

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 7 月 15 日(15.07.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/079802 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/050095
- (22) 国際出願日: 2010 年 1 月 7 日(07.01.2010)
- (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 2009-001886 2009 年 1 月 7 日(07.01.2009) JP
特願 2009-131124 2009 年 5 月 29 日(29.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人千葉大学(National University Corporation Chiba University) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 番 3 3 号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 日和佐 隆樹(HIWASA Takaki) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究科内 Chiba (JP). 瀧口正樹(TAKIGUCHI Masaki) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究科内 Chiba (JP). 岩瀬 克郎(IWASE Katsuro) [JP/JP]; 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1

号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究科内 Chiba (JP).

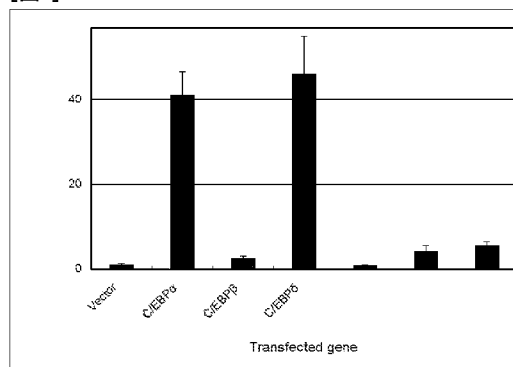
- (74) 代理人: 高橋 昌義(TAKAHASHI Masayoshi); 〒2900143 千葉県市原市ちはら台西 1 - 3 - 7 0 3 Chiba (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CAUSING GENE TO BE EXPRESSED IN C/EBP α -, C/EBP β -, C/EBP δ - OR p53-DEPENDENT MANNER USING PARTIAL SEQUENCE OF HUMAN decorin PROMOTER, AND METHOD FOR INHIBITING OR DETERMINING TRANSCRIPTION INDUCTION ABILITY OF C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ OR p53

(54) 発明の名称: ヒト decorin プロモーターの一部の配列を用いて C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくは p53 依存的に任意の遺伝子を発現させる方法、及びそれらの転写誘導能を抑制又は測定する方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed are a method for causing a gene to be expressed in a C/EBP α -, C/EBP β -, C/EBP δ - or p53-dependent manner and a method for inhibiting or determining a transcription induction ability of C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ or p53, in each of which a partial sequence of human decorin promoter is used. Also disclosed is DNA for use in the above-mentioned methods. The DNA comprises a nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, a nucleotide sequence produced by substituting or deleting one or more nucleotides in the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:3, or a nucleotide sequence capable of hybridizing with any one of the above-mentioned nucleotide sequences under stringent conditions, and has a function to regulate the transcription induction ability of C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ or p53.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/079802 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

【課題】ヒトdecorinプロモーターの一部の配列を用いてC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53依存的に任意の遺伝子を発現させる方法、及び、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53の転写誘導能を抑制又は測定する方法、更には、これに用いられるDNAを提供すること。【解決手段】配列番号1、2及び3に記載の塩基配列、前記配列番号1、2及び3に記載の塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53の転写誘導能を制御する機能を有するDNAとする。

明 細 書

発明の名称：

ヒトdecorinプロモーターの一部の配列を用いてC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53依存的に任意の遺伝子を発現させる方法、及びそれらの転写誘導能を抑制又は測定する方法

技術分野

[0001] 本発明は、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53依存的に任意の遺伝子を発現させる方法、及びC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53の転写誘導能を抑制又は測定する方法に関する。

背景技術

[0002] p53遺伝子は、人の多がん組織及びがん細胞において、最も高頻度で変異・欠失が観察されている遺伝子である（例えば下記非特許文献1参照）。変異p53遺伝子を有するリー・フラウメニ症候群患者やp53ノックアウトマウスにおいてがんが多発することから、p53遺伝子の異常はがんの発生・進展に密接に関連していると考えられている（例えば下記非特許文献2、3参照）。

[0003] p53は、転写活性調節ドメインを含むN末端領域と、DNA結合に関与するDNA結合領域と、四量体形成ドメインを含むC末端領域からなり、がん細胞で観察される変異は、DNA結合領域に集中している。

[0004] 野生型p53は転写調節因子として機能し、細胞周期、DNA修復、アポトーシスに関わる多くの遺伝子の発現に関与していることが知られている。例えば野生型p53蛋白質は、サイクリン依存性キナーゼのインヒビターであるp21遺伝子（別名：WAF1、CIP1、SDI1）の転写を活性化して細胞周期停止を誘導する。また野生型p53は、Bax遺伝子、Noxa遺伝子、Puma遺伝子等の転写を活性化してアポトーシスを誘導することが知られている（例えば下記非特許文献4乃至6参照）。

- [0005] これらのことから、p53の転写調節因子としての活性を測定することによって、発がんやアポトーシスの進行程度を推測することが可能であり、また、p53の転写誘導活性を調節することによって発がんやアポトーシスを抑制することが可能である。
- [0006] C/EBPは塩基性アミノ酸の領域とロイシンジッパーをもったbZIPタンパク質であり、異なった遺伝子にコードされたC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP γ 、CRP1、CHOPからなるC/EBPファミリーを構成している（例えば下記非特許文献7参照）。C/EBP β 、C/EBP δ は急性期反応に重要な転写因子である。C/EBP α はp21を介して細胞周期を止め、細胞増殖抑制作用を示し（例えば下記非特許文献8参照）、がん抑制遺伝子の一つである（例えば下記非特許文献9参照）。
- [0007] ところでdecorinは低分子ロイシンリッチ・プロテオグリカンと呼ばれる分子ファミリーに属し、EGFR、ErbB4、IGF-IR等の増殖因子受容体に結合して強い細胞増殖やアポトーシスに影響を及ぼす（例えば下記非特許文献10参照）。
- [0008] 非特許文献1: Cancer Research, 1994, 54, 4855-4878
非特許文献2: British Journal of Cancer, 1997, 76, 1-14
非特許文献3: Nature, 1992, 356, 215-221
非特許文献4: Cell, 1995, 80, 293-299
非特許文献5: Science, 2000, 288, 1053-1058
非特許文献6: Molecular Cell, 2001, 7, 683-694
非特許文献7: International Journal of Experimental Pathology 1998, 79, 369-391

非特許文献8: Genes and Development 1996, 10, 804-815

非特許文献9: Journal of Experimental Medicine 2005, 202, 85-96

非特許文献10: Journal of Biological Chemistry 2008, 283, 21305-21309

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記従来技術には、C/EBPファミリー、及びp53の標的遺伝子のプロモーターを用いた遺伝子発現制御に関する記載もあるが、これらの生物学的重要性を考慮すれば1つでも多くの標的遺伝子の同定が求められている。

[0010] そこで、本発明は、上記課題を鑑み、ヒトdecorinプロモーターにC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53が作用する領域を同定し、それらの転写因子に依存して任意の遺伝子を発現させる方法、及び、それらの転写誘導能を抑制又は測定する方法、更には、これに用いられるDNAを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するための一手段に係るDNAは、配列番号1及び2に記載の塩基配列、配列番号1及び2に記載の塩基配列のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、C/EBP α 、C/EBP β 、若しくはC/EBP δ の転写誘導能を制御する機能を有するものである。

[0012] また、上記課題を解決するための他の一手段に係る遺伝子を発現させる方法は、配列番号1及び2に記載の塩基配列、配列番号1及び2に記載の塩基配列のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配

列からなるDNAを他の任意の遺伝子上流につないで、C/EBP α 、C/EBP β 、若しくはC/EBP δ 依存的に他の遺伝子を発現させる。

[0013] また、上記課題を解決するための他の一手段に係る遺伝子を発現させる方法は、配列番号1及び2に記載の塩基配列、配列番号1及び2に記載の塩基配列のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなるDNAを用いて、C/EBP α 、C/EBP β 、若しくはC/EBP δ の転写誘導能を抑制又は測定する。

[0014] また、上記課題を解決するための他の一手段に係るDNAは、配列番号3に記載の塩基配列、配列番号3に記載の塩基配列のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、p53の転写誘導能を制御する機能を有するものである。

[0015] また、上記課題を解決するための他の一手段に係る遺伝子を発現させる方法は、配列番号3に記載の塩基配列、配列番号3に記載の塩基配列のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなるDNAを用いて、p53の転写誘導能を抑制又は測定する方法。

発明の効果

[0016] 以上、本発明により、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53に依存して任意の遺伝子を発現させる方法、C/EBP α 、C/EBP β 、若しくはC/EBP δ の転写誘導能を抑制又は測定する方法、及び、p53の転写誘導能を抑制又は測定する方法、更には、これに用いられるDNAを提供することが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0017] マウス線維芽細胞NIH3T3を活性化型H-ras遺伝子により形質転換したras-NIH3T3細胞はがん細胞の様相を呈するが、そこにC/EBP α 遺伝子を導入し発現させたとこ

ろ、細胞の形態が正常型に復帰することを発見した。そして、これらの遺伝子導入細胞と親株の *ras-NIH3T3* 細胞について遺伝子発現の差をマイクロアレイ法により網羅的に解析したところ、いずれも *decorin* 遺伝子の発現が上昇していた。すなわち、*COUP-TFI*、*HNF4*、及び *C/EBP α* 遺伝子の作用により、*decorin* 遺伝子の発現が誘導されるのではないかと考えられた。

[0018] 一方、*p53* は代表的ながん抑制遺伝子であり、その遺伝子を *ras-NIH3T3* 細胞に導入したところ、上記と同様の形態的正常復帰が観察された。またマウス *decorin* 遺伝子を導入しても同様の形態的正常復帰が観察された。これらのことから、*COUP-TFI*、*HNF4*、及び *C/EBP α* と *p53*、及び *decorin* の間に何らかの関係があると推定された。

[0019] そこで次に、*decorin* 遺伝子の発現調節機構について解析した。解析は、後述の実施例から明らかとなるが、ヒト培養食道がん細胞株 *T. Tn* のゲノムDNAを鋳型として、*decorin* 遺伝子のプロモーター領域（-1338~-205）をPCR法により増幅して単離し、ルシフェラーゼ・レポータープラスミド *pGL3*（プロメガ社）に組み込み、レポータープラスミド *deco*（-1338~-205）-*Luc* を作製した。そしてこのレポータープラスミドを *COUP-TFI*、*HNF4*、*C/EBP α* 、及び *p53* の発現ベクターとともにマウス線維芽細胞 *ras-NIH3T3* に導入し、2日後にルシフェラーゼ活性を測定した。*C/EBP α* と同じ遺伝子ファミリーである *C/EBP α* 、*C/EBP β* 、*C/EBP δ* 、*COUP-TFI*、及び *p53* 遺伝子の導入細胞ではルシフェラーゼ活性が2~46倍に上昇していた（後述の図1参照）。なお *HNF4* はほとんど影響がなかった。

[0020] 次にこのルシフェラーゼ・レポータープラスミドに組み込まれた *decorin* 遺伝子のプロモーター領域（-1338~-205）を段階的に5'側から削除して7種類のレポータープラスミド（*Deco*（-1237:-

205) -Luc、Deco (-1037 : -205) -Luc、Deco (-736 : -205) -Luc、Deco (-599 : -205) -Luc、Deco (-414 : -205) -Luc、Deco (-287 : -205) -Luc、Deco (-252 : -205) -Luc) を作製した。またDeco (-204 : +42) -Lucも別途作製した。p53によるこれらのプラスミド由来のルシフェラーゼ活性の変動を調べたところ、-252~-205の領域で最も顕著なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた(後述の図2参照)。この活性上昇はp53の用量に依存しており(後述の図3参照)、ヒトグリオーマ細胞U-87でも同様の結果が得られた(後述の図4参照)。

[0021] このdecorinプロモーター領域(-252~-205)にはp53の結合コンセンサス配列(5' -PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3')に類似した配列(AGGCAAGTAG)が含まれていた。そこでこの配列のうち最も重要であると推定されているCAAGをAAATに変異させたレポータープラスミドDeco(-252 : -205)m-Lucを作製して調べたところ、p53による活性化は5分の1程度に減少した(後述の図2、及び3参照)。これらのことからp53はdecorinプロモーターの-252~-205の領域に作用して下流の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

[0022] 次に、クロマチン免疫沈降法により、アドリマイシン処理したヒトグリオーマ細胞U-87のクロマチン分画を抗p53抗体を用いて免疫沈降し、共沈したDNAをdecorinプロモーター領域に設計したプライマーを用いてPCR法により増幅したところ、予想されたDNAのバンドが検出された(後述の図5参照)。このことはp53がdecorinプロモーター領域に直接結合することを示唆している。

[0023] 次にEMSA(electrophoresis mobility shift assay)法によりp53とdecorinプロモーターの結合を調べた。decorinプロモーターの-256~-232の領域の配

列を持つ合成DNAをプローブとしてdigoxigeninで標識し、U-87細胞の核抽出液と混合し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、DNAをメンブレンに転写した後、アルカリフォスファターゼ標識抗digoxigenin抗体とCSPD [Disodium 3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)Tetracyclo[3.3.1.1^{3,7}.1^{3,7}]Dodecan}-4-yl)phenyl phosphate]を用いて検出した結果、DNA-タンパク質複合体が移動度の低下したバンドとして検出された(図6)。このバンドは核抽出液の非存在下では観察されなかった。また、過剰量の非標識プローブを加えると消失した。また、抗p53抗体(N-19、またはM-19)を加えるとコントロールの抗NF- κ B抗体を加えたサンプルに比べ、バンドが薄くなった。このことはdecorinプロモーターの-256~-232の領域にp53が結合することを示す。

[0024] 一方、C/EBP α 、C/EBP β 、及びC/EBP δ によるルシフェラーゼ活性の上昇は-204~+42の領域を含むレポータープラスミドで最も高かった(後述の図7、8、9参照)。このことからこれらのC/EBPファミリーはdecorinプロモーターの-204~+42の領域に主に作用すると考えられた。また、C/EBP α 、及びC/EBP β では-414~-205の領域で高く、-287~-205の領域では減少した(後述の図7、8、9参照)。このことからC/EBP α とC/EBP β はdecorinプロモーターの-414~-288の領域にも作用して下流の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

[0025] HNF4はp53と同様にDeco(-252:-205)-Lucに対して最も高い発現誘導活性を示した(後述の図10参照)。また、COUP- τ FIはDeco(-204~+42)-Luc、及びDeco(-287:-205)-Lucで高い活性を示し、Deco(-252:-205)-Lucでは活性が低下した(後述の図11参照)。しかしながら、これらはDeco(-252:-205)-Lucに対しても発現誘導活性を示

したことからそれらの作用領域は明確でなかった。

[0026] すなわち、本発明の第一の形態に係るDNAは、配列番号1及び2に記載の塩基配列、配列番号1及び2に記載の塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、C/EBP α 、C/EBP β 若しくはC/EBP δ の転写誘導能を制御する機能を有する。なお配列番号1に記載の塩基配列は、decorinプロモーターの-414~-288の領域を示すものであり、配列番号2に記載の塩基配列は、decorinプロモーターの-204~+42の領域を、配列番号3は、decorinプロモーターの-252~-205の領域をそれぞれ示している。

[0027] なおこの形態において、配列番号1及び2に記載の塩基配列は、decorin遺伝子のプロモーター領域の一部であることが好ましい。

[0028] また本発明の第二の形態に係る遺伝子を発現させる方法は、上記第一の形態に係るDNAを、他の遺伝子の上流につないで、C/EBP α 、C/EBP β 若しくはC/EBP δ 依存的に他の任意の遺伝子を発現させる。

[0029] また本発明の第三の形態に係るC/EBP α 、C/EBP β 若しくはC/EBP δ の転写誘導能を抑制又は測定する方法は、上記第一の形態に係るDNAを用いて行なう。

[0030] また、本発明の第四の形態に係るDNAは、配列番号3に記載の塩基配列、配列番号3に記載の塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、p53の転写誘導能を制御する機能を有する。

[0031] なおこの形態において、配列番号3に記載の塩基配列は、decorin遺伝子のプロモーター領域の一部であることが好ましい。

[0032] また本発明の第五の形態に係るp53の転写誘導能を抑制又は測定する方法は、上記第四の形態に係るDNAを用いて行なう。

[0033] ここで、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニー、プラーク由来のDNA又はこのDNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在か65℃で葉イブリダイゼーションを行なった後、0.1～2×SSC溶液（1×SSCの組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるものを挙げるができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）等に記載されている方法に準じて行なうことができる。

[0034] また、本発明において用いられるレポータープラスミドはルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドに限られず、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、オワンクラゲ蛍光発色体（GFP）を挙げることができる。

[0035] また、また、本発明の一に係る遺伝子を発現させる方法において、接続させる遺伝子は、限定されるわけではないが、薬剤耐性遺伝子、アポトーシス阻害遺伝子、殺細胞遺伝子、及び、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 若しくはp53の標的で発現異常を引き起こした遺伝子などが考えられる。薬剤耐性遺伝子の例としては、dhfr、gpt、neo、hygro、trpB、hisD、ODCなどがある。dhfrはメトトレキセートへの耐性を与える遺伝子であり、gptはミコフェノール酸への耐性を与える遺伝子であり、neoはアミノグリコシドG-418への耐性を与える遺伝子であり、hygroはハイグロマイシンへの耐性を与える遺伝子である。またtrpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを許容する遺伝子であり、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノ

ールを利用することを許容する遺伝子であり、ODC（オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子）は、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤である2-（ジフルオロメチル）-DL-オルニチン（DFMO）に対する耐性を与える遺伝子である。アポトーシス阻害遺伝子の例としてはIAPを挙げることができる。IAP遺伝子の上流に配列番号2の遺伝子を組み込んで細胞に予め導入しておけば、薬物処理によりp53を活性化させた場合にアポトーシスは起こさず、細胞周期の停止を優先的に起こすことができる。逆に、がん細胞などを死滅させたい場合には殺細胞遺伝子を接続させることによって目的を達成できる。C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、p53の標的で発現異常を引き起こした遺伝子の発現を正常に戻すためには、本実施形態に係るプロモーターDNAを有する標的遺伝子をアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスなどのベクターに挿入し、又は、リポソームなどに封入して体細胞に導入することにより、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、p53の正常な転写制御下に標的遺伝子を発現させることができる。

[0036] 配列番号1、配列番号2又は配列番号3に記載のDNAを過剰に細胞内に導入し、そこにC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 又はp53を結合させてそれらの機能を制御する際、このプロモーターDNAの少なくとも一部を含むDNAは、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 又はp53との結合を拮抗阻害する。拮抗阻害に用いるDNAは、通常少なくとも6塩基の鎖長を有する。

[0037] またdecorineプロモーターDNAは、配列番号1、配列番号2及び配列番号3のうち1若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列を採用することができる。当業者であれば、種々の文政生物学的手法、例えば制限酵素法、DNAエキソヌクレアーゼによる欠失導入、変異プライマーを用いたPCR法によるプロモーター配列の改変、部位特異誘発法による変異導入、合成変異DNAの導入などの方法で、天然型プロモーターDNAの塩基配列の一部を他の塩基に置換したり、あるいは、一部塩基を欠失、ま

たは、付加させることにより、天然型と同等のプロモーターDNAと同等のプロモーター活性を有し、液が置換、欠失、及び／又は付加した塩基配列を有するDNAも使うことができる。

実施例

[0038] 以下、本発明の具体的な実施の例について詳細に説明する。

[0039] (実施例 1)

まず、ヒト培養食道癌細胞 T. Tn からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、AC007115.1 Homo sapiens chromosome 12 clone の 12030 base ~ 13163 base [decorin 遺伝子のプロモーター領域 (-38 ~ -205) ; 全長 1134 塩基対]、及び 13164 塩基対 ~ 13409 塩基対 [decorin 遺伝子のプロモーター領域 (-204 ~ +42) ; 全長 246 塩基対] の領域を PCR 法により増幅した。その際、Xho I、及び Hind III サイトをそれぞれ末端に導入し、TA クローニングにてサブクローニングを行い、ホタル・ルシフェラーゼ・レポータープラスミド pGL3-Basic vector (プロメガ社) の Xho I-Hind III 間に組み込み、レポータープラスミド Deco (-1338 : -205) -Luc を作製した。

[0040] そして、このレポータープラスミドを SV40、CMV プロモーターにより恒常的にウミシイタケ・ルシフェラーゼを発現するコントロールプラスミド pGL4.73 [hRLuc/SV40] vector、又は pGL4.75 [hRLuc/CMV] vector、及び COUP-TFI、HNF4、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、又は p53 の発現ベクター、又はインサート遺伝子を含まない空の対照ベクターとともにマウス線維芽細胞 ras-NIH3T3 に Lipofectamine-Plus 試薬 (インビトロジェン社) を用いて導入した。そして 2 日間培養した後、ルシフェラーゼ活性をデュアル・ルシフェラーゼ定量システム (プロメガ社) を用いて測定し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性に対するホタル・ルシ

フェラーゼ活性の比を算出した。この結果、対照ベクターに比べC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、COUP-TF I、及びp53遺伝子の導入細胞ではルシフェラーゼ活性が2～46倍に上昇していた（図1）。なおHNF4に関しては殆ど影響がなかった。

[0041] （実施例2）

ルシフェラーゼ・レポータープラスミドDeco（-1338：-205）-Lucに組み込まれたdecorin遺伝子のプロモーター領域（-1338～-205）を段階的に5'側から削除して7種類のレポータープラスミド（Deco（-1237：-205）-Luc、Deco（-1037：-205）-Luc、Deco（-736：-205）-Luc、Deco（-599：-205）-Luc、Deco（-414：-205）-Luc、Deco（-287：-205）-Luc、Deco（-252：-205）-Luc）をreverse PCT法により、KOD Mutagenesis Kit（東洋紡社）を用いて作製した。そして、これらのプラスミドまたはDeco（-204：+42）-Lucとコントロールプラスミド-pGL4.73[hRLuc/SV40]vector、及びp53発現ベクターをras-NIH3T3細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性の変動を調べたところ、-252～-205の領域で最も顕著なホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇が認められた（図2）。なおこの活性上昇は、p53の用量に依存しており、（図3）、ヒトグリオーマ細胞U-87でも同様の結果が得られた（図4）。

[0042] （実施例3）

decorinプロモーターの-252～-205の領域にはp53の結合コンセンサス配列（5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3'）に類似した配列（AGGCAAGTAG）が含まれていた。そこで、この配列のうち最も重要であると推定されるCAAGをAAATに変異させたレポータープラスミドDeco（-252：-205）m-LucをKOD Mutagenesis Kitを用いて作製して調べたとこ

ろ、p53による活性化は170倍から30倍程度に減少した（図3）。このことからp53はdecorinプロモーターのAGGCAAGTAGを含む-252~-205の領域に作用して顆粒の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

[0043] （実施例4）

ChIP Assay Kit（Active Motif社）を用いて、クロマチン免疫沈降解析を行なった。アドリマイシン処理したヒトグリオーマ細胞U-87のクロマチン分画を抗p53抗体（DO-1、及びBp53-12；サンタクルーズ社）を用いて免疫沈降し、共沈したDNAをdecorinプロモーター領域（-413~-232）に設計したプライマー（AACTGGTGGACAGGGAGAAAG、及び、TCGGATTCTACTTGCTTGG）を用いてPCT法により増幅したところ、予想された182塩基対のDNAのバンドが検出された（図5）。このことは、p53がdecorinプロモーターに直接結合することを示唆している。

[0044] （実施例5）

EMSA法によりp53とdecorinプロモーターの結合を調べた。decorinプロモーターの-256~-232の領域の配列を持つ合成DNAをプローブとしてdigoxigeninで標識し、U-87細胞の核抽出液と混合し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、DNAをメンブレンに転写した後、アルカリフォスファターゼ標識抗digoxigenin抗体とCSPD [Disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl)phenyl phosphate]を用いて検出した。DNA-タンパク質複合体を示す移動度の低いバンドが検出された（図6、レーン2）。このバンドは核抽出液の非存在下では観察されなかった（レーン1）。また、過剰量の非標識プローブを加えると消失した（レーン6）。また、抗p53抗体（N-19

、またはM-19)を加える(レーン3、4)とコントロールの抗NF- κ B抗体を加えたサンプル(レーン5)に比べ、バンドが薄くなった。このことはdecorinプロモーターの-256~-232の領域にp53が結合することを示す。

[0045] (実施例6)

一方、C/EBP α 、C/EBP β 、及びC/EBP δ によるdecorinプロモーターの活性化を同様に実施例2に示すレポータープラスミドを用いて調べたところ、ホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇は-204~+42、及び-414~-205の領域を含むレポータープラスミドで高く、-287~-205の領域では減少した(図7、8、9)。このことからC/EBP α 、C/EBP β 、及びC/EBP δ はdecorinプロモーターの-204~+42、及び-414~-288の領域に作用して顆粒の遺伝子の発現を誘導すると考えた。

[0046] HNF4について同様に、decorinプロモーターへの影響を調べた結果、Deco(-252:-205)-Lucに対して最も高い発現誘導活性を示した(図10)。また、COUP-TFIはDeco(-287:-205)-Lucで最も高い活性を示し、Deco(-252:-205)-Lucでは活性化が減弱したが完全には消失しなかった(図11)。したがって、それらの作用領域については確定しなかった。

産業上の利用可能性

[0047] 本発明は、DNA、このDNAを利用したC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、及びp53の機能解析、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、及びp53に依存的な遺伝子発現、及びC/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、及びp53の機能抑制が可能となり、細胞増殖、分化、細胞死の関与する種々の疾患の解明と予防に大きな進展が期待でき、産業上の利用可能性がある。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]種々の転写因子によるdecorinプロモーターの活性化である。

Deco (−1338 : −205) −Luc (0.1 μg) をSV40プロモーターにより恒常的にウミシイタケ・ルシフェラーゼを発現するコントロールプラスミドpGL4.73 [hRLuc/SV40] vector (0.01 μg)、及びC/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、COUP-TFI、HNF4、またはp53の発現ベクター、またはインサート遺伝子を含まない空の対照ベクター (pEF-BOS) (0.3 μg) とともにマウス線維芽細胞ras-NIH3T3にLipofectamine Plus試薬 (インビトロジェン社) を用いて導入した。2日間培養した後、ルシフェラーゼ活性をデュアル・ルシフェラーゼ定量システム (プロメガ社) を用いて測定し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性に対するホタル・ルシフェラーゼ活性の比を算出した。その結果、対照ベクターに比べC/EBPα、C/EBPβ、C/EBPδ、COUP-TFI、及びp53遺伝子の導入細胞ではルシフェラーゼ活性が2~46倍に上昇していた。HNF4はほとんど影響がなかった。

[図2] p53によるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。レポータープラスミド、Deco (−1338 : −205) −Luc、Deco (−1237 : −205) −Luc、Deco (−1037 : −205) −Luc、Deco (−736 : −205) −Luc、Deco (−599 : −205) −Luc、Deco (−414 : −205) −Luc、Deco (−287 : −205) −Luc、Deco (−252 : −205) −Luc、又はDeco (−204 : +42) −Luc (0.1 μg) をコントロールプラスミドpGL4.73 [hRLuc/SV40] vector (0.01 μg)、及びp53発現ベクター (0.3 μg) とともにras-NIH3T3細胞に共導入し、ルシフェラーゼ活性の変動を調べた。その結果、−252~−205の領域を持つレポーターに対して最も顕著なホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。

[図3] ras-NIH3T3細胞におけるp53によりdecorinプロモーターの活性化を示す図である。図2と同様にレポータープラスミド、D

e c o (- 2 5 2 : - 2 0 5) - L u c、またはD e c o (- 2 5 2 : - 2 0 5) m - L u cに対するp 5 3の用量依存的活性化を調べた。D e c o (- 2 5 2 : - 2 0 5) m - L u cはd e c o r i nプロモーターの- 2 5 2 ~ - 2 0 5の領域に見られるp 5 3の結合コンセンサス配列 (5' - P u P u P u C (A / T) (A / T) G P y P y P y - 3') に類似した配列 (A G G C A A G T A G) のC A A GをA A A Tに変異させたレポータープラスミドである。この活性化はp 5 3の用量に依存しており、p 5 3結合コンセンサス配列に依存していた。

[図4] U-87グリオーマ細胞におけるp 5 3によるd e c o r i nプロモーターの活性化を示す図である。図3と同様にレポータープラスミド、D e c o (- 1 3 3 8 : - 2 0 5) - L u c、D e c o (- 2 8 7 : - 2 0 5) - L u c、またはD e c o (- 2 5 2 : - 2 0 5) - L u cに対するp 5 3用量依存的活性化をヒトグリオーマ細胞U-87を用いて調べた。D e c o (- 2 5 2 : - 2 0 5) - L u cに対して最も高い活性化を示した。

[図5] クロマチン免疫沈降法によるp 5 3とd e c o r i nプロモーターの結合解析を示す図である。図中の矢印はPCR産物の位置を示す。ChIP Assay Kit (Active Motif社)を用いてクロマチン免疫沈降解析を行なった。アドリアマイシン処理したヒトグリオーマ細胞U-87のクロマチン分画を抗p 5 3抗体 (DO-1、及びBp 5 3-12; サンタクルーズ社)を用いて免疫沈降し、共沈したDNAをd e c o r i nプロモーター領域 (- 4 1 3 ~ - 2 3 2) に設計したプライマー (A A C T G G T G G A C A G G G A G A A A G)を用いてPCR法により増幅した。p 5 3抗体を用いた時にのみ予想された182塩基対のDNAのバンドが検出された。このことはp 5 3がd e c o r i nプロモーターに直接結合することを示唆している。矢印は予想されるPCR産物の位置を示す。

[図6] EMSAによるd e c o r i nプロモーターとp 5 3の結合を示す図である。EMSA法によりp 5 3とd e c o r i nプロモーターの結合を調べた。d e c o r i nプロモーターの- 2 5 6 ~ - 2 3 2の領域の配列を持

つ合成DNAをプローブとしてdigoxigeninで標識し、アドリマイシン処理U-87細胞の核抽出液と混合し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、DNAをメンブレンに転写した後、アルカリフォスファターゼ標識抗digoxigenin抗体を反応させ、CSPD [Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate]を用いて検出した。移動度の低いバンドはDNA-タンパク質複合体を示す。レーン1：標識プローブのみ、核抽出液なしレーン2：標識プローブ+核抽出液レーン3：標識プローブ+核抽出液+抗p53抗体(N-19)レーン4：標識プローブ+核抽出液+抗p53抗体(M-19)レーン5：標識プローブ+核抽出液+抗NF- κ B抗体レーン6：標識プローブ+核抽出液+非標識プローブ($\times 80$)これらの結果はdecorinプロモーターの-256~-232の領域にp53が結合することを示す。

[図7] C/EBP α によるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。C/EBP α によるdecorinプロモーターの活性化を図2と同様にレポータープラスミドを用いて調べた。ホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇は-204~+42の領域に対して最も著しく、次いで-414~-205の領域を含むレポータープラスミドで高く、-287~-205の領域では低下した。このことからC/EBP α はdecorinプロモーターの-204~+42、及び-414~-288の領域に作用して下流の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

[図8] C/EBP β によるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。C/EBP β によるdecorinプロモーターの活性化を図2と同様にレポータープラスミドを用いて調べた。ホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇は-204~+42、及び-414~-205の領域を含むレポータープラスミドで高く、-287~-205の領域では低かった。このことからC/EBP β はdecorinプロモーターの-204~+42、及び-4

14～-288の領域に作用して下流の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

[図9] C/EBP δ によるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。C/EBP δ によるdecorinプロモーターの活性化を図2と同様にレポータープラスミドを用いて調べた。ホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇は-204～+42の領域に対して最も高く、その他のレポーターでは3分の1以下であった。このことからC/EBP δ はdecorinプロモーターの-204～+42の領域に主に作用して下流の遺伝子の発現を誘導すると考えられた。

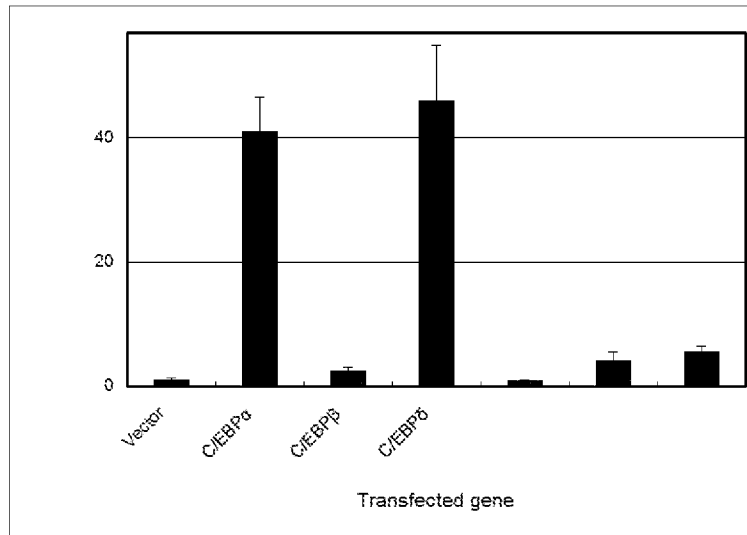
[図10] HNF4によるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。HNF4について図2と同様にdecorinプロモーターへの影響を調べた。Deco(-252:-205)-Lucに対して最も高い発現誘導活性を示した。

[図11] COUP-TFIによるdecorinプロモーターの活性化を示す図である。COUP-TFIによるdecorinプロモーターの活性化を図2と同様にレポータープラスミドを用いて調べた。COUP-TFIはDeco(-287:-205)-LucとDeco(-204:+42)-Lucに対して最も高い活性を示し、Deco(-252:-205)-Lucでは活性化が減弱したが完全には消失しなかった。従って、それらの作用領域は確定しなかった。

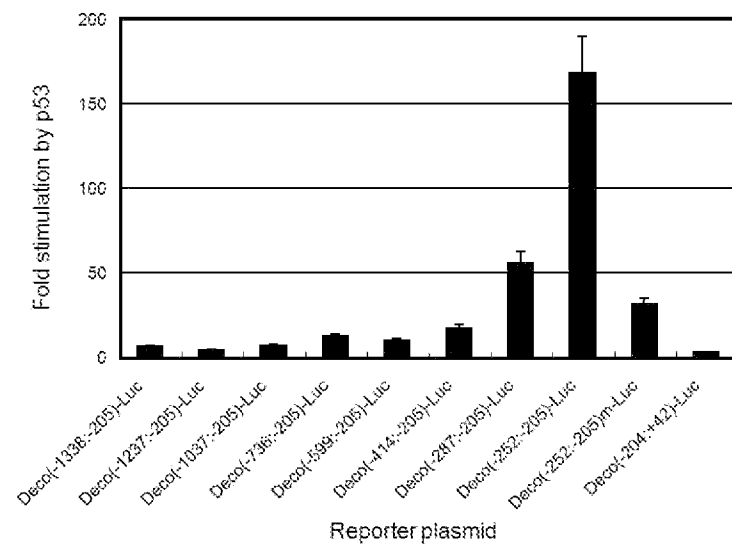
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号 1 及び 2 に記載の塩基配列、前記配列番号 1 に記載の塩基配列のうち 1 若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、C/EBP α 、C/EBP β 若しくは C/EBP δ の転写誘導能を制御する機能を有する DNA。
- [請求項2] 前記配列番号 1 及び 2 に記載の塩基配列が、decorin 遺伝子のプロモーター領域の一部である請求項 1 記載の DNA。
- [請求項3] 請求項 1 及び 2 に記載の DNA を、他の遺伝子の上流につないで、C/EBP α 、C/EBP β 若しくは C/EBP δ 依存的に前記他の遺伝子を発現させる方法。
- [請求項4] 請求項 1 に記載の DNA を用いて C/EBP α 、C/EBP β 若しくは C/EBP δ の転写誘導能を抑制又は測定する方法。
- [請求項5] 配列番号 3 に記載の塩基配列、前記配列番号 3 に記載の塩基配列のうち 1 若しくは複数個の塩基が置換又は欠失してなる塩基配列、又は、これら塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなり、p53 の転写誘導能を制御する機能を有する DNA。
- [請求項6] 前記配列番号 3 に記載の塩基配列は、decorin 遺伝子のプロモーター領域の一部である請求項 5 記載の DNA。
- [請求項7] 請求項 5 に記載の DNA を用いて p53 の転写誘導能を抑制又は測定する方法。

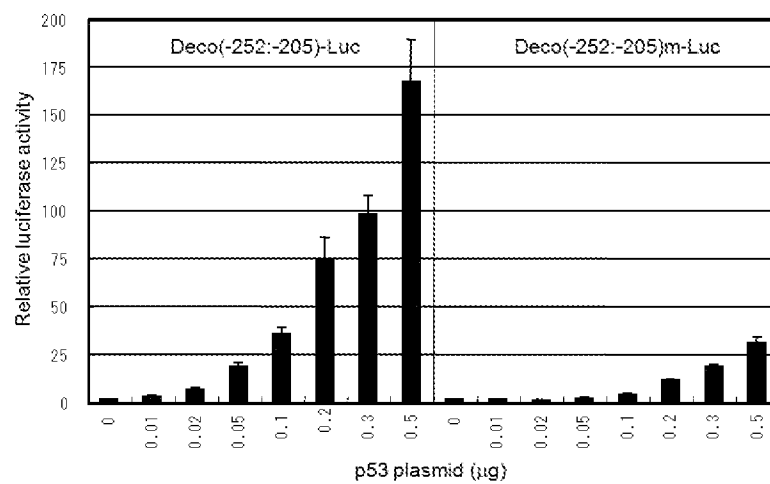
[図1]



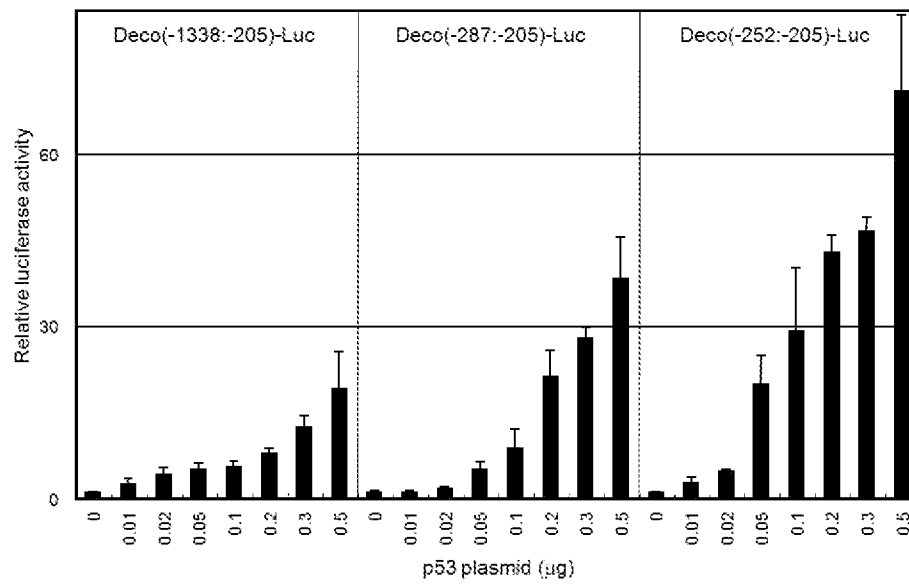
[図2]



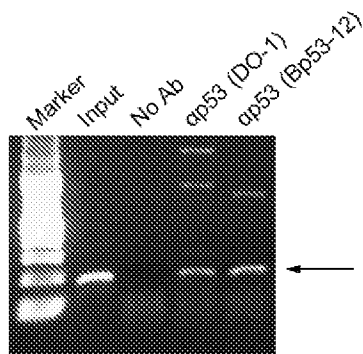
[図3]



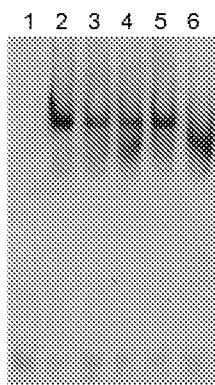
[図4]



[図5]



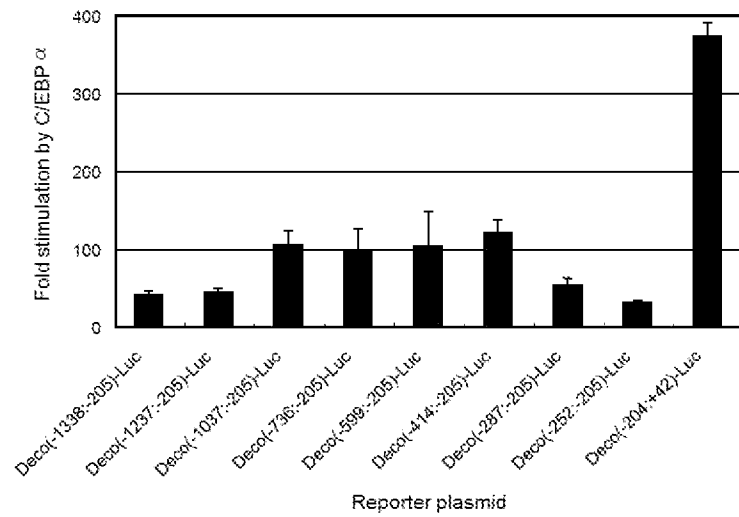
[図6]



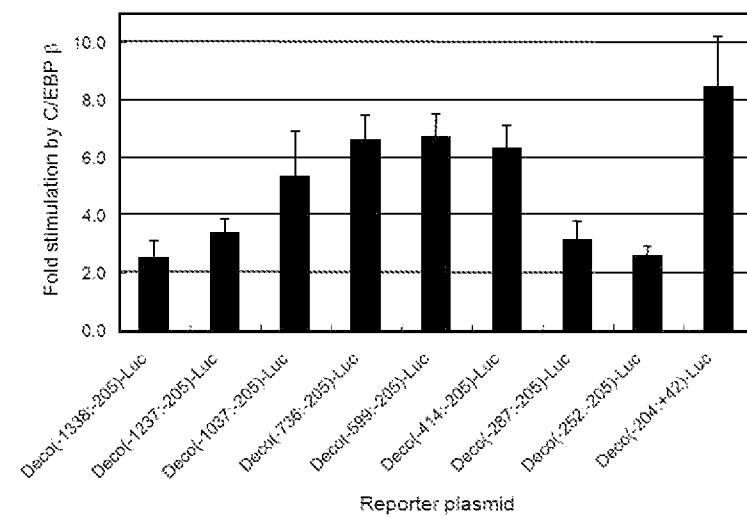
- 1: Dig-labeled probe
- 2: Dig-labeled probe + nuclear extract
- 3: Dig-labeled probe + nuclear extract + α p53 (N-19)
- 4: Dig-labeled probe + nuclear extract + α p53 (M-19)
- 5: Dig-labeled probe + nuclear extract + α NF κ B p65
- 6: Dig-labeled probe + nuclear extract + unlabeled probe (x80)

Probe: decorin promoter: -256/-232

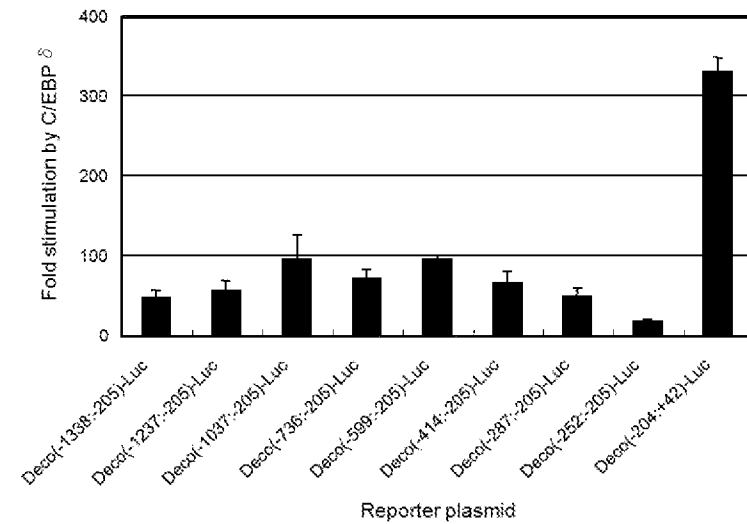
[図7]

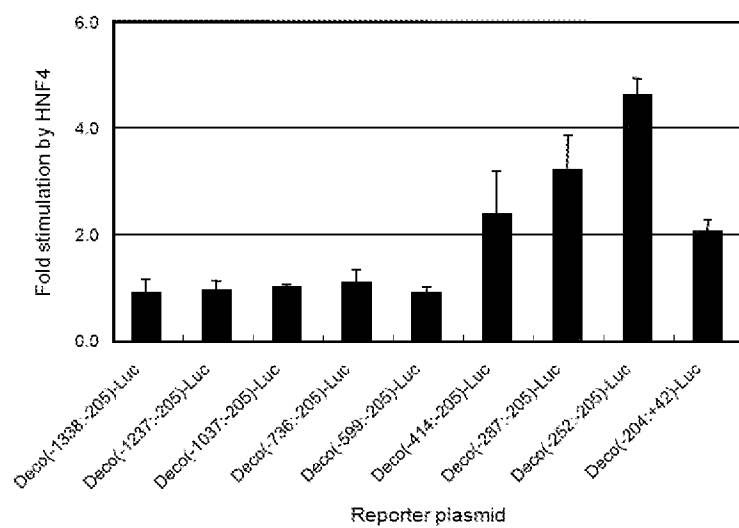
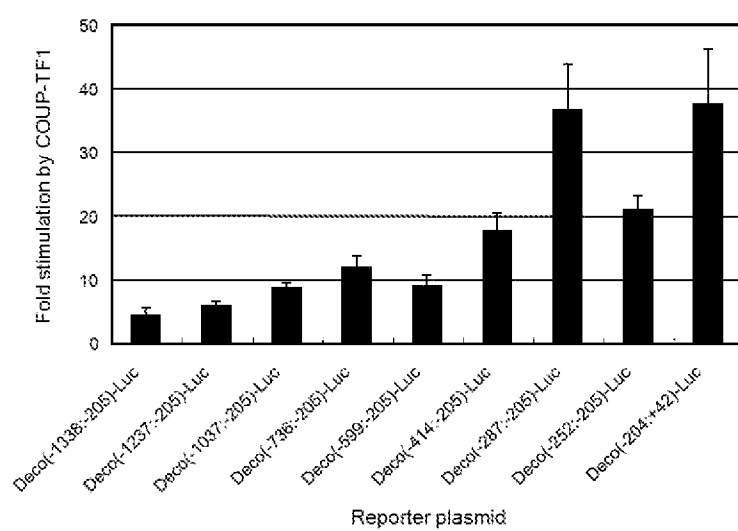


[図8]



[図9]



[10][11]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12Q1/68

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CORTES-CANTELI M et al., Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury, J. Biol. Chem., 2004, Vol.279, No.14, pp.14409-14417	1-4
Y	Namiko KUROIWA et al., "C/EBP Family no Saibo Zoshoku Yokuseino: Antei Donyu Kabu o Mochiita Kaiseki", Journal of Japanese Biochemical Society, 2001, vol.73, no.8, page 716	1-4
Y	HE F et al., Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol.372, No.4, pp.746-751	1-4



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
18 March, 2010 (18.03.10)Date of mailing of the international search report
30 March, 2010 (30.03.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050095

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAUVIEL A et al., Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene, J. Biol. Chem., 1996, Vol.271, No.40, pp.24824-24829	1-4
A	TIMCHENKO NA et al., CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein, Genes Dev., 1996, Vol.10, No.7, pp.804-815	1-4
A	TAKIGUCHI M, The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs, Int. J. Exp. Pathol., 1998, Vol.79, No.6, pp.369-391	1-4
A	SCHAEFER L et al., Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction, J. Biol. Chem., 2008, Vol.283, No.31, pp.21305-20309	1-4
A	IOZZO RV et al., Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma, Experientia, 1993, Vol.49, No.5, pp.447-455	1-4
A	SANTRA M et al., Structural and functional characterization of the human decorin gene promoter, J. Biol. Chem., 1994, Vol.269, No.1, pp.579-587	1-4
A	DEMOOR-FOSSARD M et al., A composite element binding the vitamin D receptor and the retinoic X receptor alpha mediates the transforming growth factor-beta inhibition of decorin gene expression in articular chondrocytes, J. Biol. Chem., 2001, Vol.276, No.40, pp.36983-36992	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050095

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

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

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

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

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

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050095

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

A common technical feature between the invention according to claim 1 and the inventions according to claims 5-7 resides in DNA that is a region contained in a human decorin gene promoter and can interact with a transcription regulation factor. However, the DNA is known, as disclosed in Documents 1 and 2 shown below. The DNA depicted in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 recited in claim 1 and the DNA depicted in SEQ ID NO:3 recited in claim 5 share no common important structural factor. Therefore, the above-mentioned common technical feature cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Consequently, the inventions according to claims 1-7 cannot be regarded as being so linked to one another as to form a single general inventive concept through a common technical feature.

Then, marshaling the claims of the present international application based on the technical features thereof, the claims include two groups of inventions classified as follows: (1) claims 1-4; and (2) claims 5-7.

Document 1: HE F et al., Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, vol. 372, no. 4, pp. 746-751

Document 2: MAUVIEL A et al., Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene, J. Biol. Chem., 1996, vol. 271, no. 40, pp. 24824-24829

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CORTES-CANTELI M et al., Microarray analysis supports a role for ccaat/enhancer-binding protein-beta in brain injury, J. Biol. Chem., 2004, Vol.279, No.14, pp.14409-14417	1-4
Y	黒岩波子ほか, C/E B Pファミリーの細胞増殖抑制能: 安定導入株を用いた解析, 生化学, 2001, Vol.73, No.8, p.716	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 3 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 3 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

西村 亜希子

4 B

3 4 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HE F et al., Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol.372, No. 4, pp.746-751	1-4
Y	MAUVIEL A et al., Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene, J. Biol. Chem., 1996, Vol.271, No. 40, pp.24824-24829	1-4
A	TIMCHENKO NA et al., CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein, Genes Dev., 1996, Vol.10, No. 7, pp. 804-815	1-4
A	TAKIGUCHI M, The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs, Int. J. Exp. Pathol., 1998, Vol.79, No. 6, pp.369-391	1-4
A	SCHAEFER L et al., Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction, J. Biol. Chem., 2008, Vol.283, No. 31, pp.21305-20309	1-4
A	IOZZO RV et al., Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma, Experientia, 1993, Vol.49, No. 5, pp.447-455	1-4
A	SANTRA M et al., Structural and functional characterization of the human decorin gene promoter, J. Biol. Chem., 1994, Vol.269, No. 1, pp.579-587	1-4
A	DEMOOR-FOSSARD M et al., A composite element binding the vitamin D receptor and the retinoic X receptor alpha mediates the transforming growth factor-beta inhibition of decorin gene expression in articular chondrocytes, J. Biol. Chem., 2001, Vol.276, No. 40, pp.36983-36992	1-4

請求項 1 に係る発明と、請求項 5－7 に係る発明は、ヒトデコリン遺伝子プロモーターにおける、転写制御因子との相互作用領域である DNA を共通の技術的特徴としているが、このような DNA は、下記文献 1, 2 に記載のように公知であるし、そもそも、請求項 1 に記載の配列番号 1 もしくは配列番号 2 に示される DNA と、請求項 5 に記載の配列番号 3 に示される DNA は重要な構造要素が共通していないから、前記共通の技術的特徴は PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味における特別な技術的特徴とはいえない。

よって、請求項 1－7 に係る発明は、共通の技術的特徴を有することにより、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。

そこで、技術的特徴に基づき整理すると、この国際出願の請求の範囲は (1) 請求項 1－4 (2) 請求項 5－7 とに区分される 2 発明を包含するものである。

文献 1 : HE F et al., Upregulation of decorin by FXR in vascular smooth muscle cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008, Vol.372, No.4, pp.746-751

文献 2 : MAUVIEL A et al., Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP-1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene, J. Biol. Chem., 1996, Vol.271, No.40, pp.24824-24829

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（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 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項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1 - 4

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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