などの薬学的に許容される添加剤を用いる従来の手段によって調製することができる。また、製剤には緩衝塩、着色料、着色料および甘味料を適宜含めることもできる。経口投与のための製剤は、P2X7R活性を調節する作用因子の制御放出が得られるように適切に製剤化される。

20

【0211】

吸入による投与の場合、本発明に従って用いるための、P2X7R活性を調節する作用因子は、適した噴霧剤（例えば、ジクロロジフルロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適したガスなど）を用いて、加圧容器またはネブライザーからエアロゾル噴霧の形態で送達されることが好都合である。加圧エアロゾルの場合、投与単位は一定量を送達するための弁を付与することによって決定する。P2X7R活性調節因子とラクトースまたはデンブなどの適した粉末基剤との粉末混合物を含む、吸入器または吹入器で用いるためのゼラチン製などのカプセル剤および薬包を製剤化することもできる。

30

【0212】

P2X7R活性を調節する作用因子を、例えばボラス注射または連続注入による、注射による非経口投与のために製剤化することもできる。注射部位には、静脈内、腹腔内または皮下が含まれる。注射のための製剤は、防腐剤を加えた単位投薬式剤形（例えば、アンプルまたは多回分の用量を含む容器中にある）として提供することができる。P2X7R活性を調節する作用因子は、油性もしくは水性溶媒における懸濁液、溶液または乳濁液としての形態をとることができ、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化用剤を含むことができる。または、作用因子は、使用前に適切な溶媒（例えば、発熱物質を含まない滅菌水など）によって構成するための粉末形態をとってもよい。

40

【0213】

P2X7R活性を調節する作用因子を、必要に応じて、前記作用因子を含む1つまたは複数の単位投薬式剤形を含む包装物またはディスペンサー装置として提供することもできる。この包装物は例えばプリスター包装などの金属または合成樹脂製の箔を含みうる。包装物ま

50

たはディスペンサー装置に投与のための指示を添付してもよい。

【0214】

1つのより好ましい態様において、前述の方法または使用法は、大うつ病、全般性不安障害および双極性障害からなる群より選択される情動障害を治療することが想定される。

【0215】

1つの特に好ましい態様において、前記大うつ病は、大うつ病、気分変調、非定型的うつ病、月経前不快気分障害および季節性情動障害からなる群より選択される。

【0216】

もう1つの特に好ましい態様において、前記全般性不安障害は、パニック障害、恐怖症、広場恐怖症、対人恐怖症、特定の恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、分離不安障害、躁病、軽躁病および気分循環性障害からなる群より選択される。

10

【0217】

さらにもう1つの特に好ましい態様は、前記双極性障害が双極性障害I型または双極性障害II型であるものである。

【0218】

さらに、本発明は、本発明の核酸分子、ベクター、宿主、ポリペプチド、抗体もしくはアプタマー、プライマーもしくはプライマー対、または本発明の以下の方法において同定もしくは特性決定された分子を含む、キットにも関する。

【0219】

本発明のキットはさらに、反応緩衝液、保存液、および/または、科学的もしくは診断的アッセイを行うために必要な残りの試薬もしくは材料などを任意に含むことが有益である。さらに、本発明のキットの部分は、バイアルもしくは瓶に個別に、または容器もしくは多容器ユニット内に組み合わせてパッケージ化することが可能である。

20

【0220】

本発明のキットは、特に、本発明のポリペプチドを生産するための方法、本明細書に以下に述べるようなP2X7R ATP感受性イオンチャンネルと特異的に相互作用する分子の同定および/もしくは特性決定の方法を実施するために有益に用いることができ、ならびに/またはそれを本明細書で言及したさまざまな用途に、例えば、診断用キットとして、研究用ツールとして、もしくは治療用ツールとして用いることもできると考えられる。さらに、本発明のキットは、科学的、医学的および/または診断的な目的に適した検出のための手段を含んでもよい。キットの製造は、好ましくは、当業者に公知の標準的な手順に従って行われる。

30

【0221】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドと特異的に相互作用しうる化合物または化合物の混合物を同定するための方法であって、(a)本発明のポリペプチドを、検査しようとする候補化合物または化合物の混合物と接触させる段階；および(b)前記のものが前記ポリペプチドと特異的に相互作用しうるか否かを判定する段階、を含む方法にも関する。ポリペプチドは直接与えてもよく、または、例えばインビトロもしくは適した宿主細胞における、対応する本発明の核酸分子またはベクターの発現によって与えてもよい。

【0222】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの特性を変化させうる化合物の特性決定のための方法であって、(a)本発明のポリペプチドを前記化合物と接触させる段階；および(b)化合物が前記ポリペプチドの特性を変化させるか否かを判定する段階、を含む方法にも関する。

40

【0223】

「本発明のポリペプチドの特性を変化させる」という用語は、本明細書に上述したような、本発明のポリペプチドに対する機能的特性が、上記の方法によって同定された化合物と接触させる前の機能的特性と比較して変化すること、すなわち変わることを意味する。

【0224】

本発明のポリペプチドと相互作用しうる、またはその機能的特性を変化させうるものの

50

前記同定および/または特性決定は、特に、本発明の核酸分子をトランスフェクトすることによって行いうる。前記宿主にはHEK 293細胞が非制限的に含まれ、または機能的発現のためにカエル卵母細胞、好ましくはアフリカツメガエル卵母細胞への注入が行われる (Goldin, *Methods Enzymol.* 207 (1992), 266)。発現されたP2X7R ATP感受性チャンネルを、標準的な二電極式電位固定法を用いて調べる (Stuhmer, *Methods Enzymol.* 207 (1992), 319; Kohler, *Science* 273 (1996), 1709)。本明細書に定義したP2X7R ATP感受性イオンチャンネルの発現後に、同定および/または特性決定を行おうとする分子の非存在下および/または存在下での電流を推定する。膜電流の推定のための方法は当技術分野で周知であり、これには例えば、Hamill, *Pflugers Arch.* 391 (1981), 85-100に記載されたようなパッチクランプ方法、またはMethfessel, *Pflugers Archive* 407 (1986), 577-588に記載されたような卵母細胞における二電極電位固定法が含まれる。本発明によれば、「本発明のポリペプチドと相互作用すること」という用語は、本発明のポリペプチドが上記の方法によって同定された化合物と直接的および/または間接的に相互作用することを意味する。さらに、本発明は、本発明のポリペプチドと相互作用しうる分子に関するスクリーニングの方法であって、(a) 本発明のポリペプチドを分子と接触させる段階; および (b) 応答を測定および/または検出する段階; ならびに (c) 前記応答を前記候補分子の非存在下で測定した標準的な応答と比較する段階、を含む方法にも関する。

10

【0225】

本発明はまた、P2X7R遺伝子の発現を増強および/または低下させうる化合物を同定するための方法であって、P2X7R遺伝子をその天然のプロモーターから発現する、またはP2X7Rプロモーターによって作動するレポーター遺伝子を発現する細胞と接触させる段階、および、化合物が存在しない条件と比較して遺伝子の発現が増大または低下したか否かを判定する段階を含む方法にも関する。

20

【0226】

可能性のある候補分子または分子の候補混合物は、特に、化学的または生物的な由来を持つ、天然に存在する、および/または合成的、組換え的および/または化学的に生産された物質、化合物または組成物であってよく、または本明細書に上述した化合物もしくは組成物であってもよい。したがって、候補分子は、野生型P2X7R ATP感受性イオンチャンネルと結合および/または相互作用する、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、アミノ酸および/もしくはそれらの誘導体、またはその他の化合物、例えばイオンでありうる。このような結合性および/または相互作用性の候補化合物は、特に、例えばFields, *Nature* 340 (1989), 245-246; Gyuris, *Cell* 75 (1993), 791-801; またはZervos, *Cell* 72 (1993), 223-232に記載された、酵母ツーハイブリッドシステムまたは改変酵母ツーハイブリッドシステムを用いて見いだされる可能性がある。

30

【0227】

さらに、可能性のある候補分子を、前記候補分子が引き起こす影響を解明する目的で、本発明のポリペプチドを発現する卵母細胞もしくはHEK 293細胞などの細胞と、または本発明のポリペプチドを含む膜パッチと接触させ、対応する応答(特に、用量応答、電流応答または単方向流チャンネル応答)を測定することもできる。

【0228】

また、本発明によるP2X7R ATP感受性イオンチャンネルと相互作用しうる分子の同定、特性決定およびスクリーニングのための方法であって、96ウェル、384ウェル、1536ウェル(および他の)市販のプレートを用いて行われる、いわゆるハイスループットスクリーニング方法および当技術分野で公知の類似のアプローチを含む方法も本発明の範囲に含まれる (Spencer, *Biotechnol. Bioeng.* 61 (1998), 61-67; Oldenburg, *Annu. Rev. Med. Chem.* 33 (1998), 301-311)。本発明に従って用いられるそのほかの方法には、ハイスループットスクリーニングにおける均等蛍光読み取り (homogenous fluorescence readout) (特に、Pope, *Drug Discovery Today* 4 (1999), 350-362に記載されているような) が非制限的に含まれる。P2X7R ATP感受性イオンチャンネルと相互作用しうる分子の同定、特性決定および/またはスクリーニングのための本発明の方法では、特に、本発明のポリ

40

50

ペプチドを発現する本明細書に定義した宿主を用いる。細胞系アッセイ、前記アッセイおよび/または測定のための装置は当技術分野で周知であり、特に、Gonzalez, Drug Discovery Today 4 (1999), 431-439またはRamm, Drug Discovery Today 4 (1999), 401-410に記載されている。また、本明細書に記載したハイスループットスクリーニングを、例えば、当技術分野でルーチン的な方法を用いてアフリカツメガエル卵母細胞などの宿主細胞に導入しうるcRNA、すなわちcDNA構築物由来の合成RNAを用いることによって行うことも想定されている。一例として、直接的な核酸注入には、Eppendorf社の微量注入システム(Micromnipulator 5171およびTransjector 5242)などを用いることができる。注入/形質転換された細胞は、約4時間後に、当技術分野で一般的に実施されているパッチクランプ法を用いてイオン流に関して分析することができる。

10

【0229】

さらに、本発明は、薬学的組成物の製造のための方法であって、本発明のP2X7R ATP感受性イオンチャンネルと相互作用しうる、および/またはその特性を変化させる分子の同定、特性決定および/またはスクリーニングのための方法の諸段階を含む上に、前記同定された、特性決定された、および/またはスクリーニングされた分子の誘導体を生成するさらなる段階をさらに含む方法にも関する。このような誘導体は特に、ペプチド模倣の手法によって生成することができる。

【0230】

本発明はさらに、薬学的組成物の製造のための方法であって、本発明のP2X7R ATP感受性イオンチャンネルと相互作用しうる、および/またはその特性を変化させる分子の同定、特性決定および/またはスクリーニングのための方法の諸段階を含む上に、同定された、特性決定された、スクリーニングされたおよび/または誘導体化された分子を薬学的に許容される形態へと製剤化する段階を含む方法にも関する。

20

【0231】

1つのより好ましい態様において、本発明は、前記分子に神経保護分子、向知性分子および/または抗てんかん分子が含まれるような方法に関する。

【0232】

本発明のさらにもう1つの態様は、抗うつ効果を有しうる生物的、化学的または薬理学的作用因子を同定することを目的とする、P2X7Rポリペプチド、特に本発明によるものの使用法である。「作用因子(agent)」という用語は、対象または細胞に対して適切に投与された場合に所望の治療的または予防的な効果を誘導しうる化合物または化学的組成物のことを指す。例えば、本発明は、イオンの流入および流出を調節する作用因子の同定および特性決定を目的とする、P2X7Rを発現する細胞の作製を可能にする。例えば、HEK293細胞またはその他の細胞系(例えば、HCN-1A、HCN-2、HIT-T15、RIN-m5F、betaTC3、PC12、HT22、SH-SY5Y、Neuro2AまたはCA77)に対して、ヒトP2X7RをコードするcDNAを安定的にトランスフェクトし、12、96および384ウェルプレートにプレATINGすることができる。前記細胞を適切な培地中で培養する。このような培地の例は当技術分野で周知であり、例えば、Freshney, 「動物細胞の培養: 基本技法マニュアル(Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique)」, 4th edition, Wiley-Liss Publishing, 2000を参照されたい。

30

40

【0233】

続いて、前記細胞を前記作用因子とともに15分インキュベートし、その後3mM ATPにより10分間刺激する。続いて各ウェル内の細胞外培地の急速吸引によって反応を停止させる。次に各ウェル内の細胞を1mlの10% HNO₃により一晚抽出する。抽出物中のカリウム(K⁺)含有量は、原子吸光分光法によって決定することができる。続いて、3mM ATPによって引き起こされるK⁺放出の阻害率または誘発率を測定し、作用因子の非存在下におけるK⁺放出と比較する作用因子の機能を測定する。また、P2X7R活性をカルシウムの移動によってモニターすることもできる(Ca²⁺; Denver et al., Drug Discov. Today 7 (1998), 323-332; Gonzalez et al., Drug Discov. Today 9 (1999), 431-439; Helmchen and Waters, Eur. J. Pharmacol. 447 (2002), 119-129)。また、作用因子の検査をATPの非存在下

50

で行うこともできる。

【0234】

P2X7R活性を、グルタミン酸およびGABAなどの神経伝達物質の分泌によってモニターすることもできる。処理細胞における神経伝達物質レベルは、適した方法、例えば、固相酵素免疫アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などによって定量化しうる。これらの方法を用いて、多数の化合物を神経伝達物質 (例えば、グルタミン酸) 分泌の増加に関してスクリーニングすることができる。グルタミン酸の放出は、例えば、蛍光分析グルタミン酸放出アッセイ (例えば、Amplex Redグルタミン酸 / グルタミン酸オキシダーゼアッセイキット、Molecular Probes) またはハイスループット電気生理学によって測定することができる。

10

【0235】

さらにもう1つの面において、本発明は、本明細書に開示したP2X7Rポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを、前記P2X7Rポリペプチドまたは本発明のポリペプチドに対するアゴニスト活性を有する化合物または作用因子を同定するための方法に用いる。作用因子および化合物については本明細書の以上および以下に述べている。詳細には、P2X7遺伝子を発現する細胞を本明細書に上述した作用因子候補、分子または化合物と接触させ、カルシウム流入または臭化エチジウム移入を、特に以下の実施例8に記載したような、当技術分野で公知の方法によって測定する。P2X7Rに対する作動薬の同定のために用いられる細胞は、好ましくは海馬細胞系の細胞である。海馬細胞系は、例えばEP 0 773 287号またはEP 0 773 292号に記載されたような当技術分野で公知の方法によって調製される。海馬細胞系の非制限的な例には、Eves et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 4373-4377に記載されたラットH19-7海馬細胞 (ATCC-2526)、Lee et al. J. Neurosci. 10 (1992), 1779-1787に記載されたマウスHN9.10海馬細胞、またはRenfranz et al., Cell 66 (1991), 713-729に記載されたラットHi5B海馬細胞がある。好ましくは、前述の方法に従って用いられる海馬細胞は、HT系の細胞である (Davis and Maher (1994), Brain Res. 652, 169-173), Morimoto and Koshland (1990), Neuron 5, 875-880を参照)。また、海馬細胞は内因性P2X7R遺伝子を発現することが好ましい。しかし、当技術分野で一般的に知られた方法を用いて外因性P2X7R遺伝子を導入することにより、このような細胞を遺伝的に改変しうることも想定されている。以下の実施例に実施例8に記載されているように、本明細書に記載のP2X7Rポリペプチドまたは本発明のポリペプチドに対する作動薬を同定

20

30

【0236】

もう1つの態様では、生物的または薬学的作用因子に応答したレポーター遺伝子の発現の増大または低下を、対応する細胞に存在するタンパク質もしくはmRNAのレベルもしくは状態を検出する、またはレポーター遺伝子の生物活性を検出する方法を用いて分析することが可能な、P2X7Rプロモーター (上記参照) によって調節されるレポーター遺伝子をコードする核酸構築物を細胞に対してトランスフェクトする。用いる適したレポーター分子または標識には、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光、化学発光物質または発色物質、ならびに基質、補助因子、阻害薬、磁性粒子などが含まれる。このような薬物スクリーニングアッセイの設計は当技術分野で周知である; Harvey ed., 「薬剤探索法の進歩 (Advances in drug discovery techniques)」、John Wiley and Sons, 1998; Vogel and Vogel eds., 「薬剤の探索および評価: 医薬品アッセイ (Drug discovery and evaluation: Pharmaceutical Assay)」、Springer-Verlag Berlin, 1997)。例えば、動物モデルにおける薬物スクリーニング、動物細胞を用いるインビトロ試験、または動物における毒性試験を含むインビボ試験。インビトロモデルは、さまざまな薬物スクリーニング法の任意のものにおいて化合物のライブラリーのスクリーニングのために用いることができる。

40

【0237】

候補作用因子には数多くの化学物質群が含まれるが、それらは一般には有機分子、好ましくは分子量が50ダルトンよりも高く約2,500ダルトンよりも低い低分子量有機化合物である。候補作用因子は、蛋白質との構造的相互作用、特に水素結合のために必要な官能基

50

を含み、一般にはアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基を少なくとも1つ含み、好ましくはこのような化学官能基を少なくとも2つ含む。候補作用因子はしばしば、1つまたは複数の上記の官能基によって置換された、環状炭素もしくは複素環式構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む。

【0238】

候補作用因子は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体またはそれらの組み合わせを含む、生体分子からも見いだされる。候補作用因子は、合成化合物または天然化合物のライブラリーを含む、多種多様な供給源から得られる。例えば、ランダムなオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、多種多様な有機化合物および生体分子のランダムおよび定方向的な合成のための数多くの手段を利用することができる。または、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態にある天然化合物のライブラリーが入手可能であり、またはそれらを容易に作製することができる。加えて、天然または合成的に作製されたライブラリーおよび化合物を、従来の化学的、物理的および生化学的手段によって容易に改変し、コンビナトリアルライブラリーの作製に用いることもできる。構造類似体を作製するために、既知の薬物にアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの定方向的またはランダムな化学修飾を行ってもよい。

10

【0239】

用いる薬物スクリーニングのためのもう1つの技法は、公開PCT出願WO 84/03564号に記載されたような、対象となるタンパク質に対する適した結合親和性を有する化合物のハイスループットスクリーニングをもたらす。この方法では、本発明のタンパク質に対して適用される場合、多数のさまざまな低分子量被験化合物、例えば、アプタマー、ペプチド、低分子量化合物などを、プラスチック製ピンなどの固体基質または何らかの他の表面上に用意するか合成する。被験化合物をタンパク質またはその断片と反応させて、洗浄する。続いて、結合したタンパク質を当該技術分野で周知の方法によって検出する。前述の薬物スクリーニング法に用いるために、精製タンパク質をプレート上に直接コーティングすることもできる。または、ペプチドを捕捉してそれを固体支持体上に固定化するために非中和性抗体を用いることもできる。もう1つの態様においては、タンパク質と結合しうる中和抗体がタンパク質の結合に関して被験化合物と特異的に競合する競合的薬物スクリーニングアッセイを用いてもよい。このようにして、抗体を用いて、タンパク質と共通の1つまたは複数の抗原決定基を有するペプチドの存在を検出することができる。

20

30

【0240】

本発明はさらに、特に、製造しようとする薬学的組成物が、神経保護物質、向知性物質、プリリアントブルー、ピペリジンまたはそのピペラジン誘導体、アダマンタン誘導体、置換型フェニル化合物、酸化ATP、2-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸または3-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン-5-三リン酸をさらに含む方法を提供する。また、製造しようとする薬学的組成物が、フルオキシセチン、パロキシセチン、セルトラリン、フルロキサミン (fluroxamine)、ミルタザピン、レオレチン (reoretine)、ネファゾドンまたは炭酸リチウムなどの抗うつ薬をさらに含む方法も想定されている。

【0241】

本発明の1つの好ましい態様において、前述の方法の化合物には、変化したATP感受性イオンチャンネルP2X7Rに対する拮抗薬、部分的拮抗薬、部分的作動薬および/または作動薬が含まれる。

40

【0242】

本発明によれば、「拮抗薬」という用語は、アゴニスト作用を阻害および/または抑制しうる分子/物質のことを表す。「拮抗薬」という用語には、特にMutschler, 「薬物作用 (Arzneimittelwirkungen)」(1986), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germanyに記載されたような、競合的、非競合的、機能的および化学的な拮抗薬が含まれる。本発明による「部分的拮抗薬」という用語は、特に非競合的機序により、作動薬の作用を不完全に遮断しうる分子/物質のことを意味する。

【0243】

50

本発明の文脈において、拮抗薬は好ましくは、それ自体では応答を引き起こさないが、作動薬により媒介される応答は阻止する薬剤である。これは、別の生物活性物質によって通常誘導される受容体関連応答に対抗する化学的実体である。P2X7Rの場合、拮抗薬のIC50は10ナノモル濃度から300マイクロモル濃度までの間である。

【0244】

本発明によれば、「作動薬」は親和性ならびに固有活性を有する分子/物質を表す。ほとんどの場合、前記固有活性()は、前記作動薬によって誘発される効果(EA)と所定の生体系で得られる最大限の効果(Emax)との比率に比例すると定義される：したがって、固有活性は以下の式として定義しうる：

$$\alpha \sim \frac{EA}{E_{\max}}$$

10

【0245】

最も高い相対的固有活性は、EA/Emax = 1の場合に得られる。固有活性が1である作動薬は完全な作動薬であり、一方、固有活性が > 0かつ < 1である物質/分子は部分的作動薬である。部分的作動薬は二元的作用を示す、すなわちそれらはアゴニスト作用ならびにアンタゴニスト作用をともに含む。

【0246】

好ましくは、本発明の文脈において、作動薬(完全な作動薬)は、受容体と相互作用して、その受容体に特徴的な最大限または完全な生理的または薬理的応答を惹起させる内因性物質または薬剤である。P2X7Rの天然リガンドであるATPはEC50が300 μMである作動薬であり、一方、合成P2X7R作動薬Bz-ATPのEC50は8 μMである。したがって、P2X7Rの作動薬のEC50は300 μMと等しいかそれ以下である。EC50は、X軸に作動薬の濃度をプロットし、Y軸にイオン流をプロットした用量反応曲線上でのベースライン応答と最大応答との半分の応答を誘発する作動薬の濃度として定義される。逆作動薬(負の拮抗薬とも呼ばれる)とは、作動薬のものと同一受容体に対して作用しながら、反対の効果を生じる薬剤のことである。部分的作動薬は、同じく生理的または薬理的応答を引き起こすが、適用した薬剤の量にかかわらず、その最大限応答が完全な作動薬の最大限応答を下回る内因性物質または薬剤である。P2X7Rの場合、部分的作動薬のEC50は300 μMを上回る。

20

30

【0247】

したがって、当業者は、上記の方法のいずれかに従って同定および/または特性決定を行おうとする化合物/分子/物質のアゴニストおよび/もしくはアンタゴニスト作用ならびに/または特性を解明する目的で、本発明の化合物および方法を容易に用いることができる。好ましくは、本明細書に上述した変異および/または欠失を含むATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの同定された拮抗薬は、野生型P2X7R ATP感受性イオンチャンネルによって通常示される性質を回復させるのに有用である。本明細書に上述した変異および/または欠失を含むATP感受性イオンチャンネルP2X7Rの同定された作動薬は、P2X7R ATP感受性イオンチャンネルの失われた機能を回復させるのに有用である可能性がある。

【0248】

以下の実施例により、本発明およびその多くの利点に関してより良い理解が得られると思われるが、これらは例示のみを目的としており、本発明の範囲を制限することは全く意図していない。

40

【0249】

実施例1

均一なヒト集団における双極性情動障害の連鎖解析

Saguenay / Lac St-Jean地域からサンプリングされた合計485例の個体を含む種々のサイズの41家系を連鎖解析に用いた。個体は診断名に従って以下のように分布した：双極性障害I型(BPI)または双極性型の分裂情動障害に罹患した個体105例；双極性障害II型(BPII)と診断された個体42例；再発性大うつ病と診断された個体54例；および単一エピソード

50

ド大うつ病の個体57例。残りの個体227例は罹患しておらず正常であった。計算の目的には以下の分類を用いた：BPI、双極性型の分裂情動障害、BPIIおよび再発性大うつ病のいずれかと診断された個体は罹患例とみなした（ $n=201$ ）；単一の大うつ病エピソードを有する個体は表現型不明と評価した（ $n=57$ ）；他のすべての診断は非罹患例とみなした（ $n=227$ ）。

【0250】

各個体からの血液試料を10ml K3 EDTA Vacutainerチューブ（Becton-Dickinson）に集め、Puregene DNA単離キット（Gentra Systems）によりゲノムDNAを単離した。血液を50ml コニカルチューブに注ぎ入れ、4倍容積の赤血球溶解用溶液で希釈した。室温で10分間インキュベートした後に、チューブを2,000gで10分間遠心し、上清を除去して細胞ペレットおよび残りの液体200-400 μ lを残した。チューブのボルテックス処理によって細胞を再懸濁させ、ピペティングを行いながら細胞溶解溶液9mlを添加した。RNアーゼA溶液（20mg/ml）40 μ lを添加し、チューブを数回倒置することによって試料を混合した。試料を37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートし、室温まで冷ました。タンパク質沈降溶液3mlを細胞溶解液に添加した。チューブを30秒間強くボルテックス処理し、2,000gで10分間遠心した。上清を、100% イソプロパノール9mlを含む新たなチューブに注ぎ入れた。数回穏やかに転置することによって試料を混合した。チューブを2,000gで5分間遠心した。DNAの白色ペレットを10mlの70% エタノールで洗浄し、チューブを2,000gで3分間遠心した。エタノールを除去し、ペレットを部分的に風乾させた。DNAをDNA水和溶液500 μ l中に溶解した。最終濃度を300~400 μ g/mlに調整した。

10

20

【0251】

マイクロサテライトマーカーの遺伝子型判定には、蛍光を利用する方法を用いた。手短かに述べると、各反復配列を含む領域を、非標識プライマーおよび蛍光標識プライマー（Applied biosystems inc, CA, USA）を用いるPCRによって増幅した。マーカーに付随する色素および対応するPCR産物の長さは表2に列記されている。PCR反応には、10ngのDNA試料、0.2単位のTaq platinum DNAポリメラーゼ（Invitrogene, CA, USA）、20mM Tris-Cl（pH 8.4）、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、100 μ MのdNTPおよび1.5 μ Mずつの各プライマーを用いた（最終容積7 μ l中）。Taq platinum DNAポリメラーゼを活性化するために試料を95 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートした後に、10サイクルのPCR増幅を以下の通りに行った：95 $^{\circ}$ C 15秒間；58 $^{\circ}$ C 15秒間；72 $^{\circ}$ C 30秒間；その後以下の通りに15サイクルを行った：89 $^{\circ}$ C 15秒間；58 $^{\circ}$ C 15秒間；72 $^{\circ}$ C 30秒間。最後に試料を72 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。PCR増幅の後に試料を色素標識プライマーおよびPCR産物の長さに応じてプールした（4種類の試料のプール）。プールした試料をABI 3100 DNA分析装置（Applied Biosystems inc, CA, USA）を用いて分離した。その結果得られたデータを、以前に記載されたように、Genemapper2（Applied Biosystems inc, CA, USA）を用いて解析し、Macintosh環境で設計された4Dデータベース（ACIUS）中にコンパイルした（Morissette et al., Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.) 88 (1999), 567-587）。

30

【0252】

以下の連鎖解析に用いたマーカーは表2に示されている。連続したマーカー間の組換え率（ q ）を解析家系別に計算した。

40

（表2）連鎖解析のために用いたゲノムマーカー

座位	付随する色素	対立遺伝子の長さ(bp)	距離(q)	累積距離(cM)	ヘテロ接合度(%)
D12S1619	VIC	170-210	0.0135	0.00	74.5
NBG11	VIC	204-218	0.006	1.37	65.5
D12S1666	FAM	241-281	0.001	1.97	66.9
NBG5	VIC	253-261	0.001	2.07	38.3
D12S1721	VIC	263-299	0.005	2.17	72.1
NBG8	VIC	166-188	0.011	2.67	73.3
NBG6	NED	182-218	0.0115	3.79	73.9
NBG9	VIC	156-180	0.0035	4.95	68.9
NBG10	FAM	174-186	0.001	5.30	49.7
NBG12	NED	165-207	0.009	5.40	64.2
NBG4	NED	171-199	0.001	6.31	66.4
NBG3	VIC	182-206	0.006	6.41	64.8
NBG2	VIC	171-199		7.01	54.2

10

20

30

-cMorgans単位での累積距離に関してはホールデンマップ関数を用いた。

二点のパラメトリック分析に関しては、遺伝モデルに対するパラメトリックLODスコアを最大化するMODスコア分析を用いた。

劣性モデルに関するMODスコア分析では以下の結果が得られた。

【 0 2 5 3 】

(表3) 劣性モデルに関するMODスコア分析

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	LODスコア(q最大)
D12S1619	0.0135	0.00	3.46 (0.10)
NBG11	0.006	1.37	4.06 (0.04)
D12S1666	0.001	1.97	1.22 (0.14)
NBG5	0.001	2.07	0.66 (0.16)
D12S1721	0.005	2.17	2.82 (0.10)
NBG8	0.011	2.67	1.51 (0.00)
NBG6	0.0115	3.79	4.77 (0.06)
NBG9	0.0035	4.95	0.75 (0.22)
NBG10	0.001	5.30	0.74 (0.00)
NBG12	0.009	5.40	1.41 (0.16)
NBG4	0.001	6.31	3.56 (0.08)
NBG3	0.006	6.41	3.96 (0.08)
NBG2		7.01	2.59 (0.10)

10

【 0 2 5 4 】

罹患した同胞対の間で共有される対立遺伝子を分析するために、ANALYZE、ASPEX V1.85パッケージからのsib_Phase (David Hinds and Neil Risch 1999 ; ftp://lahmed.stanford.edu/pub/aspex、同じくhttp://watson.hgen.pitt.edu/docs usage.htmlも参照されたい) およびSIMWALK2 (Sobel and Lange, Am J Hum Genet 58 (1996), 1323-1337) を用いたモデルフリーLODスコアの検討を行った。ANALYZEプログラムは、同胞群に対してそれぞれのサイズに応じた重み付けを行う。ASPEX sib_Phaseプログラムは失われた情報を対立遺伝子頻度を利用して再構築し、親が不足しているデータセットに適応しているが、型判定された他の子供を利用して親の再構築および相特定を行うこともできる。SimWalk2は、任意のサイズの系統に対するハプロタイプ解析、パラメトリック連鎖解析、非パラメトリック連鎖 (NPL) 解析、共通同祖遺伝子数 (IBD) およびミスタイプ解析のための統計遺伝学用コンピュータアプリケーションである。SimWalk2は、これらの多点解析を行うために、マルコフ連鎖モンテカルロ (MCMC) およびシミュレートされたアニーリングアルゴリズムを用いる。

20

【 0 2 5 5 】

ASPEX sib_Phaseを2種類のコンピュータ計算戦略に用いた：第1に、厳密に独立した同胞対を用いることによる；第2に、すべての罹患した同胞対の組み合わせを用いることによる。ASPEXは二点および多点での計算のために用いた。

30

【 0 2 5 6 】

ANALYZEおよびASPEXを用いて観察された二点解析の結果を表4に示した。

(表4) ANALYZEおよびASPEXを用いて観察された二点解析の結果

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	ANALYZE による同胞対 LODスコア	sib_phase LODスコア 独立した同胞対	sib_phase LODスコア すべての同胞対
D12S1619	0.0135	0.00	2.31	2.55	3.14
NBG11	0.006	1.37	2.83	2.72	3.27
D12S1666	0.001	1.97	1.01	2.52	3.14
NBG5	0.001	2.07	0.50	2.52	3.13
D12S1721	0.005	2.17	1.57	2.51	3.12
NBG8	0.011	2.67	0.51	2.24	2.75
NBG6	0.0115	3.79	2.55	2.11	2.64
NBG9	0.0035	4.95	0.49	1.65	1.97
NBG10	0.001	5.30	0.77	1.45	2.10
NBG12	0.009	5.40	0.47	1.44	2.17
NBG4	0.001	6.31	1.21	1.29	3.07
NBG3	0.006	6.41	1.84	1.29	3.07
NBG2		7.01	1.24	1.22	3.00

40

【 0 2 5 7 】

SIMWALK2は血統樹に基づいて4種類の統計量を計算した。これらの統計量は、ファウン

50

ダーに由来するマーカー対立遺伝子間のクラスター化の程度の指標となる。

【0258】

統計量Aは、罹患者に対する、異なるファウンダー対立遺伝子に寄与する対立遺伝子の数であり、これは劣性形質に対する連鎖を検出するには最も強力である。統計量Bは何らかの1つのファウンダー対立遺伝子に由来する、罹患者における対立遺伝子の最大数であり、これは優性形質に対する連鎖を検出するには最も強力である。統計量Cは、罹患者間でのマーカー対立遺伝子の「エントロピー」である。統計量Dは、IBD血縁係数によって計測された、すべての罹患者対の間で共有される対立遺伝子の程度である。統計量CおよびDは、少数のファウンダー対立遺伝子が罹患者間に過度に存在するか否かを示す、より一般的な統計量である。

10

【0259】

表5は、SIMWALK2を用いて観察された結果を示している。本発明者らは、p値は一般に保存的であるべきと指摘する。それらは $-\text{Log}(p\text{-値})$ として表されている。対応関係については、 $-\text{Log}(0.05) = 1.30$ 、 $-\text{Log}(0.01) = 2$ 、 $-\text{Log}(0.001) = 3$ などである。

(表5) SIMWALK2解析

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	STAT(A) -Log(p-値)	STAT(B) -Log(p-値)	STAT(C) -Log(p-値)	STAT(D) -Log(p-値)
D12S1619	0.0135	0.00	1.4550	0.4103	1.1306	1.1310
NBG11	0.006	1.37	2.0157	1.4375	1.5955	1.9845
D12S1666	0.001	1.97	2.0236	0.9765	1.4727	1.4614
NBG5	0.001	2.07	1.7596	0.8558	1.3866	1.3602
D12S1721	0.005	2.17	1.6628	1.1692	1.4235	1.6384
NBG8	0.011	2.67	1.5374	0.6940	1.0623	1.1552
NBG6	0.0115	3.79	1.5896	0.4452	1.0935	1.1786
NBG9	0.0035	4.95	1.2677	0.3815	0.8412	0.9133
NBG10	0.001	5.30	1.1117	0.3642	0.6987	0.7554
NBG12	0.009	5.40	1.0809	0.3485	0.6694	0.7179
NBG4	0.001	6.31	1.1024	0.4148	0.6368	0.8544
NBG3	0.006	6.41	1.1040	0.4146	0.6373	0.8559
NBG2		7.01	1.0963	0.5380	0.6587	0.9356

20

【0260】

独立した同胞対のみを用いた場合にASPEXを用いて観察された多点解析の結果(図1b)。最大のLODスコア値はNBG11で観察された。

30

【0261】

すべての同胞対を考慮に入れた場合にASPEXを用いて観察された多点解析の結果(図1c)。最大のLODスコア値はNBG11で観察されたが、第2のピークはNBG4およびNBG3に認められた。

【0262】

ASPEXによって計算された多点および二点でのLODスコア値は同程度であった。すべての同胞対を用いた場合に観察された第2のピークは、NBG12に対してテロメア側にある染色体領域を共有する、多くの罹患同胞との組換え罹患個体の存在によって説明される可能性がある。この種の個体は、1人の同胞ではなくすべての同胞対を用いた場合のLODスコア値に対して大きな影響を及ぼす。この状況は2つの同胞群で観察された。

40

【0263】

引き続き層解析を行った。HOMOGでは不均一性に関する証拠は検出されなかったが、選択した染色体領域に認められた対立遺伝子共有に基づいて均一性検定を構築した。この解析には41家系のうち20家系のみを用いたが、これは他の家系ではこれらの領域のすべてには遺伝子型判定が行われていなかったためである。選択した領域内の各マーカーに関して、罹患した同胞対による対立遺伝子共有IBDの割合をASPEX(sib_phase)を用いて推定した。保たれた各領域に関して、共有対立遺伝子の割合を主成分解析のための変数として用い、第一主成分を連鎖の指数として用いた。不均一性(相関 <0)またはエピスタシス

50

(相関 > 0) を検出するために、相関解析をこれらの指数に対して行った。Fisherアルゴリズムを用いて、家系を特定の座位と連鎖するものと連鎖しないものの2つの群に分けた。染色体12領域と染色体15領域との間には負の相関が観察された ($r = -0.51$; $p = 0.023$)。クラスター解析からは、20家系のうち11家系は染色体12との連鎖があることが示唆された。この部分標本を層と呼んだ。

【0264】

この層は11家系(サンプリングした266個体)を含み、BPIまたは双極性型の分裂情動障害が52例、BPIIが20例、再発性大うつ病が28例含まれる。

【0265】

表6に示された以下のMODスコア値を劣性モデルで得た。

(表6) 劣性モデルによるMODスコア

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	LODスコア (q最大)
D12S1619	0.0135	0.00	4.03 (0.08)
NBG11	0.006	1.37	4.98 (0.00)
D12S1666	0.001	1.97	1.49 (0.12)
NBG5	0.001	2.07	0.79 (0.14)
D12S1721	0.005	2.17	4.23 (0.06)
NBG8	0.011	2.67	2.79 (0.00)
NBG6	0.0115	3.79	5.06 (0.06)
NBG9	0.0035	4.95	1.57 (0.14)
NBG10	0.001	5.30	1.73 (0.00)
NBG12	0.009	5.40	1.65 (0.12)
NBG4	0.001	6.31	4.60 (0.08)
NBG3	0.006	6.41	4.84 (0.06)
NBG2		7.01	2.80 (0.06)

10

20

【0266】

層に対して適用されたANALYZEおよびASPEXを用いて得たモデルフリーLODスコアの結果は表7に示されている。

(表7) ANALYZEおよびASPEXを用いて得たモデルフリーLODスコア

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	ANALYZE LODスコア	sib_phase LODスコア 独立した同胞対	sib_phase LODスコア すべての同胞対
D12S1619	0.0135	0.00	4.54	5.29	7.65
NBG11	0.006	1.37	4.29	5.34	7.70
D12S1666	0.001	1.97	2.77	5.36	7.74
NBG5	0.001	2.07	0.67	5.36	7.74
D12S1721	0.005	2.17	4.48	5.35	7.74
NBG8	0.011	2.67	2.97	4.87	7.00
NBG6	0.0115	3.79	4.05	4.59	6.76
NBG9	0.0035	4.95	2.03	3.72	5.41
NBG10	0.001	5.30	2.00	3.42	5.89
NBG12	0.009	5.40	0.89	3.44	6.11
NBG4	0.001	6.31	2.84	3.71	9.00
NBG3	0.006	6.41	3.89	3.71	9.01
NBG2		7.01	1.91	3.52	8.73

30

40

【0267】

SIMWALK2を用いて観察されたモデルフリーの結果は表8に示されている。

(表8) SIMWALK2を用いて得たモデルフリーLODスコア

座位	距離 (q)	累積距離 (cM)	STAT(A) -Log(p- 値)	STAT(B) -Log(p- 値)	STAT(C) -Log(p- 値)	STAT(D) -Log(p- 値)
D12S1619	0.0135	0,00	2,5963	0,9565	3,2156	2,3584
NBG11	0.006	1,37	3,0698	1,7400	3,7747	3,0103
D12S1666	0.001	1,97	2,9340	1,6546	3,5812	2,7223
NBG5	0.001	2,07	2,9781	1,2722	3,6505	2,7846
D12S1721	0.005	2,17	2,9680	1,2630	3,6844	2,7752
NBG8	0.011	2,67	3,0954	1,0804	3,4399	2,5654
NBG6	0.0115	3,79	3,1632	1,0672	3,2670	2,5956
NBG9	0.0035	4,95	2,2106	1,0137	2,7765	2,4456
NBG10	0.001	5,30	2,5513	1,0251	2,7625	2,1914
NBG12	0.009	5,40	2,4893	0,9868	2,6841	2,0920
NBG4	0.001	6,31	2,9028	1,1312	3,4063	2,8156
NBG3	0.006	6,41	2,9070	1,1326	3,4637	2,8300
NBG2		7,01	2,8430	1,1108	3,3135	2,7978

10

【 0 2 6 8 】

独立した同胞対のみ (図1b) またはすべての同胞対 (図1c) を考慮することによる、AS PEX sib_phaseを用いた層に対する多点解析の結果は図1dおよび1eに示されている。以前に報告したように、すべての同胞対を観察した場合には第2のピークが現れた。

【 0 2 6 9 】

信頼区間を算出した。感受性遺伝子 (say t) の位置の推定にはGENEFINDER (Liang et al., Am. J. Hum. Genet. 66 (2000), 1631-1641) を用いた。この方法は、多数のマーカーに関する、罹患した同胞対のIBD (同祖遺伝子) 共有に基づく。本発明者らの解析においては、系図を同胞群に分類した。56の核家族および183の同胞対を用いた。Liang KY, Huang CY, Beaty TH (2000) 「同胞対における質的形質および量的形質の多点解析のための統一化されたサンプリングアプローチ (A unified sampling approach for multipoint analysis of qualitative and quantitative traits in sib pairs)」、Am J Hum Genet 66: 1631-1641。

20

【 0 2 7 0 】

GENEFINDERの結果は、情動障害に関する感受性遺伝子がマーカーD12S1721の 3.19 ± 0.44 6cMテロメア側に位置することを示している (D12S1721は性平均化されたMarshfield染色体12マップ上の136.82cMにほぼ位置する)。

30

95% C.I.: [2.32, 4.06];

99% C.I.: [2.03, 4.35]

99.9% C.I.: [1.71, 4.67]

【 0 2 7 1 】

この層からは24の核家族および107の同胞対が得られ、感受性遺伝子の位置は 3.07 ± 0.5 7と推定された (以上のマップを参照)。以下の信頼区間 (C.I.) が得られた。

95% C.I.: [1.95, 4.19];

99% C.I.: [1.59, 4.55]

99.9% C.I.: [1.18, 4.96]

40

【 0 2 7 2 】

NBGマイクロサテライトマーカーを用いる関連解析を、CLUMP (Sham & Curtis, Ann. Hum. Genet. 59 (1995), 97-105) を用いて行った。標本は以下の通りに分布した: 男性83例 / 症例; 女性124例 / 症例; 男性95例 / 対照; および女性101例 / 対照。p値の推測のために1000回のシミュレーションを用いた。観察された結果を表9にまとめている。

(表9) NBGマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析

座位	標本		T1統計量 (p-値)	T2統計量 (p-値)	T3統計量 (p-値)	T4統計量 (p-値)
	症例	対照				
NBG11	204	129	0.226	0.562	0.410	0.421
NBG5	206	194	0.972	0.980	0.948	0.971
NBG8	206	194	0.983	1.000	0.994	0.978
NBG6	206	194	0.147	0.074	0.759	0.485
NBG9	206	190	0.512	0.940	0.786	0.583
NBG10	206	190	0.594	0.480	0.403	0.709
NBG12	206	190	0.002	0.019	0.003	0.117

10

T1統計量は、生の分割表に対する通常のカイ二乗統計量である。

T2統計量は、列を小さな期待値とまとめた後に得られる分割表に対して適用される通常のカイ二乗統計量である。

T3統計量は、元の表の1つの列を他の列の合計と比較することによって得られる最大のカイ二乗統計量である。

T4統計量は、対立遺伝子の何らかの組み合わせをその残りと比較することによって得られる最大のカイ二乗統計量である。

【0273】

1%レベルで有意な関連が得られたのはNBG12マーカーのみであった。他のマーカーに関しては、双極性障害と関連性があるように思われる単一の対立遺伝子は存在しなかった。罹患者間に過度に存在するファウンダー対立遺伝子は存在しないように思われる。遺伝子型とNBGマーカーとの関連性に関しては有意な結果はみられない。

20

【0274】

ほかの対照例および症例の個体を含む標本に対して、マイクロサテライトマーカーを利用するさらなる関連解析をCLUMPを用いて行った。p値の推定には1000回のシミュレーションを用いた。

(表9a) マイクロサテライトマーカーの対立遺伝子解析および遺伝子型解析のための、統計量T1およびT3に関してCLUMPを用いて観察された経験的p値

名称	有効な		対立遺伝子		遺伝子型	
	症例	対照	T1 (p-値)	T3 (p-値)	T1 (p-値)	T3 (p-値)
NBG11	204	98	0.250	0.421	0.680	0.553
D12S1666	208	175	0.366	0.543	0.393	0.476
NBG5	213	179	0.969	0.934	0.997	1.000
D12S1721	210	176	0.693	0.463	0.805	0.838
NBG8	213	179	0.754	0.921	0.973	0.929
NBG6	213	179	0.008	0.356	0.172	0.449
NBG9	213	175	0.759	0.768	0.690	0.606
NBG10	213	175	0.521	0.178	0.122	0.173
D12S1349	212	180	0.887	0.864	0.782	0.816
NBG12	213	175	0.002	<10 ⁻³	0.018	0.552
NBG4	207	178	0.418	0.506	0.813	0.545
NBG3	209	175	0.171	0.829	0.601	0.897
D12S378	211	180	0.171	0.405	0.540	0.560
NBG2	210	170	0.896	0.749	0.210	0.613
D12S1614	210	179	0.803	0.692	0.710	0.831
D12S342	211	180	0.394	0.740	0.445	0.622
D12S340	209	179	0.890	0.869	0.895	0.838
D12S1639	209	180	0.087	0.170	0.652	0.295
D12S1634	211	181	0.361	0.248	0.505	0.590
D12S2075	203	181	0.023	0.157	0.085	0.451

30

40

【0275】

50

HWE仮説は、多数の検討に対する保存的ボンフェロニ補正を適用した後に各マイクロサテライトマーカーについて5%レベルで成立した(Bland & Altman, Brit. J. Med. 310 (1995) 170)。表9aは、対立遺伝子および遺伝子型の関連解析に関してCLUMPを用いて観察された経験的p値を列記している。対立遺伝子関連解析の下でT1およびT3統計量に関してマーカーNBG12では0.005未満の経験的p値が観察された。T1統計量からは双極性情動障害とNBG6との間に対立遺伝子関連が示差された(経験的p値=0.008)。さらに、最も遠位のマーカーD12S2075では辛うじて有意な経験的p値である0.023が観察された。

【0276】

以上を総合すると、パラメトリック解析およびモデルフリー多点解析の結果は、D12S1619とD12S1666との間に位置する遺伝子を調査すべきことを示唆すると結論される。さらに、GENEFINDERの結果によれば、NBG9の動原体側に位置する遺伝子は関連解析および連鎖非平衡解析の対象として検討すべきである。さらに、P2X7R遺伝子のイントロン9に位置するNBG6マーカーとも正の関連が認められた。

【0277】

実施例2

P2X7Rを双極性情動障害と関連づける、染色体12の物理的マッピングおよび変異解析

疾患関連領域に関して最も保存的な予測はマーカーNBG11とNBG2との間に含まれた(図1a参照)。実施例1に記載した連鎖解析および関連解析により、genethonマーカーおよびNBGマーカーを用いて、この領域の範囲を定めた。この領域のおおよその長さは5.2Mbである。この領域には2つの大きなギャップ(FLJ10701とFLJ32372との間、およびFLJ1466とMOND0Aとの間)が含まれていた。この領域にある少なくとも73種の遺伝子を列挙したが、このうち48は既知の遺伝子であり、25は未知であるが、UCSCで得られた最新ゲノム構成(November 2002)に基づいてmRNAおよび/またはESTクラスターとの関連性がみられた。予想される遺伝子は列挙しなかった。しかし、GENEFINDERを用いるCI 99%(信頼区間)の推定により、マーカーD12S1666とNBG9との間に最も興味深い領域が限定された。このゲノム領域は1.6Mbをカバーし、少なくとも28種の遺伝子を含み、大きなギャップは存在しない。このため、D12S1666とNBG9との間のゲノム区域を記載するためにfBAD(家族性双極性情動障害)領域という用語を用いた。この領域の内部で見いだされた遺伝子には、CaMKK2、CABP、P2X7、P2X4、PIN、PLA2、GIB、CIT、PXN、Rab35およびAPC5が含まれる。しかし、現在の技術を考慮すると、当業者にとって、P2X7Rを情動障害と関連性のある遺伝子として選ぶことは明らかではないと考えられる。以上に列挙したものからの他の遺伝子は明らかであると考えられる。

【0278】

例えば、CaMKK2遺伝子(Ca²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼ、またはCaMKKbとしても知られる)は、Ca²⁺依存性シグナル伝達経路に参与するセリン/トレオニンタンパク質キナーゼである。CaMKK2はインビトロで、転写因子(例えば、CREB、SRF、MEF2; Corcoran and Means, J. Biol. Chem. 276 (2001), 2975-2978; Soderling, Trends Biochem. Sci. 24 (1999), 232-236)のリン酸化を介して遺伝子転写を調節する下流キナーゼCaMKIVおよびCaMKIを活性化することができる。Ca²⁺カスケードにおけるその役割は決定的ではない。いくつかの研究からは、CaMKがCaMKKのリン酸化がなくても活性化されることが示唆されている(Matsushita and Nairn, J. Biol. Chem. 274 (1998), 10086-10093)。しかし、CaMKKはCa²⁺/カルモジュリンによる活性化に対する感受性がより高いため、CaMKKリン酸化の段階はCa²⁺シグナルの増幅には寄与すると考えられ、このためCaMKKはレベルof細胞内Ca²⁺レベルが低い場合には重要なメディエーターであると考えられる(Anderson et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 31880-31889)。

【0279】

CaMKK2は、双極性情動障害の患者の脳ではcAMP依存性シグナル伝達経路(PKA活性化により媒介される)が冒されていることが先行技術によって示唆されているため、うつ病の明らかな標的である(Field et al., J. Neurochem. 73 (1997), 1704-1710; Rahman et al., J. Neurochem. 68 (1997), 297-304; Takahashi et al., J. Neurosci. 19 (1999),

10

20

30

40

50

610-618)。リンパ芽球細胞系を用いた1件の研究によれば、双極性障害を細胞内カルシウムレベルの上昇と関連づけることが可能であった (Yoon et al., *Mol. Psychiatry* 6 (2001), 678-683)。さらに、いくつかのグループは、抗うつ薬とCaMK活性化との関連性を見いだしている (Budziszewska et al., *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000), 1385-1393; Cosogno et al., *Neuropsychopharmacology* 24 (2001), 21-30; Mori et al., *Neuropharmacology* 40 (2001), 448-456; Zanotti et al., *Neuropharmacology* 37 (1998), 1081-1089)。さらに、PKAを介したリン酸化によるCaMKKの阻害は、両方の経路に密接な関係があることを示唆する (Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 273 (1999), 21473-21481)。これらの観察所見は、当業者にとって、CaMKK2が双極性情動障害の原因となる遺伝子であることを示唆すると考えられる。

10

【0280】

情動障害に関するもう1つの明らかな候補は、9つのコード性エクソンの選択的使用によって4種類のニューロン性Ca²⁺結合タンパク質、すなわちL-CABP、S-CABP、カルプレインおよびカルデンドリンを生成する、CABP1遺伝子である (Haeseleer et al., *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 1247-1260)。それらの発現はほぼ完全に脳組織に局限している。カルプレインに関する機能研究により、CaMKIIのCaM結合ドメインと競合的に相互作用することにより、それがCa²⁺/カルモジュリン依存性CaMKII活性に対して負の影響を及ぼすことが判明している (Yamagushi et al., *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 3610-3616)。他のCABP1選択的産物に関してもCa²⁺シグナル伝達における同様の役割が予想される。Ca²⁺依存性シグナル伝達経路におけるCABP1遺伝子の関与により、当業者にとってこの遺伝子を双極性情動障害に関する候補として選択することは明らかであると考えられる。しかし、すべてのCABP1エクソンを変異の存在に関して分析したところ、驚いたことに非コード領域に2つの変異が検出されたのみであった。

20

【0281】

PIN遺伝子 (NOS (一酸化窒素合成酵素) のタンパク質性阻害物質) は、双極性情動障害の原因として、もう1つの明らかな候補である。脳内では一酸化窒素 (NO) はアポトーシス、シナプス形成および神経発生に関与する可能性がある。NOは他の神経伝達物質のように小胞内に蓄えることができないため、その放出はNOS (一酸化窒素合成酵素) の活性によって調節される。PINは、NOSの活性ホモ二量体複合と結合して不安定化することによる、NOSの直接的阻害物質である (Jaffrey et al., *Science* 274 (1996), 774-777)。PINは進化を通じて高度に保存されており、多くの細胞種で発現される。抑うつ状態における血漿硝酸レベルを評価した最近の臨床研究により、うつ病ではNO産生が増加していること (Suzuki et al., *J. Affect. Disord.* 63 (2001), 221-224) およびこれがNOS阻害の欠陥に起因する可能性が示唆されている。さらに、マウスモデルでは、NO合成酵素の拮抗薬と抗うつ作用とのつながりが示されている (Harkin et al., 1999; Karolewicz et al., *Eur. J. Pharmacol.* 372 (1999), 215-220)。このため、PINは明らかであると考えられる。しかし、NOの多面的な作用のため、PIN機能の欠陥は全身で多くの無関係な障害も生じさせると考えられる。したがって、本明細書の開示において提示された情報がなければ、当業者は、情動障害と関連性のある遺伝子として、PINは予測してもP2X7Rは予測していないと考えられる。

30

40

【0282】

ヒトホスホリパーゼA2 1B群 (PLA2G1B) は、グリセロ-3-ホスホコリンからの脂肪酸の遊離を触媒する。ホスホリパーゼA2遺伝子 (PLA2) は多くの組織で発現される。いくつかの研究は脳内の過剰PLA2活性と情動障害との関連性を示している (Chang et al., *Neurochem. Res.* 23 (1998), 887-892; Hibbeln et al., *Biol. Psychiatry* 25 (1989), 945-961)。さらに、他の遺伝学的研究により、PLA2G1B遺伝子と双極性情動障害との関連性も見いだされている (Dawson et al., *Psychiatr. Genet.* 5 (1995), 177-180)。したがって、PLA2G1Bは情動障害に関して可能性のある候補である。しかし、本実施例では、PLA2G1B遺伝子のエクソン3内に単一のサイレント変異が見いだされたのみであった。

【0283】

50

ヒトシトロン (citron) キナーゼ遺伝子、Rho関連タンパク質 (CIT) は、GTPアーゼRhoと会合する183kDaタンパク質である。CITは他のRho関連キナーゼであるROCKおよびROKタンパク質と高度の類似性がある (Madaule et al., Nature 394 (1998), 491-494)。Rho GTPアーゼは、細胞骨格の組織化、膜輸送、細胞増殖および転写活性化などの多くのプロセスに参与する (Van Aelst and D'Souza-Schorey, Genes Dev. 11 (1997), 2295-2322)。シトロン-Kの脳変種 (キナーゼドメインを持たない) に関する研究によってシナプス後高密度タンパク質 (PSD-95) との関連性が判明し、このことからシナプスの組織化または機能における役割が示唆されている (Zhang et al., J. Neurosci. 19 (1999), 96-108; Furuyashiki et al., J. Neurosci. 19 (1999), 109-118)。

【0284】

10

ヒトパキシリン (PXN) 遺伝子は、フォーカルアドヒージョンに認められる68kDaタンパク質である。これは、接着分子が細胞骨格と動的に相互作用する場所であるフォーカルアドヒージョンの内部に存在する (Salgia et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 5039-5047)。これらの動的な相互作用を調節するシグナル伝達経路の解明は始まったばかりである。多くの観察所見は、パキシリンが増殖因子受容体からフォーカルアドヒージョンにシグナルを伝達することが示唆している。パキシリンは脳を含む多くの組織で発現される。

【0285】

しかし、以下に述べるように、情動障害の原因となる遺伝子はP2X7受容体 (P2X7R) であることが同定された。

【0286】

20

上述の遺伝子のコード配列およびエクソン-イントロン境界における変異を検索した。これはこのような変異は機能的に重要な一塩基多型 (SNP) を生じさせる可能性が高いためである。出発標本はSaguenay / Lac St-Jean地域からの血縁関係のない16例の罹患個体としたが、これは頻度が0.05である多型の検出力が80%である。多型を同定するために、標的配列をまずPCRによって増幅した。続いてPCR産物をWhatman GF/Cメンブラン (VWR, Montreal, Canada) で精製し、PicoGreen dsDNA定量化アッセイ (Molecular probes, Oregon, USA) を用いて定量した。4ngの精製PCR産物のシーケンシングは、DYEnamic ETターミネーターサイクルシーケンシングキット (Amersham Biosciences, Baie D'Urfe, Canada) を用いて行った。シーケンシング産物をABI PRISM 3730XL DNA分析装置およびABI PRISM 3700 DNA分析装置を用いて分析した。PCR産物のシーケンシングは両方の向き

30

(表10) マーカー-D12S1666とNBG9との間の変異解析

遺伝子	位置	変種	対立遺伝子	変更内容
Rab35	エクソン06	RABE06A	486G-A	サイレントAsn162
Rab35	イントロン04	RABI04A	51C-T	不明
Rab35	イントロン03	RABI03A	33G-A	不明
Rab35	イントロン02	RABI02B	85G-A	不明
Rab35	イントロン02	RABI02A	76C-G	不明
PXN	エクソン11	PXNE11A	1527C-T	サイレントThr509
PXN	エクソン06	PXNE06A	750C-T	サイレントSer250
PXN	エクソン02	PXNE02A	217G-A	Gly73Ser
PLA2G1B	エクソン03	PLA2G1BE03A	294C-T	サイレントSer98
PIN	5'UTR01	PINUTR01A	-49T-G	不明
PIN	5'UTR01	PINUTR01B	-80T-C	不明
PIN	イントロン02	PINI02A	26C-T	不明
PIN	イントロン02	PINI02B	50C-T	不明
CaBP	イントロン04	CaBPI04A	35C-T	不明
CaBP	エクソン01	CaBPE01A	-23A-G	不明
OASL	エクソン02	OASLE02A	213G-T	サイレントGly72
OASL	エクソン02	OASLE02B	408C-T	サイレントLeu136
OASL	エクソン05	OASLE05A	1042G-A	Val348Met
OASL	エクソン06	OASLE06A	1509G-A	サイレントSer503
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5L	362T-C	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5M	532T-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5K	1100A-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5J	1122A-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5I	1171C-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5F	1351T-C	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5N	1702G-A	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5G	1731T-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5H	1860C-T	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5A	2162C-A	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5B	2238C-T	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5D	2373A-G	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5E	2569G-A	不明
P2X7R	5'UTR	P2XR7UTR5C	2702G-A	不明
P2X7R	イントロン01	P2XR7I01C	3166G-C	不明
P2X7R	イントロン01	P2XR7I01A	24778C-T	不明
P2X7R	イントロン01	P2XR7I01B	24830C-T	不明
P2X7R	エクソン02	P2XR7v02A	24942T-C	Val76Ala
P2X7R	エクソン03	P2XR7E03A	26188C-T	Arg117Trp
P2X7R	イントロン03	P2XR7I03A	26308A-G	不明
P2X7R	イントロン03	P2XR7I03B	26422G-A	不明
P2X7R	イントロン04	P2XR7I04A	32394G-A	不明
P2X7R	イントロン04	P2XR7v05B	32434T-C	不明
P2X7R	エクソン05	P2XR7E05D	32493G-A	Gly150Arg
P2X7R	エクソン05	P2XR7v05A	32507C-T	Tyr155His

10

20

30

40

P2X7R	エクソン05	P2XR7E05C	32783C-T	サイレントCys168	
P2X7R	イントロン05	P2XR7I05C	32783A-C	不明	
P2X7R	イントロン05	P2XR7I05D	35309T-C	不明	
P2X7R	イントロン05	P2XR7I05B	35374C-T	不明	
P2X7R	イントロン05	P2XR7I05A	35378A-C	不明	
P2X7R	エクソン06	P2XR7E06A	35438G-A	Glu186Lys	
P2X7R	エクソン06	P2XR7E06B	35454T-C	Leu191Pro	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06C	35549T-C	不明	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06G	35641G-C	不明	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06D	35725A-C	不明	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06F	36001T-G	不明	10
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06E	36064A-T	不明	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06A	36091DelGTTT	不明	
P2X7R	イントロン06	P2XR7I06B	36108C-G	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07A	36374C-T	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07B	36378G-A	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07C	36387T-A	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07D	36398G-C	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07E	37439C-T	不明	
P2X7R	イントロン07	P2XR7I07F	37513T-C	不明	
P2X7R	エクソン08	P2XR7E08C	37604C-T	Arg270Cys	
P2X7R	エクソン08	P2XR7v08A	37605G-A	Arg270His	20
P2X7R	エクソン08	P2XR7v08B	37623G-A	Arg276His	
P2X7R	エクソン08	P2XR7E08D	37633C-T	サイレントAsp279	
P2X7R	イントロン09	P2XR7v11A	47214C-T	不明	
P2X7R	エクソン11	P2XR7v11B	47383G-A	Ala348Thr	
P2X7R	エクソン11	P2XR7v11C	47411C-G	Thr357Ser	
P2X7R	イントロン11	P2XR7I11D	47563T-C	不明	
P2X7R	イントロン12	P2XR7I12A	54307C-T	不明	
P2X7R	イントロン12	P2XR7I12B	54308G-A	不明	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13F	54399C-T	Ala433Val	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13A	54480A-G	Gln460Arg	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13B	54523C-T	サイレントPro474	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13G	54562DelCCCTGAGAG CCACAGGTGCCT	7aa 488 ~ 494 の PESHRCL の欠失	30
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13C	54588A-C	Glu496Ala	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13H	54664C-G	サイレントHis521	
P2X7R	エクソン13	P2XR7E13D	54703G-T	サイレントLeu534	
P2X7R	エクソン13	P2XR7E13J	54804A-T	Ile568Asn	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13I	54834G-A	Arg578Gln	
P2X7R	エクソン13	P2XR7v13E	54847G-A	サイレントPro582	
P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3A	55169C-A	不明	
P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3B	55170A-C	不明	
P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3C	55171A-C	不明	
P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3D	55917C-T	不明	
P2X7R	3'UTR	P2XR7UTR3E	54925G-A	不明	40
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5I	-1956G-A	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5H	-1649G-A	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5G	-800G-A	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5A	-648C-A	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5B	-537A-G	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5C	-437A-G	不明	

P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5J	-206VNRG	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5D	-211C-G	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5F	-150VNRGGGCCCC	不明	
P2X4R	5'UTR	P2XR4UTR5E	-98G-T	不明	
P2X4R	イントロン01	P2XR4I01A	31G-T	不明	
P2X4R	エキソン02	P2XR4E02A	262G-A	サイレント異変 Ala87	
P2X4R	イントロン02	P2XR4I02A	4600C-T	不明	
P2X4R	イントロン03	P2XR4I03A	15G-A	不明	
P2X4R	イントロン03	P2XR4I03B	72G-A	不明	
P2X4R	エキソン04	P2XR4E04A	355G-A	Ile119Val	
P2X4R	エキソン04	P2XR4E04A	375G-A	サイレントVal125	10
P2X4R	イントロン04	P2XR4I04B	17T-C	不明	
P2X4R	イントロン04	P2XR4I04A	32G-A	不明	
P2X4R	エキソン05	P2XR4E05A	465T-C	サイレントSer155	
P2X4R	エキソン07	P2XR4E07A	724A-G	Ser242Gly	
P2X4R	イントロン08	P2XR4I08A	DelT	不明	
P2X4R	エキソン09	P2XR4E09A	944A-G	Tyr315Cys	
P2X4R	イントロン10	P2XR4I10A	11G-T	不明	
P2X4R	イントロン10	P2XR4I10B	G-C	不明	
P2X4R	イントロン10	P2XR4I10C	A-G	不明	
P2X4R	イントロン11	P2XR4I11B	C-G	不明	
P2X4R	イントロン11	P2XR4I11C	T-A	不明	20
P2X4R	イントロン11	P2XR4I11A	374C-T	不明	
CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3bA	733C-T	不明	
CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3aB	390G-A	不明	
CaMKK2	3'UTR	CaMKK2UTR3aA	239G-A	不明	
CaMKK2	イントロン15	CaMKK2I15B	325T-C	不明	
CaMKK2	イントロン15	CaMKK2I15A	169G-A	不明	
CaMKK2	イントロン14	CaMKK2I14A	224A-G	不明	
CaMKK2	イントロン10	CaMKK2I10A	156DelGTGATCCGCCT G	不明	
CaMKK2	イントロン09	CaMKK2I09B	528A-G	不明	
CaMKK2	イントロン09	CaMKK2I09A	521A-G	不明	
CaMKK2	エキソン09	SNP6f18v5	1095C-A	サイレントIle365	30
CaMKK2	エキソン09	SNP6f18v4	1087C-T	Arg363Cys	
CaMKK2	エキソン05	CaMKKE05A	687C-T	サイレントPro229	
CaMKK2	イントロン03	CaMKK2I03A	10C-T	不明	
CaMKK2	イントロン02	CaMKK2I02A	39C-T	不明	
CaMKK2	イントロン01	CaMKK2I01B	2911G-C	不明	
CaMKK2	イントロン01	CaMKK2I01A	89C-A	不明	
CaMKK2	エキソン01	SNP6f18v2	253A-T	Thr85Ser	
CaMKK2	エキソン01	SNP6f18v1	29G-A	Ser10Asn	
CaMKK2	5'UTR01	CaMKK2UTR01B	253T-C	不明	
CaMKK2	5'UTR01	CaMKK2UTR01A	63C-A	不明	
APC5	イントロン01	APC5I01A	10G-T	不明	
APC5	イントロン01	APC5I01B	50A-T	不明	
APC5	イントロン05	APC5I05A	73T-C	不明	
APC5	イントロン06	APC5I06A	73T-G	不明	
APC5	エキソン11	APC5E11A	1416C-T	サイレントHis472	40

【 0 2 8 7 】

遺伝子Rab35、PXN、PLA2G1B、PIN、CaBP、OASL、P2X4R、CaMKK2およびAPC5における各SNPは、それらが見いだされた遺伝子およびその遺伝子の位置（イントロン領域またはエクソン領域）に従って命名した。P2X7R遺伝子における各SNPは、SEQ ID NO: 1上での位置に従って命名した。対立遺伝子は位置および観察された変種を記している。コード領域における位置は開始コドンからの相対値であり、イントロンSNPの位置は対応するイントロン

(判明している場合)の開始点からの相対値としている。表2および12に含まれる、P2X7RにおけるSNPの同定および各SNPの位置決定のために用いたプライマーは、表1aおよびSEQ ID NO 52~111に規定されている。

【0288】

ミスセンスSNPを用いる関連解析を行った。スプライス部位に近接している可能性のあるミスセンスSNPまたはSNPを用いたが、これは疾患はタンパク質の不適切な機能と関連している可能性が高いためである。症例群は、双極性分裂情動障害型の双極性Iの個体(182例)および双極性IIと診断された人(31例)から構成された。Saguenay / Lac-St-Jean地域からの多くの対照は、Steinert、GlaucomaおよびPaget DNAバンクからサンプリングした。対照個体は情動障害と診断されていない。双極性障害の生涯リスク(1%)からみて、対照を精神障害に関してスクリーニングする必要はない。

10

【0289】

PCR産物の直接シーケンシングは群を抜いて最も正確な解析方法であり、本発明者らのシーケンシングプラットフォームの能力を考慮した場合に選択されるべき方法である。PCR産物を上記のように直接シーケンシングによって解析した。シーケンシング解析の後に、個体は施設内開発プログラムGENO.plを用いて、対応するSNPへと自動的に型判定される。SNP遺伝子型判定の結果は4Dデータベース中にコンパイルされる。

【0290】

関連仮説をCLUMPを用いて検証した(Sham & Curtis 1995、Ann. Hum. Genet. 59: 97-105)。p値の推定には1000回のシミュレーションを用いた。結果は表11に示されている。対立遺伝子の関連性の検定には、生の分割表に対する通常のカイ二乗統計量であるT1統計量を用いた。さらに、元の表の1つの列を他の列の合計と比較することによって得られる最大のカイ二乗統計量であるT3統計量と呼ばれるものを、可能性のある遺伝子型関連について検定するために以前のものに加えたが、これはT1統計量の結果は分割表が低値の細胞を含む場合には偏る可能性があるためである。

20

(表11) CLUMPを用いた関連仮説

遺伝子	SNP	有効な		対立遺伝子 解析 p-値(T1)	遺伝子型解析	
		症例	対照		p-値 (T2)	p-値 (T3)
P2X7R	P2XR7v11B	208	211	0.795	0.036	0.028
	P2XR7v13A	212	214	0.344	0.250	0.186
	P2XR7v13E	212	211	0.780	0.017	0.017
CAMKK2	SNP6f18v5	206	135	1.00	1.00	1.00
	SNP6f18v4	206	135	0.816	0.962	0.841
	SNP6f18v2	205	135	0.057	0.110	0.095
	SNP6f18v1	206	135	0.512	0.532	0.385

30

【0291】

P2X7、P2X4およびCaMKK2におけるSNPを用いた関連解析により、約5%またはそれ未満の水準で有意な関連性が示される。P2X7における3種類の遺伝子型関連が観察された。しかし、SNP P2XR7v11BおよびP2XR7v13Eは分割表によれば密接な関連性がある。また、CaMKK2におけるSNP6f18v2に関して5.7%レベルで対立遺伝子関連がみられる。それぞれの関連SNPに関する情報は表10および12に記載されている。

40

【0292】

CLUMPを用いるさらなる関連解析を、より多くの症例および対照個体を含む標本に対して行った。p値を推定するために1000回のシミュレーションを用いた。

(表11a) SNPの対立遺伝子および遺伝子型分析に関してCLUMPを用いて観察された経験的p値およびオッズ比(OR)と95%信頼区間

遺伝子	マーカー (マーカーのランク)	対立遺伝子 頻度	有効な		対立遺伝子			遺伝子型	
			症例	対照	T1 p-値	OR	OR 95% CI	T1 p-値	T3 p-値
P2XR7	P2XR7UTR5F (1)	C (0.18); T (0.82)	212	208	0.280	1.21	0.86- 1.71	0.067	0.069
	P2XR7UTR5G (2)	G (0.09); T (0.91)	211	204	0.481	1.19	0.76- 1.87	0.261	0.231
	P2XR7UTR5H (3)	C (0.95); T (0.05)	210	202	0.549	1.19	0.67- 2.13	0.768	0.582
	P2XR7UTR5A (4)	A (0.05); C (0.95)	210	207	0.526	1.26	0.68- 2.34	0.754	0.517
	P2XR7UTR5B	C (0.78); T	211	207	0.629	1.09	0.79-	0.104	0.128

	(5)	(0.22)					1.50		
	P2XR7UTR5D (6)	A (0.96); G (0.04)	211	205	0.268	1.43	0.77- 2.65	0.598	0.240
	P2XR7UTR5E (7)	A (0.04); G (0.96)	211	210	0.658	1.23	0.65- 2.33	0.139	0.234
	P2XR7UTR5C (8)	A (0.22); G (0.78)	208	210	0.889	1.04	0.75- 1.44	0.168	0.293
	P2XR7I01B (9)	C (0.98); T (0.02)	210	207	0.352	1.71	0.67- 4.39	0.348	0.348
	P2XR7v02A (10)	C (0.05); T (0.95)	211	208	0.189	1.49	0.84- 2.64	0.397	0.167
	P2XR7I04A (11)	A (0.01); G (0.99)	211	211	0.344	0.25	0.03- 2.23	0.356	0.356
	P2XR7v05B (12)	C (0.75); T (0.25)	212	211	0.854	1.03	0.76- 1.41	0.234	0.335
	P2XR7E05D (13)	A (0.01); G (0.99)	211	211	0.726	1.51	0.42- 5.38	0.735	0.735
	P2XR7v05A (14)	C (0.48); T (0.52)	211	209	0.638	1.07	0.82- 1.40	0.895	0.895
	P2XR7E05C (15)	C (0.97); T (0.03)	210	211	0.195	0.45	0.16- 1.31	0.349	0.276
	P2XR7I07E (16)	C (0.64); T (0.36)	208	214	0.394	0.87	0.66- 1.16	0.057	0.064
	P2XR7v08A (17)	A (0.24); G (0.76)	210	212	0.221	1.22	0.90- 1.67	0.433	0.496
	P2XR7v08B (18)	A (0.05); G (0.95)	210	213	0.386	0.71	0.36- 1.41	0.520	0.662
	P2XR7V11A (19)	C (0.88); T (0.12)	213	149	0.394	0.80	0.50- 1.29	0.387	0.463
	P2XR7v11B (20)	A (0.36); G (0.64)	208	211	0.795	1.04	0.79- 1.38	0.036	0.028
	P2XR7v11C (21)	C (0.89); G (0.11)	211	212	0.409	0.82	0.52- 1.28	0.303	0.661
	P2XR7v13F (22)	C (0.99); T (0.01)	196	207	0.030	3.24	1.04- 10.12	0.039	0.039
	P2XR7v13A (23)	A (0.84); G (0.16)	212	214	0.344	1.21	0.85- 1.72	0.250	0.186
	P2XR7v13B (24)	C (0.89); T (0.11)	207	212	0.494	0.83	0.53- 1.31	0.315	0.699
	P2XR7v13C (25)	A (0.77); C(0.23)	211	213	0.731	0.95	0.68- 1.31	0.557	0.616
	P2XR7V13H (26)	C (0.98); G (0.02)	211	213	0.238	1.75	0.68- 4.49	0.236	0.236
	P2XR7E13D (27)	G (0.89); T (0.11)	211	213	0.435	0.82	0.53- 1.28	0.268	0.680
	P2XR7E13J (28)	A (0.03); T (0.97)	204	199	0.179	0.48	0.16- 1.42	0.329	0.329
	P2XR7v13E (29)	A (0.36); G (0.64)	212	213	0.841	1.04	0.79- 1.37	0.026	0.025
	P2XR7UTR3E (30)	A (0.04); G (0.96)	205	197	1.000	0.96	0.45- 2.04	1.000	1.000
	P2XR7UTR3A (31)	A (0.47); C (0.53)	208	209	0.932	0.99	0.75- 1.30	0.264	0.239
	P2XR7UTR3B (32)	A (0.92); C (0.08)	208	210	0.174	0.65	0.38- 1.14	0.151	0.303
	P2XR7UTR3C (33)	A (0.95); C (0.05)	208	210	0.395	0.71	0.36- 1.40	0.508	0.667

10

20

30

40

P2XR4	UTR5A	A (0.18); C (0.82)	212	210	0.285	0.82	0.57-1.18	0.514	0.484
	UTR5B	A (0.69); G (0.31)	212	210	0.670	0.93	0.70-1.25	0.833	0.833
	I06A	C (0.84); T (0.16)	207	192	0.212	0.78	0.53-1.16	0.398	0.217
	E07A	A (0.84); G (0.16)	212	208	0.294	0.81	0.55-1.19	0.536	0.479
	UTR3A	C (0.74); G (0.26)	211	203	0.015	1.50	1.11-2.02	0.021	0.014
	UTR3B	A (0.97); T (0.03)	211	209	0.653	0.81	0.33-1.97	0.649	0.649
	UTR3C	C (0.03); G (0.97)	211	209	0.653	0.81	0.33-1.97	0.672	0.672
CAMK K2	E09B	A (0.03); C (0.97)	208	214	0.830	0.85	0.36-2.00	0.829	0.829
	E09A	C (0.83); T (0.17)	208	214	0.202	0.78	0.54-1.14	0.446	0.473
	E01B	A (0.35); T (0.65)	207	214	0.048	1.33	1.01-1.76	0.126	0.218
	E01A	C (0.93); T (0.07)	208	214	0.189	1.44	0.86-2.39	0.439	0.237

10

20

【0293】

マイナー対立遺伝子の頻度が1%よりも高いかそれと等しい、P2X7Rにおける33種のSNP、P2X4Rにおける7種のSNP、およびCAMKK2における4種のSNPの遺伝子型判定を行った(表11a)。これらのSNPの遺伝子型分布にはHWEからの有意な逸脱はみられなかった。双極性情動障害群において、マイナー対立遺伝子頻度の統計学的に有意な(5%水準で)増加が、p2XR7v13F(p値=0.030、OR=3.24、95%CI=1.04-10.12)、P2XR4UTR3A(p値=0.015、OR=1.50、95%CI=1.11-2.02)およびCAMKK2E01B(p値=0.048、OR=1.33、95%CI=1.01-1.76)で観察された。SNP P2XR7v13FおよびP2XR4UTR3Aでの遺伝子型も、T1および13統計量に関してこの水準で有意に異なり、症例標本においてヘテロ接合体が多かった。P2X7Rのエクソン11からの1つのSNPであるP2XR7v11Bおよびエクソン13からのP2XR7v13Eは遺伝子型分布の分布を示し、いずれもT3統計量に関して観察された最小p値は0.028および0.025であった。この場合も、これらの多型では双極性標本においてヘテロ接合体頻度のそれぞれ12%および13%の増加が観察された。

30

【0294】

有意ハプロタイプ関連性検定からは、P2X7R遺伝子に重複する種々のSNP群に関して0.5%未満のp値が得られた(表11b)。SNP32507からSNP54847までの範囲にわたるSNP収集物(表11c)をハプロタイプ分布の例として考慮することにより、本発明者らは、ハプロタイプ番号1に関して、症例と対照との間での頻度に最大の差を観察した(表11d)。ハプロタイプ番号2は、症例群でより高頻度に観察されたハプロタイプのもう1つの例である。これに対して、ハプロタイプ番号3の頻度は対照標本の方が幾分高かった(頻度の差=0.091)。表11eは表11dに示したヌクレオチド性ハプロタイプから生じるペプチド産物を提示している。

40

(表11b) T1またはT3統計量に関して0.5%水準で有意な対立遺伝子関連性を示したハプロタイプ

ハプロタイプ (マーカーのラング ¹)	#SNP数	距離 ²	ハプロタイプに 関して有効な		T1 統計量	T3 統計量	ハプロ タイプ数 ³
		(bp)	症例	対照	(p-値)	(p-値)	
P2XR7I01B- P2XR7v13A (9-23)	15	29618	361	257	0.0003	0.0252	20
P2XR7v02A- P2XR7v13B (10-24)	15	29550	361	260	0.00008	0.0294	20
P2XR7I04A- P2XR7v13C (11-25)	15	22164	360	264	0.0003	0.0323	19
P2XR7v05B- P2XR7v13H (12-26)	15	22200	361	265	0.0004	0.0065	18
P2XR7E05D- P2XR7E13D (13-27)	15	22180	365	268	0.0035	0.0287	16
P2XR7v05A- P2XR7E13J (14-28)	15	22267	352	246	0.0007	0.0163	15
P2XR7E05C- P2XR7v13E (15-29)	15	22269	353	250	0.0012	0.0200	10
P2XR7I07E- P2XR7UTR3E (16-30)	15	17452	355	247	0.0020	0.0192	11

10

1 表11bに示されたハプロタイプにおけるSNPのマーカーランクは表11aで遺伝子型判定が行われたものを指す。

2 ハプロタイプの最も離れた2つのSNP間の距離

20

3 症例群または対照群における頻度 > 1%であるハプロタイプの数

【 0 2 9 5 】

(表 1 1 c) ハプロタイプを形成するSNPに関する位置および対立遺伝子。ハプロタイプは表11dに記載されている

SEQ ID NO	多型	位置
1	C-T	32507
1	C-T	32548
1	C-T	37439
1	G-A	37605
1	G-A	37623
1	C-T	47214
1	G-A	47383
1	C-G	47411
1	C-T	54399
1	A-G	54480
1	C-T	54523
1	A-C	54588
1	C-T	54664
1	G-T	54703
1	T-A	54804
1	G-A	54847

30

【 0 2 9 6 】

(表 1 1 d) 罹患個体と対照個体との間で頻度に有意差がみられたハプロタイプ

ハプロタイプ	32507	32548	37439	37605	37623	47214	47383	47411	54399	54480
No 1	C	C	C	A	G	C	G	C	C	A
No 2	C	C	C	G	G	C	G	C	C	A
No 3	C	C	T	G	G	C	A	C	C	A

40

ハプロタイプ	54523	54588	54664	54703	54804	54847	F罹患患者	F対照
No 1	C	A	C	G	T	G	0.20	0.13
No 2	C	C	C	G	T	G	0.05	0.01
No 3	C	A	C	G	T	A	0.11	0.20

50

【 0 2 9 7 】

(表 1 1 e) 表11cに記載されたcSNPに対応するアミノ酸。それらの位置はSEQ ID NO : 3に従っている

SEQ ID NO:3 における位置	155	168	270	276	348	357	433
ハプロタイプ 1	Y	C	H	R	A	T	A
ハプロタイプ 2	Y	C	R	R	A	T	A
ハプロタイプ 3	Y	C	R	R	T	T	A

SEQ ID NO:3 における位置	460	474	496	521	534	568	582
ハプロタイプ 1	Q	P	E	H	L	I	P
ハプロタイプ 2	Q	P	A	H	L	I	P
ハプロタイプ 3	Q	P	E	H	L	I	P

10

【 0 2 9 8 】

実施例3

うつ病に罹患した個体においてP2X7Rに見いだされた多型

P2X7R遺伝子におけるSNPを用いた関連解析を、ドイツ人集団からの症例 / 対照標本 (個体535例) で実施した。症例群は双極性I型またはII型と診断された個体36例および単極性障害 (すなわち、うつ病) と診断された個体279例から構成され、罹患男性133例および罹患女性182例であった。対照として、残りの対照個体220例は正常 (すなわち、すなわちうつ病でない) と診断されている) であり、これは男性81例および女性182例、ならびに性別不明14例であった。この2つの群における性別分布は同じであった。

20

【 0 2 9 9 】

罹患個体24例の部分集団を用いることにより、この標本におけるSNPを同定した。ドイツ人集団で検出されたP2X7R遺伝子のSNPは、Saguenay / Lac-St-Jean集団で認められたSNPと同一ではないにしても類似していた (表12参照)。Arg117Trp (P2XR7E03A)、Glu186Lys (P2XRTE06A)、Leu191Pro (P2XR7E06B)、Ile568Asn (P2XR7E13J) などのその他の稀なミスセンスSNPもドイツ人集団で認められた。これらのアミノ酸はオルソログP2X7遺伝子間で高度に保存されている。Ile568Asn (P2XR7E13J) 変異はP2X7の表面発現にかかわる可能性がある。

30

(表 1 2) ヒトP2X7R遺伝子における、Saguenay / Lac-St-Jean集団およびドイツ人集団での多型の比較

関連する エクソン または イントロン	変種 (SNPまたは その他)	対立遺伝子	位置*	変更内容	頻度 (カナダ)	頻度 (ドイツ)
5'UTR	P2XR7UTR5L	T-C	362	不明	0,13	0,08
5'UTR	P2XR7UTR5M	T-G	532	不明	0,16	0,1
5'UTR	P2XR7UTR5K	A-G	1100	不明	0,13	0,13
5'UTR	P2XR7UTR5J	A-G	1122	不明	0,13	0,13
5'UTR	P2XR7UTR5I	C-G	1171	不明	0,06	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5F	T-C	1351	不明	0,3	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5N	G-A	1702	不明	-	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5G	T-G	1731	不明	0,17	0,15
5'UTR	P2XR7UTR5H	C-T	1860	不明	0,07	0,15
5'UTR	P2XR7UTR5A	C-A	2162	不明	0,07	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5B	C-T	2238	不明	0,3	0,27
5'UTR	P2XR7UTR5D	A-G	2373	不明	0,07	0,12
5'UTR	P2XR7UTR5E	G-A	2569	不明	0,1	0,02
5'UTR	P2XR7UTR5C	G-A	2702	不明	0,31	0,27
イントロン01	P2XR7I01C	G-C	3166	不明	0,03	-
イントロン01	P2XR7I01A	C-T	24778	不明	0,03	-
イントロン01	P2XR7I01B	C-T	24830	不明	0,03	稀
エクソン02	P2XR7v02A	T-C	24942	Val76Ala	0,06	0,08
エクソン03	P2XR7E03A	C-T	26188	Arg117Trp	-	稀
イントロン03	P2XR7I03A	A-G	26308	不明	0,7	0,44
イントロン03	P2XR7I03B	G-A	26422	不明	0,18	0,12
イントロン04	P2XR7I04A	G-A	32394	不明	0,03	0,01

10

20

イントロン04	P2XR7v05B	T-C	32434	不明	0,33	0,29
エクソン05	P2XR7E05D	G-A	32493	Gly150Arg	稀	0,02
エクソン05	P2XR7E05E	G-A	32506	サイレント Val154	-	稀
エクソン05	P2XR7v05A	C-T	32507	Tyr155His	0,33	0,44
エクソン05	P2XR7E05C	C-T	32548	サイレント Cys168	稀	0,02
イントロン05	P2XR7I05C	A-C	32783	不明	0,25	-
イントロン05	P2XR7I05D	T-C	35309	不明	ND	0,35
イントロン05	P2XR7I05B	C-T	35374	不明	0,7	0,67
イントロン05	P2XR7I05A	A-C	35378	不明	0,7	0,65
エクソン06	P2XR7E06A	G-A	35438	Glu186Lys	-	0,02
エクソン06	P2XR7E06B	T-C	35454	Leu191Pro	-	0,02
イントロン06	P2XR7I06C	T-C	35549	不明	0,04	0,08
イントロン06	P2XR7I06G	G-C	35641	不明	-	0,02
イントロン06	P2XR7I06D	A-C	35725	不明	0,21	0,27
イントロン06	P2XR7I06F	T-G	36001	不明	0,17	0,3
イントロン06	P2XR7I06E	A-T	36064	不明	0,11	0,1
イントロン06	P2XR7I06A	DelGTTT	36091- 36094	不明	0,14	0,3
イントロン06	P2XR7I06B	C-G	36108	不明	0,14	0,29
イントロン07	P2XR7I07A	C-T	36374	不明	0,07	-
イントロン07	P2XR7I07B	G-A	36378	不明	0,21	0,28
イントロン07	P2XR7I07C	T-A	36387	不明	0,21	0,28
イントロン07	P2XR7I07D	G-C	36398	不明	0,42	0,4
イントロン07	P2XR7I07E	C-T	37439	不明	0,41	-
イントロン07	P2XR7I07F	T-C	37513	不明	-	稀
エクソン08	P2XR7E08C	C-T	37604	Arg270Cys	稀	-
エクソン08	P2XR7v08A	G-A	37605	Arg270His	0,46	0,24
エクソン08	P2XR7v08B	G-A	37623	Arg276His	0,03	0,02
エクソン08	P2XR7E08D	C-T	37633	サイレント Asp279	稀	-
イントロン09	P2XR7v11A	C-T	47214	不明	0,08	0,03
エクソン11	P2XR7v11B	G-A	47383	Ala348Thr	0,5	0,44
エクソン11	P2XR7v11C	C-G	47411	Thr357Ser	0,08	0,07
イントロン11	P2XR7I11D	T-C	47563	不明	0,43	0,44
イントロン12	P2XR7I12A	C-T	54307	不明	0,32	-
イントロン12	P2XR7I12B	G-A	54308	不明	0,03	-
エクソン13	P2XR7v13F	C-T	54399	Ala433Val	0,13	-
エクソン13	P2XR7v13A	A-G	54480	Gln460Arg	0,13	0,17
エクソン13	P2XR7v13B	C-T	54523	サイレント Pro474	0,1	0,07
エクソン13	P2XR7v13G	DelCCCTGAGA GCCACAGG TGCCT	54562- 54582	7aa 488~494 (PESHRCL) の欠失	稀	-
エクソン13	P2XR7v13C	A-C	54588	Glu496Ala	0,13	0,06
エクソン13	P2XR7v13H	C-G	54664	His521Gln	0,03	-
エクソン13	P2XR7E13D	G-T	54703	サイレント Leu534	0,1	0,02
エクソン13	P2XR7E13J	A-T	54804	Ile568Asn	-	0,01
エクソン13	P2XR7v13I	G-A	54834	Arg578Gln	-	稀

10

20

30

40

エクソン13	P2XR7v13E	G-A	54847	サイレント Pro582	0,4	0,45
3'UTR	P2XR7UTR3A	C-A	55169	不明	0,48	0,37
3'UTR	P2XR7UTR3B	A-C	55170	不明	0,09	0,1
3'UTR	P2XR7UTR3C	A-C	55171	不明	0,05	0,06
3'UTR	P2XR7UTR3D	C-T	55917	不明	0,001	-
3'UTR	P2XR7UTR3E	G-A	54925	不明	-	0,01

【 0 3 0 0 】

多型の位置および番号は、SEQ ID NO : 1に定められたヒトP2X7R遺伝子に対応する。P2X7R遺伝子のゲノム構成を同定するために、既知の多型マーカー、配列タグ部位 (STS)、BAC末端配列および発現配列タグ (EST) を用いてBACクローンをまず構築した。向きおよび順序が特定されていないDNA領域を、Phrapを用いて1つの配列へと再アセンブルし、P2X7Rエクソンをスカフォールドとして用いて小片の順序を決定した。P2X7Rの完全な遺伝子の構築は行われていない。存在するのは、エクソン6~13、NT_037809までの部分的遺伝子構造のみである。このため、SEQ ID NO : 1に示されたP2X7R遺伝子を包含するこのゲノム配列は、特にイントロン領域において何らかの配列の誤りを含む可能性がある。SNP増幅およびシーケンシングのために用いたプライマーは表1aに示され、SEQ ID NO : 52~11に示されている。

10

【 0 3 0 1 】

統計解析はCLUMP法 (Sham & Curtis 1995, Ann. Hum. Genet. 59: 97-105) に従って行った。表13に、P2X7R遺伝子におけるSNPに関する対立遺伝子および遺伝子型関連解析をまとめている。

20

(表 1 3) CLUMPを用いた対立遺伝子および遺伝子型関連解析

座位	対立遺伝子頻度*	有効な		対立遺伝子解析 P値(T1)	遺伝子型解析	
		症例	対照		P値(T1)	P値(T3)
P2XR7UTR5F	2(0.23); 4(0.77)	311	217	0.109	0.319	0.339
P2XR7UTR5N	1(0.001); 3(0.999)**	314	218	0.038	0.048	0.048
P2XR7UTR5G	2(0.001); 3(0.105); 4(0.894)	314	218	0.993	0.714	0.761
P2XR7UTR5H	2(0.92); 4(0.08)	312	215	0.743	0.884	0.754
P2XR7UTR5A	1(0.08); 2(0.92)	312	219	0.557	0.786	0.678
P2XR7UTR5B	2(0.73); 4(0.27)	310	218	0.485	0.761	0.814
P2XR7UTR5D	1(0.92); 3(0.08)	311	217	0.555	0.787	0.691
P2XR7v02A	2(0.09); 4(0.91)	313	218	0.501	0.729	0.591
P2XR7I04A	1(0.04); 3(0.96)	314	220	0.604	0.433	0.348
P2XR7v05B	2(0.69); 4(0.31)	314	220	0.133	0.270	0.325
P2XR7E05D	1(0.03); 3(0.97)	314	220	0.842	0.827	0.827
P2XR7E05E	1(0.006); 3(0.994)**	314	220	0.048	0.045	0.045
P2XR7v05A	2(0.60); 4(0.40)	314	220	0.038	0.144	0.219
P2XR7E05C	2(0.98); 4(0.02)	314	220	1.000	1.000	1.000
P2XR7I07F	2(0.002); 4(0.98)	315	219	1.000	1.000	1.000
P2XR7v08A	1(0.23); 3(0.77)	315	219	0.454	0.673	0.634
P2XR7v08B	1(0.02); 3(0.98)	315	219	0.636	0.638	0.638
P2XR7v11A	2(0.95); 4(0.05)	311	218	0.348	0.391	0.436
P2XR7v11B	1(0.45); 3(0.55)	312	218	0.605	0.803	0.790
P2XR7v11C	2(0.93); 3(0.07)	312	218	0.793	0.256	0.924
P2XR7I11D	2(0.45); 4(0.55)	312	219	0.665	0.735	0.740
P2XR7v13A	1(0.87); 3(0.13)	305	215	0.017	<0.001	<0.001
P2XR7v13B	2(0.93); 4(0.07)	305	216	1.000	0.228	0.677
P2XR7V13C	1(0.91); 2(0.09)	305	216	0.151	0.006	0.008
P2XR7E13D	3(0.94); 4(0.06)	315	219	0.402	0.429	0.474
P2XR7E13J	1(0.01); 4(0.99)	315	219	0.618	0.603	0.603
P2XR7E13I	1(0.004); 3(0.996)	315	219	0.999	1.000	1.000
P2XR7v13E	1(0.46); 3(0.54)	314	219	0.699	0.866	0.845
P2XR7UTR3A	1(0.518); 2(0.482)	314	219	0.617	0.850	0.875
P2XR7UTR3B	1(0.966); 2(0.034)	313	219	0.522	0.850	0.643
P2XR7UTR3C	1(0.979); 2(0.021)	313	219	0.636	0.505	0.382
P2XR7UTR3E	1(0.02); 3(0.98)	315	219	0.147	0.161	0.161

10

20

* 対立遺伝子頻度の欄は、各SNPに関する対立遺伝子 (A = 1、C = 2、G = 3、T = 4) およびそれぞれの頻度を提示している。

** このSNPに関して、本発明者らは、両方の (対立遺伝子および遺伝子型) 2 × 2分割表でゼロセルを認めた。Fisherの直接検定法でp値 < 0.045が観察された。

【0302】

SNP解析に関しては、対照標本においてハーディー-ワインベルグ (HW) 平衡の調整を行った。ハーディー-ワインベルグ則 (HWP) は以下のように述べる事ができる：移動も特定の遺伝子型に対する選択もなく、変異率が一定に保たれている大規模な無作為交配集団において、種々の遺伝子型の割合は一つの世代から別の世代を経ても変化しない。対立遺伝子Aおよびaを有する二対立遺伝子系を例にとる。集団内のAの割合をpと表し、aの割合をqと表した場合、p + qはこの座位での対立遺伝子の合計を表し、すなわちp + q = 1である。HWPは、婚姻分類、血族婚、集団層別化、混合、特定の遺伝子型の生存能力低下といった集団的課題を評価するために有用である。SNP P2XR7v13Aはハーディー-ワインベルグ平衡に従っていない。

【0303】

優性遺伝様式を示す感受性対立遺伝子の検出に有用なことが知られている、対立遺伝子の陽性度 (positivity) 表を用いる関連仮説の検証も行った (Ohashi and Tokunaga, J. Hum. Genet. 44 (1999), 246-248; Ohashi et al., Ann. Hum. Genet. 65 (2001), 197-206)。この方法を用いた場合も、p値が0.253であったP2XR7v05Aを除き、対立遺伝子頻度表を用いて得られたものと同様の結果が得られた。すなわち、P2XR7v05Aはこの解析では関連性の有意性が低かった。この違いは遺伝様式による可能性がある。

30

40

50

【0304】

ドイツ人集団の解析における単極性個体の割合は、米国精神医学会 (American Psychiatric Association) (「精神障害の診断と統計の手引き・第四版改訂版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition Text Revision)」 (DMS-IV-TR)、American Psychiatric Press, 2000) が、単極性障害に対する感受性は女性群の方が高いことを報告していることからみて、極めて重要である。性別変数が関連解析に影響を及ぼしうるか否かを明らかにするために、性別パラメーターを調節することにより、さらに関連解析を行った。性別情報のないドイツ人集団内の正常個体は検討から除外した。続いて、性別を因子として含めることによってロジスティック回帰モデルを導き出した。できるだけ安定したモデルを得るために、相互作用の有無別のモデルに関する対数尤度間の差を用いることによって回帰モデルを最小化した (Hosmer and Lemeshow「応用ロジスティック回帰 (Applied logistic regression)」、John Wiley and Sons, 1989)。分割表からのゼロセルの取り扱いのために用いた戦略は、関連性のあるカテゴリーを完全に排除することであった。計算はSAS v8.0を用いて行った。SASは、使用者がデータをさまざまなやり方で操作および解析することを可能にする統計用ソフトウェアパッケージである。その能力により、このソフトウェアパッケージは、医科学、生命科学および社会科学を含む多くの学術分野で用いられている。

10

【0305】

性別パラメーターを導入しても、以前の解析ですでに観察された関連性は損なわれなかった。さらに、この解析モデルにより、そのほかの結果も示された：P2XR7v05Bとの可能性のある対立遺伝子関連性 ($p = 0.064$) およびP2XR7v08Aとの遺伝子型関連性 ($p = 0.042$) が観察された。

20

【0306】

Saguenay / Lac St-Jeanからの標本をドイツ人集団からのものと合わせることでプールの標本を用いた関連解析を行った。結果は表14に示されている。この解析の目的は両方の集団に共通する特徴を明確に示すことにある。しかし、両方の集団間の違い (主に罹患個体の表現型、すなわち、Saguenay / Lac St-Jean標本では双極性障害であるのに対してドイツ人集団では大部分が単極性障害) に応じて、性別および民族性を含みいくつかのパラメーターを調節した。ロジスティック回帰のためのモデル化戦略については上記の通りである。

30

(表14) 両方の集団からのプール標本を用いた関連解析

座位	対立遺伝子解析		遺伝子型解析	
	SNPに関するp値	性別に関するp値	SNPに関するp値	性別に関するp値
P2XR7v02A	0.8254	0.0085	0.8650	0.4531
P2XR7v05B	0.1751	0.3714	0.2034	0.5110
P2XR7v05A	0.3808	0.0266	0.0885	0.1392
P2XR7v08A	0.0452	0.0041	0.1021	0.3452
P2XR7v08B	0.3471	0.0040	0.3413	0.3617
P2XR7v11A	0.3559	0.0136	0.5888	0.4404
P2XR7v11B	0.5902	0.0093	0.3897	0.4302
P2XR7v11C	0.3731	0.0094	0.7648	0.4615
P2XR7v13A	0.0047	0.0209	<0.0001	0.4814
P2XR7v13B	0.5129	0.2352	0.9584	0.4092
P2XR7v13C	0.2466	0.0284	0.2225	0.4228
P2XR7v13E	0.8168	0.0159	0.3713	0.4990

40

【0307】

P2XR7v13A座位に関して対立遺伝子および遺伝子型関連性が観察され ($p = 0.0047$)、これは別々の解析時よりも強かった。有意な対立遺伝子関連性はP2XR7v08A座位に関して認められた ($p = 0.0452$)。さらに、本解析により、SNP P2XR7v05Aとその起源物との間に

50

も、 p 値 = 0.0515である可能性のある関連性（表には示していない）が示されており、これは両方の標本で別々に行われた関連解析と一致している（表13参照）。

【0308】

ハプロタイプ解析をドイツ人集団を用いて行った。PHASEプログラム（Stephens et al., Am. J. Hum. Genet. 68 (2001), 978-989）を用いて、P2X7R遺伝子のエクソン内部のSNPハプロタイプを推定した。各エクソンが複数の関連SNPを有するようなハプロタイプを作成した（エクソン-関連SNPについては表15を参照）。症例群は個体218～220例の範囲であり、一方、対照群は個体312～316の範囲であった。各エクソンに対して多くのハプロタイプを作成したことから、関連仮説をCLUMP方法を用いて検証した。T1およびT3統計量の検定は上記の通りに行った。分割表における少数の有効セルが存在する結果としてのT2およびT4統計量も計算した。T2統計量は、列を小さな期待値とまとめた後に得られる分割表に対して適用される通常のカイ二乗統計量である。T4統計量は、元の表の1つの列を他の列の合計値と比較することによって得られる最大のカイ二乗統計量である。 p 値の推定には1000回のシミュレーションを用いた。その結果得られたデータを、性別パラメーターを考慮に入れる目的でSAS V8.0を用いたロジスティック回帰モデル（上記）を用いて解析した（これらの検定に関しては標本を正常個体14例に減らした）。しかし、この解析方法には再構築されるハプロタイプの信頼性に制約がある。

（表15）エクソン-関連SNP

エクソン	SNP 関連
5	P2XR7E05D P2XR7E05E P2XR7v05A P2XR7E05C
8	P2XR7v08A P2XR7v08B
11	P2XRv11B P2XRv11C
13	P2XR7v13A P2XR7v13B P2XR7v13C P2XR7E13D P2XR7E13J P2XR7v13I P2XR7v13E

（表16）P2X7Rのエクソン13におけるハプロタイプとの遺伝子型関連性

エクソン (ハプロタイプ)	対立遺伝子解析			遺伝子型解析		
	クランプ*	p値(性別)	p値(ハプロ)	クランプ	p値(性別)	p値(ハプロ)
5(5)	T1:0.032 T2:0.068 T3:0.054 T4:0.059	0.3133	0.1947	T1:0.193 T2:0.159 T3:0.099 T4:0.304	0.460	0.5355
8(3)	T1:0.551 T2:0.585 T3:0.646 T4:0.646	0.3813	0.3064	T1:0.812 T2:0.689 T3:0.644 T4:0.756	0.5428	0.6652
11(3)	T1:0.750 T2:0.786 T3:0.726 T4:0.726	0.0886	0.7396	T1:0.625 T2:0.919 T3:0.929 T4:0.921	0.2305	0.9494
13(15**)	T1:0.088 T2:0.079 T3:0.147 T4:0.072	0.1871	0.1264	T1:0.001 T2:0.002 T3:0.057 T4:<0.001	0.4610	0.019

10

*ゼロセルを含む分割表の理由から、T1検定は検討しなかった。

**これらの15種のハプロタイプのうち、8ハプロタイプは症例セルが3例未満の個体を有することが認められた。

20

【0309】

表16は、P2X7R遺伝子のエクソン13におけるハプロタイプとの遺伝子型関連性を示している。興味深いことに、エクソン13には多くのハプロタイプが観察された。エクソン13における統計量の間の違い（T3の方が有意性が低い）は、本疾患に複数の遺伝子型のハプロタイプが関与することによって説明可能である。可能性のある対立遺伝子関連性はP2X7R遺伝子のエクソン5におけるハプロタイプとも認められた。

【0310】

以下は、P2X7Rにおける多型の機能的帰結を示した臨床的結果である。

【0311】

うつ病の発生および経過は、視床下部-脳下垂体-副腎皮質（HPA）系の中樞性調節における障害と因果関係がある。HPA系における異常は、デキサメタゾン抑制試験（DST）またはデキサメタゾン/コルチコトロピン放出ホルモン（Dex/CRH）複合試験を用いて測定することができる。DSTまたはDex/CRH試験におけるコルチゾールおよび/または副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）測定値の変化は、抑うつ患者におけるHPA機能不全を示す（Heuser et al, J. Psychiat. Res. 28 (1994) 341-356; Rybakowski and Twardowska, J. Psychiat. Res. 33 (1999) 363-370; Zobel et al, J. Psychiat. Res. 35 (2001) 83-94; Kunzel et al, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178）。情動障害と関連性のあるP2X7R SNPがHPA系の変化とも相関することを示す目的で、DSTおよびDex/CRH試験に回答したコルチゾールおよびACTHのレベルをP2XR7v13A SNPおよびP2XR7v13C SNPに関して測定した。P2XR7v13Aは、P2X7Rタンパク質におけるGln460Arg改変をもたらすAからGへのヌクレオチド変化からなる。P2XR7v13C SNPはGlu496Ala改変をもたらすAからCへのヌクレオチド変化に対応し、これはタンパク質活性を顕著に低下させることが示されている（Wiley et al, Drug Dev. Res. 53 (2001) 72-76）。

30

40

【0312】

DSTおよびDex/CRH試験を行うための方法および条件は当技術分野で周知であり、例えば、Heuser et al, J. Psychiat. Res. 28 (1994) 341-356; Kunzel et al, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178を参照されたい。手短に述べると、個体に対して23:00に1.5mgデキサメタゾンの経口投与による前投与を行う。DST試験の場合には、血液標本を、デキサメタゾン投与前の8:00（すなわち、デキサメタゾン前）およびデキサメタゾ

50

ン投与後の翌朝8:00(すなわち、デキサメタゾン後)に採取した。Dex/CRH試験の場合には、静脈カテーテルをデキサメタゾン投与の翌日14:30に挿入し、15:00、15:30、15:45、16:00および16:15に、EDTAおよびトラジロール(Bayer Inc., Germany)を含むチューブに血液を採取した。15:02の時点で、100mgのヒトCRH(Ferring Inc., Germany)を静脈内投与した。血漿中コルチゾール濃度の測定は市販のラジオイムノアッセイキット(ICN Biomedicals, USA)を用いて行い、血漿中ACTH濃度は市販の免疫測定アッセイ(Nichols Institute, USA)を用いて測定した。いずれのアッセイも製造元の指定に従って行った。

【0313】

P2XR7v13A SNPに関しては、AGまたはGG対立遺伝子を有する個体において、AA対立遺伝子を有する個体と比較して基礎コルチゾールレベルの低下が入院時に認められた(図1f)。Dex/CRH試験では、GG対立遺伝子を有する個体において、AAまたはAG対立遺伝子を有する個体と比較してコルチゾール応答およびACTH応答の低下が計測された(図1gおよび1h)。さらに、抗うつ薬投与に対する応答もGG個体の方が遅かった(図1i)。

10

【0314】

P2XR7v13C SNPに関しては、基礎コルチゾールレベルの低下がデキサメタゾン投与後に測定された(図1j)。Dex/CRH試験では、CC対立遺伝子を有する個体は、AAおよびAC個体と比較してコルチゾール応答の増大を示したが(図1k)、ACTH応答は低下した(図1l)。これらの結果はHPA系の調節異常を意味する。

【0315】

このように、P2XR7におけるSNPはHPA系における機能不全と関連しており、このことはP2XR7における多型の機能的および臨床的な帰結を示している。

20

【0316】

実施例4

P2XR7遺伝子の構造ならびにmRNA発現および転写物配列

ヒトP2XR7プロモーターに対応する1700bpヌクレオチド配列を、MatInspector V2.2アルゴリズムおよびTransfac 4.0アルゴリズムを用いて解析した。この解析により、P2XR7遺伝子が標準的なTATAボックスを含まず、転写開始を成立させうるSPI部位を有することが示された。SPI配列に加えて、転写因子GATA、OctおよびIkarusの結合部位も存在する。これらの部位は組織特異性を付与すると考えられている。興味深いことに、P2XR7プロモーターは複数の結合部位を有しており、このことはAP-1、NFATおよびCEBPBなどの種々のサイトカインに対する応答性を示唆する。

30

【0317】

P2XR7は13個のエクソンおよび12個のイントロンを有し(Buell et al., Receptors Channels 5 (1998), 347)、このことは、理論的に複数の異なる転写物を生じさせ、異なる機能を有する可能性のある種々のアイソフォームを生成させると考えられる選択的スプライシングの基盤をなす。選択的スプライシングを受けた変異体は明確には同定されなかった。しかし、ESTクラスター化の実験により、3種類のスプライシング変異体の記載が可能になった。その1つはエクソン5の欠失によって定義される。このP2XR7v02変異体は脳由来の細胞系から単離されたクローンIMAGE:3628076に対応する。エクソン5を欠くP2XR7v02はフレームシフトを生じ、このために短縮したポリペプチドが生成される。第2のスプライシング変異体であるP2XR7v03は短いイントロン10がmRNAに存在することを特徴とする。この変異体は、2つの高品質配列である、ヒト扁桃核由来のcDNAクローンBRAMY2008977(AC番号:AK090866)および未知のヒト腫瘍に由来するESTクローンdbEST:7339877によって裏づけられた。最後の変異体であるP2XR7v04は第1エクソンの欠失によって定義され、これはエクソン2の近傍での選択的なプロモーター使用を示唆する。頭頸部腫瘍に由来する高品質ESTクローンdbEST:4782844によってこの変異体は裏づけられた。これらの変異体は図16a~16eに示されている。

40

P2X7 変異体

P2X7v01 MPACCSCSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSVCALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v04 MPPVD-----AFPLPFS---FALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v02 MPACCSCSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSVCALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v03 MPACCSCSDVDFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIIFSVCALVSDKLYQRKEPVISS
1.....10.....20.....30.....40.....50

P2X7v01 VHTKVKGIAEVKKEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQNSFFVMTNFKTEGQEORLCP
P2X7v04 VHTKVKGIAEVKKEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQNSFFVMTNFKTEGQEORLCP
P2X7v02 VHTKVKGIAEVKKEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQNSFFVMTNFKTEGQEORLCP
P2X7v03 VHTKVKGIAEVKKEIVENGVKLVHSVFDADYTFPLQNSFFVMTNFKTEGQEORLCP
61.....70.....80.....90.....100.....110

P2X7v01 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEHGNQKTCVSAWCPIEAVEEAPRPA
P2X7v04 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEHGNQKTCVSAWCPIEAVEEAPRPA
P2X7v02 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGLLS-----
P2X7v03 EYPTRRTLCSDDRGCKKGWMDPQSKGIQTGRVVEHGNQKTCVSAWCPIEAVEEAPRPA
121.....130.....140.....150.....160.....170

P2X7v01 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD
P2X7v04 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD
P2X7v02 -----
P2X7v03 LLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNLPGLNITCTFHKTQNPQCPIFRLGDI FRETGD
181.....190.....200.....210.....220.....230

P2X7v01 NFSDVAIQGGIMGIEIYWCNLDLRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYK
P2X7v04 NFSDVAIQGGIMGIEIYWCNLDLRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYK
P2X7v02 -----
P2X7v03 NFSDVAIQGGIMGIEIYWCNLDLRFHCHPKYSFRRLDDKTTNVS LYPGYNFRYAKYK
241.....250.....260.....270.....280.....290

P2X7v01 ENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFDI IQLVVYIGSTLSYFGLAAVDFIDFLIDTYSS
P2X7v04 ENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFDI IQLVVYIGSTLSYFGLAAVDFIDFLIDTYSS
P2X7v02 -----
P2X7v03 ENNVEKRTLKIVFGIRFDILVFGTGGKFDI IQLVVYIGSTLSYFGLVDRDSL FHALGKWF
301.....310.....320.....330.....340.....350

P2X7v01 NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYVSFVDESHIRMVNQQLLGRS
P2X7v04 NCCRSHIYPWCKCCQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYVSFVDESHIRMVNQQLLGRS
P2X7v02 -----
P2X7v03 EGSD-----
361.....370.....380.....390.....400.....410

P2X7v01 LQDVKGQEVPRPAMDFTDLSRLPLALHDT PPIPGQP EEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v04 LQDVKGQEVPRPAMDFTDLSRLPLALHDT PPIPGQP EEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v02 -----
P2X7v03 -----
421.....430.....440.....450.....460.....470

P2X7v01 SCLPSQLPESHRCLEELCCRKPGACIT TSELFRKLVLSRHVLQFLLLYQEPLLDVDS
P2X7v04 SCLPSQLPESHRCLEELCCRKPGACIT TSELFRKLVLSRHVLQFLLLYQEPLLDVDS
P2X7v02 -----
P2X7v03 -----
481.....490.....500.....510.....520.....530

P2X7v01 TNSRLRHCA YRCYATWRFSGQDMADFA I LPSCCRWRIRKEFPKSEGQYSGFKSPY
P2X7v04 TNSRLRHCA YRCYATWRFSGQDMADFA I LPSCCRWRIRKEFPKSEGQYSGFKSPY
P2X7v02 -----
P2X7v03 -----
541.....550.....560.....570.....580.....590

【 0 3 1 8 】

このため、ヒトP2X7Rの転写開始配列および翻訳開始配列を、Blast、GenescanおよびHM Mgeneコンピュータソフトウェアを用いて解析した。この解析により、P2X7Rが高い確率で翻訳開始部位を1つしか持たないことが示された。信頼性のある5'末端を有するほとんどのP2X7R発現配列タグ (EST ; 一意的クラスターHs.193470) には同一の転写開始部位が認められた。選択的スプライシングの徴候を示すESTは認められなかった。このように、インシリコ解析からは、選択的スプライシングまたは選択的プロモーター使用によって生じる複数の異なる転写物が見いだされる可能性は低いことが示唆されている。

【 0 3 1 9 】

上述のインシリコデータは、コード配列の開始部および終止部に対応するそれぞれ14および19塩基 (5'-ATGCCGCTTGCTG-3' ; 5'-GTAGGATACTTGAAGCCA-3') のオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを用いた、予想されるヒトP2X7Rの全コード配列の範囲にわたるRT-PCR分析によって確かめられた。全脳、解離した種々の脳領域、胸腺、脾臓および腎臓から全RNAを単離し、P2X7R発現に関して分析した。RT-PCR反応は、C. Therm One Stepポリメラーゼシステム (Roche Applied Science) および高温で開始するタッチダウンPCRのためのプロトコルを用いて行った。手短に述べると、製造元の条件に従って逆転写を52 で実施した。PCR反応は最初の5サイクルはアニーリング温度64 で行い、次の30サイクルは54 で行った。

【0320】

P2X7Rの全コード配列に対応する、サイズが1785bpである単一の特異的バンドが検出された。P2X7R mRNAは全脳、海馬、小脳、白血球および胸腺で検出されたが、脳皮質、視床下部、脾臓および腎臓では検出されなかった (図2)。すべてのPCR産物をpGEM-T-Easyプラスミド (Promega) を用いてクローニングし、Top-10菌 (Invitrogen) で青色-白色選択を用いて選別し、EcoRI消化によって検証した。予想されるサイズのフラグメントを有するクローンを増幅し、シーケンシングのために精製した。この配列により、1785bpクローンの実体が野生型P2X7Rの全コード配列であることが確かめられた。すなわち、検討したすべての組織において、野生型P2X7Rは全コード配列を含む単一の転写物として発現される。組織特異的アイソフォームが存在する可能性は低い。これらの検討は、P2X7R mRNA発現および転写物プロセッシングに関する有用な情報を与える。この情報は、インサイチュ-ハイブリダイゼーション、ノーザンプロット法およびサザンプロット法のためのリポプローブの合成、ならびにP2X7Rの過剰発現のための細胞の作製に利用することができる。

【0321】

実施例5

マウス脳におけるP2X7R発現

P2X7Rの発現を、P2X7Rの内部ペプチドを対象とするポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いる、マウス全脳の連続切片の免疫組織化学法によってさらに検討した。非ストレス下マウスから得た脳を急速凍結し、16 μm切片として切り出した上で、パラホルムアルデヒドにより5分間固定した。1:10ウマ血清により室温で30分間切片をブロックした。すべての抗体をTBST緩衝液 (0.05% Tween-20を含むTris緩衝食塩液) で希釈した。一次抗体は希釈度1:200で用い、一晚インキュベートした。洗浄はすべてTBST緩衝液で行った。二次抗体としては、抗ヤギIgGビオチン化抗体 (Vector Laboratories) を用い、検出はストレプトアビジン-ビオチン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体システム (Vector Laboratories) をジアミノベンシジン (diaminobenzidine) と併用して行った。スライドを標準的な手順を用いてトルイジンブルーにより対比染色した。一次抗体の非存在下で同じ手順を陰性対照として実施した。組織の保存性を検証するための陽性対照としては、タンパク質Patched1に対して特異的な抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて検証した。Patched1を陽性対照として用いた理由は、これが関係するすべての脳構造を染色する上、ストレスおよび抗うつ薬による影響を受けないためである。脳細胞におけるP2X7Rの特異的な細胞内局在に一致する、極めて特異的な染色パターンが検出された。陰性対照にはシグナルが全く存在しなかった。Patched1による陽性対照は、すべての試料で同一のシグナル強度および分布を示し、このことからすべての組織が等しく良好に保存および処理されたことが示された。

【0322】

頭側から尾側へと見ていくと、P2X7Rタンパク質はまず嗅球の糸球体層で低レベルで観察された (図3)。P2X7Rは脳室周囲視床下核の限局した領域でも極めて低レベルで存在した (図3)。脳側室の周囲の上皮細胞もわずかな染色を示した (図3)。より強いシグナルが海馬の限局した領域で検出され、シグナルは多形層、網状分子層および上行層の単細胞内に存在した (図4)。海馬のより後方の領域では、シグナルは分子層、放射状層およびCA3付近に存在した。さらに尾側の位置では、P2X7Rは交連下器官で発現されていた (図4)。このように、非ストレス下マウスの脳内での基礎的なP2X7R発現は、これまでうつ病、ストレス、学習および記憶と関連づけられている領域に限局していた。

【0323】

10

20

30

40

50

実施例6

P2X7Rは抗うつ薬を投与したマウスでは調節を受ける

情動障害におけるP2X7Rの役割に関するさらなる検証を、ストレスおよび抗うつ薬の投与に応答したその発現パターンを検討することによってさらに行った。行動レベルで抗うつ効果を生じることが証明されている投与スケジュールによる投与を、選択的セロトニン再取り込み阻害薬パロキセチンなどの古典的抗うつ薬の抗不安効果および抗うつ効果を検出するのに適した種々の行動パラダイムを用いることによって抗うつ薬に反応することが特徴づけられたマウスマウスに対して行った。パロキセチンは胃管により、未処置雄性マウスに対して、10mg/kg体重・1日2回の用量で28日の期間にわたって投与した。並行して、マウスの一方の対照群に対して媒体溶液（すなわち、パロキセチンを含まない）を同じ投与レジメンを用いて投与し、マウスの第2の対照群は、同じ実験期間中は元のままに放置して非ストレス下（すなわち、非処理）においた。この長期投与の後に、投与の有効性を確かめるために、各実験群のマウスの一部を、明暗ボックス（不安行動の試験）およびPorsoltの強制水泳試験（抑うつ様行動の試験）で試験した（図5）。受動ストレス対処行動は抗うつ薬パロキセチンの長期投与後に減少した。実験群の残りの部分（すなわち、試験を体験させなかったマウス）は断頭処理し、脳を直ちに摘出して使用時まで-80℃で保存した。

10

【0324】

非ストレス条件下にあるマウス、媒体適用によって加えられた軽度のストレス下にあるマウス、およびパロキセチン投与を受けたマウスの脳内でのP2X7Rの発現を、各群からの3つの異なる脳を用いて評価した。各群のマウスからの連続スライドを、完全に比較しうる結果を得るために、同じ材料を用いる免疫組織化学法によって並行して分析した。ストレスおよびパロキセチン投与のいずれに対しても嗅球でのP2X7R発現に関して顕著な変化は認められなかった（図6）。しかし、視床下部の脳室周囲核では、パロキセチンはP2X7R発現の軽度の抑制を引き起こした（図7）。種々の脳領域において上衣細胞には顕著な変化は認められなかった（図8）。最も劇的な変化は海馬で観察され、ここではストレスを伴う取り扱いによってP2X7Rが強く抑制され、一方、パロキセチン投与は基礎レベルを上回る顕著な賦活を引き起こした（図9、10および11）。この効果は海馬の全体にわたって観察されたが、歯状回付近の多形層で最も明らかであった。交連下器官では、種々の投与を行ってもP2X7R発現は変化しないままであった。以上のように、P2X7R発現は、うつ病およびストレスにかかわる2つの特定の脳領域で強く調節されている。低レベルのP2X7Rが認められ、うつ病に直接かかわらない他の脳領域では変化は認められなかった。

20

30

【0325】

パロキセチンを投与し、強いP2X7R発現を示したマウスからの試料では、P2X7Rの分布をより詳細に分析することが可能であった（図10および11）。P2X7Rタンパク質は細胞体中存在するだけでなく、歯状回の顆粒層への神経支配を行う突出部においても明確に検出された（図12）。P2X7Rのこの細胞内局在は、神経伝達物質放出および長期増強における役割と一致する。

【0326】

いくつかの報告（Muria et al., *Biochem. J.* 288 (1992), 897-901; Ferrari et al., *FEBS Lett.* 447 (1999), 71-75）で、P2X7Rの慢性的および高用量での賦活がいくつかの細胞種におけるアポトーシスを引き起こす可能性が示唆されていることから、上記のマウスの海馬を、アポトーシス細胞とP2X7R発現細胞との共存に関して、連続切片におけるTUNEL染色および免疫組織化学法を用いて分析した。相関する切片において、アポトーシス細胞はごく少数しか検出されず、それらはP2X7R発現が観察されなかった海馬の顆粒層に沿って存在した（図13）。種々の投与条件間でアポトーシス細胞の数に関する有意差は認められなかった。したがって、アポトーシス細胞の位置および数はP2X7Rの細胞性発現の位置および数とは相関せず、P2X7Rが海馬におけるアポトーシスの誘導に關与する可能性は否定される。

40

【0327】

50

このように、P2X7R発現はうつ病にかかわる特定の脳領域にかなり限局している。さらに、これらの特定の領域におけるP2X7R発現はストレスによって抑制され、抗うつ薬投与によって強く賦活される。したがって、P2X7Rは、うつ病研究の分野において最も高度な規準に準拠した、抗うつ薬の作用に関するすべての基準を満たしている。さらに、これらの結果は慢性ストレスに伴ってP2X7Rの機能の変調が起こり、これが情動障害のいくつかの様相に対するモデルとして役立つ可能性を示唆する。

【0328】

実施例7

マウスにおけるP2X7R阻害の行動上の影響

P2X7R阻害が情動障害の原因因子として作用することを示すために、他のいかなる脳機能にも影響を及ぼすことなく、脳の特異な領域におけるP2X7R機能を特異的に阻害した。これは、二本鎖短鎖干渉性RNA分子 (siRNA) を脳の限局領域に対して送達することによって実現した。

【0329】

海馬で観察されたP2X7Rの発現パターン (図9、10および11) および海馬がうつ病への関与が知られていることから、歯状回 (海馬) をsiRNA適用の標的領域として選択した。雄性の未処置マウスに対して、定位装置を用いてガイドカニューレ (23ゲージ、長さ8mm) を両側性に移植した。プレグマに対する座標は、-2.0mm後方、±1.0mm側方および-1.0mm腹側とした。5日間の回復期間の後に、マウスを以下の3つの実験群に分けた: 媒体 (veh)、対照二本鎖RNA (対照) およびP2X7R特異的二本鎖siRNA (siRNA)。P2X7R siRNAに対して用いた配列は、5'-GUGGGUCUUGCACAUGAUCTT-3' および5'-GAUCAUGUGCAAGACCCACTT-3' である。両方の配列をアニーリングさせ、二本鎖RNAとして一体化した上で注射した。手術後の第6日に、マウスにイソフルランによる軽い麻酔をかけた上でsiRNAの注射を行った。対照およびsiRNAの濃度は0.1nmol / μ lとし、一側当たり1 μ lを特別に適合させた注射システム (30ゲージ、長さ9mm) を用いて注入した。注入用の麻酔は短期間のものであり、マウスは直ちに、または操作から数秒後に目覚めた。

【0330】

ひとたび脳内に送達されると、P2X7Rに対して特異的なsiRNA分子は脳細胞によって取り込まれ、相補的P2X7R mRNAの分解を高い効率で特異的に誘導した。その結果、他のいかなる脳機能にも影響を及ぼさずにP2X7R機能は短期間で特異的に阻害された。この点に関して、媒体または対照siRNAの注入は正常行動に対して、すなわち、飼料および水の摂取に対しても飼育ケージ内での運動行動に対しても明らかな変化を引き起こさなかった。

【0331】

抑うつ様行動に対するP2X7R阻害の影響を、標準的な試験パラダイムであるPorsoltの強制水泳試験に従って、siRNA、対照または媒体の注入から24時間後および48時間後に評価した (Porsolt et al., Arch. Int. Pharmacodyn. 229 (1977), 327-336; Porsolt Rev. Neurosci. 11 (2000), 53-58)。抑うつ様行動を評価するために用いたパラメーターは、動物がストレスを伴う状況に能動的に対処しない場合に行動上の絶望 (behavioural despair) に付随してみられる行動である、動物が水中に浮遊している時間とした。媒体適用例と比較して、浮遊行動 (受動ストレス対処) に対する対照二本鎖RNA (5'-CAACUUCAUCUUCUACGCGTT-3') の影響は検出されなかった。これに対して、P2X7R特異的siRNAを注入されたマウスは、対照と比較して、抑うつ様行動として解釈される受動行動の有意な増加を示した (図14)。この解釈は、強制水泳試験における受動ストレス対処行動に対する抗うつ薬の効果を図式化した場合にさらに明白となった (図5)。受動ストレス対処行動は、P2X7Rを標的とするsiRNAの急性海馬内注射 (両側、歯状回) 後に増加した。Porsoltの強制水泳試験は、抗うつ薬の有効性を評価するために用いられる標準的な試験であり、多くの研究により、正しい動物モデルを用いるならば、この試験がこれらの効果に関して選択的な感受性を有することが証明されている。このパラダイムは、医薬化合物の試験のため、および、P2X7Rが阻害された (siRNA) マウスが示したように受動行動の増加を示す、うつ病の動物モデルのパリデーシンのために幅広く用いられている。

10

20

30

40

50

【0332】

この実験の最後にマウスを屠殺し、siRNA注射の位置および効率を確かめるために脳を検査した。この目的で、脳を切片として切り出し、上述のプロトコールを用いてスライドを免疫組織化学法によって染色した。特異的二本鎖siRNA、対照二本鎖RNAおよび媒体を注射したマウスの脳を並行して検査した。これらの条件下で、歯状回の近傍に注射した、P2X7Rを対象とする特異的siRNAは、媒体または対照二本鎖RNAを注射したマウスからの試料と比較して、P2X7Rタンパク質の発現を平均80%阻害した。P2X7Rを発現する細胞の数および発現の強度はいずれも強く抑えられた(図15)。siRNAの注射は局所炎症および海馬の浸潤のいずれの徴候も引き起こさなかった。以上より、P2X7R発現はインビボでのsiRNA適用によって特異的かつ局所的に阻害される。この阻害は行動変化を引き起こし、このことは情動障害におけるP2X7Rの原因としての役割を示している。これらの結果を上述の内容と総合することにより、P2X7Rにおける変異がヒトにおける情動障害と関連性があり、P2X7R活性の調節に抗うつ効果があるという観察所見が裏づけられ、確認された。

10

【0333】

実施例8

薬物スクリーニングアッセイ

P2X7R作動薬の同定のための方法を、内因性P2X7遺伝子を発現する不死化マウス海馬細胞系を用いて確立した。手短に述べると、細胞を37 / 5% CO₂下で、10%ウシ胎仔血清(Gibco)を含むDMEM中にて培養することにより、P2X7の発現を確かめた。集密度80%に達したところで、細胞をPBS中に集め、シリンジ(18G針)に繰り返し通すことによってホモジネート化した。全タンパク質の量を、Bradfordアッセイ(Sigma; 1:5に希釈、O.D.を595nmで測定)を製造元の推奨に従って用いることによって測定した。続いて、タンパク質ホモジネートを同じ容積のローディングバッファー(50mM Tris-Cl pH 6.8; 25%グリセロール; 7,2mMプロモフェモールブルー; 2% SDS; 200nM β-メルカプトエタノール)と混合し、その後に沸騰水中で10分間変性させた。各試料の20mgを、0,4% SDSを含む10%ポリアクリルアミドゲルにローディングした。電気泳動およびウエスタンブロットのトランスファーは、例えば、Sambrook Russell「分子クローニング、実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)に記載された、従来のプロトコールに従って行った。続いて膜を5%粉乳でブロックし、P2X7Rに対する抗体(1:1000希釈; Santa Cruz Biotech)とインキュベートした後に、ウマ抗ヤギペルオキシダーゼ結合二次抗体(1:10000希釈; Santa Cruz Biotech)とインキュベートした。続いて膜をLumi-Lightウエスタンブロット基質(Roche Applied Science)中にて37 で1時間インキュベートし、その後にBioMax MR Film(Kodak)に対して10分間露光させた。

20

30

【0334】

P2X7Rタンパク質の予想サイズに対応する70kDバンドがHT-22細胞で検出され、このことから内因性マウスP2X7遺伝子の発現が示された(図17)。第2のマウス海馬細胞系(HT-39)はP2X7を発現しなかった。

【0335】

P2X7Rはカルシウムイオンおよびナトリウムイオンの細胞内への移入を可能にするATP感受性イオンチャンネルであることから、HT-22細胞へのカルシウム流入をモニターすることによる、P2X7R作動薬の同定のための方法を確立した。細胞にまず蛍光色素オレゴングリーンAMエステル(Molecular Probes)を室温で30分間負荷し、余分な色素を除去するためにDMEM/10%ウシ胎仔血清で2回洗浄した上で、100 μMの2'-および2'-3'-0-(4ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸(BzATP: C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)の存在下で15分間培養した。BzATPはP2X7Rの既知の作動薬である(North and Surprenant Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580)。細胞内へのカルシウム移動はフルオレセインフィルター(波長492/517nm)を装着した蛍光顕微鏡で観察した。オレゴングリーンAMエステルは細胞内カルシウムと結合する蛍光色素である。これにより、BzATPで処理した細胞では緑色の蛍光が観察され(図18)、このことは細胞内へのカルシウム流入をもたらすP2X7R

40

50

の活性化、およびオレゴングリーン色素と細胞内カルシウムとの結合の増加を示している。または、オレゴングリーンAMエステルの代わりにFluo-3、fluo-4、fluo-5F、fluo-5N、fluo-4FF、Fluo-4デキストラン、Fluo-3AM、Fluo-4AM、Fluo-5F AM、Fluo-5N AMおよびFluo-4FF AM (Molecular Probes) を用いることもできる。また、HT-22細胞内へのカルシウム流入を、Calcium Plusアッセイキット (Molecular Device) またはFluorometric Imaging Plate Reader Systems用のFLIPR (登録商標) カルシウムアッセイキット (Molecular Device) を用いて、96ウェルおよび384ウェルのマイクロプレートで測定することもできる。HT-22細胞の代わりに、外因性P2X7遺伝子を導入することによって遺伝的に改変された細胞を含め、P2X7Rを発現する任意の細胞を用いることができる。

【0336】

カルシウム流入に対するP2X7R作動薬の特異性は、BzATP添加の1時間前にHT-22細胞を100μM酸化ATP (oATP; Sigma) で前処理することによって確かめられた。oATPはこの受容体の非可逆的阻害薬である (Chen et al., J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203)。細胞に緑色蛍光が存在しないことによって示されたように、作動薬によるP2X7Rの活性化はoATPによって阻害された (図18)。

【0337】

P2X7R活性を測定するさらにもう1つの方法では、P2X7R発現細胞への臭化エチジウムの移入を用いる。作動薬によるP2X7Rの活性化によって臭化エチジウムの移入が可能となり、これが核DNAと結合して蛍光シグナルを放出する。または、プロビジウム色素YOPRO-1を臭化エチジウムの代わりに用いることもできる。蛍光の増加をP2X7受容体の活性化の指標として用いる。したがって、本アッセイは、P2X7Rに対するアゴニスト作用を有する作用因子または化合物の効果の試験および定量化を行うために用いることができる。本実施例では、1ウェル当たり 10^3 個のHT-22細胞を96ウェル平底マイクロタイタープレートに播き、細胞が培養表面に付着するまで、10%FCSを含むDMEM培地中にて37℃/5%CO₂下でインキュベートした。ひとたび付着したところで、10%FCS、 10^{-4} M臭化エチジウムおよび種々の濃度のBzATP (1μM、10μM、100μM、500μM、1mM) を含むDMEM培地中で細胞を60分間インキュベートした。続いて、臭化エチジウムがDNAに組み込まれた蛍光細胞の数を、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Germany) を用いて算定することができる。100μMを上回る濃度で、BzATPはP2X7Rシグナル伝達の活性化を示す蛍光性核の数を増加させた (図19a)。または、臭化エチジウム蛍光をPerkin-Elmer蛍光プレートリーダー (励起520nm、発光595nm、スリット幅: Ex 15nm、Em 20nm)。得られた読み取り値から、それぞれの作用因子候補または化合物に関するpIC50の数値を算出することができる。すなわち、P2X7R作動薬はEC50が300μMと等しいかそれ未満である作用因子または化合物として定義され、この際、EC50という用語は作動薬に対する最大応答の50%を誘発する濃度として定義される (North and Surprenant, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 (2000), 563-580)。P2X7Rに対する作動薬の特異性は、作動薬および臭化エチジウム色素を添加する前に細胞を100μMのo-ATPと60分間プレインキュベートすることによって評価しうる。これらの条件下では、作動薬によるP2X7Rの活性化はoATPによって阻害され、蛍光細胞の数の減少が起こる (図19b)。

【0338】

P2X7R作動薬の同定のためのさらにもう1つの方法を、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 初期プロモーター/エンハンサー領域の制御下でヒトP2X7R遺伝子を過剰発現する不死化マウス細胞系を作製することによって考案した。ヒトP2X7R cDNAをpcDNA3.1ベクター (Invitrogen) に挿入し、Lipofectamine (Invitrogen) を製造元の指示に従って用いてマウス海馬細胞系HT-22にトランスフェクトした。トランスフェクションの1日後に、500μg/ml G418を含む培養液を細胞に添加した。耐性クローンを別個に単離し、選択培地の適用後に14日間培養した。

【0339】

化合物のアゴニスト活性は、ヒトP2X7Rを過剰発現する細胞内へのカルシウム移入を測定することによって評価した。細胞を96ウェルプレートで培養し、37℃、5%CO₂下で、10%ウシ胎仔血清 (Gibco) を含むDMEM中において、それらが集密状態に達するまでインキ

10

20

30

40

50

ユベートした。続いて細胞に10 μ MのFluo-4AM (Molecular Probes) を1時間負荷した。Fluo-4AMは細胞内カルシウムと結合する蛍光色素である。負荷の後に、0.5mM CaCl₂および20mM HEPESを含む緩衝液で細胞を1回洗浄し、20 μ M BzATPまたは50 μ Mテニダップで処理した。アゴニスト活性は、Fluo-4AMに対する結合の増加および蛍光の増加をもたらす、カルシウム流入の増加を測定することによって検出した。蛍光シグナルの変化は、Fluostar Optimaプレートリーダー (BMG biotech) を用いて測定される。BzATPおよびテニダップはいずれも蛍光強度の急速な増加を引き起こし、これは時間経過に伴って徐々に減少した (図19c)。このように、いずれの化合物も、細胞内へのイオンの流入をもたらすP2X7Rの活性を賦活した。

【0340】

実施例9

【0341】

作動薬によるP2X7Rの活性化は抗うつ効果を有する

P2X7Rの活性化が情動障害に対する治療効果を有することを示すために、P2X7R作動薬であるBzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) を、高度の不安を呈し、抗うつ薬に反応し、しかも垂慢性的な抗うつ薬投与後に不安寛解を示す、選択したDBA/201aマウス系統に対して投与した (Lucki et al. *Psychopharmacology* 155 (2001), 315-322)。BzATPは、P2X7Rに対する強い選択性を有する化合物である (North and Surprenant, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 (2000), 563-580)。本実施例では、P2X7R作動薬をマウスの海馬内に直接注射した。しかし、P2X7R作動性の作用因子または化合物を経口、皮下、静脈内、動脈内、結節内、髄内、髄腔内、脳室内、鼻腔内、気管支内、経皮的、結節内、直腸内、腹腔内、筋肉内、肺内、膈内、直腸内または眼内に送達することも可能と考えられる。

【0342】

4カ月齢の雄性マウスに対して、定位装置 (David Kopf Instruments) を用いてガイドカニューレ (23ゲージ、長さ8mm) を両側性に移植した。ブレグマに対する座標は、-2.0mm後方、 \pm 1.0mm側方および-1.0mm腹側とした。手術後に、マウスを10~12日間かけて回復させた。この回復期間の後に、マウスに対して脳の両側に1 μ lの媒体溶液 (0.5% DMSO、Sigma) または50 μ M BzATP (Sigma、0.5% DMSO中に調製) を60秒間かけて注射した。注射はガイドカニューレに挿入し、チューブを介して10 μ lハミルトンシリンジと接続した9mm-30ゲージ針を用いて行った。

【0343】

個々のマウスの行動を、媒体溶液またはBzATPの注射から24時間後にPorsoltの強制水泳試験を用いて評価した。試験に対する5分間の前曝露を媒体またはBzATP注射の10~15分後に行った。強制水泳試験は、一次ストレスによって誘発される回避または逃避の低下 (行動上の絶望と呼ばれる) を計測する標準的な試験である。この試験は、抗うつ薬の有効性の判定、新たな医薬化合物の試験、およびうつ病の動物モデルのパリデーシヨンのために用いられる (Porsolt et al., *Arch. Int. Pharmacodyn.* 229 (1977), 327-336; Porsolt, *Rev. Neurosci.* 11 (2000), 53-58; Reneric et al., *Behav. Brain Res.* 136 (2002), 521-532; Page et al., *Psychopharmacology* 165 (2003), 194-201; Kelliher et al., *Psychoneuroendocrinology* 28 (2003), 332-347)。この試験は、水を含む円筒形ガラス容器にマウスを5分間入れることからなる。このような状況では、マウスは円筒の底に触れることができず、このため泳ぐことを強制される。もがき (struggling) と浮遊を対比して、それぞれの時間、潜時および頻度を行動パラメーターとしてスコア化する。浮遊 (すなわち、平衡および呼吸を保つことのみを目的として行われる移動) は、動物がストレスを伴う状況に対して能動的に対処する試みを行わないことから、絶望に伴う受動行動であり、抑うつ様症状を表す。もがき (すなわち、逃れようとする能動的な試み) の増加は、うつ病様症状の改善として解釈しうる能動的対処行動を意味する。例えば、セロトニン作動性抗うつ薬の投与は浮遊に費やす合計時間を減少させ (Borsini, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19 (1995), 377-395; Redrobe and Bourin, *Psychopharmacology* 138 (1998), 1

10

20

30

40

50

98-206、これに並行して能動行動（すなわち、水泳またはもがきの時間を増加させる；Luski et al., *Psychopharmacology* 155 (2001), 315-322）。

【0344】

P2X7R作動薬BzATPは、能動的な逃避の試みを増加させ（すなわち、もがきの時間および頻度を増加させ、もがきの潜時を短縮させる）ことが見いだされ、一方、媒体溶液を注射した対照マウスと比較して、受動行動の減少（すなわち、浮遊の時間および頻度を減少させ、浮遊の潜時を延長させる）が測定された（図20）。観察された結果を、Mann-Whitney U検定および片側MANOVA検定を用いて統計学的に検証した。もがきの時間、浮遊の潜時および浮遊の頻度の差は統計学的に有意であることが判明した。もがきの潜時および頻度ならびに浮遊時間に関する結果は統計学的には裏づけられなかったが、それらはそれでもストレス対処行動の改善に向けての傾向を示した。これらの結果はP2X7R作動薬が抑うつ様症状の改善をもたらしていることを示している。

【0345】

強制水泳試験によって導き出される結論は、動物の活動に対する作用因子または化合物の非特異的な影響によって左右される可能性があるため（すなわち、もがき行動は能動的対処行動の増加ではなく活動亢進の結果である可能性がある）、BzATPが移動活動に対して及ぼす可能性のある影響に関して、オープンフィールド試験によって評価した（Crawley「私のマウスはどこが悪いのか：トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスの行動学的表現型分類（What's wrong with my mouse: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mouse）」、Wiley-Liss (2000)）。対照媒体溶液または50 μM BzATPを投与したマウスにおける移動活動を、個々の動物をダークグレーの木製の箱（30 × 30 × 40cm）に入れることにより、注射の24時間後に評価した。移動活動をビデオカメラを用いて30分間モニターした。続いて、試験期間中にマウスが移動した合計距離を、VideoMot 2コンピュータソフトウェア（TSE GmbH, Bad Homburg）を用いて分析した。対照媒体溶液およびBzATPを投与したマウスの間に移動活動に関する差は計測されなかった（図21）。このことからみて、BzATPの適用は活動亢進を誘発しない。これらの結果は、作動性の作用因子または化合物によるP2X7Rの活性化は抑うつ様症状の改善をもたらすが、それは動物の行動自体に対する非特異的な効果には起因しないことを裏づけるものである。

【0346】

いくつかの報告により、P2X7Rの活性化はインピトロでアポトーシスおよび細胞死を誘導していることが示唆されている（Di Virgilio et al., *Cell Death Differ.* 5 (1998), 191-199、Virginio et al., *J. Physiol.* 519 (1999), 335-346）。海馬におけるP2X7Rの活性化が細胞死を引き起こすか否かを検証するために、BzATPを投与したマウスの脳内でのアポトーシスレベルを定量した。マウスを行動実験の終了時に屠殺し、脳を摘出して急速凍結した上で、16 μm切片へと切片化した。続いて、DeadEnd蛍光分析TUNELシステムを製造元の推奨に従って用いて（Promega Corporation）、脳切片をアポトーシスに関して検討した。TUNELシステムは、アポトーシス細胞の断片化したDNAを測定する。本アッセイに関する陽性対照は、脳切片を1単位/mlのDNアーゼIで10分間前処理することによって作製した。

【0347】

対照媒体またはP2X7R作動薬を投与したマウスの脳内では、DNアーゼで前処理した陽性対照とは対照的に、極めて少数のアポトーシス細胞（すなわち、1枚の脳切片当たり細胞1個未満）しか観察されなかった（図22）。さらに、対照動物とBzATPを投与したマウスとの間にはアポトーシス細胞の数に関して有意差は観察されず、このことからP2X7Rの活性化はインピボでの脳細胞死を引き起こさないことが示された。

【0348】

実施例10

P2X7R拮抗薬には抗うつ効果はない

P2X7R拮抗薬KN-62（1-(N,0-ビス[5-イソキノリンスルホニル]-N-メチル-L-チロシル)-4-フェニルピペラジン）および酸化ATP（oATP）を、高度の不安を表す行動特性を呈するDB

10

20

30

40

50

A / 201aマウス (Harlan Winkelmann, Germany) に対して投与した。KN-62はP2X7Rの非競合拮抗薬であることが示されており (Chessel et al., Brit. J. Pharmacol., 124 (1998), 1314-1320)、一方、oATPはP2X7Rの非可逆的阻害薬として作用する (Chen et al., J. Biol. Chem., 268 (1993), 8199-8203)。

【0349】

本実施例では、P2X7R拮抗薬を海馬の歯状回領域内に直接注射した。手短に述べると、3カ月齢の雄性マウスに対して、定位装置 (David Kopf Instruments) を用いてガイドカニューレ (23ゲージ、長さ8mm) を両側性に移植した。プレグマに対する座標は、-1.5mm後方、±1.0mm側方および-0.8mm腹側とした。マウスを手術後10~13日かけて回復させた。この回復期間の後に、マウスに対して脳の両側に1µlの媒体溶液 (0.01%DMSO、Sigma) または100nM KN-62 (Sigma、0.01%DMSO中に調製) または10µM oATP (Sigma、PBS中に調製) を60秒間かけて注射した。すべての注射は、ガイドカニューレに挿入し、チューブを介して10µlハミルトンシリンジと接続した9mm-31ゲージ針を用いて行った。

10

【0350】

個々のマウスの行動を、媒体溶液、KN-62またはoATPの注射から24時間後にPorsoltの強制水泳試験を用いて評価した。試験に対する5分間の前曝露を媒体、KN-62またはoATP注射の15~17分後に行った。Porsoltの強制水泳試験に関する説明は実施例9で行っている。本実施例では、媒体、KN-62またはoATP投与マウスの間に、能動的な逃避の試み (すなわち、もがきの時間、頻度、潜時) の変化も受動行動 (すなわち、浮遊の時間、頻度、潜時) の変化も認められなかった (図23)。観察された結果を、片側MANOVA検定を用いて統計学的に検証した。媒体、KN-62またはoATP投与マウスの間に認められた差は統計学的には裏づけられなかった。これらの結果は、P2X7R拮抗薬が抑うつ様症状を改善せず、抗うつ作用を有していないことを示している。

20

【0351】

強制水泳試験によって導き出される結論は、動物の活動に対する作用因子または化合物の非特異的な影響によって左右される可能性があるため (すなわち、もがき行動は能動的対処行動の増加ではなく活動亢進の結果である可能性がある)、P2X7R拮抗薬oATPが移動活動に対して及ぼす可能性のある影響に関して、オープンフィールド試験を行うことによって評価した。対照媒体溶液、10µM oATPまたは50µM oATPを投与したマウスにおける移動活動を、個々の動物をダークグレーの木製の箱 (30×30×40cm) に入れることにより、注射の24時間後に評価した。移動活動をビデオカメラを用いて30分間モニターした。続いて、試験期間中にマウスが移動した合計距離を、VideoMot2コンピュータソフトウェア (T SE GmbH, Bad Homburg) を用いて分析した。対照媒体溶液およびoATPを投与したマウスの間に移動活動に関する差は計測されなかった (図24)。すなわち、P2X7R拮抗薬の適用は動物における活動低下も活動亢進も誘発しなかった。

30

【図面の簡単な説明】

【0352】

【図1A】双極性情動障害と関連性のあるヒト染色体12上の領域のゲノム地図。マーカーNBG11とNBG2との間に見いだされた遺伝子を示している。

40

【図1B】独立した同胞対に対するASPEXを用いた多点解析を示した図。

【図1C】すべての同胞対に対するASPEXを用いた多点解析を示した図。

【図1D】独立した同胞対のみを考慮することによるASPEX sib_Phaseを示した図。

【図1E】すべての同胞対を考慮することによるASPEX sib_Phaseを示した図。

【図1F】デキサメタゾンの投与前および後 (DST試験) の基礎コルチゾールレベルに対するP2XR7v13A多型の影響。個体を入院して最初の10日間にわたり試験に供した。AGおよびGG遺伝子型を有する個体はデキサメタゾン投与前および投与後のコルチゾールレベルが有意に低い。

【図1G】Dex / CRH試験時のコルチゾール応答に対するP2XR7v13A多型の影響。個体を入院して最初の10日間 (すなわち、入院時) および退院前の10日間 (すなわち、退院時) にわたって試験に供した。GG遺伝子型を有する個体は、入院時および退院時のDex / CRH試験

50

に反応したコルチゾールレベルが相対的に低い。これらの結果はHPA系の異常を示している。

【図1 H】Dex / CRH試験時のACTH応答に対するP2XR7v13A多型の影響。個体を入院して最初の10日間（すなわち、入院時）および退院前の10日間（すなわち、退院時）にわたって試験に供した。GG遺伝子型を有する個体は、入院時および退院時のDex / CRH試験に反応したACTHレベルが相対的に低い。これらの結果はHPA系の異常を示している。

【図1 I】寛解までの抗うつ薬の投与期間。うつ病はハミルトンうつ病評価尺度（HAM-D ; Hamilton, Br. J. Soc. Clin. Psychol. 6 (1967) 278-296）に従って診断している。HAM-Dスコアが10またはそれ未満であれば抑うつ症状の寛解とみなされる。

【図1 J】デキサメタゾンの投与前および後（DST試験）の基礎コルチゾールレベルに対するP2XR7v13C多型の影響。個体を入院して最初の10日間にわたり試験に供した。CC遺伝子型を有する個体はデキサメタゾン投与後のコルチゾールレベルが上昇している。

【図1 K】Dex / CRH試験時のコルチゾール応答に対するP2XR7v13C多型の影響。個体を入院して最初の10日間（すなわち、入院時）および退院前の10日間（すなわち、退院時）にわたって試験に供した。ACまたはCC遺伝子型を有する個体は入院時のDex / CRH試験に反応したコルチゾールレベルが上昇しており、これはHPA系の異常を示す。

【図1 L】Dex / CRH試験時のACTH応答に対するP2XR7v13C多型の影響。個体を入院して最初の10日間（すなわち、入院時）および退院前の10日間（すなわち、退院時）にわたって試験に供した。CC遺伝子型を有する個体は入院時および退院時のDex / CRH試験に反応したACTHレベルが低い。これらの結果はHPA系の異常を示している。

【図2】種々の組織におけるP2X7Rの全コード配列に関するRT-PCR分析。

【図3】非ストレス下マウスの脳内の嗅球、視床下部および上衣細胞におけるP2X7R発現。倍率100倍。

【図4】非ストレス下マウスの脳内の海馬 / 歯状回および交連下器官におけるP2X7R発現。倍率100倍。

【図5】強制水泳試験における浮遊行動。受動ストレス対処行動は抗うつ薬パロキセチンの長期投与によって低下した（Par28：パロキセチンを28日間投与、経口）。基礎n = 8 ; 媒体n = 8 ; Par28 n = 8。

【図6】非ストレス下、媒体投与および抗うつ薬投与マウスの嗅球におけるP2X7R発現の比較分析。倍率100倍。

【図7】非ストレス下、媒体投与および抗うつ薬投与マウスの視床下部におけるP2X7R発現の比較分析。倍率100X倍。

【図8】非ストレス下、媒体投与および抗うつ薬投与マウスの上衣細胞におけるP2X7R発現の比較分析。倍率100倍。

【図9】非ストレス下、媒体投与および抗うつ薬投与マウスの海馬におけるP2X7R発現の比較分析。倍率25倍。

【図10】媒体投与マウスの海馬におけるP2X7R発現。倍率25倍。

【図11】抗うつ薬パロキセチンを投与したマウスの海馬におけるP2X7R発現。倍率25倍。

【図12】抗うつ薬パロキセチンを投与したマウスの歯状回におけるP2X7Rの詳細な発現。倍率400倍。

【図13】抗うつ薬パロキセチンを投与したマウスの海馬におけるP2X7R発現およびアポトーシス細胞の比較分析。倍率100倍。

【図14】強制水泳試験における浮遊行動。受動ストレス対処行動は、P2X7Rを標的とするsiRNAの急性海馬内投与（両側、歯状回）後に増加した。媒体n = 7 ; 対照RNA n = 10 ; P2X7R siRNA n = 9。

【図15】媒体、対照RNAおよびP2X7Rを標的とするsiRNAを投与したマウスの海馬におけるP2X7R発現の比較分析。倍率は上列100倍、下列25倍。

【図16】図16a ~ eは、P2X7Rのイントロンにおける多型によって生じる3種類のスプライシング変異体である。

10

20

30

40

50

【図17】 不死化海馬細胞系におけるP2X7Rの発現。

【図18】 P2X7R作動性化合物 (BzATP) で処理した海馬細胞におけるカルシウム流入の増加。

【図19】 (a) P2X7R作動性化合物 (BzATP) で処理した、または (b) P2X7R拮抗性化合物で前処理した海馬細胞における臭化エチジウム色素の移入。(c) P2X7R活性に対するBzATPおよびテニダップのアゴニスト作用。ヒトP2X7Rのカルシウムチャンネル活性を基礎条件下で4秒~10秒間測定した。A.10 μM Fluo-4-AMを添加し、それ以外の処理を行わなかった細胞からなる陰性対照。B.4秒間の基礎値測定後に20 μM BzATPで処理した細胞。C.4秒間の基礎値測定後に50 μMテニダップで処理した細胞。

【図20】 強制水泳試験における行動に対するP2X7R作動性化合物 (BzATP) の海馬内注射の効果。

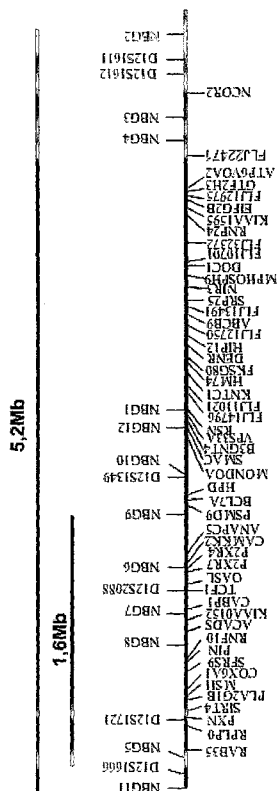
【図21】 P2X7R作動性化合物 (BzATP) を投与したマウスの移動活動を測定したオープンフィールド試験。

【図22】 対照媒体溶液またはP2X7R作動性化合物 (BzATP) を投与したマウスの海馬におけるアポトーシス細胞の比較分析。

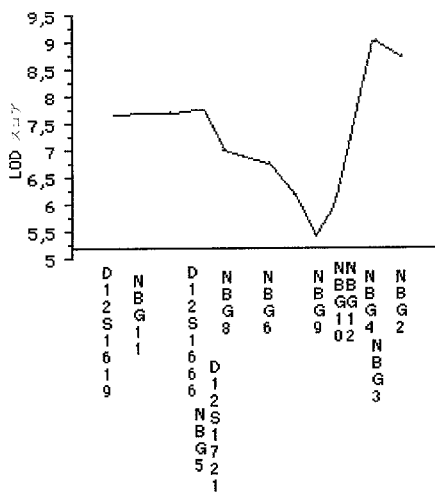
【図23】 強制水泳試験時の行動に対するP2X7R拮抗薬KN-62およびoATPの海馬内注射の効果。

【図24】 P2X7R拮抗薬KN-62およびoATPを投与したマウスの移動活動を測定したオープンフィールド試験。

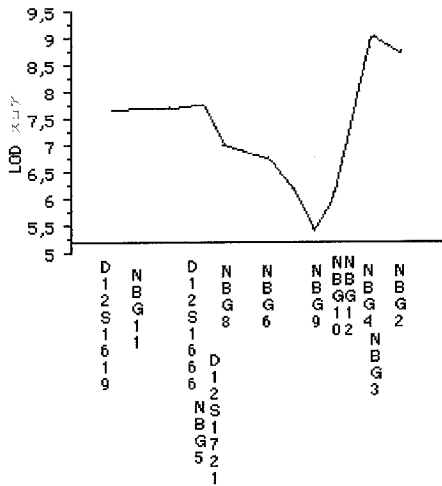
【図1A】



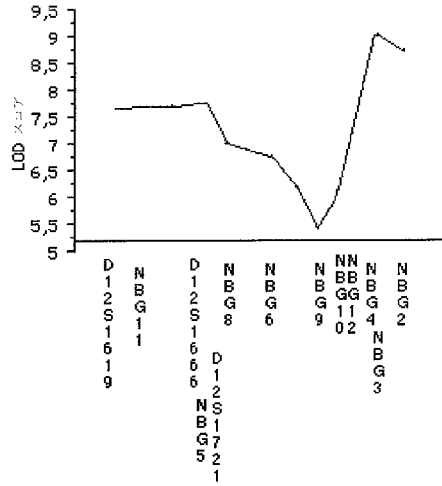
【図1B】



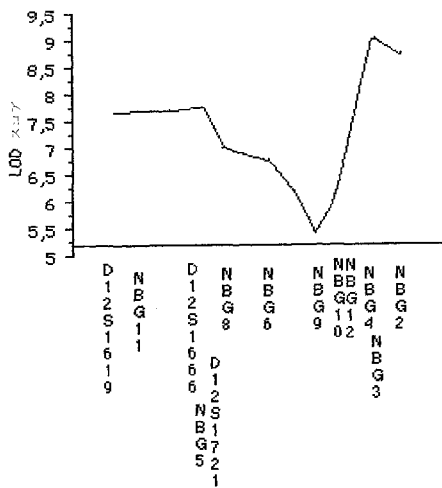
【 図 1 C 】



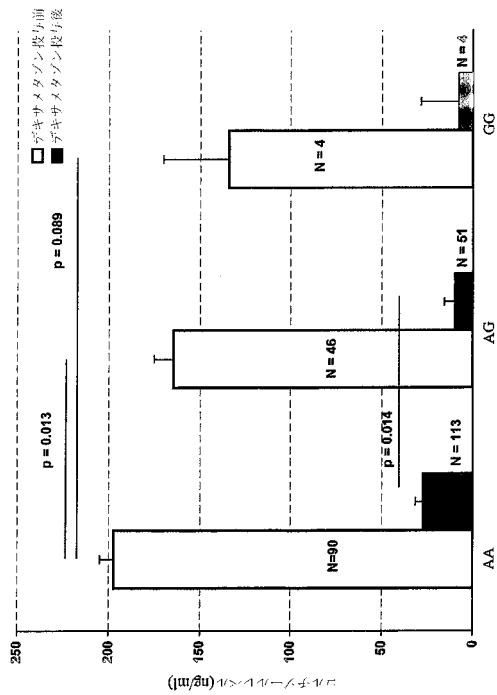
【 図 1 D 】



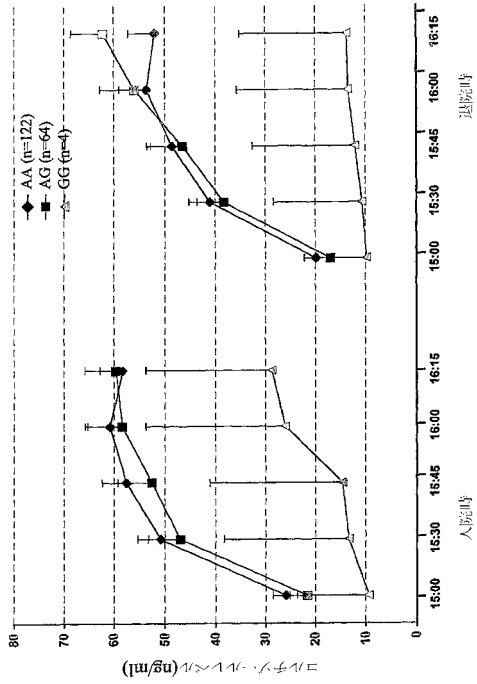
【 図 1 E 】



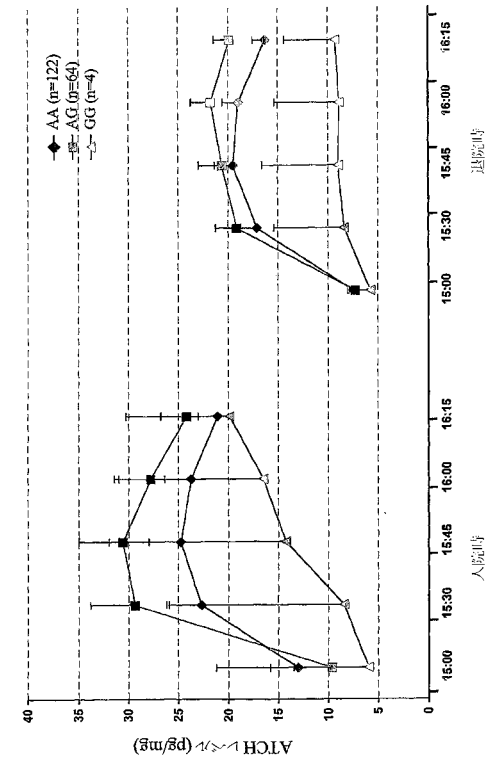
【 図 1 F 】



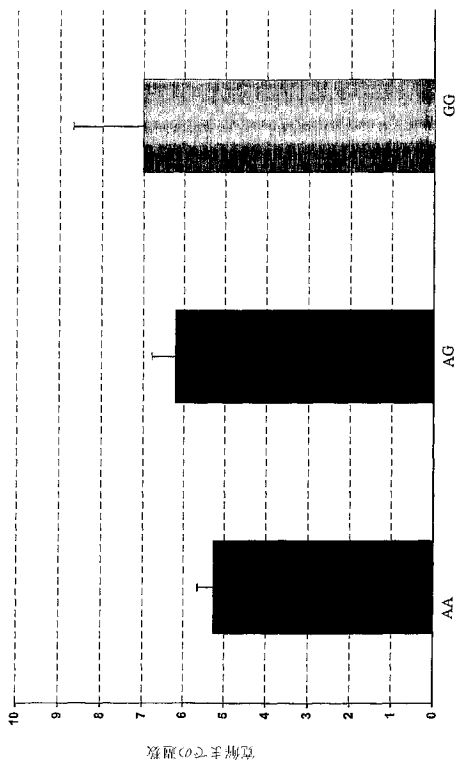
【 図 1 G 】



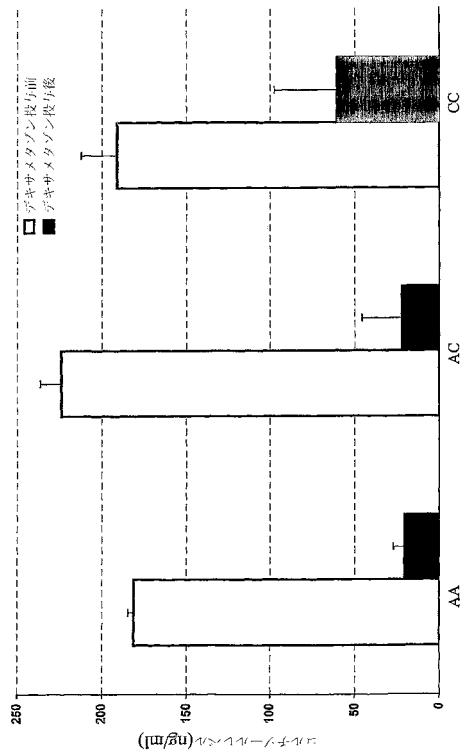
【 図 1 H 】



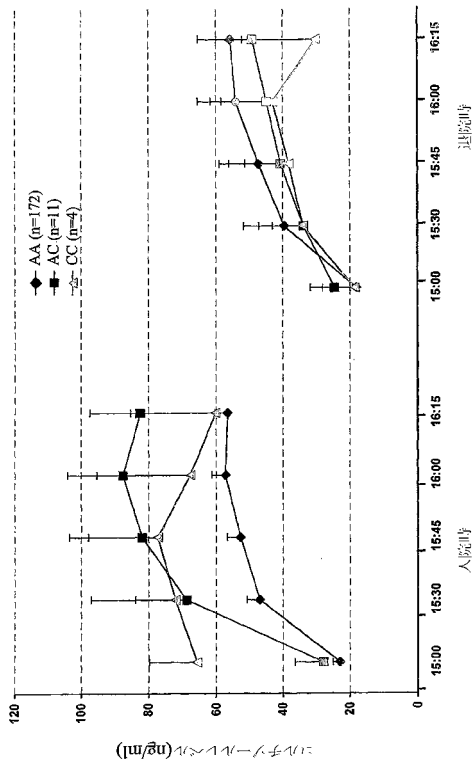
【 図 1 I 】



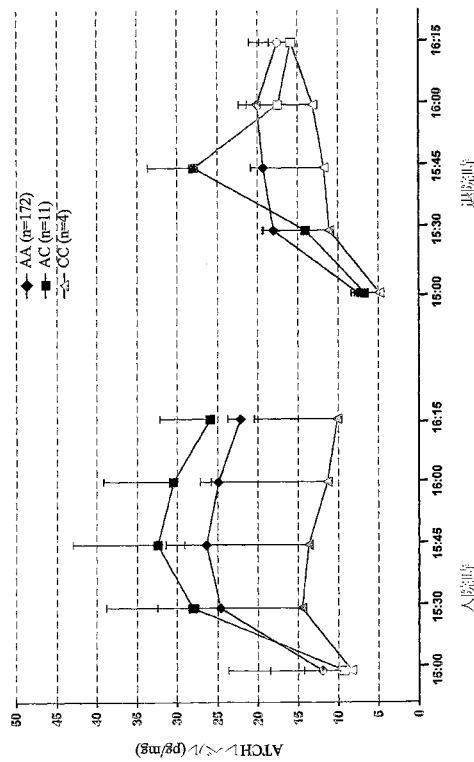
【 図 1 J 】



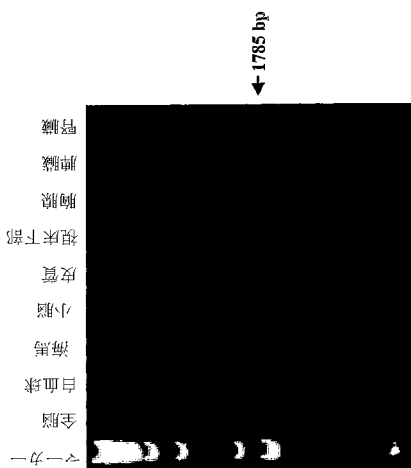
【 図 1 K 】



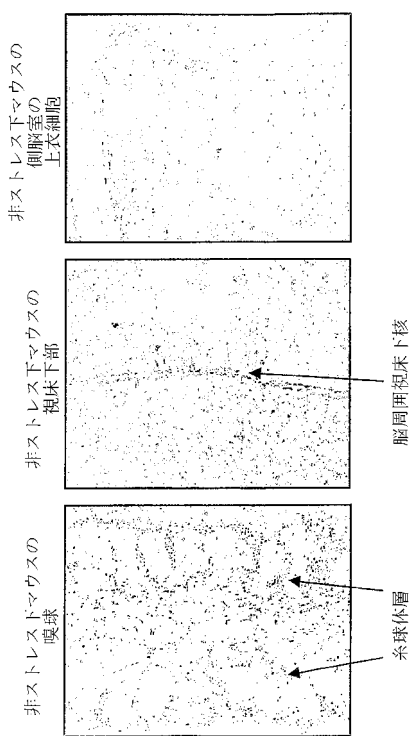
【 図 1 L 】



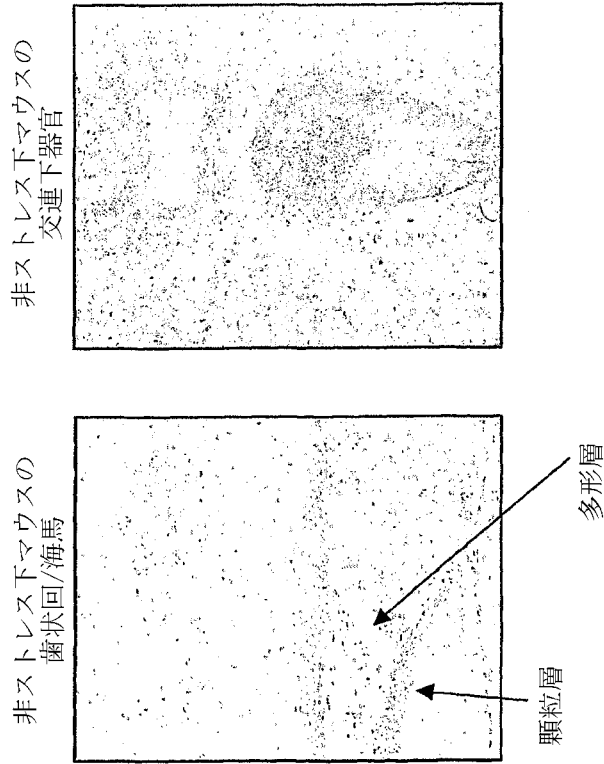
【 図 2 】



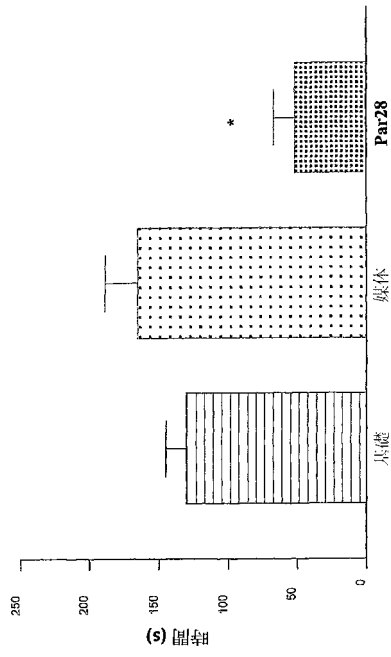
【 図 3 】



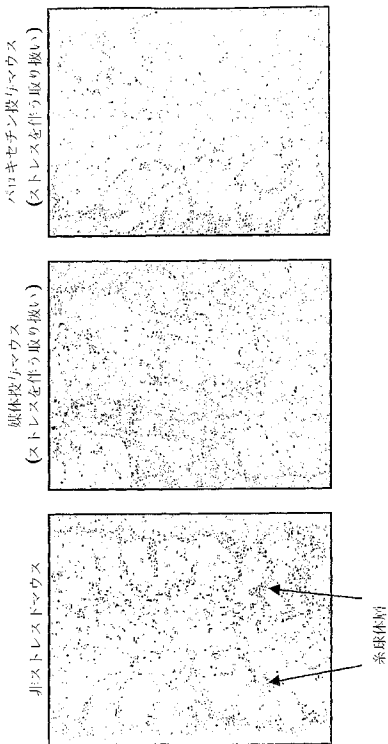
【 図 4 】



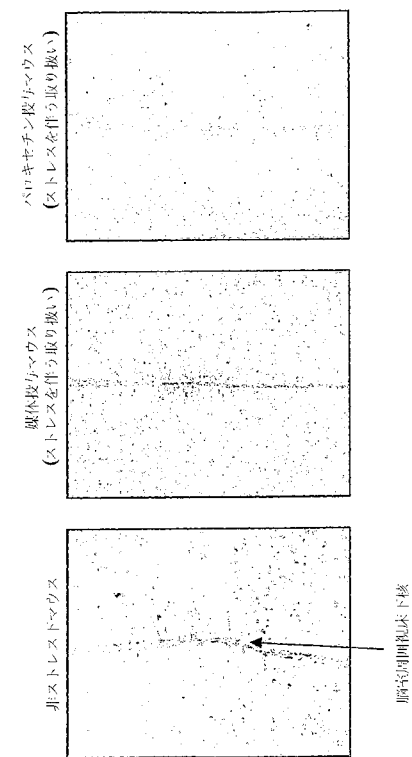
【 図 5 】



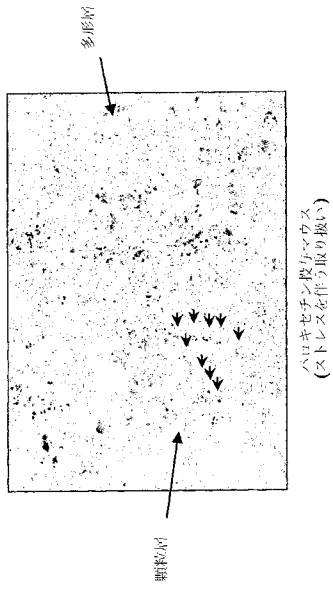
【 図 6 】



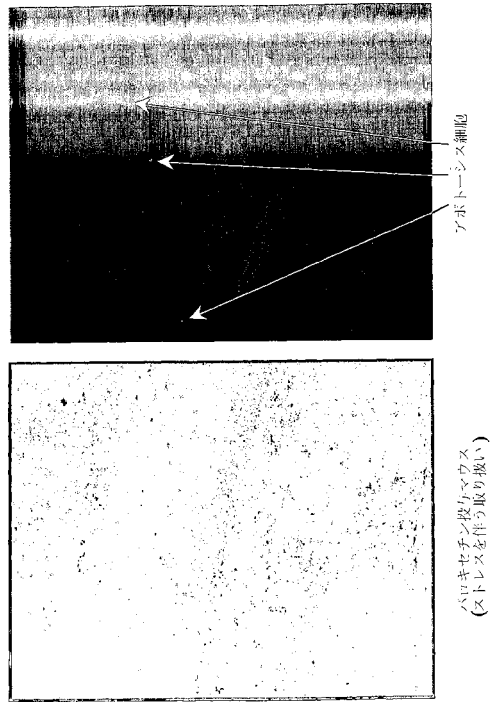
【 図 7 】



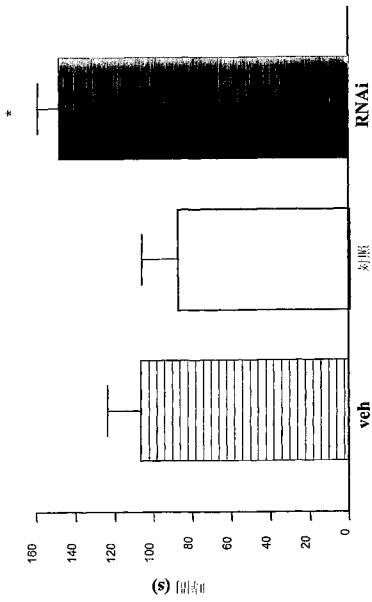
【 図 1 2 】



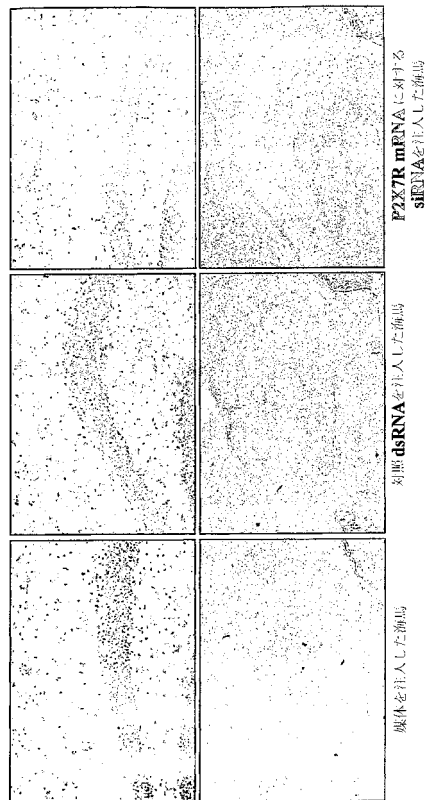
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 1 6 A 】

P2X7v01 MFACCCSDVTFQYETNKVTRIQSMNYGTTIKWFFHVIIFSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v04 MFPVD-----APPCLPFS--FALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v02 MFACCCSDVTFQYETNKVTRIQSMNYGTTIKWFFHVIIFSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
P2X7v03 MFACCCSDVTFQYETNKVTRIQSMNYGTTIKWFFHVIIFSYVCFALVSDKLYQRKEPVISS
1.....10.....20.....30.....40.....50

P2X7v01 VHTKVKGLAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCP
P2X7v04 VHTKVKGLAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCP
P2X7v02 VHTKVKGLAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCP
P2X7v03 VHTKVKGLAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQGNSEFFVMTNFKTEGQEQRLCP
61.....70.....80.....90.....100.....110

【 1 6 B 】

P2X7v01 EYPTRRTLCSSDRGCKGMDPQSKGIQTRGVHVEGNQKTCVSAWCPLEAVEEAPRA
P2X7v04 EYPTRRTLCSSDRGCKGMDPQSKGIQTRGVHVEGNQKTCVSAWCPLEAVEEAPRA
P2X7v02 EYPTRRTLCSSDRGCKGMDPQSKGLLS-----
P2X7v03 EYPTRRTLCSSDRGCKGMDPQSKGIQTRGVHVEGNQKTCVSAWCPLEAVEEAPRA
121.....130.....140.....150.....160.....170

P2X7v01 LLNSAENFTVLLKNNIDFPGHNYTTRNIIPLGLNITCTFHKTONPQCFIFRLGDIFFRETGD
P2X7v04 LLNSAENFTVLLKNNIDFPGHNYTTRNIIPLGLNITCTFHKTONPQCFIFRLGDIFFRETGD
P2X7v02 -----
P2X7v03 LLNSAENFTVLLKNNIDFPGHNYTTRNIIPLGLNITCTFHKTONPQCFIFRLGDIFFRETGD
181.....190.....200.....210.....220.....230

【 1 6 C 】

P2X7v01 NFSVVAIQGGIMGLEIYWDNCNLDREWFHCHHPKYSFRLLDDKTNNVSLVPGVNRFRYAKYK
P2X7v04 NFSVVAIQGGIMGLEIYWDNCNLDREWFHCHHPKYSFRLLDDKTNNVSLVPGVNRFRYAKYK
P2X7v02 -----
P2X7v03 NFSVVAIQGGIMGLEIYWDNCNLDREWFHCHHPKYSFRLLDDKTNNVSLVPGVNRFRYAKYK
241.....250.....260.....270.....280.....290

P2X7v01 ENNVEKRTLKVFIREFDILVFTGGKFDIIQIVVYIGSTLSYFGLAAVFDLIDTYS
P2X7v04 ENNVEKRTLKVFIREFDILVFTGGKFDIIQIVVYIGSTLSYFGLAAVFDLIDTYS
P2X7v02 -----
P2X7v03 ENNVEKRTLKVFIREFDILVFTGGKFDIIQIVVYIGSTLSYFGLVDRDSELFHALGKWFPG
301.....310.....320.....330.....340.....350

【 1 6 D 】

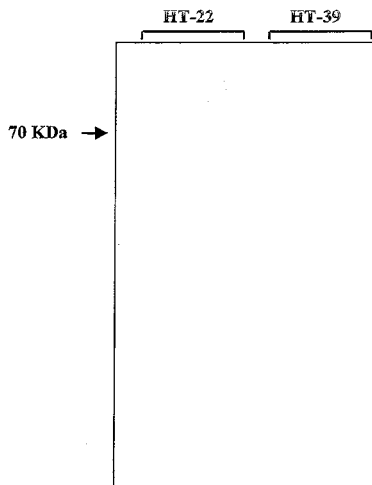
P2X7v01 NCCRSHIYPWCKCCQPCVNVNEYRKKCESIVEPKTKYVSFVDSHIRMVWQQLLGRS
P2X7v04 NCCRSHIYPWCKCCQPCVNVNEYRKKCESIVEPKTKYVSFVDSHIRMVWQQLLGRS
P2X7v02 -----
P2X7v03 EGS-----
361.....370.....380.....390.....400.....410

P2X7v01 LQDVKGQEVPRPAMDFTDLSRLPLALHDTPPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v04 LQDVKGQEVPRPAMDFTDLSRLPLALHDTPPIPGQPEEIQLLRKEATPRSRDSPVWCQCG
P2X7v02 -----
P2X7v03 -----
421.....430.....440.....450.....460.....470

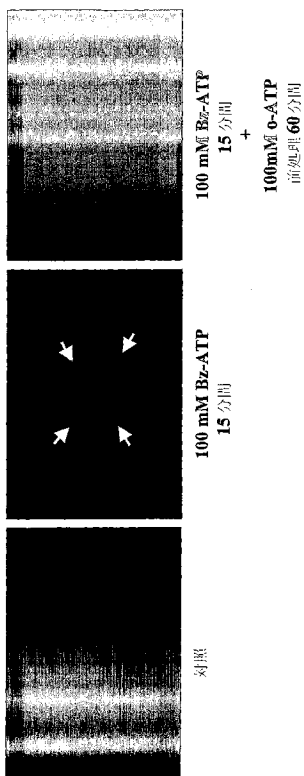
【 図 1 6 E 】

P2X7v01 SCLPSQLPESHRCLEELCCCKKPKGACITWSELFRKLVLSRHVIQFLLLYQEPFLIALDVIDS
 P2X7v04 SCLPSQLPESHRCLEELCCCKKPKGACITWSELFRKLVLSRHVIQFLLLYQEPFLIALDVIDS
 P2X7v02 -----
 P2X7v03 -----
 481.....490.....500.....510.....520.....530
 P2X7v01 TNSRLRHCAVECYATWFGSSQDMADFAILPSCCRWRIRKRFKSEGGQYSGFKSPY
 P2X7v04 TNSRLRHCAVECYATWFGSSQDMADFAILPSCCRWRIRKRFKSEGGQYSGFKSPY
 P2X7v02 -----
 P2X7v03 -----
 541.....550.....560.....570.....580.....590

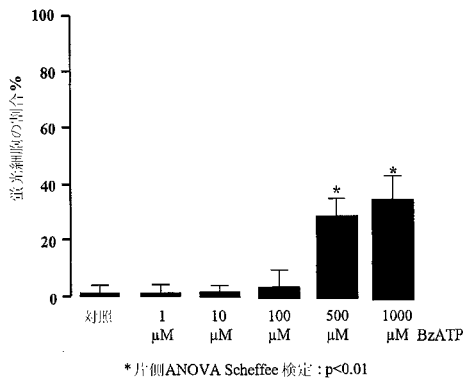
【 図 1 7 】



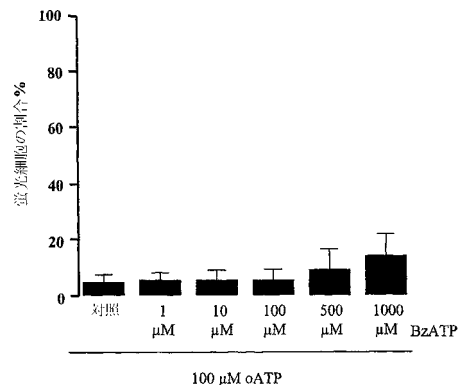
【 図 1 8 】



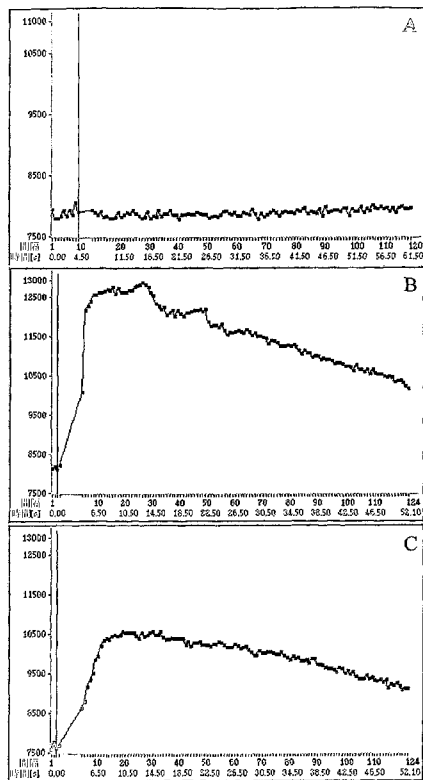
【 図 1 9 A 】



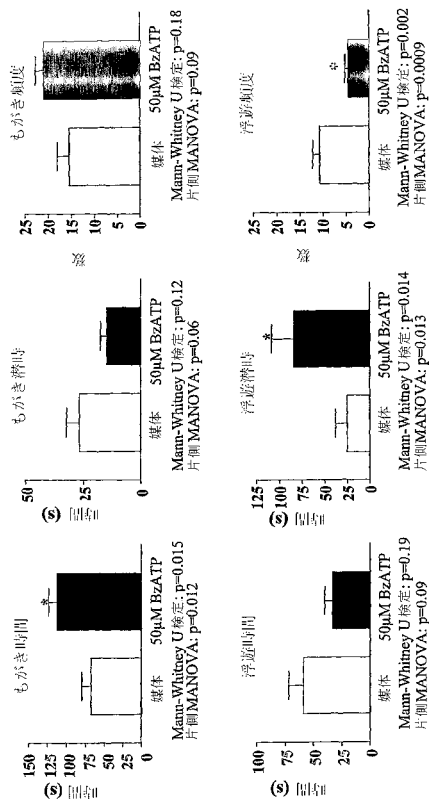
【 図 1 9 B 】



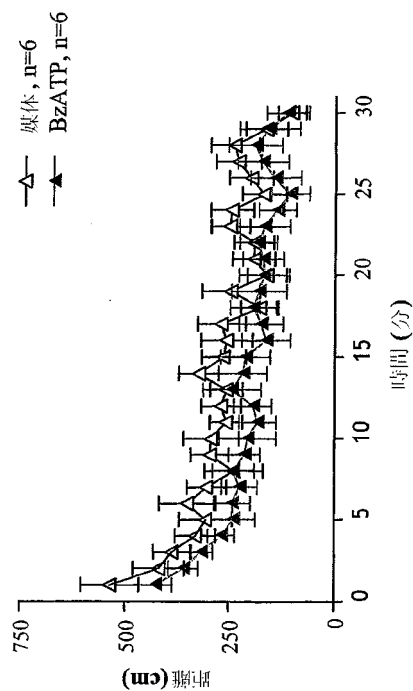
【 図 19 C 】



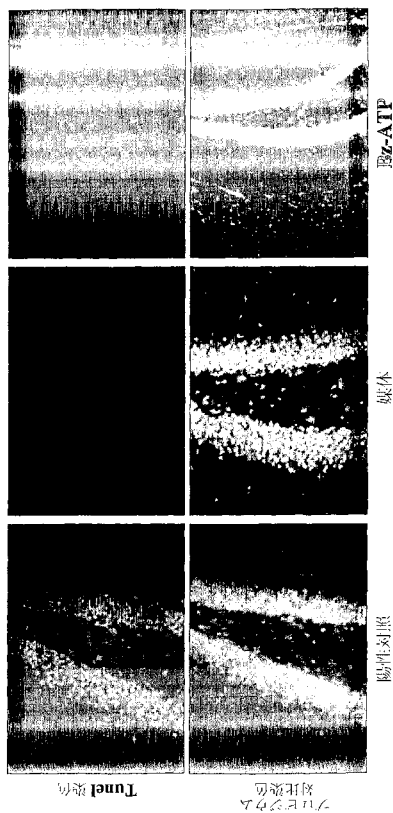
【 図 20 】



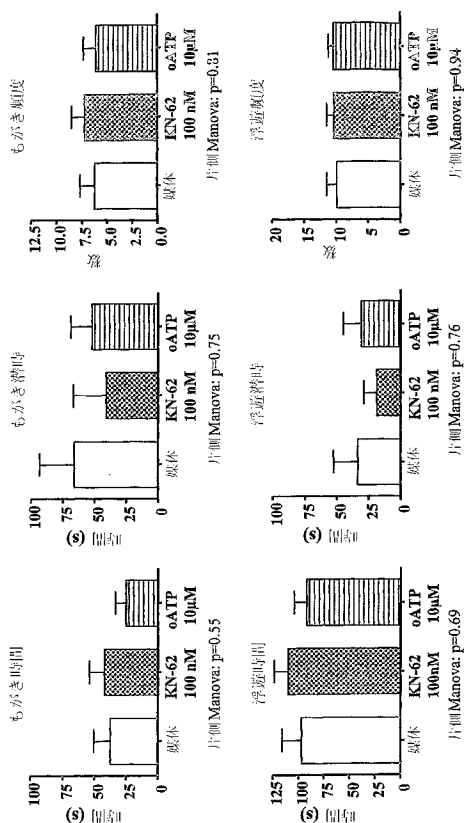
【 図 21 】



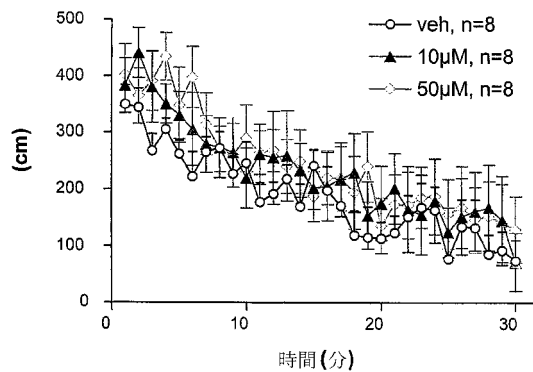
【 図 22 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 配 列 表 】

2010011855000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 21 年 9 月 25 日 (2009.9.25)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

情 動 障 害 を 治 療 す る た め の 薬 学 的 組 成 物 の 調 製 の た め の、P2X7R 作 動 薬 の 使 用 法。

【 請 求 項 2 】

作 動 薬 が、ATP、ATP-4 お よ び BzATP (2'-3'-O-(4-ベンゾイルベンゾイル)アデノシン5'-三リン酸 (C₂₄H₂₄N₅O₁₅P₃)) から なる 群 より 選 択 さ れ る、請 求 項 1 記 載 の 使 用 法。

【 請 求 項 3 】

情 動 障 害 を 治 療 す る た め の 薬 学 的 組 成 物 の 調 製 の た め の、テニダップ (tenidap) (C₁₅H₁₁ClN₂O₂S) また は そ の 誘 導 体 また は 3-置換-2-オキシインドール-1-カルボキサミド の 使 用 法。

【 請 求 項 4 】

薬 学 的 組 成 物 が 任 意 に、-アドレナリン受容体調節因子 を さ ら に 含 む、請 求 項 1 ~ 3 の い ず れ か 一 項 記 載 の 使 用 法。

【 請 求 項 5 】

-アドレナリン受容体調節因子が、DL-プロプラノロール (propranolol)、D-プロプラノロール お よ び ラベタロール (labetolol) から なる 群 より 選 択 さ れ る -アドレナリン受容

体拮抗薬である、請求項 4記載の使用法。

【請求項 6】

情動障害が、大うつ病、全般性不安障害および双極性障害からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5のいずれか一項記載の使用法。

【請求項 7】

大うつ病が、大うつ病、気分変調、非定型的うつ病、月経前不快気分障害および季節性情動障害からなる群より選択される、請求項 6記載の使用法。

【請求項 8】

全般性不安障害が、パニック障害、恐怖症、広場恐怖症、対人恐怖症、特定の恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、分離不安障害、躁病、軽躁病および気分循環性障害からなる群より選択される、請求項 6記載の使用法。

【請求項 9】

双極性障害が双極性障害I型または双極性障害II型である、請求項 6記載の使用法。

专利名称(译)	用于诊断和治疗情感障碍的手段和方法		
公开(公告)号	JP2010011855A	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2009196458	申请日	2009-08-27
申请(专利权)人(译)	Afekutisu制药公司		
[标]发明人	バーデンニコラス シラバーインゲ パエスペレーダマルセロ		
发明人	バーデン ニコラス シラバー インゲ パエス-ペレーダ マルセロ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K31/7076 A61K31/404 A61K45/00 A61K31/138 A61K31/166 A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61K35/12 A61K35/56 A61K35/66 A61K39/395 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/22 A61P5/24 A61P15/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/53 C12P21/08 A61K31/40 C07H21/04 C12N15/12 G01N33/68		
CPC分类号	A61K31/40 A61K31/7088 A61P5/24 A61P15/00 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P43 /00 C07K14/705 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/6872 G01N33/6896 G01N2800/304		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 A61K31/7076 A61K31/404 A61K45/00 A61K31/138 A61K31/166 A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61K35/12 A61K35/56 A61K35/66 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P25/18 A61P25/24 A61P25/22 A61P5/24 A61P15/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68.Z G01N33/53.D C12P21/08 A61K35/60 A61K35/64 A61K35/65 A61K35/74.A A61K36/06.Z A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5 /00.101 C12N5/12 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024 /EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064 /AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065 /CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/AA22 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /CA18 4C084/DC50 4C084/MA01 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA05 4C084/ZA12 4C084/ZA18 4C084/ZA81 4C084/ZC11 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC13 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/GA04 4C086/GA07 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086/MA04 4C086/MA10 4C086/NA14 4C086/ZA05 4C086 /ZA12 4C086/ZA18 4C086/ZA81 4C086/ZC11 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB28 4C087/BB33 4C087/BC30 4C087/BC83 4C087/CA03 4C087/CA08 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/MA02 4C087 /NA14 4C087/ZA05 4C087/ZA12 4C087/ZA18 4C087/ZA81 4C087/ZC11 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/AA03 4C206/FA19 4C206/GA07 4C206/GA22 4C206/KA01 4C206/KA04 4C206/MA01 4C206 /MA02 4C206/MA03 4C206/MA04 4C206/MA14 4C206/MA28 4C206/NA14 4C206/ZA05 4C206/ZA12 4C206/ZA18 4C206/ZA81 4C206/ZC11 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2003008753 2003-04-17 EP 2003019626 2003-09-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于诊断和治疗情感障碍的药物和方法。解决方案：5'UTR区域或3'UTR区域发生突变，外显子3、5、6、8或13或内含子1、3、4、5、6、7、9、11或12或外显子发生突变 编码ATP敏感离子通道P2X7R（优选为基因组序列）的核酸分子，其在13位缺失。核酸分子编码的多肽，包含该核酸分子的载体和宿主细胞，以及产生该核酸分子编码的多肽的方法。同样，特异性靶向由核酸分子编码的多肽的抗体，和特异性结合核酸分子的适体。此外，用于鉴定和表征能够与多肽特异性相互作用的化合物的方法，以及用于制备药物组合物方法。[选择图]无

エクソン	アミノ酸残基	野生型における位置
エクソン3	R (Arg)	117
エクソン5	G (Gly)	150
エクソン6	E (Glu)	186
エクソン6	L (Leu)	191
エクソン8	R (Arg)	270
エクソン13	I (Ile)	568
エクソン13	R (Arg)	578