

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年7月20日 (20.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/075626 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学
研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/300224

(22) 国際出願日: 2006年1月11日 (11.01.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-004297 2005年1月11日 (11.01.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 祐輔 (NAKA-MURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EXAMINING INFLAMMATORY DISEASE AND METHOD OF SCREENING REMEDY FOR INFLAMMATORY DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性疾患の検査法および炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法

(57) Abstract: A gene polymorphism on a Toll-like receptor gene is analyzed and an inflammatory disease is examined based on the results of the analysis. A remedy for an inflammatory disease is screened by selecting a substance capable of altering the interaction between Toll-like receptor and galectin-2.

(57) 要約: トルライクレセプター遺伝子上に存在する遺伝子多型を分析し、該分析結果に基づいて炎症性疾患を検査する。また、トルライクレセプターとガレクチン-2の相互作用を変化させる物質を選択することにより炎症性疾患の治療薬のスクリーニングを行う。

WO 2006/075626 A1

明 細 書

炎症性疾患の検査法および炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法 技術分野

[0001] 本発明は心筋梗塞などの炎症性疾患の検査方法及び炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、ライフスタイルの変化に伴って、炎症性疾患、特に心筋梗塞などの冠動脈疾患の死亡リスクが増加している(非特許文献1又は2参照)。したがって、これらの疾患について早期に発症リスクを判定する方法の開発が望まれている。

[0003] 心筋梗塞などの冠動脈疾患は遺伝的素因によって発症する可能性が提唱され、遺伝子変異の有無によって、心筋梗塞を判定する方法がいくつか知られている。例えば、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の発症リスクを判定する方法が知られている(特許文献1参照)。しかしながら、より正確に判定するためには、さらなる判定法の開発が求められていた。

[0004] トルライクレセプター(Toll-like receptor)は、昆虫の受容体であるTollのホモログとして単離された、免疫応答などに関与する一回膜貫通型受容体である(非特許文献3参照)。トルライクレセプターをコードする遺伝子のいくつかの部位における多型が喘息に関連することが知られていた(非特許文献4参照)。しかしながら、トルライクレセプター遺伝子の多型と心筋梗塞等の炎症性疾患との関連については知られていなかった。

[0005] ガレクチン(galectin)はガラクトースに結合性を示すタンパク質であるが、哺乳類では現在、10種類のガレクチンが知られている。その中で、ガレクチン-2は14kDaのサブユニットからなる非共有結合性のホモダイマーを形成し、還元剤非存在下では自己凝集し活性を失うことが知られている。また、ガレクチン-2の発現は正常成人組織中では下部小腸を主とした上皮細胞に多く認められることが知られているが、その詳細な生理機能については知られていなかった(非特許文献5参照)。

特許文献1:特開2002-136291号公報

非特許文献1:Nature Medicine, 1997, vol.3, p600-601

非特許文献2:New England Journal of Medicine, 1997, vol.337, p1360-1369

非特許文献3:J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 40, 38105-38108, 2003

非特許文献4:Genes Immun. 2004 Aug;5(5):343-6

非特許文献5:Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1997, vol.9, No.45, p87-93

発明の開示

[0006] 本発明は、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症リスクや発症の有無を正確に検査する方法を提供することを課題とする。本発明はまた、心筋梗塞等の炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた。その結果、トルライクレセプター遺伝子の一塩基多型が心筋梗塞に関連することを見出した。さらに、トルライクレセプターがガレクチン-2と特異的な相互作用を示すことから、両者の相互作用を変化させる物質をスクリーニングすることで心筋梗塞等の炎症性疾患の治療薬が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1)トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、該分析結果に基づいて炎症性疾患を検査する方法。

(2)前記多型が一塩基多型である、(1)の方法。

(3)トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター1遺伝子であり、該トルライクレセプター1遺伝子上に存在する一塩基多型が配列番号1の201番目の塩基に相当する塩基または配列番号2の197番目の塩基に相当する塩基の多型である、(2)の方法。

(4)トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター4遺伝子であり、該トルライクレセプター4遺伝子上に存在する一塩基多型が配列番号3の202番目の塩基に相当する塩基の多型である、(2)の方法。

(5)トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター1遺伝子であり、該トルライクレセプター1遺伝子の多型が、配列番号1の201番目の塩基または配列番号2の197

番目の塩基の一塩基多型と連鎖不平衡にある多型である、(1)の方法。

(6)トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター4遺伝子であり、該トルライクレセプター4遺伝子の多型が、配列番号3の202番目の塩基の一塩基多型と連鎖不平衡にある多型である、(1)の方法。

(7)炎症性疾患が心筋梗塞である(1)～(6)のいずれかの方法。

(8)配列番号1の塩基配列において201番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。

(9)配列番号1の塩基配列において201番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。

(10)配列番号2の塩基配列において197番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。

(11)配列番号2の塩基配列において197番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。

(12)配列番号3の塩基配列において202番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。

(13)配列番号3の塩基配列において202番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。

(14)トルライクレセプターおよびガレクチン-2を含むスクリーニング系に医薬候補物質を添加する工程、トルライクレセプターとガレクチン-2との相互作用を測定する工程、及び前記相互作用を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法。

(15)トルライクレセプターがトルライクレセプター1またはトルライクレセプター2である(14)のスクリーニング方法。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]免疫沈降によるTLRとガレクチン2の相互作用解析の結果を示す図。IPは免疫沈降を、WBはウエスタンブロットを意味する。

[図2]免疫沈降によるTLR2の細胞内領域とガレクチン2の相互作用解析の結果を示す図。IPは免疫沈降を、WBはウエスタンブロットを意味する。

発明を実施するための最良の形態

[0010] <1>本発明の検査方法

本発明の検査方法は、トルライクレセプター (TLR) 遺伝子の炎症性疾患に関連する遺伝子多型を分析し、該分析に基づいて炎症性疾患を検査する方法である。炎症性疾患としては、炎症との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定されないが、例えば、慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー疾患、細菌性ショック、または心筋梗塞や脳卒中などの冠動脈疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。なお、本発明において、「検査」とは炎症性疾患の発症リスクの検査や発症の有無の検査を含む。

[0011] トルライクレセプター遺伝子としては、トルライクレセプター1 (TLR1) 遺伝子又はトルライクレセプター4 (TLR4) 遺伝子が好ましい。TLR1遺伝子としては、ヒトTLR1遺伝子が好ましく、例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースにアクセス番号U88540で登録された配列を有する遺伝子を挙げることができる。TLR4遺伝子としては、ヒトTLR4遺伝子が好ましく、例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースにアクセス番号AF172169で登録された配列を有する遺伝子を挙げることができる。なお、これらの遺伝子是人種の違いなどによって炎症性疾患に関連する塩基以外の塩基において置換や欠失等が存在する可能性があるため、上記配列の遺伝子に限定されない。

なお、トルライクレセプター遺伝子の配列はセンス鎖を解析してもよいし、アンチセンス鎖を解析してもよい。

[0012] 遺伝子多型の種類は炎症性疾患に関連するものである限り特に制限されず、一塩基多型 (SNPs)、及びVNTR (Variable Number of Tandem Repeat) などを含む。

炎症性疾患に関連するTLR1遺伝子の一塩基多型は特に制限されないが、好ましくは1805番目 (配列番号1の201番目) の塩基または130番目 (配列番号2の塩基配列の197番目) の多型が挙げられる。なお、1805番目、130番目とは翻訳開始点から数えた番号である。

1805番目の塩基を含む配列としては、例えば、配列番号1の配列が挙げられる。

該1805番目の塩基は、この配列の201番目の塩基に相当する。ヒト染色体上のTLR1遺伝子においては、この塩基がT(チミン)又はG(グアニン)となる多型が存在する。

130番目の塩基を含む配列としては、例えば、配列番号2の配列が挙げられる。該130番目の塩基は、この配列の197番目に相当する。ヒト染色体上のTLR1遺伝子においては、この塩基がT(チミン)又はC(シトシン)となる多型が存在する。

なお、「相当する」とは、ヒトTLR1遺伝子上の上記配列を有する領域中の該当塩基を意味し、仮に、人種の違いなどによって上記配列がSNP以外の位置で若干変化したとしても、その中の該当塩基を解析することも含む。

- [0013] 炎症性疾患に関連するTLR4遺伝子の一塩基多型は特に制限されないが、好ましくは-1440番目(配列番号3の202番目)の塩基の多型が挙げられる。なお、-1440番目とはDunnen J. T. and Antonarakis S. E. Hum. Mutation 15, 7-12, 2000に基づく番号である。-1440番目の塩基を含む配列としては、例えば、配列番号3の配列が挙げられる。該-1440番目の塩基は、この配列の202番目の塩基に相当する。ヒト染色体上のTLR4遺伝子においては、この塩基がT(チミン)又はC(シトシン)となる多型が存在する。

なお、「相当する」とは、ヒトTLR4遺伝子上の上記配列を有する領域中の該当塩基を意味し、仮に、人種の違いなどによって上記配列がSNP以外の位置で若干変化したとしても、その中の該当塩基を解析することも含む。

上記の塩基の多型を単独または組み合わせて解析することにより、炎症性疾患を検査することができる。また、これらの一塩基多型と連鎖不平衡にある多型に基づいて検査を行ってもよい。連鎖不平衡にある多型としては、他の塩基の一塩基多型やVNTRなどが挙げられる。

- [0014] TLR遺伝子の遺伝子多型の解析に用いる試料としては、染色体DNAを含む試料であれば特に制限されないが、例えば、血液、尿等の体液サンプル、粘膜細胞などの細胞、毛髪等の体毛などが挙げられる。遺伝子多型の解析にはこれらの試料を直接使用することもできるが、これらの試料から染色体DNAを常法により単離し、これを用いて解析することが好ましい。

- [0015] TLR遺伝子の遺伝子多型の解析は、通常の遺伝子多型解析方法によって行うこと

ができる。例えば、シーケンス解析、PCR、ハイブリダイゼーションなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0016] シーケンスは通常の方法により行うことができる。具体的には、多型を示す塩基の5'側 数十塩基の位置に設定したプライマーを使用してシーケンス反応を行い、その解析結果から、該当する位置がどの種類の塩基であるかを決定することができる。なお、シーケンスを行う場合、あらかじめ多型を含む断片をPCRなどによって増幅しておくことが好ましい。

[0017] また、PCRによる増幅の有無を調べることによって解析することができる。例えば、多型を示す塩基を含む領域に対応する配列を有し、かつ、各多型に対応するプライマーをそれぞれ用意する。それぞれのプライマーを使用してPCRを行い、増幅産物の有無によってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

また、LAMP法(特許第3313358号明細書)、NASBA法(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification; 特許2843586号明細書)、ICAN法(特開2002-233379号公報)などによって増幅の有無を調べることもできる。その他、単鎖増幅法を用いてもよい。

[0018] また、多型を含むDNA断片を増幅し、増幅産物の電気泳動における移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することもできる。このような方法としては、例えば、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism)法(Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.)が挙げられる。具体的には、まず、TLR遺伝子の多型部位を含むDNAを増幅し、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離し、分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

[0019] さらに、多型を示す塩基が制限酵素認識配列に含まれる場合は、制限酵素による切断の有無によって解析することもできる(RFLP法)。この場合、まず、DNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片を分離し、検出されたDNA断片の大きさによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。TLR1遺伝子の1805番目の塩基の多型については、この多型がGの場合PstI切断部位が生じるため、PstIによる切断の有無によって検出することができる。

[0020] 次に、上記のような方法によって解析した多型に基いて、炎症性疾患について検査を行う。

例えば、TLR1遺伝子の1805位の塩基の多型に基いて判定する場合は、該塩基がGの場合、炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。また、対立遺伝子の多型を含めて考慮してもよく、例えば、遺伝子型がGGまたはTGアレルの場合に、TTアレルと比べて炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。

TLR1遺伝子の130位の塩基の多型に基いて判定する場合は、該塩基がCの場合、炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。また、対立遺伝子の多型を含めて考慮してもよく、例えば、遺伝子型がCCまたはTCアレルの場合に、TTアレルと比べて炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。

TLR4遺伝子の-1440位の塩基の多型に基いて判定する場合は、該塩基がCの場合、炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。また、対立遺伝子の多型を含めて考慮してもよく、例えば、遺伝子型がCCアレルの場合に、TCまたはTTアレルと比べて炎症性疾患の発症リスクが高い、炎症性疾患に罹患している可能性が高いなどと判定することができる。

[0021] 本発明の判定法においては、TLR遺伝子の多型に加え、他の遺伝子の多型を解析し、それらの遺伝子の多型の組合わせに基いて炎症性疾患の判定を行ってもよい。他の遺伝子としては、ガレクチン-2遺伝子が挙げられる。ガレクチン-2遺伝子の配列としては、NCBIにNT_011520に登録されている配列を挙げることができ、ガレクチン-2遺伝子の多型としては、イントロン1の3279番目の塩基の多型を挙げることもできる。この塩基は、配列番号20の377番目の塩基に相当する。ヒトガレクチン-2遺伝子では該塩基がA/Tとなる多型が存在する。そして、この位置の遺伝子型がAAの場合に比べて、TTの場合に炎症性疾患のリスクが高い(Nature. 2004 May 6;429(6987):72-5.)。

さらに、本発明の検査方法においては心筋梗塞との関連が知られているリンホトキ

シン α 遺伝子の多型 (Nat Genet. 2002 Dec;32 (4):650-4. 2002;WO2004/015100)を組合わせて検査することもできる。

[0022] <2>本発明の検査用試薬

本発明はまた、炎症性疾患を検査するためのプライマーやプローブなどの検査試薬を提供する。このようなプローブとしては、配列番号1の塩基配列において201番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有するプローブ、配列番号2の塩基配列において197番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有するプローブ、配列番号3の塩基配列において202番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有するプローブが挙げられる。

また、プライマーとしては、配列番号1の塩基配列の201番目の塩基の多型を判別することのできるプライマー、例えば、配列番号1の塩基配列の201番目の塩基を含む配列を有する領域を増幅することのできるプライマー；配列番号2の塩基配列の197番目の塩基の多型を判別することのできるプライマー、例えば、配列番号2の塩基配列の197番目の塩基を含む配列を有する領域を増幅することのできるプライマー；配列番号3の塩基配列の202番目の塩基の多型を判別することのできるプライマー、例えば、配列番号3の塩基配列の202番目の塩基を含む配列を有する領域を増幅することのできるプライマーが挙げられる。これらのプライマーは多型を含む領域（好ましくは50～1000塩基の長さの領域）の両端に設定されたフォワードプライマーとリバースプライマーのプライマーセットであってもよい。また、シーケンス解析や単鎖増幅に用いる場合、上記塩基の5'側領域、好ましくは30～100塩基上流の配列を有するプライマーや、上記塩基の3'側領域、好ましくは30～100塩基下流の領域に相補的な配列を有するプライマーが例示される。PCRによる増幅の有無で多型を判定するために用いるプライマーとしては、上記塩基を含む配列を有し、上記塩基を3'側に含むプライマーや、上記塩基を含む配列の相補配列を有し、上記塩基の相補塩基を3'側に含むプライマーなどが例示される。

このようなプライマーやプローブの長さは特に制限されないが、例えば、10～100塩基のオリゴヌクレオチドが好ましく、15～50塩基のオリゴヌクレオチドがより好ましい。なお、本発明の検査用試薬はこれらのプライマーやプローブに加えて、PCR用の

ポリメラーゼやバッファーを含むものであってもよい。

- [0023] また、本発明の検査用試薬は、さらにガレクチン-2遺伝子の多型を解析するためのプライマーやプローブをさらに含むものであってもよい。このようなプローブとしては、配列番号20の塩基配列の377番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有するプローブが挙げられ、プライマーとしては、配列番号20の塩基配列の377番目の塩基を含む配列を有するDNAを増幅することのできるプライマーが挙げられる。

[0024] <3>スクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法は、トルライクレセプター (TLR) およびガレクチン-2を含むスクリーニング系に医薬候補物質を添加する工程、TLRとガレクチン-2との相互作用を測定する工程、及び前記相互作用を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法である。

- [0025] TLR及びガレクチン-2 (Nature. 2004 May 6;429(6987):72-5.) は、いずれもその遺伝子上の多型が心筋梗塞などの炎症性疾患に関連を示し、かつ、これらのタンパク質は生体内で特異的に相互作用しているため、これらの相互作用を変化させる物質は炎症性疾患に対する医薬の候補物質になりうる。TLRタンパク質としては、TLR1またはTLR2が好ましい。

- [0026] 医薬候補物質としては特に制限はなく、例えば、低分子合成化合物であってもよいし、天然物に含まれる化合物であってもよい。また、ペプチドであってもよい。スクリーニングには個々の被検物質を用いてもよいが、これらの物質を含む化合物ライブラリーを用いてもよい。候補物質の中からTLRとガレクチン-2の相互作用を変化させるものを選択することにより、炎症性疾患の治療薬を得ることができる。ここで、「変化」とは相互作用を阻害すること、および相互作用を強化することを含む。

- [0027] TLRおよびガレクチン-2を含むスクリーニング系とは、これらの両タンパク質を含むスクリーニング系を意味し、インビトロの系であってもよいし、細胞系であってもよい。上記スクリーニング系はこれらのタンパク質が直接添加される系であってもよいし、遺伝子から転写されたmRNAが翻訳されることによりこれらのタンパク質が含まれるようになった系であってもよい。

- [0028] インビトロのスクリーニング系として具体的には、以下に示すような、TLRタンパク質

およびガレクチン-2タンパク質を用いたプルダウンアッセイや表面プラズモン共鳴現象を利用した検出法などが挙げられる。

[0029] インビトロのスクリーニング系に用いられるTLRタンパク質およびガレクチン-2タンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来の蛋白質であってもよい。さらに、化学合成したものであってもよい。タンパク質の由来に制限はなく、ヒトおよび他の動物を含む真核生物由来の蛋白質を用いることができるが、好ましくは、ヒト由来のタンパク質が用いられる。ヒト由来のTLR1タンパク質としては、配列番号13のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。ヒト由来のTLR2タンパク質としては、配列番号15のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。また、ガレクチン-2との結合性を保持する限りにおいて、配列番号13または15のアミノ酸配列において一または数個のアミノ酸が置換・欠失・付加された配列を有するものであってもよい。

一方、ヒト由来のガレクチン-2タンパク質としては、配列番号17のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。また、TLR2との結合性を保持する限りにおいて、配列番号17のアミノ酸配列において位置または数個のアミノ酸が置換・欠失・付加された配列を有するものであってもよい。なお、上記数個とは、好ましくは2～50個、より好ましくは2～20個、特に好ましくは2～10個である。

[0030] また、タンパク質は結合部位を含む部分ペプチドを使用してもよい。TLRは分子量が大きく発現が必ずしも容易でないため、ガレクチン-2との結合に関与する細胞内ドメインを用いてもよい。または他のペプチドとの融合タンパク質を用いてもよい。融合させるペプチドとしては、例えば、プルダウンアッセイや精製に使用できるGST、Hisタグ、Sタグなどのペプチドタグが挙げられる。

[0031] 組換えによりタンパク質を得るためには、例えば、配列番号12(TLR1)、配列番号14(TLR2)や配列番号16(ガレクチン-2)の塩基配列を有するDNAを大腸菌や動物細胞などに導入して組換えタンパク質を発現させ、該タンパク質を精製することによって得ることができる。なお、必ずしも精製されたタンパク質を用いる必要はなく、粗精製物や細胞抽出物を相互作用の検出に使用してもよい。上記DNAを大腸菌に導入するためのベクターとしてはpETベクター(Novagen社)やpGEXベクター(Amersham Pharmacia社)などが挙げられ、動物細胞に導入するためのベクターとしては、pcD

NAベクター (Invitrogen社)、pcDNA (Invitrogen)などが挙げられる。

[0032] インビトロの系として、プルダウンアッセイを行う場合は、TLRとガレクチン-2タンパク質とをインビトロでインキュベートし、一方のタンパク質に対する抗体、またはこのタンパク質が融合タンパク質の場合、融合するペプチドタグに対する抗体やアフィニティカラム等で複合体を回収したのち、該タンパク質に結合する他方のタンパク質を検出することにより、両タンパク質の相互作用を評価することができる。この系に被検物質を添加し、相互作用に影響を与える物質を選択することによってスクリーニングを行うことができる。プルダウンアッセイにおいては、一方のタンパク質を放射性同位体やビオチン等の標識物質で標識し、それを利用して検出してもよい。

[0033] さらに、インビトロのスクリーニング系として、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用する系を挙げることでもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、タンパク質間の相互作用を微量の蛋白質試料を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である(例えばBIAcore、Pharmacia製)。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることによりTLRおよびガレクチン-2の結合を評価することが可能である。さらに、コンビナトリアルケミストリーを利用したハイスループットスクリーニング (Science 1996, 273 p458-64、Nature 1996, 384 p11-13)などにより本発明のスクリーニングを行うことも可能である。

さらに、その他のスクリーニング系として、蛍光によって検出する系を用いることもできる (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET))。

[0034] また、細胞系でスクリーニングを行うこともできる。例えば、免疫沈降を用いる方法を挙げることができる。すなわち、TLRとガレクチン-2とを発現する細胞を培養し、細胞を回収後、一方のタンパク質に対する抗体等で複合体を回収したのち、他方のタンパク質を、そのタンパク質に対する抗体等を用いて検出することにより、両者のタンパク質の相互作用を検出でき、また、該相互作用に与える被検物質の影響を評価することができる。この場合において、両タンパク質は細胞が内因的に発現するタンパク質であってもよいが、どちらかまたは両方のタンパク質を外来的に細胞で発現させることもできる。用いる細胞としては、CHO細胞やCOS細胞などを挙げることができるが

、これらに限定されない。

動物細胞内で蛋白質を外来的に発現させる場合、例えば、上述したようなTLRおよび／またはガレクチン-2をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA 1, pCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで当該遺伝子を発現させることができる。なお、これらのタンパク質はMycタグやFlagタグなどのペプチドタグとの融合タンパク質として発現させてもよい。

[0035] 細胞を用いたスクリーニング系としては、さらに、酵母または動物細胞などを用いた2ハイブリッド法が挙げられる。

酵母2-ハイブリッド法においては、TLRまたはガレクチン-2のどちらか一方のタンパク質またはその部分ペプチドを、GAL4 DNA結合領域等と融合させた融合タンパク質を発現するベクター、そして他方のタンパク質またはその部分ペプチドをVP16またはGAL4等の転写活性化領域と融合させた融合タンパク質を発現するベクターを構築し、これらを、レポーター遺伝子をコードするベクターと共に酵母細胞に導入して、被検物質を含む試料の存在下でレポーター活性を指標に化合物のアッセイを行う。TLRタンパク質とガレクチン-2タンパク質との相互作用によりレポーター遺伝子の発現が誘導されるが、被検化合物により両者のタンパク質の相互作用が阻害されると、レポーター遺伝子の発現が抑制される。レポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。2ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

2ハイブリッド法によるスクリーニングは例えば、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもクロンテック社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(ストラタジーン社製))などを使用して行うことができる。

実施例

[0036] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されない。

(1) 一塩基多型の解析

インフォームドコンセントの得られた日本人の心筋梗塞患者及び非心筋梗塞者(コントロール)それぞれについて、TLR1遺伝子、TLR4遺伝子の一塩基多型を解析した。具体的には、TLR1遺伝子の1805番目の塩基の多型については、被検者の血液から単離した染色体DNAを鋳型にし、配列番号4, 5のプライマーを用いてPCRを行ってDNAフラグメントを増幅し、得られたフラグメントを制限酵素PstI (Takara)で消化し、4%Nusieve GTGアガロースゲル (Takara)で泳動パターンを解析することにより調べた。

TLR1遺伝子の130番目の塩基の多型については、被検者の血液から単離した染色体DNAを鋳型に、配列番号6および7のプライマーを使用してPCRを行い、得られた増幅産物について配列番号10のプライマーを用いて多型部位のシーケンス解析を行った。

TLR4遺伝子の-1440番目の塩基の多型については、被検者の血液から単離した染色体DNAを鋳型に、配列番号8および9のプライマーを使用してPCRを行い、得られた増幅産物について配列番号11のプライマーを用いて多型部位のシーケンス解析を行った。

なお、解析された心筋梗塞患者は、(i) 30分以上の胸部圧迫感、痛み、胸苦しさなどの病歴を持つ、(ii) 少なくとも1の標準誘導又は2の胸部誘導において0.1mVより大きいSTセグメントの上昇を示す、(iii) 血清クレアチンキナーゼ濃度が標準値の2倍以上に上昇する、の3つの条件 (Nat Genet. 2002 Dec;32 (4):650-4. 2002)のうち2つ以上を満たすことによって心筋梗塞であると診断された患者である。解析結果を表1に示す。

[0037] [表1]

表1. TLR1 遺伝子内の SNP と心筋梗塞 (MI) の相関

Genotype	MI: 人 (%)	Control: 人 (%)	Allele T vs allele C (exon 1) or G (exon 4)		CC (exon 1) or TT (exon 4) vs others	
			χ^2 [P value]	Odds ratio(95%CI)	χ^2 [P value]	Odds ratio(95%CI)
TLR1 exon 1						
130T>C*						
Ser44Pro						
TT	2210(86.5%)	1590(88.7%)	5.23	1.23	4.52	3.5
TC	324(12.8%)	199(11.1%)	[0.022]	(1.03-1.47)	[0.034]	(1.02-12.2)
CC	15(0.6%)	3(0.2%)				
Total	2549(100%)	1792(100%)				
TLR1 exon 4						
1805T>G*						
Ser602Ile						
TT	2685(97.6%)	2046(99.0%)	13.4	2.52	15.95	2.72
TG	66(2.4%)	20(1.0%)	[0.00021]	(1.52-4.16)	[0.000065]	(1.63-4.53)
GG	0(0%)	0(0%)				
Total	2751(100%)	2066(100%)				

[0038] [表2]

表2. TLR1 遺伝子の130番目の CC ホモ型と1805番目の TG ヘテロ型の組み合わせとその他の型の比較

	Others; 人 (%)	combination; 人 (%)	χ^2 [P value]	Odds ratio(95%CI)
MI	2276	68	17.12	3.01
CO	1614	16	[0.000035]	[1.74-5.25]

[0039] [表3]

表3. TLR4遺伝子内の SNP と心筋梗塞 (MI) の相関

χ^2 [P value] (Odds ratio) <95%CI>					
Genotype	MI; 人 (%)	Control; 人 (%)	Genotype frequency	Allele frequency	TT vs Others CC vs Others
TLR4 promoter -1440					
T>C*					
TT	1516(55.0%)	1287(58.0%)	12.5 [0.0019]	9.2 [0.0024] (1.15)	4.5 [0.034] (1.13)
TC	1037(37.6%)	820(37.0%)			11.1 [0.00084] (1.5)
CC	203(7.4%)	112(5.0%)			
Total	2756(100%)	2219(100%)		<1.05-1.26>	<1.01-1.26> <1.18-1.90>

[0040] 表1より、TLR1遺伝子のエクソン1の130番目の塩基のT/Cの多型については、心筋梗塞患者ではCが有意に多い ($\chi^2=5.23$, $P=0.0022$; odds ratio=1.23)ことがわかった。また、TLR1遺伝子のエクソン4の1805番目の塩基のT/Gの多型については、心筋梗塞患者ではGが有意に多い ($\chi^2=13.4$, $P=0.00021$; odds ratio=2.52)ことがわかった。

さらに、130番目の塩基がCCアレルであり、かつ1805番目の塩基がTGアレルである被験者 (combination) をその他のアレルの被験者 (others) と比較したところ、combinationの被験者は心筋梗塞の割合が有意に高いことがわかった (表2; $\chi^2=17.12$, $P=0.000035$; odds ratio=3.01)。

[0041] 表3には、TLR4遺伝子のプロモーター領域の-1440番目の塩基のT/C多型と心筋梗塞との関連を示す。それによると心筋梗塞患者ではCが有意に多い ($\chi^2=9.2$, $P=0.0024$; odds ratio=1.15)ことがわかった。

[0042] (2) TLRとガレクチン-2の相互作用の確認

FLAGタグ融合ガレクチン-2 (galectin-FLAG) の構築

EcoRI, XhoI siteがそれぞれ付加されたgalectin-2に特異的なprimer (配列番号18及び19)を用い、ヒト肝臓cDNA (Clontech)をテンプレートとし、PCRを行った。増幅されたフラグメントをEcoRI, XhoI処理し、同様にEcoRI, XhoI処理したpFLAG-CMV5a vector (SIGMA)に連結して、FLAGタグ融合ガレクチン-2発現ベクターを得た (galectin-2-FLAG)。

HAタグ融合TLR1, 2, 3発現用ベクターはinvivogenより購入した (TLR-HA1, 2, 3)。

[0043] galectin-2-FLAG発現ベクター及びTLR-HA発現ベクターをFugene (Roche)を用いてCOS7細胞 (Health Science Research Resources Bank; JCRB9127)に一過的にトランスフェクションした。24時間後、細胞を、complete protease inhibitor tablet (Roche; 20mlあたり1錠) 及びMG-132 (Calbiochem; $5 \mu\text{g/ml}$)を含むlysis buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100)を用いて不溶性のdebrisが沈殿しない程度に1時間以上溶解した。次に、抗FLAGタグM2アガロース (Sigma) または抗HAアガロース (Santacruz)を用いて4°Cで12-18時間免疫沈降を行

った。沈降物をlysis bufferで3回洗浄した後、抗HA抗体ペルオキシダーゼコンジュゲート(Santa Cruz)又は抗FLAG抗体ペルオキシダーゼコンジュゲート(Sigma)を用いて可視化した。結果を図1に示す。FLAG抗体を用いて免疫沈降(IP)を行い、得られた沈降物についてHA抗体でウェスタンブロット(WB)を行った結果、ガレクチン-2-FLAGによってTLR1、TLR2を共沈降することができた。これにより、TLR1、TLR2とガレクチン-2が特異的に相互作用していることが明らかになった。

[0044] (3) TLR2の細胞内領域とガレクチン-2の相互作用の確認

TLR2の細胞内領域(配列番号15の614～784番目の領域)とSタグの融合タンパク質を発現させるためのベクターを構築した。まず、配列番号21, 22のプライマーを用いてTLR2の細胞内領域をコードするDNAフラグメントを増幅し、これをpTriEx4ベクター(Novagen社)に挿入した(S-tag-TLR2ID)。

galectin-2-FLAG発現ベクター及びS-tag-TLR2ID発現ベクターをFugene(Roche)を用いてCOS7細胞(Health Science Research Resources Bank; JCRB9127)に一過的にトランスフェクションした。S-Proteinを用いて免疫沈降を行った後、S-Proteinまたは抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロット(WB)を行った。その結果、TLR2の細胞内領域とガレクチン-2が相互作用していることがわかった。

産業上の利用の可能性

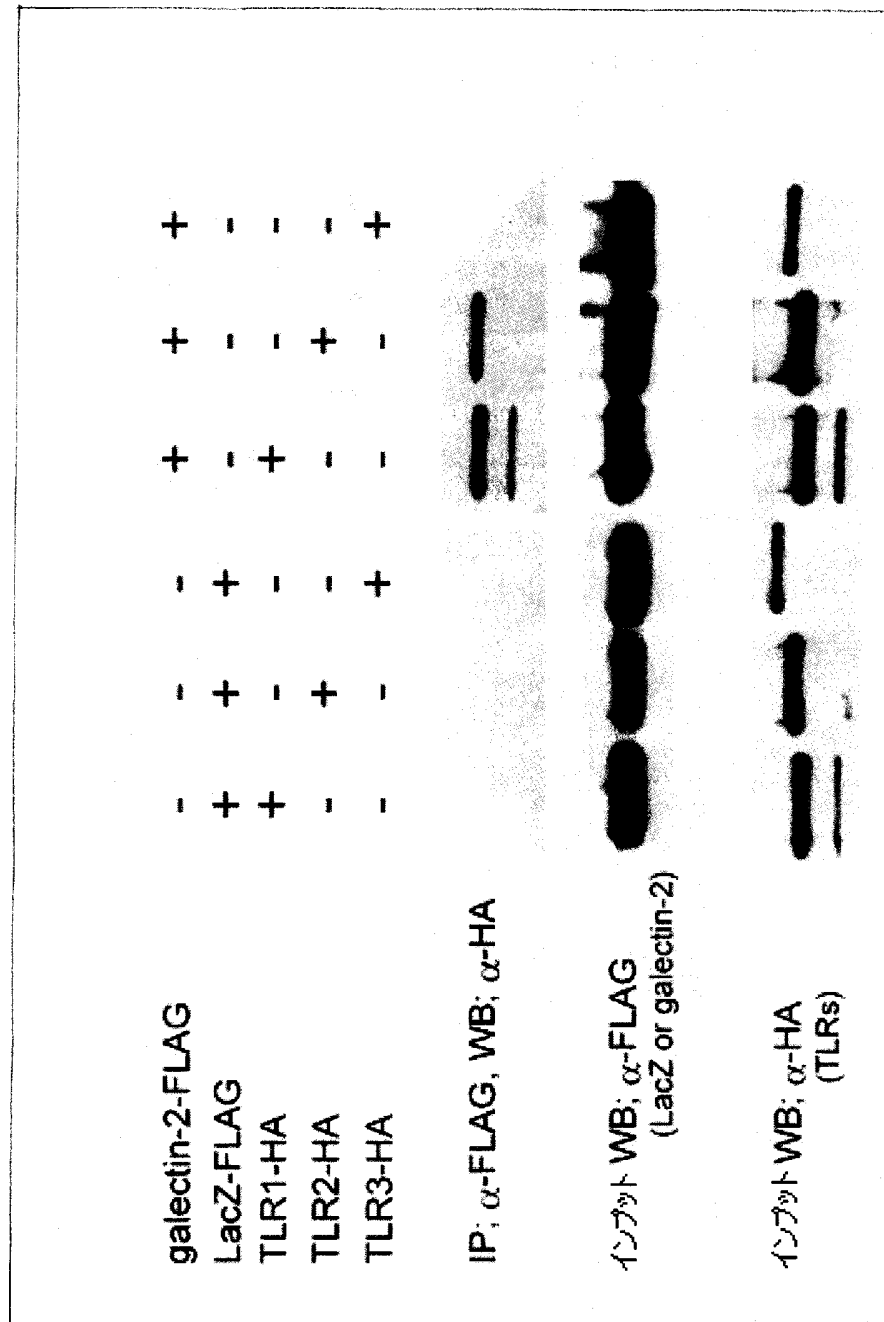
[0045] 本発明の判定方法によれば心筋梗塞等の炎症性疾患を早期に発見することができ、診断分野等において有用である。また、本発明のスクリーニング方法によれば、心筋梗塞等の炎症性疾患に対する新規医薬を得ることができ、医薬分野等において有用である。

請求の範囲

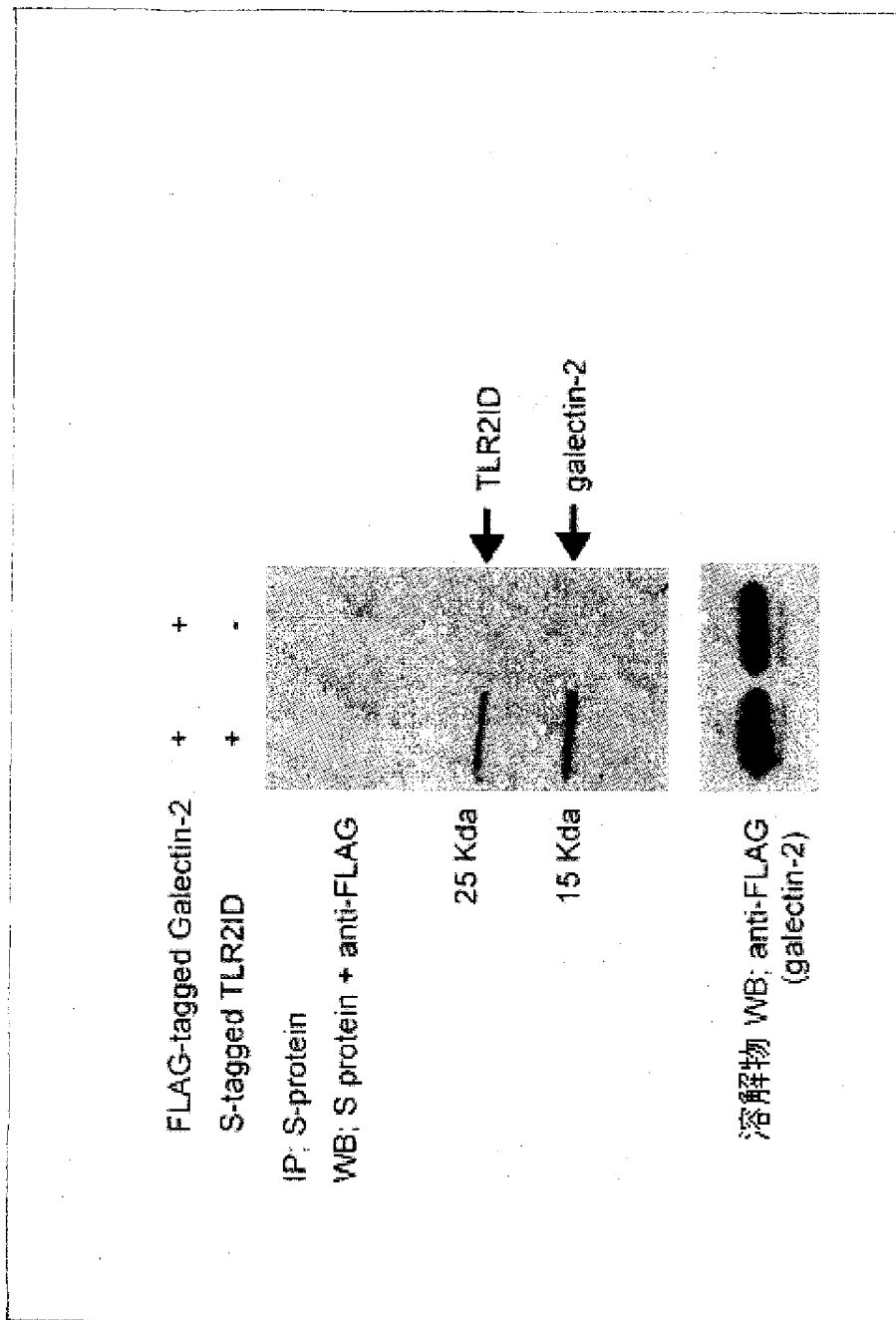
- [1] トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、該分析結果に基づいて炎症性疾患を検査する方法。
- [2] 前記多型が一塩基多型である、請求項1に記載の方法。
- [3] トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター1遺伝子であり、該トルライクレセプター1遺伝子上に存在する一塩基多型が配列番号1の201番目の塩基に相当する塩基または配列番号2の197番目の塩基に相当する塩基の多型である、請求項2に記載の方法。
- [4] トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター4遺伝子であり、該トルライクレセプター4遺伝子上に存在する一塩基多型が配列番号3の202番目の塩基に相当する塩基の多型である、請求項2に記載の方法。
- [5] トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター1遺伝子であり、該トルライクレセプター1遺伝子の多型が、配列番号1の201番目の塩基または配列番号2の197番目の塩基の一塩基多型と連鎖不平衡にある多型である、請求項1に記載の方法。
- [6] トルライクレセプター遺伝子がトルライクレセプター4遺伝子であり、該トルライクレセプター4遺伝子の多型が、配列番号3の202番目の塩基の一塩基多型と連鎖不平衡にある多型である、請求項1に記載の方法。
- [7] 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [8] 配列番号1の塩基配列において201番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。
- [9] 配列番号1の塩基配列において201番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。
- [10] 配列番号2の塩基配列において197番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。
- [11] 配列番号2の塩基配列において197番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。
- [12] 配列番号3の塩基配列において202番目の塩基を含む10塩基以上の配列、又はその相補配列を有する炎症性疾患検査用プローブ。

- [13] 配列番号3の塩基配列において202番目の塩基を含む領域を増幅することのできる炎症性疾患検査用プライマー。
- [14] トルライクレセプターおよびガレクチン-2を含むスクリーニング系に医薬候補物質を添加する工程、トルライクレセプターとガレクチン-2との相互作用を測定する工程、及び前記相互作用を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法。
- [15] トルライクレセプターがトルライクレセプター1またはトルライクレセプター2である請求項14に記載のスクリーニング方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	EDFELDT, K. et al., Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions and the relevance to myocardial infarction, European Heart Journal (2003) Vol.24, No.Abstract Supplement, page 156, P941	1-2,4,6-7, 12-13 /3,5,8-11 /14-15
X/Y/A	HAMANN, L. et al., Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2,-4, and -9 genes, J Immunol Methods (2004) Vol.285, No.2, pages 281 to 291	1-2,4,6-7, 12-13/ 3,5,8-11/ 14-15
X/Y/A	BARBER, R.C. et al., TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury, J Med Genet (2004) Vol.41, No.11, pages 808 to 813	1-2,4,6-7, 12-13/ 3,5,8-11/ 14-15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 April, 2006 (07.04.06)		Date of mailing of the international search report 25 April, 2006 (25.04.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300224

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	HALLMAN, M. et al., Toll-like receptors as sensors of pathogens, <i>Pediatr Res</i> (2001) Vol.50, No.3, pages 315 to 321	3,5,8-11/ 1-2,4,6-7, 12-15
Y/A	ANDERS, H. J. et al., Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease, <i>J Am Soc Nephrol</i> (2004) Vol.15, No.4, pages 854 to 867	3,5,8-11/ 1-2,4,6-7, 12-15
A	Koichi OZAKI et al., "Taikeiteki SNP Kaiseki ni yoru Shinkinkosoku Kanjusei Idenshigun no Dotei to sono Kinokaiseki, Lymphotoxin- α oyobi sono Ketsugobunshi Galectin-2 to Shinkinkosoku", <i>Protein, Nucleic acid and Enzyme</i> (2004) Vol.49, No.14, pages 2215 to 2221	1-15
P,A	Koichi OZAKI et al., "Tainshi Idenbyoto shite no Junkanki Shikkan Shinkinkosoku", <i>Saishin Igaku</i> (2005) Vol.60, the September issue, pages 2026 to 2034	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300224

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300224

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

Although the technical feature common to the inventions according to claims 1 to 13 resides in analyzing a polymorphism of a Toll-like receptor gene and examining an inflammatory disease, this has been already known in public as disclosed in "Eur. Heart. J., 2003, Vol.24, No. Abstract Suppl., page 156, P941). Thus, the above common technical feature cannot be considered as a special technical feature. Thus, it does not appear that there is a technical relationship between these inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features and these inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

The technical feature of the inventions according to claims 14 to 15 resides in a method of screening a remedy for an inflammatory disease with the use of the interaction between Toll-like receptor and galectin-2. Although this invention group has a matter common to the above-described invention groups of being a method wherein the relationship between Toll-like receptor and an inflammatory disease is utilized, this point has been already known in public as discussed above. Therefore, there is no technical relationship involving any special technical feature in common to the invention group as described above. Thus, these invention groups are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the present case has four invention groups as will be described hereinbelow.

(1) The inventions according to parts of claims 1 to 3, 5 and 7 and claims 8 to 9 relating to a method of analyzing a polymorphism of a Toll-like receptor gene and examining an inflammatory disease wherein a single nucleotide polymorphism occurring in Toll-like receptor 1 gene corresponds to the base at the 201-position in SEQ ID NO:1.

(2) The inventions according to parts of claims 1 to 3, 5 and 7 and claims 10 to 11 relating to a method of analyzing a polymorphism of a Toll-like receptor gene and examining an inflammatory disease wherein a single nucleotide polymorphism occurring in Toll-like receptor 1 gene corresponds to the base at the 197-position in SEQ ID NO:2.

(3) The inventions according to parts of claims 1 to 2 and 7 and claims 4, 6 and 12 to 13 relating to a method of analyzing a polymorphism of a Toll-like receptor gene and examining an inflammatory disease wherein a single nucleotide polymorphism occurring in Toll-like receptor 4 gene corresponds to the base at the 202-position in SEQ ID NO:3.

(4) The inventions according to claims 14 to 15 relating to a method of screening a remedy for an inflammatory disease comprising the step of assaying the interaction between Toll-like receptor and galectin-2.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01), C12Q1/02(2006.01)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01), C12Q1/02(2006.01)		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	EDFELDT, K. et al, Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions and the relevance to myocardial infarction, European Heart Journal (2003) Vol. 24, No. Abstract Supplement, p. 156, P941	1-2, 4, 6-7, 12 -13 /3, 5, 8-11 /14-15
X/Y/A	HAMANN, L. et al, Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes, J Immunol Methods (2004) Vol. 285, No. 2, p. 281-91	1-2, 4, 6-7, 12 -13/ 3, 5, 8-11/ 14-15
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07.04.2006	国際調査報告の発送日 25.04.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	BARBER, R. C. et al, TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury, J Med Genet (2004) Vol. 41, No. 11, p. 808-13.	1-2, 4, 6-7, 12 -13/ 3, 5, 8-11/ 14-15
Y/A	HALLMAN, M. et al, Toll-like receptors as sensors of pathogens, Pediatr Res (2001) Vol. 50, No. 3, p. 315-21	3, 5, 8-11/ 1-2, 4, 6-7, 12 -15
Y/A	ANDERS, H. J. et al, Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease, J Am Soc Nephrol (2004) Vol. 15, No. 4, p. 854-67	3, 5, 8-11/ 1-2, 4, 6-7, 12 -15
A	尾崎浩一他, 体系的SNP解析による心筋梗塞感受性遺伝子群の同定とその機能解析 リンホトキシン α およびその結合分子ガレクチン2と心筋梗塞, 蛋白質 核酸 酵素 (2004) Vol. 49, No. 14, p. 2215-2221	1-15
PA	尾崎浩一他, 多因子遺伝病としての循環器疾患 心筋梗塞, 最新医学 (2005) Vol. 60, 9月号, p. 2026-2034	1-15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

請求の範囲 1-13 に係る発明の共通の技術的特徴は、トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、炎症性疾患を検査することであるが、このことは、「Eur. Heart. J., 2003, Vol. 24, No. Abstract Suppl., p. 156, P941」に開示されるように、既に公知であるから、上記共通の技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとは言えない。よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

また、請求の範囲 14-15 に係る発明の技術的特徴は、トルライクレセプターとガレクチン 2 の相互作用を利用した炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法であり、上記発明群とトルライクレセプターと炎症性疾患の関連を利用した方法であるという点で共通しているが、上述の通り、その点は既に公知であるから、上記発明群と共通の特別な技術的特徴を含む技術的關係がなく、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、本出願には、以下の 4 発明が含まれている。

(1) トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、炎症性疾患を検査する方法において、トルライクレセプター 1 遺伝子上存在する一塩基多型が配列番号 1 の 201 番目の塩基に相当するものである方法に係る発明である請求の範囲 1-3、5、7 の部分及び請求の範囲 8-9

(2) トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、炎症性疾患を検査する方法において、トルライクレセプター 1 遺伝子上存在する一塩基多型が配列番号 2 の 197 番目の塩基に相当するものである方法に係る発明である請求の範囲 1-3、5、7 の部分及び請求の範囲 10-11

(3) トルライクレセプター遺伝子の多型を分析し、炎症性疾患を検査する方法において、トルライクレセプター 4 遺伝子上存在する一塩基多型が配列番号 3 の 202 番目の塩基に相当するものである方法に係る発明である請求の範囲 1-2、7 の部分及び請求の範囲 4、6、12-13

(4) トルライクレセプターとガレクチン 2 の相互作用を測定する工程を含む炎症性疾患治療薬のスクリーニング方法に係る発明である請求の範囲 14-15