(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5873652号
(P5873652)

(45)発行日　平成28年3月1日(2016.3.1)　(24)登録日　平成28年1月22日(2016.1.22)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	ZNAZ
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 5/077	(2010.01)	C12N	5/077	

請求項の数 7　(全 21 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-121788 (P2011-121788)
(22)出願日　平成23年5月31日 (2011.5.31)
(65)公開番号　特開2012-244979 (P2012-244979A)
(43)公開日　平成24年12月13日 (2012.12.13)
審査請求日　平成26年5月26日 (2014.5.26)

(73)特許権者　504132272
国立大学法人京都大学
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷　龍
(72)発明者　妻木　範行
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内
(72)発明者　竹森　洋
大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目６番８号
独立行政法人医薬基盤研究所内

審査官　小金井　悟

最終頁に続く

(54)【発明の名称】軟骨疾患治療薬のスクリーニング方法および軟骨疾患治療用改変軟骨細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質のスクリーニング方法であって、塩誘導性キナーゼ３を使用し、塩誘導性キナーゼ３の発現または機能を測定する工程、および塩誘導性キナーゼ３の発現または機能を抑制する物質を選択する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項２】

前記測定する工程が、塩誘導性キナーゼ３の基質の活性化レベルの測定により行われる、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記塩誘導性キナーゼ３の基質の活性化レベルの測定が、塩誘導性キナーゼ３の基質により活性化されるプロモーターに結合したレポーター遺伝子、塩誘導性キナーゼ３発現ベクターおよび塩誘導性キナーゼ３の基質の発現ベクターを導入した細胞において、当該レポーター遺伝子産物量を測定することによって行われる、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

前記塩誘導性キナーゼ３の基質により活性化されるプロモーターが５×ＧＡＬ４であり、前記塩誘導性キナーゼ３の基質にはＧＡＬ４が融合されている、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

前記塩誘導性キナーゼ３の基質がＴＯＲＣまたはＴＯＲＣ２である、請求項２～４のい

ずれかに記載の方法。
【請求項６】
軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質が、変形性関節症の治療薬、軟骨損傷の治療薬および軟骨形成異常症の治療薬から成る群より選択される治療薬である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質が、関節軟骨を肥厚化させる物質である、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、軟骨疾患治療薬のスクリーニング方法および軟骨疾患治療用改変軟骨細胞に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
変形性関節症（osteoarthritis：ＯＡ）は、関節軟骨の変性と軟骨下骨の増殖および再形成に特徴付けられる進行性の変性関節疾患である。症状は、硬直、動作制限、疼痛などであり、加齢とともに発生頻度が増加する。しかしながら、軟骨は修復能に乏しいため、変形性関節症の根治方法はなく、運動制限と鎮痛剤で疼痛をコントロールすることが治療の現状である。症状が進行し末期に至った場合には、変性した関節軟骨を切除して金属製の覆いをかぶせる人工関節置換術が行われている。
【０００３】
軟骨修復促進剤の開発をめざして、軟骨細胞の増殖を促進する化合物やタンパク質が探索されているが、実際に軟骨を組織として増大させることができるものは骨形成因子（ＢＭＰ）のみである。しかしＢＭＰは、軟骨を増大させた後に、軟骨細胞を肥大化させて骨に置換する作用を有しており、関節軟骨の治療に用いるには問題がある。近年、関節軟骨の変性に軟骨細胞の肥大化促進がかかわることが指摘され、軟骨細胞の肥大化を防ぐことが変形性関節症の治療における一つの主要なターゲットになっている。これまで明らかにされたターゲットとしては、Ｈｅｄｇｅｈｏｇ（非特許文献１）、Ｈｉｆ－２ａｌｐｈａ（非特許文献２、３）がある。また、一過性にｂｅｔａ－ｃａｔｅｎｉｎシグナルを活性化させると関節軟骨が肥厚することが報告されている（非特許文献４）。
【０００４】
また、外傷や血行障害などによる関節軟骨損傷や成長軟骨損傷に対して、幹細胞を利用した細胞移植によって損傷軟骨の再生医療が研究されている。しかし、幹細胞から誘導した軟骨様細胞は肥大化する傾向にあり、問題となっている（非特許文献５）。
【０００５】
軟骨形成異常症（chondrodysplasia）は骨系統疾患（skeletal dysplasia）に含まれ、軟骨原基および成長軟骨の先天性の障害により小人症や骨格の成長障害や変形がおきる種々疾患の総称である。軟骨形成異常症は、軟骨細胞分化にかかわる種々の遺伝子の変異によって引き起こされることが多い（非特許文献６）。その病態には軟骨細胞の分化の異常がかかわっている。すなわち、軟骨細胞分化が亢進している場合と、抑制されている場合がある。軟骨細胞の肥大化は、軟骨細胞の分化のひとつである。軟骨形成異常症に対する治療薬として、軟骨細胞分化を制御できる薬剤の開発が望まれている。また、軟骨形成異常症のいくつかの成長軟骨に対して、軟骨細胞を移植して成長を正常化させる治療が考えられる。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】Lin AC, et al. Nat Med. 2009; 15:1421-1425.
【非特許文献２】Saito T, et al. Nat Med. 2010; 16:678-686.

【非特許文献３】Yang S, et al. Nat Med. 2010; 16:687-693.
【非特許文献４】Yuasa T, et al. Am J Pathol. 2009; 175:1993-2003.
【非特許文献５】Pelttari K, et al. Arthritis Rheum. 2006; 54:3254-3266.
【非特許文献６】Warman ML, et al. Am J Med Genet A. 2011 May; 155(5):943-68.

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明は、軟骨細胞の分化または肥大化に関与する分子を見出し、軟骨疾患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。また、軟骨疾患の治療および病態の解析に利用可能な改変軟骨細胞を提供することを課題とする。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明は、上記課題を解決するために、以下の各発明を包含する。
［１］軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質のスクリーニング方法であって、塩誘導性キナーゼ３を使用することを特徴とする方法。
［２］軟骨量が減少する病気および／または軟骨の成長が障害される病気の改善のために利用する、塩誘導性キナーゼ３の発現もしくは機能が抑制または増強されている改変軟骨細胞。
【発明の効果】
【０００９】
本発明のスクリーニング方法によれば、軟骨量が減少する病気や軟骨の成長が障害される病気の治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。また、本発明の改変軟骨細胞は、軟骨量が減少する病気や軟骨の成長が障害される病気の改善に有用である。さらに、本発明の改変軟骨細胞は、軟骨細胞分化異常を再現した疾患モデル細胞として、軟骨疾患の病態解明や薬剤のスクリーニングに用いることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】（ａ）はＳＩＫ３ノックアウトマウス作製用のターゲティングベクター、ＳＩＫ３遺伝子の野生型アレルおよび変異アレルの構造を示した図であり、（ｂ）は相同組換えが生じたＥＳ細胞と生じていないＥＳ細胞のサザンブロット解析の結果を示す図であり、（ｃ）は変異アレルを持つヘテロ接合体マウス同士の交配で得られた出生児の遺伝子型をＰＣＲにより確認した結果を示す図である。
【図２】ＳＩＫ３遺伝子の変異アレルを持つヘテロ接合体マウス同士の交配で得られた１４．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像であり、（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ノックアウトマウスの組織染色像である。
【図３】ＳＩＫ３遺伝子の変異アレルを持つヘテロ接合体マウス同士の交配で得られた１８．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像であり、（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ノックアウトマウスの組織染色像である。
【図４】ＳＩＫ３遺伝子の変異アレルを持つヘテロ接合体マウス同士の交配で得られた３月齢マウスの膝関節を含む切片の組織染色像であり、（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ノックアウトマウスの組織染色像である。
【図５】ＳＩＫ３遺伝子の変異アレルを持つヘテロ接合体マウスとＳＩＫ３遺伝子トランスジェニックマウスの交配で得られた１５．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像であり、（ａ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３＋／＋の遺伝子型を持つマウス、（ｂ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３＋／－の遺伝子型を持つマウス、（ｃ）はＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウス、（ｄ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウスの組織染色像である。
【図６】生後３月齢、６月齢および８月齢のＳＩＫ３遺伝子トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの膝関節を含む切片の組織染色像である。

【図７】実施例１のスクリーニング系の模式図である。
【図８】実施例１のスクリーニング系を用いて被験物質をスクリーニングした結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
本発明者らは、塩誘導性キナーゼ３（salt-inducible kinase 3、以下「ＳＩＫ３」という）のノックアウトマウスを作製したところ、成長軟骨細胞の肥大化が著しく抑制され、関節軟骨量が増大し、関節軟骨組織が肥厚化していることを見出した。このような表現型はＳＩＫ２のノックアウトマウスには認められていない（Pigment Cell Melanoma Res. 2010:23 809?819）。そこで、この表現型がＳＩＫ３の欠失に基づくものであることを確認するために、ＳＩＫ３遺伝子の変異アレルを持つヘテロ接合体マウスとＳＩＫ３遺伝子のトランスジェニックマウスを交配してレスキュー試験を行ったところ、ＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つＦ１マウスは野生型マウスと同様の表現型を示した。これらの結果から、ＳＩＫ３の発現または機能を抑制すれば軟骨細胞の肥大化を抑制し、軟骨量を増大できることが実証された。
【００１２】
また、本発明者らは、ＳＩＫ３遺伝子のトランスジェニックマウスの膝関節の成長軟骨板が野生型マウスより早い時期に消失することを見出した。この知見から、ＳＩＫ３の発現または機能を亢進させれば、軟骨細胞の肥大化を促進し、軟骨細胞の骨化を加速できるものと考えられた。
これらの知見から、ＳＩＫ３を使用すれば、軟骨疾患の治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができることが明らかとなった。また、ＳＩＫ３の発現もしくは機能が抑制されている軟骨細胞、ＳＩＫ３の発現もしくは機能が増強されている軟骨細胞は、軟骨疾患の改善または治療に有用であることが明らかとなった。
【００１３】
〔スクリーニング方法〕
本発明は、ＳＩＫ３を使用して軟骨疾患の治療薬として有用な物質をスクリーニングする方法を提供する。より詳細には、ＳＩＫ３を使用して軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供する。軟骨細胞分化を正常化させる作用には、軟骨細胞分化のスピードが正常より抑制されている場合に、これを亢進して軟骨細胞分化を正常化させる作用、および、軟骨細胞分化のスピードが正常より亢進している場合に、これを抑制して軟骨細胞分化を正常化させる作用が含まれる。
ＳＩＫ３を使用して軟骨量を増大させる作用を有する物質、および、軟骨細胞分化のスピードを抑制する作用を有する物質は、ＳＩＫ３の発現または機能を抑制する被験物質を選択することによりスクリーニングすることができる。一方、軟骨細胞分化のスピードを亢進する作用を有する物質は、ＳＩＫ３の発現または機能を亢進する被験物質を選択することによりスクリーニングすることができる。
【００１４】
ここで、ＳＩＫについて説明する。ＳＩＫ１（塩誘導性キナーゼ１）は血圧調節因子の候補として高塩食負荷したラットの副腎皮質から単離したタンパク質リン酸化酵素である。ＳＩＫ１に似た別のタンパク質リン酸化酵素が２種存在し、ＳＩＫ２、ＳＩＫ３とそれぞれ命名されている。（以後、ＳＩＫ１／２／３に共通する場合はＳＩＫとのみ記載する。）ＳＩＫシグナルカスケードの顕著な役割はｃＡＭＰで活性化される転写因子ＣＲＥＢのフィードバック的な抑制である（JBC 2002:277 15629-37, Cell 2004:11461-76）。ＣＲＥＢはＴＯＲＣ（transducer of regulated CREB activity）と名付けられた転写共役因子が存在しないと転写能を示さない。ＳＩＫはＴＯＲＣをリン酸化依存的に失活させることでＣＲＥＢを抑制する。生理的な役割としては、ＳＩＫ１およびＳＩＫ２は肝臓におけるＣＲＥＢ依存的糖新生の抑制（Nature 2005:4371109-11）、ＳＩＫ２は膵臓でのＣＲＥＢ依存的インスリン分泌の抑制（Cell 2004:11461-76）、脳におけるＣＲＥＢ依存的な

神経栄養因子（ＢＤＮＦ）の発現抑制（Neuron 2011:69 106-119）などが知られている。一方、ＳＩＫ１はクラス２－ＨＤＡＣ（ヒストンデアセチラーゼ）を抑制することで、ＭＥＦ２Ｃ等に依存する転写を亢進させること（Nat Med 2007:13 597-603）が報告されている。しかし、ＳＩＫ３の生理的意義は明らかにされておらず、ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスの解析が待たれていた。

【００１５】

本発明のスクリーニング方法のターゲットとなるＳＩＫ３は、どのような生物由来のＳＩＫ３でもよく、特に限定されないが、哺乳動物のＳＩＫ３が好ましい。哺乳動物としては、ヒト、チンパンジー、サル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、モルモットなどが好ましく、より好ましくはヒトである。各種動物のＳＩＫ３をコードする遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の情報は、例えば表１に示すアクセッション番号で公知のデータベース（ＤＤＢＪ／ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ等）から取得することができる。

【００１６】

【表１】

	塩基配列	アミノ酸配列
ヒト	NM_025164	NP_079440
チンパンジー	XM_508771	XP_508771
イヌ	XM_536563	XP_536563
ウシ	XM_582999	XP_582999
マウス	NM_027498	NP_081774

【００１７】

本発明のスクリーニング方法を適用する被験物質としては、例えば、例えば、核酸、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞培養上清、植物抽出液、哺乳動物の組織抽出液、血漿等が挙げられる。被験物質は、新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。これら被験物質は塩を形成していてもよく、被験物質の塩としては、生理学的に許容される酸や塩基との塩が用いられる。

【００１８】

本発明のスクリーニング方法によって得られる物質は、種々の軟骨疾患の治療薬の有効成分として有用である。軟骨疾患としては、例えば、変形性関節症、軟骨損傷、軟骨形成異常症が挙げられる。軟骨形成異常症には、軟骨無形成症、軟骨形成不全症、軟骨異栄養症、軟骨発育不全症、内軟骨腫症などが含まれる。これらのうち、変形性関節症および軟骨損傷は、軟骨量が減少する病気である。また、軟骨形成異常症は軟骨の成長が障害される病気である。軟骨形成異常症の中で、例えば軟骨無形成症は、軟骨細胞の分化が亢進していると考えられる（Deng C, et al. Cell. 1996 Mar 22; 84(6):911-21、Minina E, et al. Dev Cell. 2002 Sep; 3(3):439-49、Dailey L, et al. J Cell Biol. 2003 Jun 23; 161(6):1053-66）。また、軟骨形成異常症の中で、例えばＪａｎｓｅｎ－ｔｙｐｅ ｍｅｔａｐｈｙｓｅａｌ ｃｈｏｎｄｒｏｄｙｓｐｌａｓｉａは、軟骨細胞の分化が抑制されていると考えられる（Schipani E, et al. Science. 1995 Apr 7; 268(5207):98-100）。

【００１９】

本発明のスクリーニング方法の第１の実施形態は、被験物質と内因性のＳＩＫ３を発現している細胞とを接触させる工程と、前記細胞のＳＩＫ３のタンパク質量またはｍＲＮＡ量を測定する工程と、被験物質依存的なＳＩＫ３のタンパク質またはｍＲＮＡ量の変化を分析する工程とを含むスクリーニング方法である。本実施形態のスクリーニング方法により、ＳＩＫ３の発現を抑制する物質またはＳＩＫ３の発現を亢進する物質を選択することができる。内因性のＳＩＫ３を発現している細胞は、内因性のＳＩＫ３を発現している限り特に限定されず、生体内の細胞でもよく、培養細胞でもよい。実施の簡便さの点で培養

細胞が好ましい。培養細胞は、初代培養細胞でもよく、細胞株でもよい。内因性のＳＩＫ３を発現している細胞株として、具体的には、例えば、ＨｅｐＧ２、ＣＯＳ－７、ＡＴＤＣ５などが挙げられ、これらはいずれも本発明のスクリーニング方法の第１の実施形態に好適に用いることができる。

【００２０】

被験物質と内因性のＳＩＫ３を発現している細胞とを接触させる方法は、被験物質と細胞が接触できる方法であればどのような方法でもよく、特に限定されない。例えば、培養細胞を用いる場合には、培地に被験物質を添加する方法などが挙げられる。例えば、生体において被験物質と細胞とを接触させる場合には、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与等の全身投与、標的臓器や標的組織への局所投与などが挙げられる。また、被験物質を接触させない対照群を設けることが好ましい。

【００２１】

細胞のＳＩＫ３タンパク質量は、公知の方法で細胞からタンパク質を抽出し、公知のタンパク質量測定方法を用いて定量することができる。公知のタンパク質量測定方法としては、例えば、ウエスタンブロット法、ＥＩＡ法、ＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法、タンパク質測定試薬を用いる方法などが挙げられる。細胞のＳＩＫ３ｍＲＮＡ量は、公知の方法で細胞からＲＮＡを抽出し、公知のｍＲＮＡ量測定方法を用いて定量することができる。公知のｍＲＮＡ量測定方法としては、ノーザンブロット法、ＲＴ－ＰＣＲ法、定量ＲＴ－ＰＣＲ法、ＲＮａｓｅプロテクションアッセイなどが挙げられる。

【００２２】

被験物質依存的なＳＩＫ３のタンパク質量またはｍＲＮＡ量の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群におけるＳＩＫ３のタンパク質量またはｍＲＮＡ量と比較して、被験物質を接触させた場合にＳＩＫ３のタンパク質量またはｍＲＮＡ量が減少または増加していれば、当該被験物質を目的物質として選択することができる。被験物質がＳＩＫ３のタンパク質量またはｍＲＮＡ量を減少または増加させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない細胞のタンパク質量またはｍＲＮＡ量と比較して５０％以下または１５０％以上にさせる被験物質が好ましく、２５％以下または１７５％以上にさせる被験物質がより好ましい。

【００２３】

本発明のスクリーニング方法の第２の実施形態は、被験物質とＳＩＫ３のプロモーター活性を確認可能な細胞とを接触させる工程と、前記細胞のＳＩＫ３のプロモーター活性を測定する工程と、被験物質依存的なＳＩＫ３のプロモーター活性の変化を分析する工程を含むスクリーニング方法である。本実施形態のスクリーニング方法により、ＳＩＫ３の発現を抑制する物質またはＳＩＫ３の発現を亢進する物質を選択することができる。ＳＩＫ３のプロモーター活性を確認可能な細胞としては、例えば、ＳＩＫ３のプロモーター活性を有するＤＮＡ断片の下流にレポーター遺伝子を融合したベクターが導入された細胞が挙げられる。宿主細胞は特に限定されないが、例えば、ＨＥＫ２９３、ＨｅｐＧ２、ＣＯＳ－７、ＡＴＤＣ５などが挙げられる。

【００２４】

ヒトＳＩＫ３遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を配列番号１に示した。また、マウスＳＩＫ３遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を配列番号２に示した。ＳＩＫ３のプロモーター活性を有するＤＮＡ断片として、配列番号１で表される塩基配列と同一または実質的に同一な塩基配列を有するＤＮＡ断片、および配列番号２で表される塩基配列と同一または実質的に同一な塩基配列を有するＤＮＡ断片を好適に用いることができる。ＳＩＫ３のプロモーター活性を有するＤＮＡ断片はこれらに限定されるものではなく、他の生物由来のＳＩＫ３遺伝子のプロモーター領域を有するＤＮＡ断片を用いてもよい。

配列番号１または２で表される塩基配列と実質的に同一な塩基配列を有するＤＮＡ断片としては、例えば、配列番号１または２で表される塩基配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、さらに好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性がある塩基配列を有し、配列

番号１または２で表される塩基配列を有するＤＮＡ断片と同質のプロモーター活性を有するＤＮＡ断片であればどのようなものでもよい。

【００２５】

レポーター遺伝子は、一般に用いられているものであれば特に限定されないが、安定かつ活性の定量が容易なものが好ましい。例えば、ルシフェラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）等をコードする遺伝子が挙げられる。

【００２６】

被験物質とＳＩＫ３のプロモーター活性を確認可能な細胞とを接触させる方法は、被験物質と細胞が接触できる方法であればどのような方法でもよく、特に限定されない。例えば、培地に被験物質を添加する方法などが挙げられる。また、被験物質を接触させない対照群を設けることが好ましい。

【００２７】

ＳＩＫ３のプロモーター活性は、レポーター遺伝子の発現量により測定することができる。レポーター遺伝子の発現量は、レポーター遺伝子がコードするタンパク質（レポーター遺伝子産物）に応じて適宜選択される。例えば、レポーター遺伝子がルシフェラーゼをコードする場合、導入細胞を適当な方法により溶解し、この細胞溶解液の上清中に基質となるルシフェリンを添加した後、市販の検出器を用いて発光量を測定し、レポーター遺伝子の発現量とする。他のレポーター遺伝子を用いた場合も、公知の方法でレポーター遺伝子産物量を測定することができる。

【００２８】

被験物質依存的なＳＩＫ３のプロモーター活性の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、例えば、被験物質を接触させない対照群におけるＳＩＫ３のプロモーター活性と比較して、被験物質を接触させた場合にＳＩＫ３のプロモーター活性が低下または上昇していれば、当該被験物質を目的物質として選択すれることができる。被験物質がプロモーター活性を低下または上昇させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない細胞のプロモーター活性と比較して５０％以下または１５０％以上にさせる被験物質が好ましく、２５％以下または１７５％以上にさせる被験物質がより好ましい。

【００２９】

本発明のスクリーニング方法の第３の実施形態は、被験物質とＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質とを接触させる工程と、ＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質との結合状態を確認する工程と、被験物質依存的な結合状態の変化を分析する工程を含むスクリーニング方法である。本実施形態のスクリーニング方法により、ＳＩＫ３の機能を抑制する物質またはＳＩＫ３の機能を亢進する物質を選択することができる。ＳＩＫ３の基質は、以下の式（１）で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドであればどのようなものでもよく、例えば、Cell. 2004 119:61-74 や FEBS J. 2006 273:2730-2748 等に記載の方法が利用できる。具体的には、例えば、前述のＴＯＲＣ、ＨＤＡＣ、これらのフラグメント（式（１）で表されるアミノ酸配列を含む）等が挙げられる。

Ｌｅｕ－X_1－Y_1－Y_2－X_2－Ｓｅｒ－X_3－X_4－X_5－Ｌｅｕ　（１）

（式中、X_1、X_2、X_3、X_4およびX_5は、同一または異なって、任意のアミノ酸残基を表し、Y_1はＡｒｇまたはＬｙｓを表し、Y_2はＳｅｒまたはＴｈｒを表す。）

ＳＩＫ３は、式（１）で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質を基質として認識し、これと結合して当該アミノ酸配列の第６位のＳｅｒをリン酸化する。なお、式（１）で表されるアミノ酸配列の第１位のＬｅｕおよび第１０位のＬｅｕは、他の疎水性アミノ酸に置換されていてもよい。

【００３０】

本実施形態のスクリーニング方法に用いるＳＩＫ３は、天然タンパク質および組換えタンパク質のいずれでもよい。ＳＩＫ３は、例えば、内因性のＳＩＫ３を発現している細胞

やＳＩＫ３発現ベクターが導入された細胞の培養上清または細胞抽出物から公知の方法（例えば、アフィニティーカラム）を用いて取得することができる。ＳＩＫ３の基質も天然タンパク質および組換えタンパク質のいずれでもよく、ＳＩＫ３と同様に、公知の方法で取得することができる。例えば、ＴＯＲＣのアミノ酸配列や、ＴＯＲＣをコードする遺伝子の塩基配列は、公知のデータベース（ＤＤＢＪ／ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ等）から取得することができる。なお、ヒトＴＯＲＣ２のアミノ酸配列のアクセッション番号はＮＰ＿８５９０６６であり、これをコードする遺伝子の塩基配列のアクセッション番号はＮＭ＿１８１７１５である。ヒトＴＯＲＣ２のアミノ酸配列（６９３アミノ酸、配列番号３）において、上記式（１）の配列は第１６６～１７５位に存在する。

【００３１】

被験物質とＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質とを接触させる方法は特に限定されない。例えば、ＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質とを含む反応系を準備し、ここに被験物質を添加する方法が挙げられる。接触時間、接触温度は特に限定されず、適宜選択すればよい。また、被験物質を接触させない対照群を設けることが好ましい。

ＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質との結合状態を確認する方法は、特に限定されず、公知の方法を適宜選択して使用することができる。例えば、ＥＬＩＳＡ法を好適に用いることができる。ＥＬＩＳＡ法を用いて本実施形態のスクリーニング方法を実施する場合、ＳＩＫ３およびＳＩＫ３の基質のいずれか一方を固相化し、そこに他方および被験物質を添加して反応させ、ＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質の結合状態を適当な一次抗体および二次抗体を用いて検出すればよい。

【００３２】

被験物質依存的な結合状態の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群におけるＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質との結合状態と比較して、被験物質を接触させた場合にＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質との結合状態が減弱または増強していれば、当該被験物質を目的物質として選択すれることができる。被験物質がＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質との結合状態を減弱または増強させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない場合の両者の結合状態と比較して、結合状態を５０％以下または１５０％以上にさせる被験物質が好ましく、２５％以下または１７５％以上にさせる被験物質がより好ましい。

【００３３】

本発明のスクリーニング方法の第４の実施形態は、被験物質とＳＩＫ３とＳＩＫ３の基質とを接触させる工程と、ＳＩＫ３の基質のリン酸化状態を確認する工程と、被験物質依存的なリン酸化状態の変化を分析する工程を含むスクリーニング方法である。本実施形態のスクリーニング方法により、ＳＩＫ３の機能を抑制する物質またはＳＩＫ３の機能を亢進する物質を選択することができる。

【００３４】

本実施形態では、上記第３の実施形態と同じＳＩＫ３およびＳＩＫ３の基質を使用することができ、同様の方法でこれらと被験物質を接触させることができる。ＳＩＫ３の基質のリン酸化状態を確認する方法は特に限定されず、公知の方法を適宜選択して使用することができる。例えば、リン酸化状態を識別し得る抗体を用いる方法が挙げられる。本実施形態において、ＳＩＫ３の基質として、上記のヒトＴＯＲＣ２を用いる場合には、ヒトＴＯＲＣ２のアミノ酸配列（配列番号３）の第１７１位のセリンがリン酸化されたタンパク質を特異的に認識する抗体を用いればよい。このような抗体は、ヒトＴＯＲＣ２の第１７１位のセリンがリン酸化されたタンパク質またはリン酸化部位を含むペプチドを免疫原として公知のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の作製方法に従って取得することができる。例えば、特許第４５６８０２２号に記載の方法である。

【００３５】

被験物質依存的なリン酸化状態の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群におけるＳＩＫ３の基質のリン酸化状態と比較して、被験物質を接触させた場合にＳＩＫ３の基質のリン酸化状態が減弱または増強していれば当該被

験物質を目的物質として選択すれることができる。被験物質がＳＩＫ３の基質のリン酸化状態を減弱または増強させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない場合のリン酸化状態と比較して、リン酸化状態を５０％以下または１５０％以上にさせる被験物質が好ましく、２５％以下または１７５％以上にさせる被験物質がより好ましい。

【００３６】

本発明のスクリーニング方法の第５の実施形態は、ＳＩＫ３のシグナル伝達を評価し得る系に被験物質を添加する工程と、ＳＩＫ３のシグナル伝達状態を確認する工程と、被験物質依存的なシグナル伝達状態の変化を分析する工程を含むスクリーニング方法である。本実施形態のスクリーニング方法により、ＳＩＫ３の機能を抑制する物質またはＳＩＫ３の機能を亢進する物質を選択することができる。ＳＩＫ３のシグナル伝達を評価し得る系は、ＳＩＫ３活性が正常な場合とＳＩＫ３活性が抑制または亢進された場合において、シグナル伝達の下流の差異を評価できる系であれば特に限定されない。例えば、ＳＩＫ３活性が正常な場合とＳＩＫ３活性が抑制または亢進された場合とで、レポーター遺伝子の発現量が変化するような系を構築して用いることができる。具体的には、例えば、後述する実施例１で使用した系（ＳＩＫ３の基質の発現ベクターと、当該基質のリン酸化により活性化されるプロモーターにレポーター遺伝子が結合したベクターが導入された細胞を用いる系）などが挙げられる。

【００３７】

ＳＩＫ３のシグナル伝達状態を確認する方法は、用いた系に応じて公知の方法を適宜選択すればよい。例えば、レポーター遺伝子を用いる系の場合は、用いたレポーター遺伝子に応じて、公知の方法でレポーター遺伝子産物量を測定すればよい。

被験物質依存的なシグナル伝達状態の変化を分析する方法は特に限定されない。例えば、被験物質を接触させない対照群におけるＳＩＫ３のシグナル伝達状態と比較して、被験物質を接触させた場合にＳＩＫ３の活性が低下または上昇しているとの評価が得られれば、当該被験物質を目的物質として選択すれることができる。被験物質がＳＩＫ３の活性を低下または上昇させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない場合と比較して、５０％以下または１５０％以上にさせる被験物質が好ましく、２５％以下または１７５％以上にさせる被験物質がより好ましい。

【００３８】

〔スクリーニングにより得られた物質を含有する医薬〕

上記、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、軟骨量を増大させる作用および／または軟骨細胞分化を正常化させる作用を有する物質であるので、種々の軟骨疾患の治療薬の有効成分として有用である。軟骨疾患としては、例えば、変形性関節症、軟骨損傷、軟骨形成異常症などが挙げられる。したがって、本発明には、ＳＩＫ３の発現もしくは機能を抑制する物質、または、ＳＩＫ３の発現もしくは機能を増強する物質を有効成分とする軟骨疾患の治療用医薬が含まれる。ここで、「軟骨量を増大させる作用を有する物質」とは、当該物質を正常個体に投与した場合に、当該物質を投与していない正常個体と比較して、同一部位（例えば四肢の関節）の軟骨量を増大させる作用を有する物質を意味する。軟骨量が増大しているか否かを確認する方法は特に限定されないが、例えば、比較する軟骨組織の組織標本を作製して顕微鏡観察することにより行うことができる。

【００３９】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を、軟骨疾患の治療薬として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、経口投与のための製剤としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。これらの製剤は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経口投与のための製剤としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤

は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記ＳＩＫ３の発現または機能を抑制する物質またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０等）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記ＳＩＫ３の発現または機能を抑制する物質またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

【００４０】

〔改変軟骨細胞〕

本発明は、ＳＩＫ３の発現または機能が抑制されている改変軟骨細胞、および、ＳＩＫ３の発現または機能が増強されている改変軟骨細胞を提供する。これらの改変軟骨細胞は、軟骨量が減少する病気および／または軟骨の成長が障害される病気の改善のために利用することができる。軟骨量が減少する病気としては、変形性関節症、軟骨損傷などが挙げられ、軟骨の成長が障害される病気としては、軟骨形成異常症などが挙げられる。具体的には、例えば、ＳＩＫ３の発現または機能が抑制されている改変軟骨細胞は、軟骨細胞の成熟や変性が抑制されて軟骨細胞の形態を維持することができるので、軟骨が減少する疾患の再生医療に用いる細胞として非常に有用である。また、例えば、ＳＩＫ３の発現または機能が抑制または増強されている改変軟骨細胞は、それぞれ、軟骨細胞の分化が亢進または抑制されている軟骨形成異常症の成長軟骨への移植に用いる細胞として非常に有用である。さらに、例えば、ＳＩＫ３の発現または機能が抑制または増強されている改変軟骨細胞は、疾患モデル細胞として、軟骨形成異常症の病態解析や薬剤スクリーニングに用いる細胞として非常に有用である。

【００４１】

本発明のＳＩＫ３の発現または機能が抑制されている改変軟骨細胞は、例えば、軟骨細胞に分化誘導可能な細胞のＳＩＫ３遺伝子を改変してＳＩＫ３遺伝子を不活化し、当該細胞を軟骨細胞に分化誘導することにより取得することができる。また、例えば、軟骨細胞に、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより取得することができる。また、例えば、ＳＩＫ３のノックアウトマウス（参考例１参照）から、軟骨細胞を採取することにより取得することができる。

【００４２】

本発明のＳＩＫ３の発現または機能が増強されている改変軟骨細胞は、例えば、軟骨細胞に分化誘導可能な細胞にＳＩＫ３発現ベクターを導入してＳＩＫ３の発現が増強された細胞を選択し、当該細胞を軟骨細胞に分化誘導することにより取得することができる。また、軟骨細胞にＳＩＫ３発現ベクターを導入してＳＩＫ３の発現が増強された軟骨細胞を選択することにより取得することができる。また、例えば、ＳＩＫ３遺伝子のトランスジェニックマウス（参考例２参照）から、軟骨細胞を採取することにより取得することができる。

【００４３】

本発明のＳＩＫ３の発現または機能が抑制されている改変軟骨細胞の製造方法として、例えば、軟骨細胞に分化誘導可能な細胞のＳＩＫ３遺伝子を改変して、ＳＩＫ３遺伝子を不活化する工程と、得られた細胞を軟骨細胞に分化誘導する工程を含む方法を好適に用いることができる。軟骨細胞に分化誘導可能な細胞としては、例えば幹細胞、未熟な軟骨細胞などが挙げられる。幹細胞は、自己複製能と多分化能を持った細胞を意味し、体性幹細

胞、多能性幹細胞などが含まれる。軟骨細胞に分化誘導可能な体性幹細胞としては、間葉系幹細胞が挙げられる。軟骨細胞に分化誘導可能な体性幹細胞としては、ＥＳ細胞（胚性幹細胞）、ｉＰＳ細胞（人工多能性幹細胞）、ｍＧＳ細胞（多能性生殖幹細胞）、ＥＳ細胞と体細胞との融合細胞などが挙げられる。好ましくは、間葉系幹細胞、ＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞である。

【００４４】

ＳＩＫ３遺伝子を改変する方法は特に限定されず、公知の遺伝子改変方法を適宜選択して用いることができる。例えば、紫外線や変異原物質を用いてランダムに変異を導入する方法、部位特異的に変異を導入する方法、ターゲティングベクターを用いて変異を導入する方法などが挙げられる。ＳＩＫ３遺伝子を破壊するためのターゲティングベクターとしては、例えば、本発明者らがＳＩＫ３のノックアウトマウスを作製する際に使用したターゲティングベクター（図１（ａ）参照）などが挙げられる。ＳＩＫ３遺伝子が不活化していることは、例えば、ＳＩＫ３遺伝子を改変した細胞のＳＩＫ３のｍＲＮＡ量やタンパク質量を測定すること、ＳＩＫ３遺伝子を改変した細胞から単離したＳＩＫ３タンパク質のキナーゼ活性を測定することにより確認することができる。

得られた細胞を軟骨細胞に分化誘導する方法は、例えば、文献 J Clin Invest. 2011 121:640-57. に記載の方法を好適に用いることができる。

【実施例】

【００４５】

以下、参考例および実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【００４６】

〔参考例１：ＳＩＫ３ノックアウトマウスにおける軟骨細胞の分化解析〕

（１）ＳＩＫ３ノックアウトマウス（以下「ＳＩＫ３ＫＯマウス」という）

マウスＳＩＫ３遺伝子の５’側のゲノム配列（５’ａｒｍ）、ｐｇｋプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、マウスＳＩＫ３遺伝子の３’側のゲノム配列（３’ａｒｍ）を順に持つターゲティングベクター（図１（ａ）参照）を、定法に従い作製した。得られたターゲティングベクターを、マウスＥＳ細胞に導入し、Ｇ４１８を含む培地で培養してネオマイシン耐性ＥＳ細胞を得た。得られたネオマイシン耐性ＥＳ細胞からＤＮＡを抽出し、サザンブロット解析により相同組換えクローンを同定した（図１（ｂ）参照）。

得られた相同組換えクローンをＢＤＦ２マウスより得た胚盤胞へマイクロインジェクションし、操作胚を子宮へ移植した。操作胚を移植し妊娠したマウスより、キメラマウスを出産させた。キメラマウスをＣ５７ＢＬ／６マウスと交配することによって、変異アレルを持つヘテロ接合体マウス（以下「ＳＩＫ３ヘテロＫＯマウス」という）を得た。ＳＩＫ３ヘテロＫＯマウス同士の交配によってホモ接合体のＳＩＫ３ＫＯマウスを得た。胎児または出生児の遺伝子型は、尾、耳または皮膚の一部からゲノムＤＮＡを抽出し、ＰＣＲにて確認した。ＰＣＲには、以下の３種類のプライマーを用いた。プライマーａおよびプライマーｂから、野生型アレル由来の２７０ｂｐのバンドが増幅され、プライマーａおよびプライマーｃから、変異アレル由来の４２９ｂｐのバンドが増幅される（図１（ｃ）参照）。なお、ＳＩＫ３ヘテロＫＯマウスは、独立行政法人医薬基盤研究所から入手可能である。

プライマーａ：5'-GCTACCAACTTGGTTACAGTTGCT-3'（配列番号４）

プライマーｂ：5'-AAAACGTCGAGGGTCAGCAGCAACTTCTAA-3'（配列番号５）

プライマーｃ：5'-ACGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCATT-3'（配列番号６）

【００４７】

（２）胎児からの肢芽採取

ＳＩＫ３ヘテロＫＯマウス同士の交尾を確認し、所定の日数経過後に妊娠マウスを二酸化炭素投与により安楽死させ、１４．５日胚（１４．５ｄｐｃ）および交尾後１８．５日胚（１８．５ｄｐｃ）を得た。胎児の肢芽を採取し、ホルマリン固定した。

（３）生後マウスからの四肢採取

生後３月齢のＳＩＫ３ＫＯマウスおよび同腹の野生型（ＷＴ）マウスを二酸化炭素投与により安楽死させ、解剖して四肢を採取し、ホルマリン固定およびＥＤＴＡによる脱灰を行った。

（４）組織標本作製

採取、固定した四肢の１つをパラフィン包埋し、５マイクロメートルの厚みの切片を作製した。切片をスライドガラスに貼付し、脱パラフィン後サフラニンＯ－ファーストグリーン－アイアンヘマトキシリン染色を行った。軟骨マトリックスはサフラニンＯにより赤～オレンジ色に染色される。

【００４８】

（５）標本の観察

得られた標本を光学顕微鏡で観察した。図２（ａ）、（ｂ）に１４．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像を示した。（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ＫＯマウスである。また、図において大腿骨内で濃く染まっているのが肥大化していない軟骨細胞である。図２（ａ）、（ｂ）から明らかなように、１４．５ｄｐｃ胚において、（ａ）野生型マウスでは大腿骨の中央部において軟骨細胞が肥大化し、染まりが薄くなっているが、（ｂ）ＫＯマウスでは大腿骨の中央部の中央部がほとんど薄くなっておらず、軟骨細胞の肥大化が抑制されていることが分かった。

図３（ａ）、（ｂ）に１８．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像を示した。（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ＫＯマウスである。図３（ａ）、（ｂ）から明らかなように、野生型マウス（ａ）では大腿骨の中央部において骨化が進行しているが、ＫＯマウス（ｂ）では未だ軟骨細胞の肥大化が抑制されており、骨化は生じていないことが分かった。

図４（ａ）、（ｂ）に３月齢マウスの膝関節を含む切片の組織染色像を示した。（ａ）は野生型マウス、（ｂ）はＳＩＫ３ＫＯマウスである。図４（ａ）、（ｂ）から明らかなように、（ｂ）ＫＯマウスの関節軟骨は、（ａ）野生型マウスの関節軟骨と比較して、顕著に肥厚していることが分かった。

以上の結果から、ＳＩＫ３ＫＯマウスにおいて軟骨細胞の肥大化の抑制および関節軟骨の肥厚が観察されたことから、ＳＩＫ３は、軟骨細胞肥大化抑制および軟骨肥厚化のターゲットとなる可能性が示唆された。

【００４９】

〔参考例２：ＳＩＫ３トランスジェニックマウスを用いたレスキュー試験〕

（１）ＳＩＫ３トランスジェニックマウス（以下「ＳＩＫ３Ｔｇマウス」という）

軟骨特異的発現をもたらすＸＩ型コラーゲンα２鎖遺伝子（Col11a2）プロモーター／エンハンサー（Tsumaki N, et al. J Cell Biol. 1996; 134:1573-1582.）にヒトＳＩＫ３ｃＤＮＡ（ACCESSION NM_025164）を結合してトランスジーンコンストラクトを作製した。このトランスジーンインサートをベクターバックボーンから切り出して精製した後、マウス受精卵にマイクロインジェクションし、それらを偽妊娠マウスの卵管に移植した。偽妊娠マウスから生まれたマウスからＳＩＫ３Ｔｇマウスを選別し、ＳＩＫ３Ｔｇマウスラインを樹立した。胎児または出生児の遺伝子型は、尾または耳組織よりゲノムＤＮＡを抽出し、ＰＣＲにて確認した。ＰＣＲには、以下のプライマーを用いた。

フォワードプライマー：5'-GATGTCGGATGCAGTTCTC-3'（配列番号７）

リバースプライマー　：5'-ATGTCTGTAATACACGTAGATGGATA-3'（配列番号８）

【００５０】

（２）試験方法

ＳＩＫ３ヘテロＫＯマウスとＳＩＫ３Ｔｇマウスを交配し、交尾確認後１５．５日で妊娠マウスを二酸化炭素投与により安楽死させ、１５．５日胚（１５．５ｄｐｃ）を得た。各胎児の皮膚よりゲノムＤＮＡを抽出し、ＰＣＲにてＳＩＫ３ノックアウトとＳＩＫ３トランスジェニックの遺伝子型を解析した。胎児の肢芽を採取し、ホルマリン固定した。

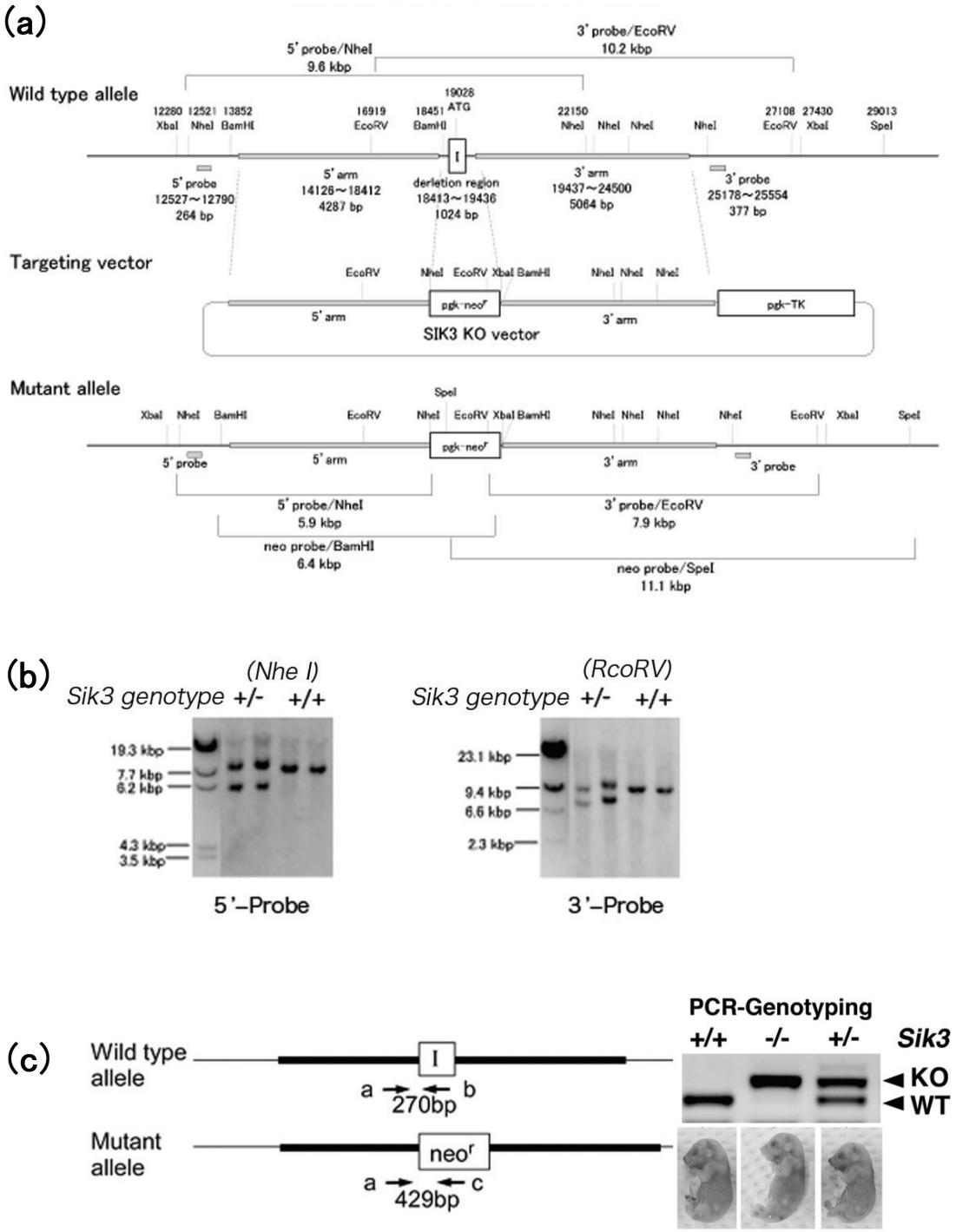
（３）組織標本作製

参考例１と同様の手順で切片を作製し、染色を施した。

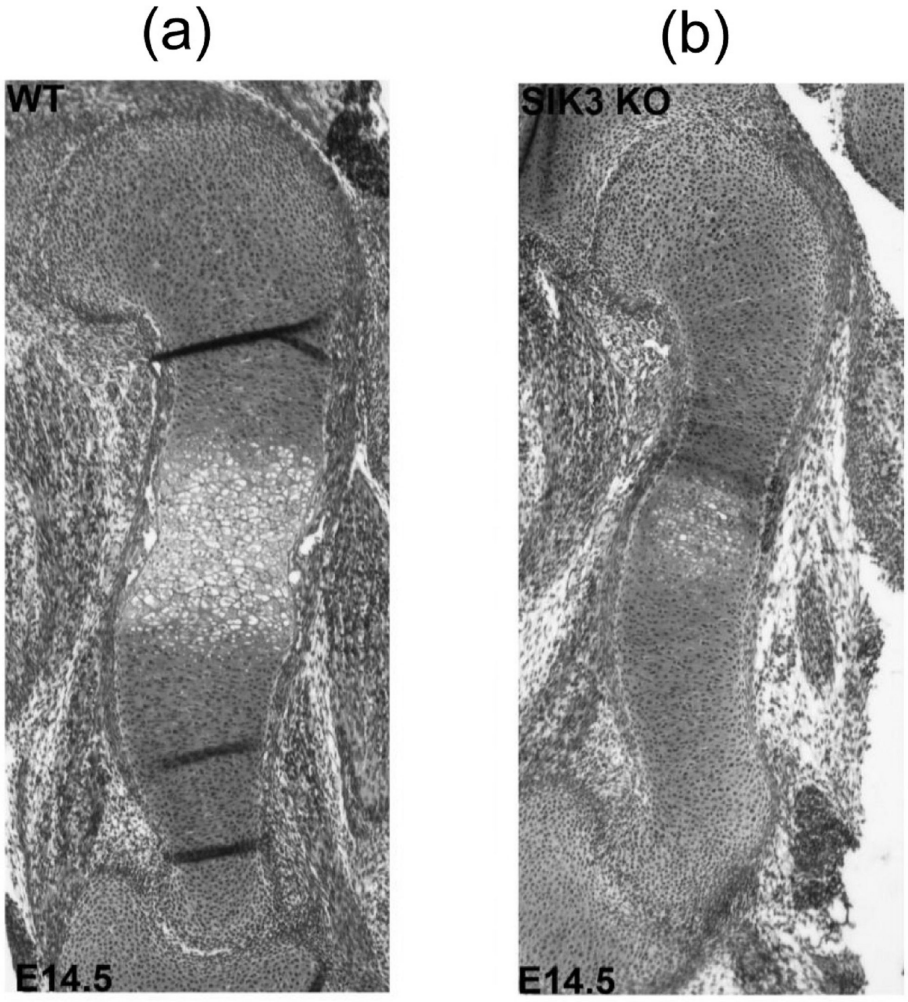
【００５１】
（４）標本の観察
得られた標本を光学顕微鏡で観察した。図５（ａ）～（ｄ）に１５．５ｄｐｃ胚の大腿骨を含む切片の組織染色像を示した。（ａ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３＋／＋の遺伝子型を持つマウス、（ｂ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３＋／－の遺伝子型を持つマウス、（ｃ）はＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウス、（ｄ）はＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウスである。図５から明らかなように、（ｃ）ＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウス（ＳＩＫ３ＫＯマウス）は、参考例１と同様に大腿骨中央部の軟骨細胞の肥大化が抑制されていたが、（ｄ）ＳＩＫ３Ｔｇ、ＳＩＫ３－／－の遺伝子型を持つマウスは、軟骨細胞の肥大化が抑制されていなかった。したがって、ＳＩＫ３の機能がレスキューされていることが明らかとなった。
この結果から、軟骨細胞の肥大化抑制は、ＳＩＫ３の機能欠失に基づくものであることが明らかとなった。
【００５２】
〔参考例３：ＳＩＫ３トランスジェニックマウスにおける膝関節成長軟骨板の観察〕
生後３月齢、６月齢および８月齢のＳＩＫ３Ｔｇマウスおよび野生型マウスを二酸化炭素投与により安楽死させ、解剖して四肢を採取し、ホルマリン固定およびＥＤＴＡによる脱灰を行った。その後、参考例１と同様の手順で切片を作製し、染色を施した。
得られた標本を光学顕微鏡で観察した。図６に各月齢マウスの膝関節を含む切片の組織染色像を示した。左が野生型マウス（図中Ｗｔ）、右がＳＩＫ３Ｔｇマウス（図中ＬＩ－ｈＳＩＫ３Ｔｇ）である。図６から明らかなように、３月齢では野生型マウスおよびＳＩＫ３Ｔｇマウスのどちらにも成長軟骨板が観察されたが、６月齢および８月齢のＳＩＫ３Ｔｇマウスでは、成長軟骨板が消失していた。一方、６月齢および８月齢の野生型マウスでは、成長軟骨板が観察された。
この結果から、ＳＩＫ３の機能亢進は、軟骨細胞の肥大化を促進させ、軟骨細胞の骨化を加速するものと考えられた。
【００５３】
〔実施例１：スクリーニング方法〕
ＨＥＫ２９３細胞に、レポーターベクターＧＡＬ４－Ｌｕｃ（ホタルルシフェラーゼ:ｐＴＡＬ－５ＸＧＡＬ４（１５０ｎｇ））、内因性レポーターベクター（リニーラルシフェラーゼ：ｐＲＬ－Ｉｎｔ（－）（３０ｎｇ））、ＴＯＲＣ発現ベクターの有り無し（ｐＭ－ＴＯＲＣ２またはｐＭのみ（５０ｎｇ））およびＳＩＫ３発現ベクターの有り無し（ｐＴａｒｇｅｔ－ＳＩＫ３またはｐＴａｒｇｅｔのみ（５０ｎｇ）をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００を利用して導入し、２４時間後に被験物質を加えさらに６時間処理した。レポーター活性の測定には、プロメガ社のＤｕａｌ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅアッセイキットを利用した。被験物質には、スタウロスポリン（ＳＴＳ）、ＳＩＫ２阻害剤であるＣｏｍｐｏｕｎｄＣを用いた。コントロールにはＤＭＳＯのみを加えた。当該スクリーニング系の模式図を図６に示した。
【００５４】
結果を図７に示した。図７において縦軸はＴＯＲＣ２の活性を示し、ホタルルシフェラーゼ活性をリニーラルシフェラーゼで割り算した後、ｐＭ－ＴＯＲＣ２の活性をｐＭの倍数で表示してある。白と黒はＳＩＫ３の有り無しの時のＴＯＲＣ２の活性を示しており、白と黒の差が大きければＳＩＫ３の活性が大きく、白と黒の差が小さければＳＩＫ３の活性が阻害されたと判定できる。図７から明らかなように、スタウロスポリン（ＳＴＳ）にＳＩＫ３阻害活性が検出された。
【００５５】
なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として

援用される。

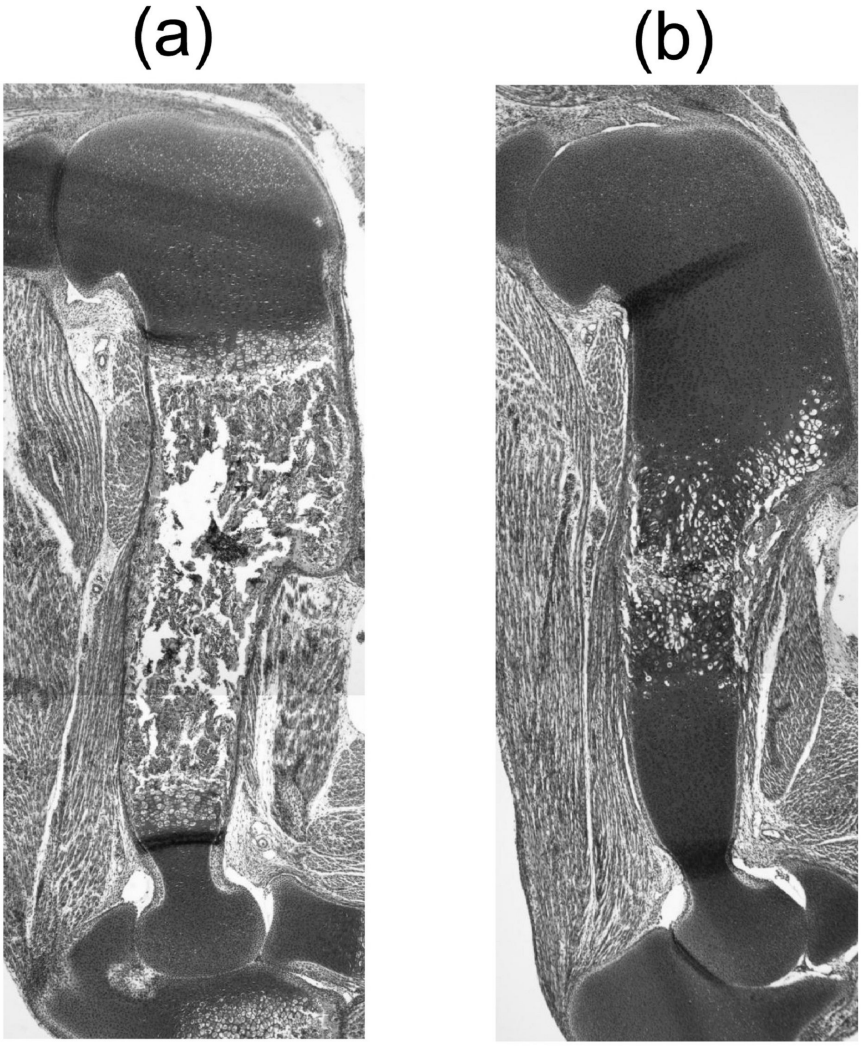
【図１】


(a)
Wild type allele
5' probe/NheI
9.6 kbp
3' probe/EcoRV
10.2 kbp
12280 12521 13852
XbaI NheI BamHI
16919
EcoRV
18451 19028
BamHI ATG
22150
NheI NheI NheI
NheI
27108 27430
EcoRV XbaI
29013
SpeI
5' probe
12527~12790
264 bp
5' arm
14126~18412
4287 bp
derletion region
18413~19436
1024 bp
3' arm
19437~24500
5064 bp
3' probe
25178~25554
377 bp
Targeting vector
EcoRV
NheI EcoRV XbaI BamHI
NheI NheI NheI
pgk-neor
pgk-TK
5' arm
3' arm
SIK3 KO vector
Mutant allele
SpeI
XbaI NheI BamHI
EcoRV
NheI EcoRV XbaI BamHI
NheI NheI NheI
NheI
EcoRV XbaI
SpeI
pgk-neor
5' probe
5' arm
3' arm
3' probe
5' probe/NheI
5.9 kbp
3' probe/EcoRV
7.9 kbp
neo probe/BamHI
6.4 kbp
neo probe/SpeI
11.1 kbp
(b)
(Nhe I)
Sik3 genotype +/- +/+
19.3 kbp
7.7 kbp
6.2 kbp
4.3 kbp
3.5 kbp
5'–Probe
(RcoRV)
Sik3 genotype +/- +/+
23.1 kbp
9.4 kbp
6.6 kbp
2.3 kbp
3'–Probe
(c)
Wild type allele
a
270bp
b
Mutant allele
neor
a
429bp
c
PCR-Genotyping
+/+ -/- +/-
Sik3
KO
WT

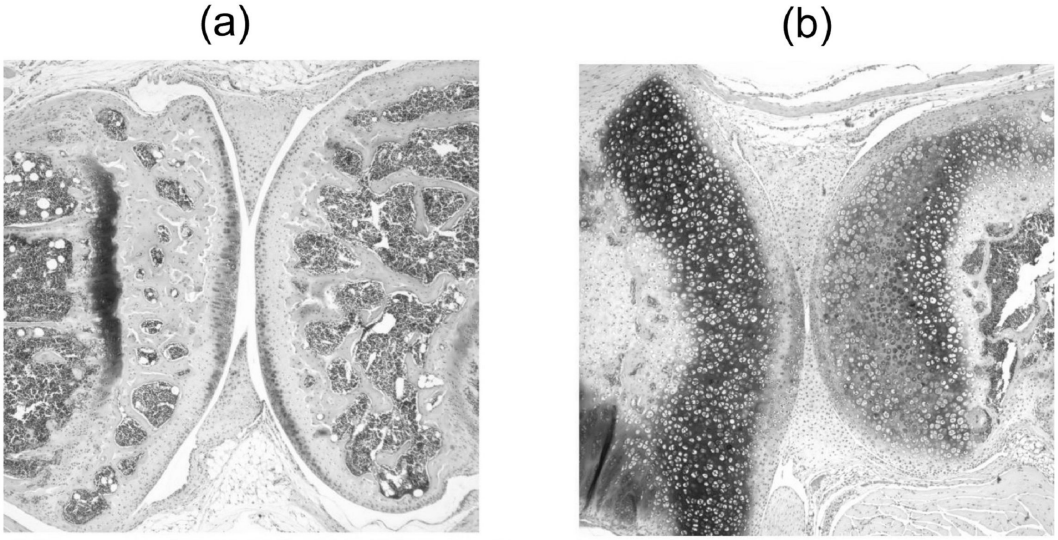
【図２】



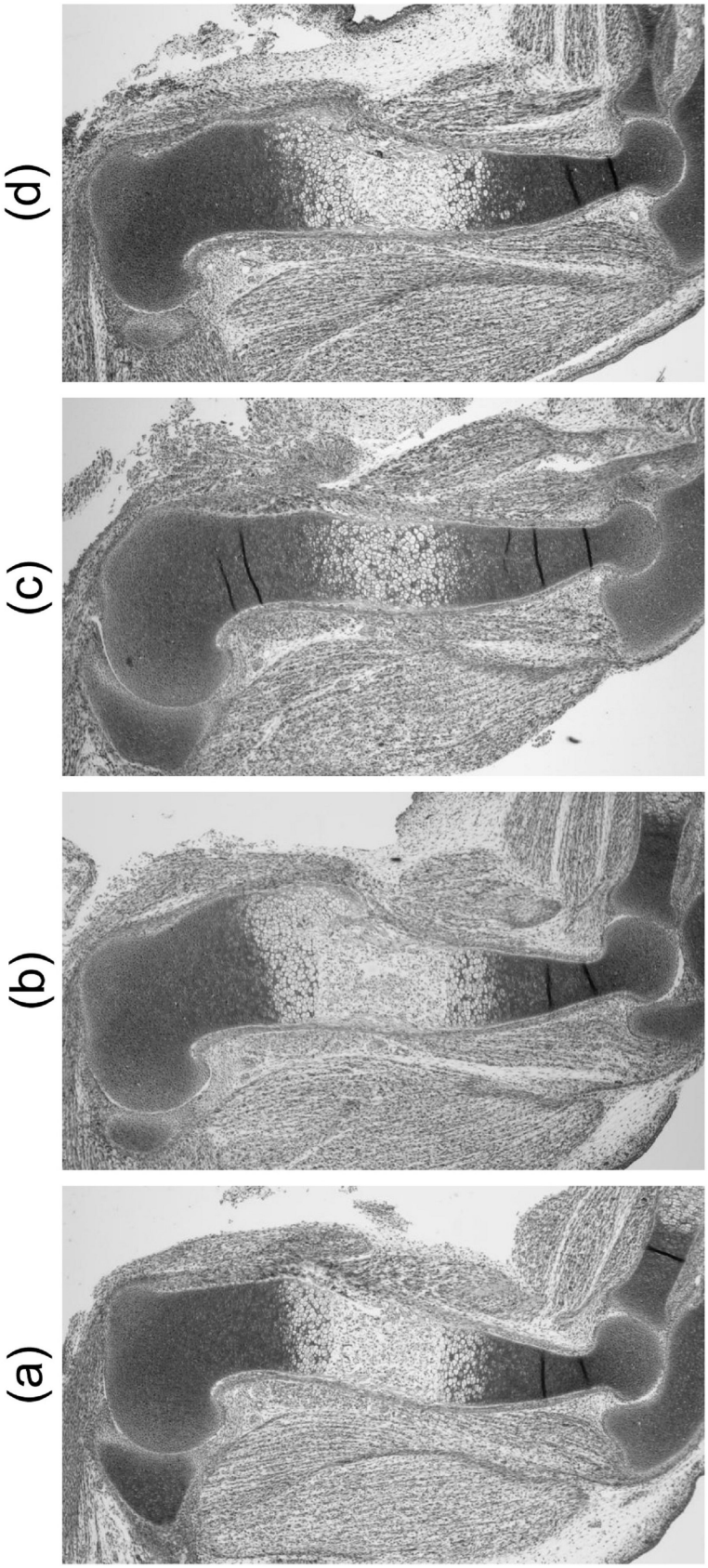
【図３】



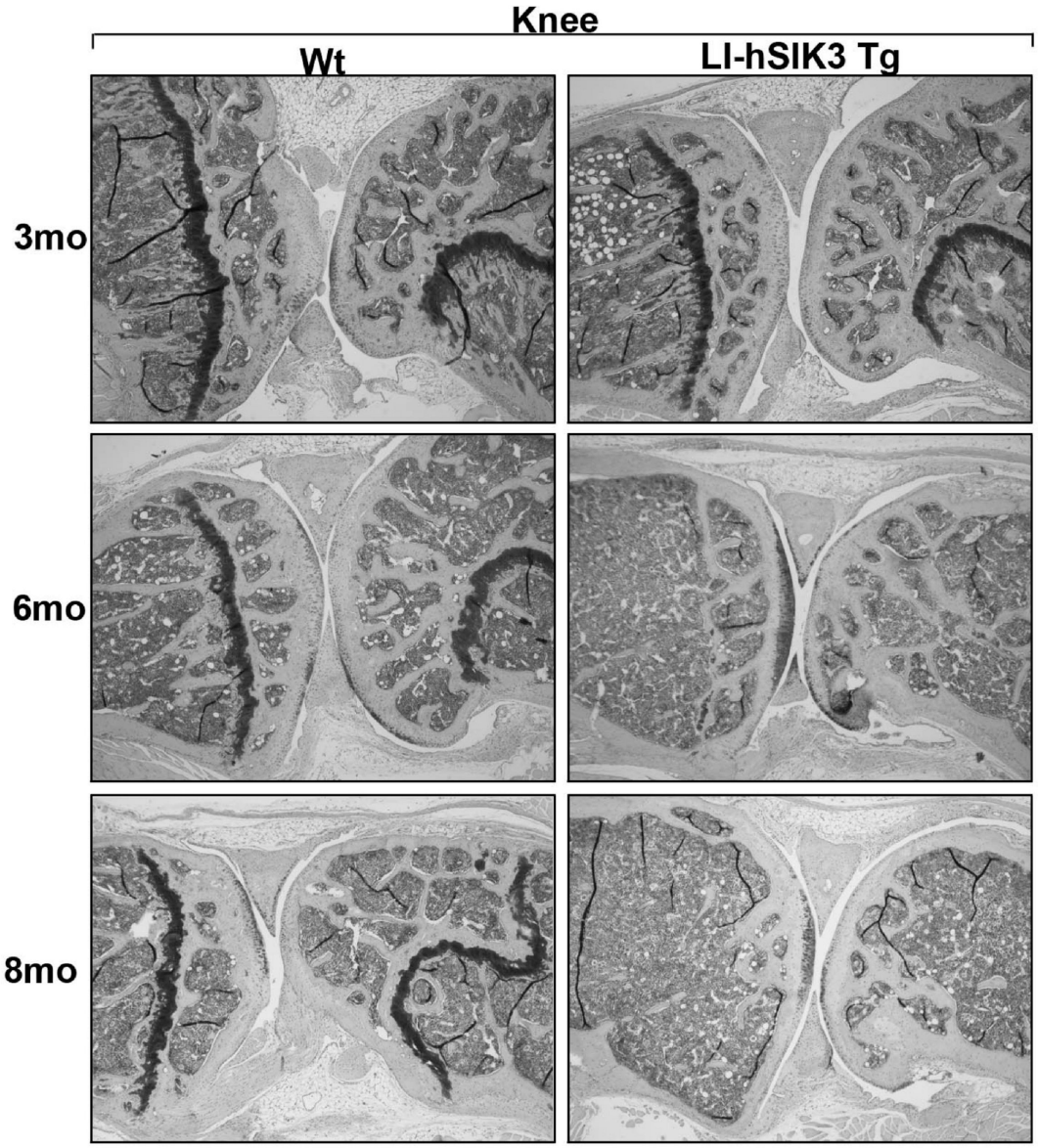
【図４】



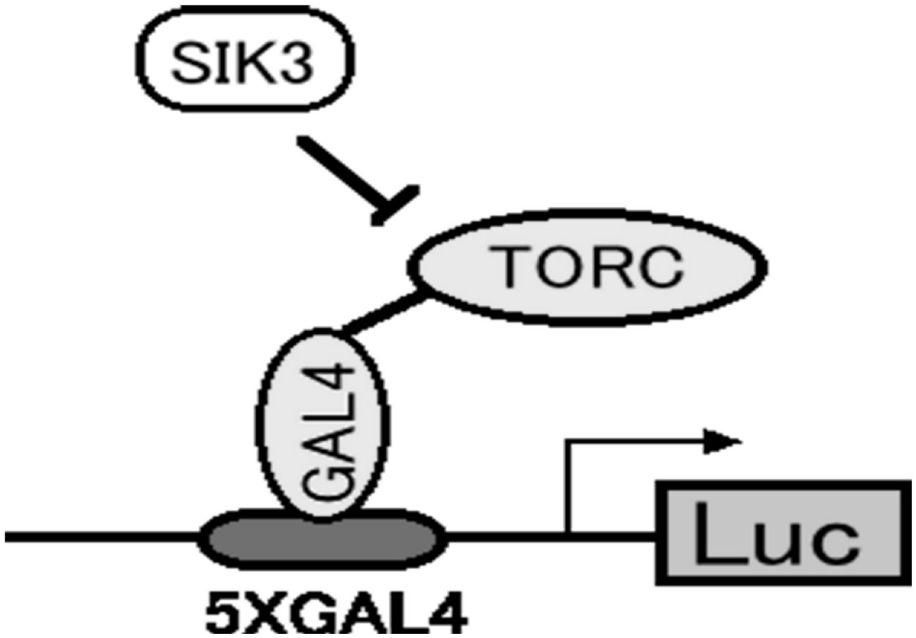
【図５】



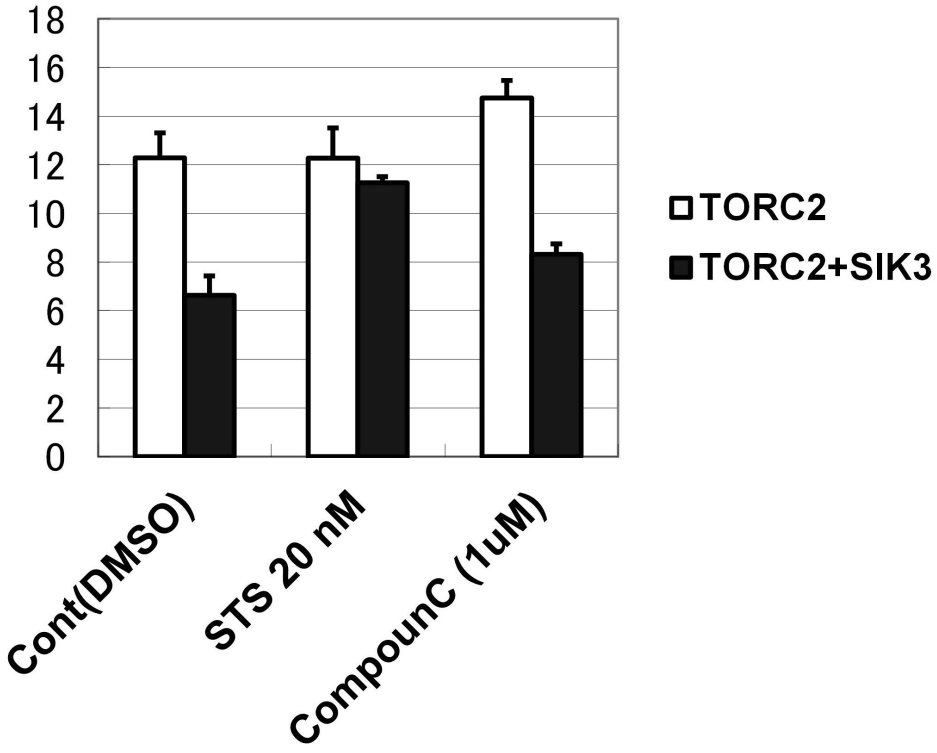
【図６】



【図７】



【図８】



【配列表】

0005873652000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

Ａ６１Ｐ	*19/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/08
Ａ６１Ｋ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/00

(56)参考文献 国際公開第２０１０／０４６４４３（WO，Ａ２）
特開２００２－０５１７８６（ＪＰ，Ａ）
FEBS Ｊ.，２００６年 ６月，Vol.273，No.12，p.2730-2748

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

Ｃ１２Ｑ １／００－ ３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
Ｇｏｏｇｌｅ Ｓｃｈｏｌａｒ