

(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
2012 年 11 月 15 日(15.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/153854 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/062230
- (22) 国際出願日: 2012 年 5 月 11 日(11.05.2012)
- (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 2011-107707 2011 年 5 月 12 日(12.05.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人立命館(The Ritsumeikan Trust) [JP/JP]; 〒6048520 京都府京都市中京区西ノ京柁尾町1番地の7 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西澤 幹雄(NISHIZAWA, Mikio) [JP/JP]; 〒5258577 滋賀県草津市野路東1-1-1 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス 生命科学部内 Shiga (JP). 奥村忠芳(OKUMURA, Tadayoshi) [JP/JP]; 〒5258577 滋賀県草津市野路東1-1-1 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス 総合理工学研究機構内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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(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))

(54) Title: CYTOKINE-CHEMOKINE MODULATOR

(54) 発明の名称: サイトカイン・ケモカインモジュレーター

(57) Abstract: The invention provides novel means for modulating the expression of cytokine-chemokine genes associated with inflammation and infection. Specifically, the invention provides an antisense nucleotide that comprises the sequence complementary to the 3'UTR of the CCL2, CCL20, CX3CL1, IL-23A, CD69, NF- κ B p65, TNF- α , Fam89a, Grk5, phospholipid scramblase 1, Runx1, semaphorin 4A, Steap4, lymphotoxin β Psmb10 or TLR2 gene induced by IL-1 β and that is capable of modulating the expression of the gene; sense oligonucleotide that contains the sequence complementary to the endogenous antisense transcription product containing the sequence complementary to the 3'UTR of the gene and that is capable of modulating the expression of the gene; and an agent that prevents and/or treats inflammatory disease or infection and contains the sense or antisense nucleotide.

(57) 要約: 本発明は、炎症や感染に関連するサイトカイン・ケモカイン遺伝子の新規発現調節手段を提供する。具体的には、IL-1 β により誘導される、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10 または TLR2 遺伝子の 3'UTR に相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るアンチセンスヌクレオチド; 前記遺伝子の 3'UTR に相補的な配列を含む内在性アンチセンス転写物に相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド; 該センスもしくはアンチセンスヌクレオチドを含んでなる、炎症性疾患または感染症の予防および/または治療剤を提供する。

WO 2012/153854 A1

明 細 書

発明の名称： サイトカイン・ケモカインモジュレーター

技術分野

[0001] 本発明は、炎症や感染に関与するサイトカイン・ケモカインのmRNAに相補的であり、かつ該mRNAの安定性を变化させる天然（内在性）アンチセンス転写物に相同な核酸（アンチセンスヌクレオチド）、及びそのサイトカイン・ケモカインmRNA安定性調節作用の利用、並びに、炎症や感染に関与するサイトカイン・ケモカインのmRNAに相補的であり、かつ該mRNAの安定性を变化させる天然（内在性）アンチセンス転写物に相補的な核酸（センスヌクレオチド）、及びそのサイトカイン・ケモカインmRNA安定性調節作用の利用に関する。

背景技術

[0002] 天然（内在性）アンチセンス転写物（Natural Antisense Transcript; 以下、「NAT」ともいう）とは、生物に内在する、mRNAに対して相補的なヌクレオチド配列を持ったRNAであり、具体的には、センス遺伝子をコードするDNA鎖（すなわちmRNAの非鋳型鎖）を鋳型として合成されたRNAである。センス-アンチセンスRNA間には2本鎖形成能があり、例えば、2本鎖RNAはRNA干渉が働く際に必要であること、及びマイクロRNA（miRNA）と呼ばれる小さなRNAによるタンパク質の翻訳制御に2本鎖RNAが関与することなどが知られている。最近の網羅的なcDNA解析により、かなり多くのNATが転写されていることが明らかとなった（非特許文献1、2）。例えば、マウスでは約2,500対（非特許文献3）、ヒトでは約2,600対（非特許文献4）のセンス-アンチセンスRNAペアが存在することが示唆されており、それらの中にはタンパク質をコードしない非翻訳性のNATが多く含まれている。

[0003] NATの生理機能については十分に解明されていないが、これまでの研究から、NATは、mRNAの安定化もしくは不安定化、mRNAからの翻訳抑制など、異なる生理機能を有する多様な制御性RNAのグループに属することがわかってきてい

る（非特許文献5）。

例えば、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）mRNAに相補的なNATは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下で増加してeNOS mRNA量を減少させることが報告されている（非特許文献6）。また、酵母においても、PH084遺伝子のNATはヒストン脱アセチル化を介してmRNAの発現を抑制することが知られている（非特許文献7）。

[0004] 一方、本発明者らは、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）mRNAの3' -非翻訳領域（UTR）に相補的なNATが存在し、このアンチセンスRNAがiNOS mRNAとハイブリダイズすることによって該mRNAが安定化されiNOSの産生量及びNOの合成量が増大すること、該NATに相補的なセンスオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）は、NATのiNOS mRNAへの結合を阻害することにより該mRNAを不安定化し、iNOSの産生及びiNOSによるNO合成を抑制し得ることを報告した（特許文献1及び2、非特許文献8）。また、西澤とその共同研究者らは、インターフェロン（IFN）- α mRNAの核外輸送に重要な、2つのステムループを有する二次構造を形成する領域に相補的なNATが存在し、このアンチセンスRNAがIFN- α mRNAの安定化に寄与しており、センスODNによるNATノックダウンがmRNAの不安定化をもたらすのに対し、アンチセンスRNAの過剰発現により該mRNAが顕著に安定化されることを見出した（特許文献3）。本発明者らはこのセンスODNによりNATを制御する手法を「NAT-targeted REgulation（NATRE）技術」と名づけた。

[0005] ところで、肝細胞において、前炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β （IL-1 β ）に応答して、サイトカインやケモカイン等の炎症や感染に関連する多くの遺伝子が発現するが、IL-1 β により誘導される初期応答遺伝子群からNATが転写されているか否かについてはこれまでに報告がなく、これら炎症/感染関連遺伝子においてセンスODNを用いた発現制御が可能か否かは全く不明のままである。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1 : WO 2007/142303号パンフレット

特許文献2 : WO 2007/142304号パンフレット

特許文献3 : WO 2011/046221号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1 : Cheng et al., Science, 308: 1149-1154 (2005)

非特許文献2 : Katayama et al., Science, 309: 1564-1566 (2005)

非特許文献3 : Kiyosawa et al., Genome Res., 13: 1324-1334 (2003)

非特許文献4 : Yelin et al., Nat. Biotechnol., 21: 379-386 (2003)

非特許文献5 : Faghihi and Wahlestedt, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10: 637-643 (2009)

非特許文献6 : Robb et al., J. Biol. Chem., 279: 37982-37996 (2004)

非特許文献7 : Camblong et al., Cell, 131: 706-717 (2007)

非特許文献8 : Matsui et al., Hepatology, 47: 686-697 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、炎症や感染に関連するサイトカイン・ケモカイン遺伝子の発現を調節し得るNATを探索し、該NATに相補的なセンスオリゴヌクレオチドや該NATと相同なアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用した、炎症性疾患やウイルス感染症などの疾患の新規予防・治療手段を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、IL-1 β により誘導される21遺伝子（サイトカインおよびケモカイン遺伝子を含む）を選択し、mRNAの3' UTRに相補的なNATを検出しようと試みた。鎖特異的RT-PCRの結果、21遺伝子のうち16遺伝子（76%）からNATが転写されていることが判明した。次に、本発明者らは、mRNAとNATの両方が豊富に転写されている7遺伝子（CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23 p19サブユニット、CD69、NF- κ B p65サブユニット、TNF- α ）を選択し、これらのmRNAの3' UTRの二次構造を予測し、ヒト-ラット間で保存された領域内の少なくとも1つ

のループを含むRNA配列に相同なセンスODNを設計・合成して、ラット肝細胞に導入し、IL-1 β 刺激後の細胞における各遺伝子のmRNAレベルをセンスODN非導入細胞と比較した。

その結果、予測された二次構造の保存された領域内のループ部分を含むRNA配列に対して設計されたほとんどのセンスODNは、標的mRNAの発現レベルを変化（増加又は減少）させたのに対し、該二次構造の保存された領域外に対して設計されたセンスODNは標的mRNAの発現レベルに影響しなかった。

[0010] 本発明者らは、これらの知見に基づいて、IL-1 β により誘導されるサイトカイン・ケモカイン遺伝子の多くに3' UTRに対応する領域を含むNATが存在し、当該遺伝子の発現がNATにより制御されており、さらに該NATがとりうる二次構造のループ部分を含む領域に相補的な（従って、mRNAに相同な）配列を有するセンスオリゴヌクレオチドを用いて、当該遺伝子の発現制御（アップレギュレーションおよびダウンレギュレーション）が可能であると結論して、本発明を完成するに至った。

[0011] 即ち、本発明は以下の通りである。

〔1〕 IL-1 β により誘導される、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2遺伝子の3' UTRに相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るアンチセンスヌクレオチド。

〔2〕 IL-1 β により誘導される遺伝子が、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65またはTNF- α である、上記〔1〕記載のアンチセンスヌクレオチド。

〔3〕 上記〔1〕記載のアンチセンスヌクレオチドを含有してなる、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2の発現調節剤。

〔4〕 炎症性疾患または感染症の予防又は治療用である、上記〔3〕記載の

剤。

〔5〕 IL-1 β により誘導される、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2遺伝子の3' UTRに相補的な配列を含む内在性アンチセンス転写物に相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド。

〔6〕 IL-1 β により誘導される遺伝子が、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65またはTNF- α である、上記〔5〕記載のセンスオリゴヌクレオチド。

〔7〕 以下の(a)-(g)のいずれかである上記〔6〕記載のセンスオリゴヌクレオチド。

(a) 配列番号1に示されるCCL2 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号25-51で示されるドメイン1もしくはヌクレオチド番号103-175で示されるドメイン2、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CCL2遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号2に示されるCCL20 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号65-107で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号124-155で示されるドメイン2もしくはヌクレオチド番号214-282で示されるドメイン3、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CCL20遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号3に示されるCX3CL1 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号1103-1202で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号1305-1369で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号1416-1482で示されるドメイン3、ヌクレオチド番号1633-1681で示されるドメイン4、ヌクレオチド番号1688-1745で示されるドメイン5、もしくはヌクレオチド番号1784-1810で示されるドメイン6、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CX3CL1遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CX3CL1遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に示されるIL-23A mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号37-55で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号193-303で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号380-448で示されるドメイン3、もしくはヌクレオチド番号555-600で示されるドメイン4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、IL-23A遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号5に示されるCD69 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号15-32で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号120-186で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号218-252で示されるドメイン3、ヌクレオチド番号344-370で示されるドメイン4、ヌクレオチド番号389-633で示されるドメイン5、もしくはヌクレオチド番号656-786で示されるドメイン6、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CD69遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号6に示されるNF- κ B p65 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号161-301で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号343-380で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号401-412で示されるドメイン3、もしくはヌクレオチド番号473-523で示されるドメイン4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、NF- κ B p65遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(g) 配列番号7に示されるTNF- α mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号304-405で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号430-546で示されるドメイン2

、ヌクレオチド番号687-713で示されるドメイン3、もしくはヌクレオチド番号752-776で示されるドメイン4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、TNF- α 遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

〔8〕上記〔5〕記載のセンスオリゴヌクレオチドを含有してなる、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psm b10またはTLR2の発現調節剤。

〔9〕炎症性疾患または感染症の予防又は治療用である、上記〔8〕記載の剤。

〔10〕被験物質の存在下及び非存在下で、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psm b10またはTLR2遺伝子のmRNAとそれに対する内在性アンチセンス転写物とのハイブリダイゼーションを検出・比較することを特徴とする、該遺伝子の発現調節物質のスクリーニング方法。

〔11〕前記遺伝子のmRNAとそれに対する内在性アンチセンス転写物とを発現する細胞に被験物質を接触させ、該細胞における該mRNA量及び／又はそれにコードされるタンパク質量の変化を測定することを特徴とする、上記〔10〕記載の方法。

発明の効果

[0012] 本発明のアンチセンスヌクレオチドは、IL-1 β により誘導される種々の遺伝子のmRNAに対するNATと同様に、該mRNAの3' UTRと相互作用することにより、該遺伝子の発現を調節することができる。一方、本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、NATと相互作用することにより、その遺伝子発現調節作用を正もしくは負に調節して、標的遺伝子の発現を望ましいレベルに調節することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1A]CCL2 mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図1B]CCL2 mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図2A]CCL20 mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図2B]CCL20 mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図3A]CX3CL1 mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図3B]CX3CL1 mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図4A]IL-23A mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図4B]IL-23A mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図5A]CD69 mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図5B]CD69 mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図6A]NF- κ B p65 mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図6B]NF- κ B p65 mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図である。

[図7A]TNF- α mRNAの3' UTRの予測された二次構造を示す図である。

[図7B]TNF- α mRNAの3' UTRの1以上のループ構造を含む保存された領域（ドメイン「+」で示す）と設計されたセンスODN（下線で示す）の位置を示す図

である。

[図8]各種センスODNを導入した肝細胞におけるCCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65およびTNF- α の発現変動を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、IL-1 β により誘導される、サイトカインやケモカインを含む種々の炎症/感染に関連する遺伝子の発現調節作用を有する、これら遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを提供する。

本発明において標的となる遺伝子 (mRNA) は、IL-1 β により誘導される遺伝子群の中で、その3' 非翻訳領域 (3' UTR) に相補的な配列を含む内在性アンチセンス転写物が存在する遺伝子であれば特に制限はないが、具体的には、例えば、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2); chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20); chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1); interleukin-23 α -subunit p19 (IL-23A); cluster of differentiation 69 (CD 69); nuclear factor- κ B p65 subunit (NF- κ B p65); tumor necrosis factor- α (TNF- α); family with sequence similarity 89 member A (Fam89a); G protein-coupled receptor kinase 5 (Grk5); phospholipid scramblase 1; runt-related transcription factor 1 (Runx1); sema domain, immunoglobulin domain, transmembrane domain and short cytoplasmic domain 4A (semaphorin 4A); six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 (Steap4); lymphotoxin β ; proteasome subunit, beta type 10 (Psm10); Toll-like receptor 2 (TLR2)等が挙げられる。好ましくは、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65またはTNF- α である。

[0015] 本発明のアンチセンスヌクレオチドは、標的mRNAの3' UTRに相補的な配列を含み、かつ標的遺伝子の発現 (タンパク質の産生) を調節し得るヌクレオチドであれば、いかなるものであってもよい。ここで「相補的」な配列とは、mRNAに対して完全相補的な配列のみならず、細胞の生理的な条件下でmRNAとハイブリダイズしてmRNAと相互作用し得る限り、1ないし数 (2, 3, 4 もしくは 5) 塩基のミスマッチを含んでもよい。好ましくは、標的mRNAの3' UTR

に相補的な配列とは、ストリンジェントな条件、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999に記載される条件（例えば、6×SSC (sodium chloride/sodium citrate) /45℃でのハイブリダイゼーション、次いで0.2×SSC/0.1% SDS/50-65℃での一回以上の洗浄等が挙げられる）下で、該mRNAとハイブリダイズし得る配列である。

[0016] 具体的には、標的mRNAに対する内在アンチセンス転写物（NAT）は、該mRNAの熱力学的に安定でない部分と相互作用すると考えられるので、本発明のアンチセンスヌクレオチドは、標的mRNAの3' UTR中の熱力学的に安定でない部分に相補的な配列を含むことが好ましい。熱力学的に安定でない部分としては、mRNAが二次構造をとった際に一本鎖の状態にある（例えば、ステム-ループ構造のループ部分にあたる）領域が挙げられる。標的mRNAの3' UTRの二次構造は、該領域のヌクレオチド配列情報をもとに、mfold (GCG Software; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7706-10 (1989) 参照) に代表されるような既存のRNA二次構造予測プログラムを用いて予測することができる。それらのヌクレオチド配列情報はいずれも容易に入手可能である。例えば、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65およびTNF- α mRNAの3' UTR配列（但し、UはTに置き換えて記載している）を配列番号1-7にそれぞれ示す。

[0017] 好ましくは、本発明のCCL2に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号1に示されるラットCCL2 mRNA 3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号25-51で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号103-175で示されるドメイン2内、他の哺乳動物におけるCCL2オルソログにあっては、前記ラットCCL2における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部（例えば、3塩基以上）を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0018] 好ましくは、本発明のCCL20に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号2に示されるラットCCL20 mRNA 3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号65-107で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号124-155で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号214-282で示されるドメイン3

内、他の哺乳動物におけるCCL20オルソログにあっては、前記ラットCCL20における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部（例えば、3塩基以上）を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0019] 好ましくは、本発明のCX3CL1に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号3に示されるラットCX3CL1 mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号1103-1202で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号1305-1369で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号1416-1482で示されるドメイン3および／またはヌクレオチド番号1633-1681で示されるドメイン4および／またはヌクレオチド番号1688-1745で示されるドメイン5および／またはヌクレオチド番号1784-1810で示されるドメイン6内、他の哺乳動物におけるCX3CL1オルソログにあっては、前記ラットCX3CL1における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0020] 好ましくは、本発明のIL-23Aに対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号4に示されるラットIL-23A mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号37-55で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号193-303で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号380-448で示されるドメイン3および／またはヌクレオチド番号555-600で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるIL-23Aオルソログにあっては、前記ラットIL-23Aの各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0021] 好ましくは、本発明のCD69に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号5に示されるラットCD69 mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号15-32で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号120-186で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号218-252で示されるドメイン3および／またはヌクレオチド番号344-370で示されるドメイン4および／またはヌクレオチド番号389-633で示されるドメイン5および／またはヌクレオチド番号656-786で示されるドメイン6内、他の哺乳動物におけるCD69オルソログ

にあつては、前記ラットCD69における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0022] 好ましくは、本発明のNF- κ B p65に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号6に示されるラットNF- κ B p65 mRNAの3' UTR配列にあつては、ヌクレオチド番号161-301で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号343-380で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号401-412で示されるドメイン3および／またはヌクレオチド番号473-523で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるNF- κ B p65オルソログにあつては、前記ラットNF- κ B p65における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0023] 好ましくは、本発明のTNF- α に対するアンチセンスヌクレオチドは、配列番号7に示されるラットTNF- α mRNAの3' UTR配列にあつては、ヌクレオチド番号304-405で示されるドメイン1および／またはヌクレオチド番号430-546で示されるドメイン2および／またはヌクレオチド番号687-713で示されるドメイン3および／またはヌクレオチド番号752-776で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるTNF- α オルソログにあつては、前記ラットTNF- α における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

[0024] ラット以外の哺乳動物におけるオルソログの対応するドメインとしては、3' UTRにAREモチーフを有する遺伝子の場合、複数種に共通なAREモチーフの周辺領域のヌクレオチド配列は哺乳動物種間でよく保存されており、二次構造も類似しているため、当該領域が好ましく選択され得る。例えば、ラット、マウスおよびヒトの上記7遺伝子の3' UTRに存在するAREモチーフ並びにヒト-ラット間および3種間で共通するAREモチーフの数を表1に示す。

[0025]

[表1]

各種mRNAの3' 非翻訳領域に存在するAREモチーフの数

遺伝子	ラット	マウス	ヒト	ラットとヒトで共通	ラットとマウスとヒトで共通
CCL2	2	1	3	1	1
CCL20	5	6	4	3	3
CX3CL1	3	3	3	3	3
IL-23	7	6	4	4	4
CD69	3	3	8	1	1
NF-kappaB p65	1	0	1	1	0
TNF-alpha	8	8	8	6	6

[0026] 本発明のアンチセンスヌクレオチドの長さに特に制限はなく、NATの全長もしくは標的mRNAの3' UTR中の前記ドメイン内の1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相補的なヌクレオチド配列を含むNATの部分配列を含むものであってよいが、配列特異性の面から、標的配列に相補的な部分を少なくとも10塩基以上、好ましくは約12塩基以上、より好ましくは約15塩基以上含むものである。また、医薬として用いる場合の投与のし易さ等の面から、500塩基以下、好ましくは300塩基以下、より好ましくは150塩基以下の塩基長を有するものが挙げられる。

[0027] さらに、本発明のアンチセンスヌクレオチドが10～50塩基程度のオリゴヌクレオチドの場合、該ヌクレオチドは、配列非特異的な反応を起こす配列（例えば、5' -CG-3'、5' -GGGG-3'、5' -GGGGG-3' 等）を含まないものから選択することが好ましく、また、標的mRNA以外のRNA中に類似の相補鎖配列が存在しないものから選択することが好ましい。他のRNA中に類似の相補鎖配列が存在しないことは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの候補配列をクエリーとして、対象とする哺乳動物のゲノム配列に対して相同性検索をかけることにより確認することができる。ここで相同性検索手段としては、公知の核酸の相同性検索ソフトウェア（例えば、NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) NBLAST及びXBLASTプログラム (version 2.0)、GCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラム等）を用いることができる。また、ゲノムDNAデータセットとしては、例えば、Celera社が提供する全ヒトゲノムデータを用いることができる。

[0028] 本発明のアンチセンスヌクレオチドは、細胞への導入方法に応じて種々の形態で用いられる。例えば、該アンチセンスヌクレオチドが10～50塩基程度のオリゴヌクレオチドの場合、一本鎖DNA、一本鎖RNA、DNA/RNAキメラのいずれであってもよく、さらに公知の修飾の付加されたものであってもよい。ここで「ヌクレオチド」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。

[0029] アンチセンスヌクレオチドを構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNAもしくはRNAでもよいが、安定性（化学的及び／又は対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどによる分解を防ぐために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、-OR（Rは、例えばCH₃（2'-O-Me）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

RNAの糖部のコンフォメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的mRNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA（LNA）（Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004）やENA（Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003）もまた、好ましく用いられ得る。

[0030] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNA（cDNA）配列に基

づいて、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。

[0031] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、ポリリジンのようなポリカチオン体、脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性物質が付加された形態で提供され得る。あるいはまた、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、膜透過機能を有するペプチド（例えば、ショウジョウバエ由来のAntennapediaホメオドメイン（AntP）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来のTAT、単純ヘルペスウイルス（HSV）由来のVP22等の細胞通過ドメイン）などで修飾することにより、該オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを促進することができる。

[0032] 一方、本発明のアンチセンスヌクレオチドがより長い塩基長からなるポリヌクレオチドの場合、該ヌクレオチドの細胞への導入は、自体公知の遺伝子導入法を用いて実施することができる。この場合、該ヌクレオチドとしては二本鎖DNAが好ましく用いられる。本発明のアンチセンスヌクレオチドは、例えば、標的遺伝子のNATを発現する細胞（例えば、IL-1 β 刺激により標的mRNAおよびNATを高発現する細胞）から総RNAを抽出し、例えば、配列番号1-7に示される標的mRNAの配列情報に基づいて、その相補鎖配列の適当な領域を増幅し得るプライマーを設計し、RT-PCRを実施することにより取得することができる（後記実施例参照）。得られたcDNAは、宿主となる動物細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, p cDNAI/Neo）などが用いられ得る。

発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 α プロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプ

ロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 α プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターは、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子、SV40複製起点などを含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

[0033] 本発明のアンチセンスヌクレオチドは、標的mRNAと相互作用することにより、標的遺伝子の発現（タンパク質の産生）を調節することができる。IL-1 β により誘導される、サイトカイン・ケモカイン遺伝子を含む種々の遺伝子は、炎症惹起もしくは抗炎症作用、感染防御、免疫応答の調節などの多様な生理活性を有するので、本発明のアンチセンスヌクレオチドを含有する医薬は、標的遺伝子の発現調節剤として、炎症性疾患や感染症を含む種々の疾患の予防及び／又は治療に利用することができる。

例えば、CCL2の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは血管新生や創傷治癒などに利用することができ、一方、CCL2は単球や好酸球を遊走するため、CCL2の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、動脈硬化を含む慢性炎症性疾患やアレルギー性炎症の予防・治療に有用である。

CCL20は広範囲の微生物に対して抗菌活性を示すので、CCL20の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは種々の微生物感染症の予防・治療に有効である。一方、CCL20は適応免疫の開始と持続に重要な役割を担っていることから、CCL20の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、気管支喘息、多発性硬化症、関節リウマチ、各種皮膚炎、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の予防・治療に有効である。

CX3CL1の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは血管新生などに利用することができ、一方、CX3CL1の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレ

オチドは、動脈硬化、糸球体腎炎を含む炎症性疾患の予防・治療や拒絶抑制、関節リウマチの予防・治療に有用である。

IL-23Aは細胞性免疫の維持に重要であり、その過剰発現は多臓器炎症を引き起こすことから、IL-23Aの発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効であり、一方、IL-23Aの発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

CD69はリンパ球の分化や活性化に重要な役割を果たしていることから、CD69の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効である。一方、CD69は炎症局所に発現する炎症細胞のほとんどで発現し、また関節リウマチや全身性エリテマトーデス（SLE）患者からCD69に対する自己抗体が検出されることなどから、CD69の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

NF- κ Bは免疫系に重要な役割を持つ転写因子であることから、NF- κ B p65の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効である。一方、NF- κ Bはがん細胞で恒常的に活性化してアポトーシスを阻害しており、また骨代謝や気管支喘息、関節炎、炎症性腸疾患、敗血症などの病態形成にも関与しているので、NF- κ B p65の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、がん、骨粗鬆症、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

TNF- α はアポトーシス誘導、炎症メディエーターや形質細胞による抗体産生の亢進などを通じて感染防御や抗腫瘍作用を示すので、TNF- α の発現を増強させ得るアンチセンスヌクレオチドは感染症やがんの予防・治療に有効である。一方、TNF- α は関節リウマチ、乾癬、糖尿病、高脂血症、敗血症、骨粗鬆症の病態形成に関与するため、TNF- α の発現を抑制し得るアンチセンスヌクレオチドは、これらの疾患の予防・治療に有用である。

[0034] 本発明のアンチセンスヌクレオチドを含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、又は適当な剤型の医薬組成物として、ヒト又は非ヒト哺乳

動物（例、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的又は非経口的（例、吸入投与、血管内投与、皮下投与、経粘膜投与など）に投与することができる。

これらの核酸を上記の各種疾患の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。即ち、本発明のアンチセンスヌクレオチドを、単独で、あるいはレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの上記の適当な哺乳動物細胞用の発現ベクターに機能可能な態様で挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該ヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やマイクロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記ヌクレオチドを単独又はリポソームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

[0035] 本発明のアンチセンスヌクレオチドは、それ自体を投与してもよいし、又は適当な医薬組成物として投与してもよい。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明のアンチセンスヌクレオチドと薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであってよい。このような医薬組成物は、経口又は非経口投与に適する剤形として提供される。

[0036] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、エアロゾル剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含してもよい。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。エアロゾル製剤はジクロロジフロロメタン、プロパン、窒素などのような圧縮された許容しうる抛射薬内に入れることができる。あるいはネブライザーやアトマイザーのような非圧縮性製剤用医薬品として製剤化してもよい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記核酸を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されてもよい。

- [0037] 経口投与のための組成物としては、固体又は液体の剤形、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、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物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していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。
- [0038] 上記の非経口用又は経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、エアロゾル剤、坐剤が挙げられる。本発明のアンチセンスヌクレオチドは、例えば、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されていることが好ましい。
- [0039] 本発明のアンチセンスヌクレオチドを含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、本発明のアンチセンスヌクレオチドを1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1回～数回程度、静脈注射や吸入等により投与するのが好都合である。他の非経口投与及び経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。
- [0040] なお前記した医薬組成物は、本発明のアンチセンスヌクレオチドとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の薬剤を含有してもよい。他の薬剤としては、例えば、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬、抗菌薬、抗真菌薬、抗原虫薬、抗生物質、抗セプシス薬、抗セプティックショック薬、エンドトキシン拮抗薬、免疫調節薬、非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド薬、炎症性メディエーター作用抑制薬、炎症性メディエーター産生抑制薬、抗炎症性メディエーター作用抑制薬、抗炎症性メディエーター産生抑制薬などが挙げられる。

[0041] 内在性アンチセンス転写物 (NAT) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド (即ち、NAT転写される遺伝子のセンスオリゴヌクレオチド) は、標的mRNAに対するNATの発現調節作用を阻害することにより、標的mRNAの安定性を調節し、標的遺伝子の発現 (タンパク質の産生) を正もしくは負に調節することができる。したがって、本発明はまた、IL-1 β により誘導される、NATが存在する遺伝子の発現調節活性を有する当該遺伝子の3' UTRと相同なセンスオリゴヌクレオチドを提供する。ここで標的となる遺伝子 (mRNA) は本発明のアンチセンスヌクレオチドに関して前記したのと同様である。

[0042] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNAの3' UTRに相補的な配列を含むNATに相補的な配列 (従って、該3' UTRに相同な配列) を含み、かつ標的mRNAの安定性を変化させ得るオリゴヌクレオチドであれば、いかなるものであってもよい。ここで「相補的」な配列とは、NATに対して完全相補的な配列のみならず、細胞の生理的な条件下でNATとハイブリダイズしてmRNAへのNATの作用を阻害し得る限り、1ないし数 (2, 3, 4 もしくは 5) 塩基のミスマッチを含んでもよい。好ましくは、標的NATに相補的な配列とは、ストリンジエントな条件、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999に記載される条件 (例えば、6 $\times$ SSC (sodium chloride/sodium citrate) /45 $^{\circ}$ Cでのハイブリダイゼーション、次いで0.2 $\times$ SSC/0.1% SDS/50 $\sim$ 65 $^{\circ}$ Cでの一回以上の洗浄等が挙げられる) 下で、該NATとハイブリダイズし得る配列である。

上述のように、標的mRNAに対するアンチセンスヌクレオチドは、該mRNAの熱力学的に安定でない部分と相互作用して該mRNAの安定性を調節するので、本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNA中の熱力学的に安定でない部分と相同な配列を含むことが好ましい。熱力学的に安定でない部分としては、mRNAが二次構造をとった際に一本鎖の状態にある (例えば、ステムループ構造のループ部分にあたる) 領域が挙げられる。

尚、「相同な」配列とは、標的mRNAの特定の部分ヌクレオチド配列と完全

に同一な配列のみならず、該mRNAに対するNATと細胞の生理的な条件下でハイブリダイズしてmRNAに対するNATの作用を阻害し得る限り、1ないし数（2, 3, 4もしくは5）個の塩基が異なってもよい。より好ましくは、「相同な」配列とは、標的mRNAの標的部位の配列とセンスオリゴヌクレオチドの配列とをalignさせたときに、オーバーラップする領域において、標的mRNAに対して90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を意味する。

[0043] さらに、本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、配列非特異的な反応を起こす配列（例えば、5' -CG-3'、5' -GGGG-3'、5' -GGGGG-3' 等）を含まないものから選択することが好ましく、また、標的mRNA以外のRNA中に類似の配列が存在しないものから選択することが好ましい。他のRNA中に類似の配列が存在しないことは、アンチセンスオリゴヌクレオチドについて上記したと同様の方法により確認することができる。

[0044] 好ましくは、本発明のCCL2 NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1に示されるラットCCL2 mRNA 3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号25-51で示されるドメイン1もしくはヌクレオチド番号103-175で示されるドメイン2内、他の哺乳動物におけるCCL2オルソログにあっては、前記ラットCCL2における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部（例えば、3塩基以上）を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CCL2 mRNAの発現を増強し得るTTAAGTAATGTTAACTTAT（CCL2-Se1; 配列番号8）、ドメイン2に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CCL2 mRNAの発現を増強し得るTCCATTTTTTTTATTTCTCTG（CCL2-Se2; 配列番号9）がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0045] 好ましくは、本発明のCCL20 NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号2に示されるラットCCL20 mRNA 3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号65-107で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号124-155で示されるドメイン2もしくはヌクレオチド番号214-282で示されるドメイン3内、他の哺乳動物におけるCCL20オルソログにあっては、前記ラットCCL20における各ドメイ

ンに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部（例えば、3塩基以上）を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CCL20 mRNAの発現を抑制し得るGGTTTCACCTGCACATCACT（CCL20-Se1；配列番号10）、ドメイン3に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CCL20 mRNAの発現を増強し得るGTTTAGCTATTTAATGTAA（CCL2-Se2；配列番号11）がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0046] 好ましくは、本発明のCX3CL1 NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号3に示されるラットCX3CL1 mRNAの3' UTR配列にあつては、ヌクレオチド番号1103-1202で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号1305-1369で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号1416-1482で示されるドメイン3、ヌクレオチド番号1633-1681で示されるドメイン4、ヌクレオチド番号1688-1745で示されるドメイン5もしくはヌクレオチド番号1784-1810で示されるドメイン6内、他の哺乳動物におけるCX3CL1オルソログにあつては、前記ラットCX3CL1における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CX3CL1 mRNAの発現を増強し得るAC TTGTGCATGTGTGTACTT（CX3CL1-Se1；配列番号13）、ドメイン2に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CX3CL1 mRNAの発現を増強し得るACAAAG TGTCTACTGAAGCA（CX3CL1-Se2；配列番号14）およびCX3CL1 mRNAの発現を抑制し得るCTACTGAAGCAGAGAGCAGC（CX3CL1-Se3；配列番号15）がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] 好ましくは、本発明のIL-23A NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号4に示されるラットIL-23A mRNAの3' UTR配列にあつては、ヌクレオチド番号37-55で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号193-303で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号380-448で示されるドメイン3もしくはヌクレオチド番号555-600で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるIL-23Aオルソログにあつては、前記ラットIL-23Aの各ドメインに対応するドメイン内の、1

以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、IL-23A mRNAの発現を抑制し得るAATCCATCAATGCAGACATC (IL23-Se1; 配列番号 16)、ドメイン2に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、IL-23A mRNAの発現を増強し得るGAAGCTGGCAGACAGCTGCA (IL23-Se2; 配列番号 17)、ドメイン3に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、IL-23A mRNAの発現を抑制し得るTCCTTCAGTTCTAACAGAAC (IL23-Se3; 配列番号 18)、ドメイン4に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、IL-23A mRNAの発現を抑制し得るAACAGTTTAGAGGATTGTTA (IL23-Se4; 配列番号 19) がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0048] 好ましくは、本発明のCD69 NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号5に示されるラットCD69 mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号15-32で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号120-186で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号218-252で示されるドメイン3、ヌクレオチド番号344-370で示されるドメイン4、ヌクレオチド番号389-633で示されるドメイン5もしくはヌクレオチド番号656-786で示されるドメイン6内、他の哺乳動物におけるCD69オルソログにあっては、前記ラットCD69における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン5に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、CD69 mRNAの発現を増強し得るGACCAATGCTTATGAAAACA (CD69-Se2; 配列番号 21)、ドメイン6に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、IL-23A mRNAの発現を増強し得るGTGGCAGATCTCTGTCAGGA (CD69-Se3; 配列番号 22) がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0049] 好ましくは、本発明のNF- κ B p65 NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号6に示されるラットNF- κ B p65 mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号161-301で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号343-380で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号401-412で示されるドメイン3もしくはヌクレオチド番号473-523で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるNF-

κ B p65オルソログにあっては、前記ラットNF- κ B p65における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、NF- κ B p65 mRNAの発現を増強し得るGAACTCTTGAGACCCTGCTT (p65-Se1; 配列番号23)、ドメイン3に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、NF- κ B p65 mRNAの発現を抑制し得るGCAACGCTCCTAGGAGCAGC (p65-Se3; 配列番号25)、ドメイン4に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、NF- κ B p65 mRNAの発現を抑制し得るAACTCTCCATGCTGAGCAGT (p65-Se4; 配列番号26) がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0050] 好ましくは、本発明のTNF- α NATに対するセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号7に示されるラットTNF- α mRNAの3' UTR配列にあっては、ヌクレオチド番号304-405で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号430-546で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号687-713で示されるドメイン3もしくはヌクレオチド番号752-776で示されるドメイン4内、他の哺乳動物におけるTNF- α オルソログにあっては、前記ラットTNF- α における各ドメインに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列に相同なヌクレオチド配列を含む。例えば、ドメイン1に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、TNF- α mRNAの発現を増強し得るAGATGTCTCAGGCCTCCCTT (TNF-Se1; 配列番号27)、ドメイン2に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、TNF- α mRNAの発現を増強し得るGGAACCCCCTATATTTATAA (TNF-Se2; 配列番号28) およびTNF- α mRNAの発現を抑制し得るTAATTGCACCTGTGACTATT (TNF-Se3; 配列番号29)、ドメイン3に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、TNF- α mRNAの発現を抑制し得るAACAAGATATTTATCTAACC (TNF-Se5; 配列番号31)、ドメイン4に対して相同なセンスオリゴヌクレオチドとして、TNF- α mRNAの発現を抑制し得るACTGAACCTCTGCTCCCCAC (TNF-Se7; 配列番号33) がそれぞれ挙げられるが、これらに限定されない。

[0051] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドの長さに特に制限はないが、配列特異

性の面から、標的NAT中の標的配列に相補的な部分を少なくとも10塩基以上、好ましくは約12塩基以上、より好ましくは約15塩基以上含むものである。また、合成の容易さ、製造コスト、投与のし易さ等の面から、50塩基以下、好ましくは40塩基以下、より好ましくは30塩基以下の塩基長を有するものが挙げられる。

[0052] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖DNA、一本鎖RNA、DNA/RNAキメラのいずれであってもよく、さらに公知の修飾の付加されたものであってもよい。ここで「ヌクレオチド」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。センスオリゴヌクレオチドがDNA (ODN) の場合、標的NATとセンスODNとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的NATの選択的な分解を引き起こすことができる。

[0053] センスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNAもしくはRNAでもよいが、安定性（化学的及び／又は対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、上記アンチセンスヌクレオチドの場合と同様に、種々の化学修飾を含むことができる。

[0054] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNA (cDNA) 配列に基づいて、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相同な配列を合成することにより調製することができる。

[0055] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、ポリリジンのようなポリカチオン体、脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性物質が付加された形態で提供され得る。あるいはまた、本発明のセンスオリゴヌクレオチドを、膜透過機能を有するペプチド（例えば、ショウジョウバエ由来のAntennapediaホメオドメイン (AntP)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来のTAT、単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来のVP22等の細胞通過ドメイン）などで修飾することにより、該オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを促進することがで

きる。

[0056] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドは、標的NATと相互作用することにより、該NATによる標的遺伝子の発現（タンパク質の産生）調節作用を変化させることができる。IL-1 β により誘導される、サイトカイン・ケモカイン遺伝子を含む種々の遺伝子は、炎症惹起もしくは抗炎症作用、感染防御、免疫応答の調節などの多様な生理活性を有するので、本発明のセンスオリゴヌクレオチドを含有する医薬は、標的遺伝子の発現調節剤として、炎症性疾患や感染症を含む種々の疾患の予防及び／又は治療に利用することができる。

例えば、CCL2の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは血管新生や創傷治癒などに利用することができ、一方、CCL2は単球や好酸球を遊走するため、CCL2の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、動脈硬化を含む慢性炎症性疾患やアレルギー性炎症の予防・治療に有用である。

CCL20は広範囲の微生物に対して抗菌活性を示すので、CCL20の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは種々の微生物感染症の予防・治療に有効である。一方、CCL20は適応免疫の開始と持続に重要な役割を担っていることから、CCL20の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、気管支喘息、多発性硬化症、関節リウマチ、各種皮膚炎、炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の予防・治療に有効である。

CX3CL1の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは血管新生などに利用することができ、一方、CX3CL1の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、動脈硬化、糸球体腎炎を含む炎症性疾患の予防・治療や拒絶抑制、関節リウマチの予防・治療に有用である。

IL-23Aは細胞性免疫の維持に重要であり、その過剰発現は多臓器炎症を引き起こすことから、IL-23Aの発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効であり、一方、IL-23Aの発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

CD69はリンパ球の分化や活性化に重要な役割を果たしていることから、CD6

9の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効である。一方、CD69は炎症局所に発現する炎症細胞のほとんどで発現し、また関節リウマチや全身性エリテマトーデス（SLE）患者からCD69に対する自己抗体が検出されることなどから、CD69の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

NF- κ Bは免疫系に重要な役割を持つ転写因子であることから、NF- κ B p65の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは感染症の予防・治療に有効である。一方、NF- κ Bはがん細胞で恒常的に活性化してアポトーシスを阻害しており、また骨代謝や気管支喘息、関節炎、炎症性腸疾患、敗血症などの病態形成にも関与しているので、NF- κ B p65の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、がん、骨粗鬆症、自己免疫疾患や炎症性疾患の予防・治療に有用である。

TNF- α はアポトーシス誘導、炎症メディエーターや形質細胞による抗体産生の亢進などを通じて感染防御や抗腫瘍作用を示すので、TNF- α の発現を増強させ得るセンスオリゴヌクレオチドは感染症やがんの予防・治療に有効である。一方、TNF- α は関節リウマチ、乾癬、糖尿病、高脂血症、敗血症、骨粗鬆症の病態形成に関与するため、TNF- α の発現を抑制し得るセンスオリゴヌクレオチドは、これらの疾患の予防・治療に有用である。

[0057] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドを含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、又は適当な剤型の医薬組成物として、ヒト又は非ヒト哺乳動物（例、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的又は非経口的（例、吸入投与、血管内投与、皮下投与、経粘膜投与など）に投与することができる。

これらの核酸を上記の各種疾患の予防・治療剤として使用する場合、上記の本発明のアンチセンスヌクレオチドと同様に製剤化し、投与することができる。

[0058] 本発明のセンスオリゴヌクレオチドを含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、本発

明のセンスオリゴヌクレオチドを1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1回~数回程度、静脈注射や吸入等により投与するのが好都合である。他の非経口投与及び経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

[0059] なお前記した医薬組成物は、本発明のセンスオリゴヌクレオチドとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の薬剤を含有してもよい。他の薬剤としては、例えば、抗ウイルス薬、抗腫瘍薬、抗菌薬、抗真菌薬、抗原虫薬、抗生物質、抗セプシス薬、抗セプティックショック薬、エンドトキシン拮抗薬、免疫調節薬、非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド薬、炎症性メディエーター作用抑制薬、炎症性メディエーター産生抑制薬、抗炎症性メディエーター作用抑制薬、抗炎症性メディエーター産生抑制薬などが挙げられる。

[0060] 本発明はまた、標的mRNAに対するNATの作用を調節することにより標的遺伝子の発現（タンパク質の産生）を調節する物質をスクリーニングする方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、被験物質の存在下及び非存在下で、標的mRNAとそれに対するNATとのハイブリダイゼーションを検出し、その程度を比較することを特徴とする。

例えば、標的mRNAとNATとを常法により単離し、いずれか一方を固相化し、他方を適当な標識剤で標識して、RNAが生理的な二次構造を形成し得る条件下で、被験物質の存在下及び非存在下に両者をハイブリダイズさせ、固相に結合した標識量を両条件下で比較する方法が挙げられる。ここでmRNA及びNATとしては、それぞれその全長を用いてもよいし、あるいはmRNAの3' UTR、並びに該領域に相補的なNAT配列を含むそれらのフラグメントを用いてもよい。

[0061] 固相の材料としては、シリコンなどの半導体、ガラス、ダイヤモンドなどの無機物、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン等の高分子物質を主成分とするフィルムなどが挙げられ、また固相の形状としては、スライドガラス、マイクロウェルプレート、マイクロビーズ、繊維型などが挙げられ

るが、それらに制限されない。固相上にmRNAもしくはNATを固定化する方法としては、予め該RNAにアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、固相上にも該RNAと反応し得る官能基（例：アルデヒド基、アミノ基、SH基、ストレプトアビジンなど）を導入し、両官能基間の共有結合で固相とRNAを架橋したり、ポリアニオン性のRNAに対して、固相をポリカチオンコーティングして静電結合を利用してRNAを固定化するなどの方法が挙げられるが、これらに限定されない。固相化RNAの調製法としては、フォトリソグラフィー法を用いてRNAを基板（ガラス、シリコンなど）上で1ヌクレオチドずつ合成するAffymetrix方式と、マイクロスポッティング法、インクジェット法、バブルジェット（登録商標）法などを用いて、予め調製されたRNAを基板上にスポッティングするStanford方式とが挙げられるが、使用するRNAの塩基長を考慮すれば、Stanford方式あるいは両者を組み合わせた手法を用いるのが好ましい。

[0062] 標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート、Cy3、Cy5などが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチン-（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0063] 被験物質としては、いかなる公知物質及び新規物質であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分などがあげられ

る。添加される被験物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、約0.1nM～約100nMの範囲で適宜選択される。インキュベーション時間としては、例えば、約1～約24時間が挙げられる。

[0064] 固相上のRNAと、標識したRNA（及び被験物質）とを接触させて、インキュベートした後、固相に結合しなかったRNAを洗い流し、固相に結合したRNAの標識量を検出する。被験物質の存在下で、非存在下に比べて固相に結合した標識量が有意に増加した場合、該被験物質を標的mRNAに対するNATの作用を増強する物質の候補として選択することができる。一方、被験物質の存在下で、非存在下に比べて固相に結合した標識量が有意に減少した場合、該被験物質を標的mRNAに対するNATの作用を抑制する物質の候補として選択することができる。

[0065] 好ましい実施態様においては、標的mRNAとNATとを発現する細胞に被験物質を接触させ、該細胞における該mRNA量及び／又はそれにコードされるタンパク質量の変化を測定することにより、より直接的に標的遺伝子の発現増強又は抑制物質を選択することができる。標的mRNAとNATとを発現する細胞は、両RNAを生来発現し得る細胞（例えば、IL-1 β 刺激した肝細胞等）であってもよいし、それらのいずれか一方もしくは両方を発現するDNAを導入した組換え細胞であってもよい。組換え細胞の場合、宿主細胞として、例えば、H4IIE-C3細胞、HepG2細胞、293T細胞、HEK293細胞、COS7細胞、2B4T細胞、CHO細胞、MCF-7細胞、H295R細胞などの動物細胞をあげることができる。標的mRNA及びNATをコードするDNAは、両RNAを常法により単離し、逆転写反応等によって二本鎖DNAに変換した後、宿主細胞内で機能しうるプロモーターを有する発現ベクターに挿入して、例えば、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などにより、このベクターを宿主細胞に導入することにより作製することができる。

[0066] 被験物質としては、前記したとおりのものが用いられる。被験物質と上記細胞との接触は、例えば、該細胞の培養に適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DM

EM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地など)や各種緩衝液(例えば、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など)の中に被験物質を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができる。添加される被験物質の濃度は化合物の種類(溶解度、毒性等)により異なるが、例えば、約0.1nM~約100nMの範囲で適宜選択される。インキュベーション時間としては、例えば、約1~約48時間が挙げられる。必要に応じて、インキュベーションの際に上記細胞をウイルスに感染させてもよい。

[0067] インキュベーション終了後(あるいは経時的に)、細胞からRNAを抽出してRT-PCR、リアルタイムPCRやノーザンブロット解析により標的mRNA量を測定するか、あるいは培養上清を回収して、自体公知の各種イムノアッセイやウェスタンブロットティング等により標的遺伝子にコードされるタンパク質量を測定する。被験物質の添加により細胞における標的mRNA量及び/又はタンパク質量が有意に増加した場合、該被験物質を標的遺伝子の発現増強物質の候補として選択することができる。一方、被験物質の添加により該mRNA量及び/又はタンパク質量が有意に減少した場合、該被験物質を標的遺伝子の発現抑制物質の候補として選択することができる。

[0068] 上記のスクリーニング法により選択された標的遺伝子の発現を増強または抑制し得る物質は、該遺伝子の発現を増強または抑制し得るアンチセンスヌクレオチドやセンスオリゴヌクレオチドと同様に、上記の各種疾患の予防および/または治療用の医薬として使用することができる。

[0069] 上記のスクリーニング法により選択された物質を含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、又は適当な剤型の医薬組成物として、ヒト又は非ヒト哺乳動物(例、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的又は非経口的(例、吸入投与、血管内投与、皮下投与など)に投与することができる。投与に用いられる医薬組成物としては、選択された物質と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであってよい。

[0070] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、エアロゾル剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含してもよい。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、選択された標的遺伝子の発現増強又は抑制物質を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、又は油性液に溶解、懸濁又は乳化することによって調製できる。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等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HC0-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、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等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。エアロゾル製剤はジクロロジフロロメタン、プロパン、窒素などのような圧縮された許容しうる抛射薬内に入れることができる。あるいはネブライザーやアトマイザーのような非圧縮性製剤用医薬品として製剤化してもよい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記標的遺伝子の発現増強又は抑制物質を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

[0071] 経口投与のための組成物としては、固体又は液体の剤形、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、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物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していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

[0072] 上記の非経口用又は経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位

の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、エアロゾル剤、坐剤が挙げられる。標的遺伝子の発現増強又は抑制物質は、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されていることが好ましい。

[0073] 上記の標的遺伝子の発現増強又は抑制物質を含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、該物質を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1回～数回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与及び経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

[0074] 以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例

[0075] （材料と方法）

肝細胞のトランスフェクション

Prostaglandins 1993;45:459-474の記載に従って、雄性Wistarラット（SPF/VAF CrLj:WI; 日本チャールズ・リバー株式会社）から肝細胞を単離し、播種して、37℃で一晩インキュベートした。肝細胞（ 3.0×10^5 細胞/ディッシュ）をセンスODNでトランスフェクトした。各ODN（1.5 μ g）をmagnet-assisted transfection A reagent（IBA）1.5 μ Lと混合し、各ウェルに添加して磁性プレート上で15分間インキュベートした後、培地を新鮮なWilliam's E培地（シグマ-アルドリッチ社）に置換した。細胞を一晩培養し、1 nM ヒトIL-1 β （大塚製薬株式会社）で4時間（RNA調製）もしくは8時間（細胞抽出）処理した。動物実験は、立命館大学びわこくさつキャンパスの動物実験委員会の承認を得て実施した。

[0076] mRNAの二次構造予測

mRNAの3' UTRの二次構造は、mfoldプログラム（Zuker）によって予測した

。mRNAの3' UTRの予測された構造の中から共通の保存された領域を選択した。各領域は少なくとも1つのステム-ループ構造を含んでいた。

[0077] センスODNのデザイン

ホスホチオエート結合で保護されたセンスODNを、J. Neurochem. 2003;86:374-382に記載の方法に従ってデザインした（ジーン・デザイン社）。デザインされたセンスODN配列は、ヒト-ラット間で保存された共通領域の少なくとも1つのループを含むmRNA配列に対応しており、CpGモチーフやG-カルテットは避けた。

[0078] 鎖特異的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

Sepasol I Super（ナカライテスク）を用いて全RNAを調製し、TURBO DNA-free kit（Ambion-Applied Biosystems）で処理した。mRNAについてはオリゴdTプライマーを用い、NATについては鎖特異的プライマーを用いて相補DNA（cDNA）を合成し、Genes Cells. 2000;5:111-125に記載の方法に従い、一対のプライマー（オペロン・バイオテクノロジーズ）を用いて、ステップダウンPCRを実施した。

CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65およびTNF- α の7遺伝子について、mRNAの増幅に使用したPCRプライマー、NATの逆転写用プライマーおよびPCRプライマーを表2および3にまとめた。

[0079] [表2]

mRNA検出用プライマー（逆転写はオリゴdTプライマー）

mRNA	mRNA PCR-Forward primer (SEQ ID NO)	mRNA PCR-Sense primer (SEQ ID NO)
CCL2	GCTGTCTCAGCCAGATGCAGTTA (34)	GATCTCACTTGGTCTGGTCCAG (35)
CCL20	CAGCCAGTCAGAAGCAGCAAGCA (36)	CTTGGTTCCTTAGGCTGAGGAGGT (37)
CX3CL1	GTA CTCTGCTGGCGGGTCAGCAC (38)	TCTCGTCTCCAGGATGATGGCGC (39)
IL-23	CAAGGACAACAGCCAGTCTGT (40)	GGTGATCCTCTGGCTGGAGGAGC (41)
CD69	TTGCCTTAAGTGTGGGCAAGTAC (42)	CCTGTCACGTTGAACCAGCTGTT (43)
NF-kappaB p65	ACCCCTTTCAAGTTCCCATAGA (44)	ACCTCAATGTCTTCTTTCTGCAC (45)
TNF-alpha	TCCCAACAAGGAGGAGAAGTTCC (46)	GGCAGCCTTGTCCCTTGAAGAGA (47)

[0080]

[表3]

アンチセンスRNA検出用プライマー

AS transcript	AS transcript RT-Sense primer (SEQ ID NO)	AS transcript PCR-Forward primer (SEQ ID NO)	AS transcript PCR-Reverse primer (SEQ ID NO)
CCL2	ACCAGTATGACAGAGAACTAG (48)	TGTGATTTGGAAATGTGATGCCCTTA (49)	CAATACCTTGGACTCTCAAAACAC (50)
CCL20	CAGTGGICTTGTCCCAATGGAT (51)	ATTCATATTGCATCATAGTGTGTC (52)	ATTTAAGAAACAAATTAAGCACACAG (53)
CX3CL1	TTGGGAAGCTTGTGGGAGGCT (54)	TGGCTCCAGAGTACTAGTTGTAG (55)	TGGCACAGACATTGGTAATGATG (56)
IL-23	AGTGAGCCTAGGCTTTGGCCA (57)	GAAATGTGAAGACTCACAGTGCT (58)	CAATCCTCTAAACTGTTACAAGGA (59)
CD69	TGACTGGATGCTACTCTGTGA (60)	ACTCTCCAGATAGATAGGACTA (61)	ATGCATGAAGGCGCTGGCTTTTG (62)
NF-kappaB p65	CAGCTTCTAGCACTCTCTCTAG (63)	TATCCAGTGTCTCCCTGGACATG (64)	TGCCCTGCTATTAAAGGCACITGA (65)
TNF-alpha	GCGACTGGGGTGTTCATCCGTTC (66)	ATTTGGTGACCAGGCTGTGCTA (67)	CAGGACCAAGGGCAAGGTAAAT (68)

[0081] (結果)

mRNAとNATの両方を転写している遺伝子を探索すべく、本発明者らはIL-1 β により誘導される21遺伝子（サイトカインおよびケモカイン遺伝子を含む）を選択し、その3' UTRに相補的なNATを検出しようと試みた。即ち、RT用の遺伝子特異的センスプライマー（表3）を用いた鎖特異的RT-PCRにより、これらの21遺伝子からNATが転写されているかどうかを調べた。表4に示すとおり、鎖特異的RT-PCR分析の結果、21遺伝子中16遺伝子（76%）からNATが転写されていることが分かった。興味深いことに、3' UTR中のAREモチーフは13のNATを転写する遺伝子（81%）中に見出された。これらのデータはmRNAの3' UTRに対応するNATがIL-1 β 誘導性遺伝子から高頻度に転写されることを示唆しており、NATが広く発現しているとのアイデアを支持するものであった。

[0082] [表4]

Group	NAT	ARE	No. of genes	Gene product
1	(+)	(+)	13	CCL2, CCL20, CD69, CX3CL1, FcγR2b, Grk5, IL-23, phospholipid scramblase 1, NF-κB, Runx1, semaphorin 4A, Steap4, TNF-α
2	(+)	(-)	3	Lymphotoxin β, Psmb10, Toll-like receptor 2
3	(-)	(+)	4	Calcitonin-related polypeptide β, carbonic anhydrase II, CCL7, Smpd3
4	(-)	(-)	1	Cdkn2b
Total			21	

[0083] 本発明者らはmRNAとNATの両方が豊富に転写されている7遺伝子（CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF-κB p65およびTNF-α）を選択し、NATRE技術を適用した。本発明者らは、これらのmRNAの3' UTRの二次構造を予測し（図

1 A-図7 A)、各センスODNは、mRNA-NAT間相互作用の阻害を引きこすmRNAと競合する共通の保存領域(図1 B-図7 B)の少なくとも1つのループを含むというルールに従って、センスODNをデザインした(表5および図1 B-図7 B)。

[0084] [表5]

Gene	Sense oligo	Sense ODN (5'→3') (SEQ ID NO)	Domain (secondary structure)
CCL2	CCL2-Se1	TTAAGTAAATGTTAAACTTAT (8)	1
	CCL2-Se2	TCCATTTTTTTATTTCTCTG (9)	2
CCL20	CCL20-Se1	GGTTTCACCTGCACATCACT (10)	1
	CCL20-Se2	GTTTAGCTATTTAATGTTAA (11)	3
	CCL20-Se3	TAATTCCCACAATCTATGA (12)	3
	CCL20-Se4	TAATTCCCACAATCTATGA (12)	3
CX3CL1	CX3CL1-Se1	ACTTGIGCATGTGTGTACTT (13)	1
	CX3CL1-Se2	ACAAAGTGTCTACTGAAGCA (14)	2
	CX3CL1-Se3	CTACTGAAGCAGAGAGCAGC (15)	2
IL-23	IL23-Se1	AATCCATCAATGCAGACATC (16)	1
	IL23-Se2	GAAGCTGGCAGACAGCTGCA (17)	2
	IL23-Se3	TCCTTCAGTTCTAACAGAAC (18)	3
	IL23-Se4	AACAGTTTAGAGGATGTGA (19)	4
CD69	CD69-Se1	GCAATAGAGGTATAGGTGACT (20)	1
	CD69-Se2	GACCAATGCTTATGAAAACA (21)	5
	CD69-Se3	GTGGCAGATCTCTGTCAGGA (22)	6
NF-kappaB p65	p65-Se1	GAACCTTTGAGACCCCTGCTT (23)	1
	p65-Se2	TTATATCCAGTGTCTTCTCTC (24)	2
	p65-Se3	GCAACGCTCCTAGGAGCAGC (25)	3
	p65-Se4	AACCTCTCCATGCTGAGCAGT (26)	4
TNF-alpha	TNF-Se1	AGATGTCTCAGGCCTCCCTT (27)	1
	TNF-Se2	GGAACCCCTATATTTATAA (28)	2
	TNF-Se3	TAATTGCACCTGTGACTATT (29)	2
	TNF-Se4	AACATGTTTTCTGTGAAAAC (30)	
	TNF-Se5	AACAAGATATTTATCTAACC (31)	3
	TNF-Se6	GATTGGTGACCAAGGCTGTC (32)	
	TNF-Se7	ACTGAACCTCTGCTCCCCAC (33)	4

[0085] ラット肝細胞を各センスODNでトランスフェクトし、細胞をIL-1 β で刺激した後、標的mRNAの発現レベルを、Hepatology, 2008;47:686-697に記載されるように、SYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRにより測定した。結果を図8に示す。内部標準にElongation factor 1alpha (EF) mRNAを用い、グラフの値は、各mRNA/EF mRNA (%)を示し、センスODN非導入細胞における発現レベルに対する相対量として表した。予測された二次構造の保存された領域内のループ部分を含むRNA配列に対して設計されたほとんどのセンスODNは、標的mRNAの発現レベルを変化(増加又は減少)させたのに対し、該二次構造の保存された領域外に対して設計されたセンスODN(TNF-Se4およびTNF-Se6)は標的

mRNAの発現レベルに影響しなかった。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明のアンチセンスヌクレオチドおよびセンスオリゴヌクレオチドは、IL-1 β により誘導される、内在性アンチセンス転写物が存在する炎症/感染関連遺伝子の発現調節剤として、炎症性疾患や感染症などの予防及び／又は治療に有用である。

[0087] 本出願は、2011年5月12日付で日本国に出願された、特願2011-107707を基礎としており、ここで言及することにより、その内容は全て本明細書に包含される。

請求の範囲

- [請求項1] IL-1 β により誘導される、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2遺伝子の3' UTRに相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るアンチセンスヌクレオチド。
- [請求項2] IL-1 β により誘導される遺伝子が、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65またはTNF- α である、請求項1記載のアンチセンスヌクレオチド。
- [請求項3] 請求項1記載のアンチセンスヌクレオチドを含有してなる、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2の発現調節剤。
- [請求項4] 炎症性疾患または感染症の予防又は治療用である、請求項3記載の剤。
- [請求項5] IL-1 β により誘導される、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2遺伝子の3' UTRに相補的な配列を含む内在性アンチセンス転写物に相補的な配列を含み、該遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項6] IL-1 β により誘導される遺伝子が、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65またはTNF- α である、請求項5記載のセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項7] 以下の(a)-(g)のいずれかである請求項6記載のセンスオリゴヌクレオチド。
- (a) 配列番号1に示されるCCL2 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号25-51で示されるドメイン1もしくはヌクレオチド番号103-175で

示されるドメイン2、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CCL2遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(b) 配列番号2に示されるCCL20 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号65-107で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号124-155で示されるドメイン2もしくはヌクレオチド番号214-282で示されるドメイン3、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CCL20遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(c) 配列番号3に示されるCX3CL1 mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号1103-1202で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号1305-1369で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号1416-1482で示されるドメイン3、ヌクレオチド番号1633-1681で示されるドメイン4、ヌクレオチド番号1688-1745で示されるドメイン5、もしくはヌクレオチド番号1784-1810で示されるドメイン6、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CX3CL1遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(d) 配列番号4に示されるIL-23A mRNAの3' UTR配列中、ヌクレオチド番号37-55で示されるドメイン1、ヌクレオチド番号193-303で示されるドメイン2、ヌクレオチド番号380-448で示されるドメイン3、もしくはヌクレオチド番号555-600で示されるドメイン4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と90%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、IL-23A遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(e) 配列番号 5 に示される CD69 mRNA の 3' UTR 配列中、ヌクレオチド番号 15-32 で示されるドメイン 1、ヌクレオチド番号 120-186 で示されるドメイン 2、ヌクレオチド番号 218-252 で示されるドメイン 3、ヌクレオチド番号 344-370 で示されるドメイン 4、ヌクレオチド番号 389-633 で示されるドメイン 5、もしくはヌクレオチド番号 656-786 で示されるドメイン 6、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1 以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、CD69 遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(f) 配列番号 6 に示される NF- κ B p65 mRNA の 3' UTR 配列中、ヌクレオチド番号 161-301 で示されるドメイン 1、ヌクレオチド番号 343-380 で示されるドメイン 2、ヌクレオチド番号 401-412 で示されるドメイン 3、もしくはヌクレオチド番号 473-523 で示されるドメイン 4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1 以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、NF- κ B p65 遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

(g) 配列番号 7 に示される TNF- α mRNA の 3' UTR 配列中、ヌクレオチド番号 304-405 で示されるドメイン 1、ヌクレオチド番号 430-546 で示されるドメイン 2、ヌクレオチド番号 687-713 で示されるドメイン 3、もしくはヌクレオチド番号 752-776 で示されるドメイン 4、又は他の哺乳動物におけるオルソログのそれらに対応するドメイン内の、1 以上のループ構造の少なくとも一部を含む配列と 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、TNF- α 遺伝子の発現を調節し得るセンスオリゴヌクレオチド

[請求項 8]

請求項 5 記載のセンスオリゴヌクレオチドを含有してなる、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、Ly

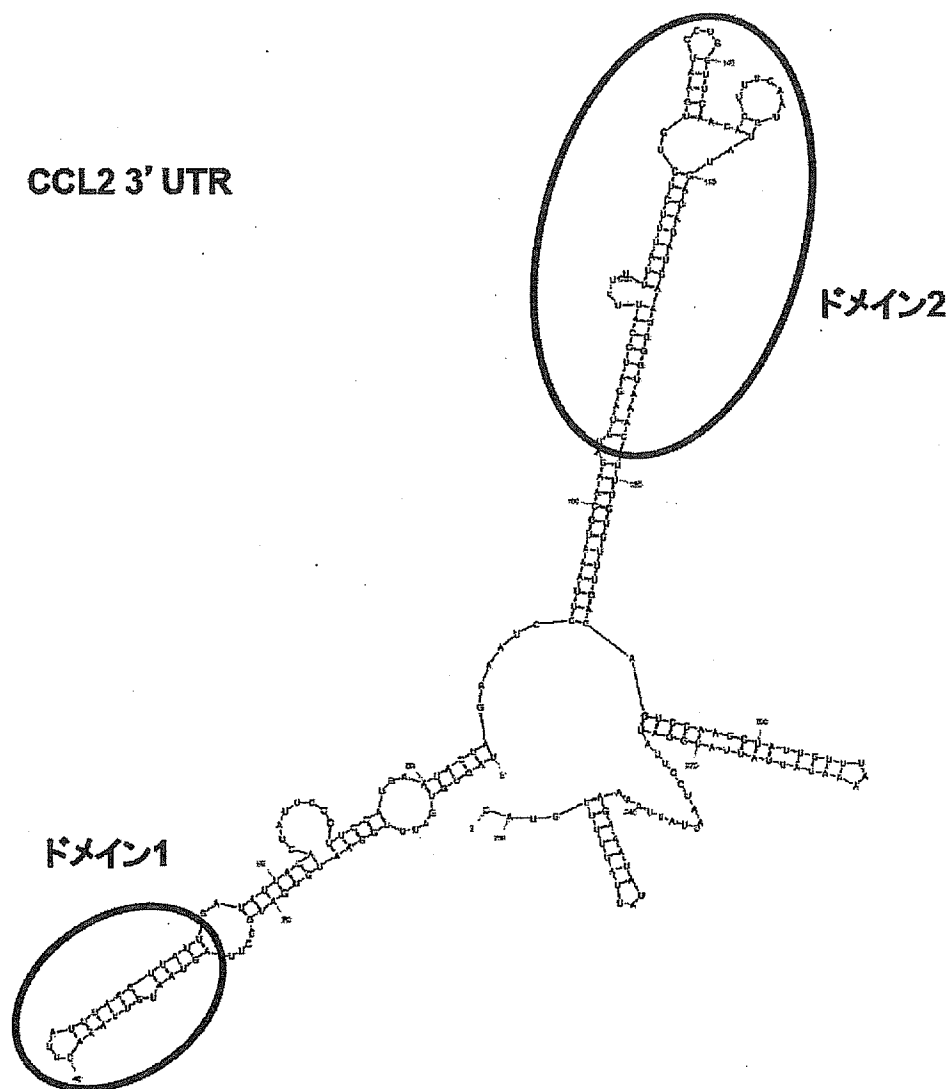
lymphotoxin β Psmb10またはTLR2の発現調節剤。

[請求項9] 炎症性疾患または感染症の予防又は治療用である、請求項8記載の剤。

[請求項10] 被験物質の存在下及び非存在下で、CCL2、CCL20、CX3CL1、IL-23A、CD69、NF- κ B p65、TNF- α 、Fam89a、Grk5、phospholipid scramblase 1、Runx1、semaphorin 4A、Steap4、lymphotoxin β Psmb10またはTLR2遺伝子のmRNAとそれに対する内在性アンチセンス転写物とのハイブリダイゼーションを検出・比較することを特徴とする、該遺伝子の発現調節物質のスクリーニング方法。

[請求項11] 前記遺伝子のmRNAとそれに対する内在性アンチセンス転写物を発現する細胞に被験物質を接触させ、該細胞における該mRNA量及び／又はそれにコードされるタンパク質量の変化を測定することを特徴とする、請求項10記載の方法。

[図1A]



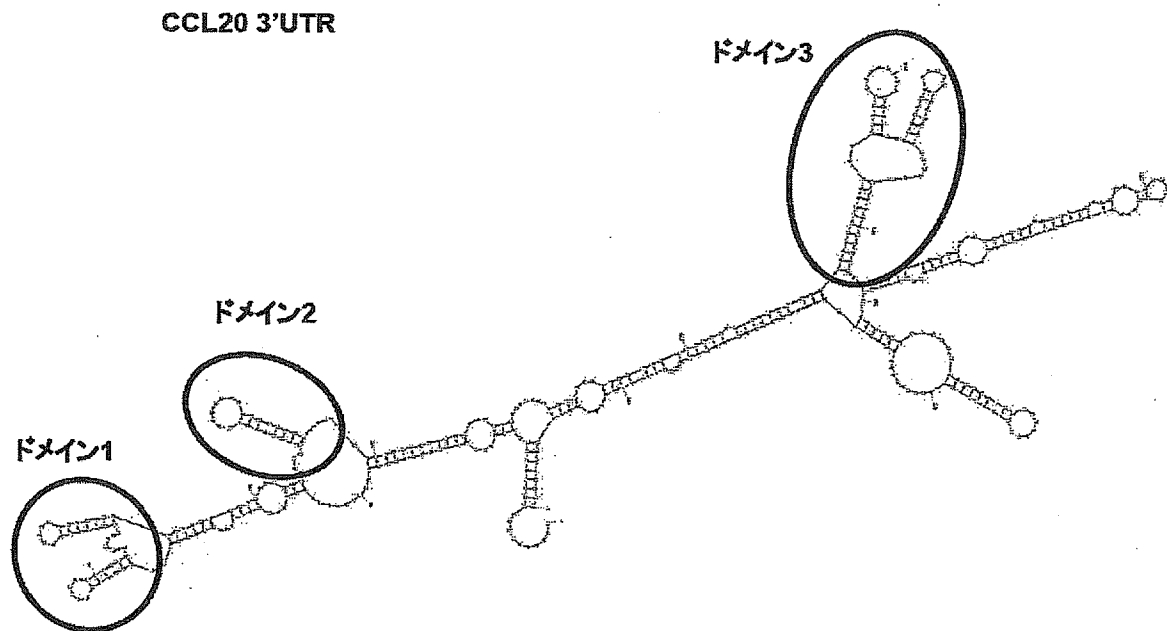
[図1B]

<ドメイン1>
 +++++ +++++ +++++ +
 TGTGATTGG AATGTGATCG CITAAAGTAAT GTTAAAGTTA TTAACTTAT TGATATTACA CTATTCGGT CCATGAATAC TAGAAATCCT TAAATGCAAG 100
 CCL2-Se1

<ドメイン2>
 +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +
 ATGTAGATCC ATTTTTTAT TTCTCTGTA ATCCTGGTC AACACTTCA ATGTATGAGA GATGAATGGG TAAACTTTGT GTTGAGAGT CCAAGGTATT 200
 CCL2-Se2

GTTTAAATA TTATTATGGA TATTCCTAAT TATTAAAGA AATATATTAT TTTTGTAC

[図2A]



[図2B]

<ドメイン1>

+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
 AAACGGATGC TTTTGTGGGA TGGAAATTGGA CACAGCCCAA GGAGGAAATG ATCAGAGCTG GGGTTGGAGG TTTCACCTGC ACATCACTGC ACAGACCTGA 100
CCL20-Se1

<ドメイン2>

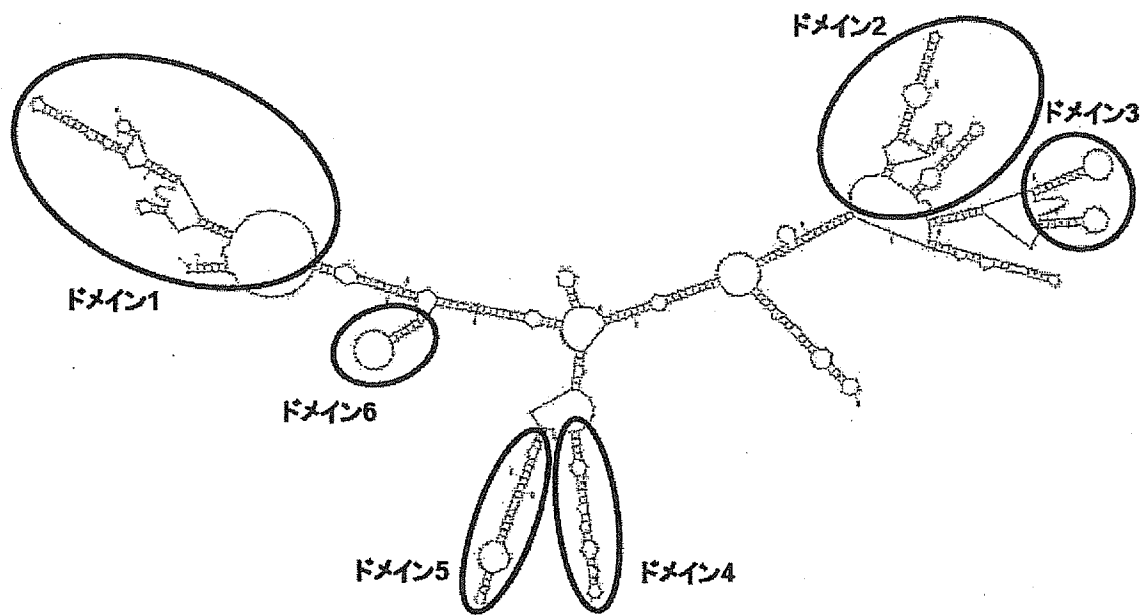
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
 TTTGTGTCCG AGTGGTCTTG TCCAATGGAT GAAGTTGATT CATATTGCAT CATAGTGTGT CATATTTAAG CTCATATTAG AGTTAAGTTG TATTTTGTGT 200

<ドメイン3>

+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++
 TATTTATAGA TCCGAATTTT CTATGTTTAG CTATTTAATG TTAATTTCCG ACAATCTATG AGGGGCGCTT AGTAGAAGGT TCAATATTAT GTTTAAGGCA 300
CCL20-Se2 CCL20-Se3

GTAAAGTTAT ATGGCCCTTC TTGGAACAA TAAGCTATTG TAAAAATATT TAATGTTCTT CTGTGTGCTT AATTGTTTCT TAAATTGATA CGATTTACTT 400

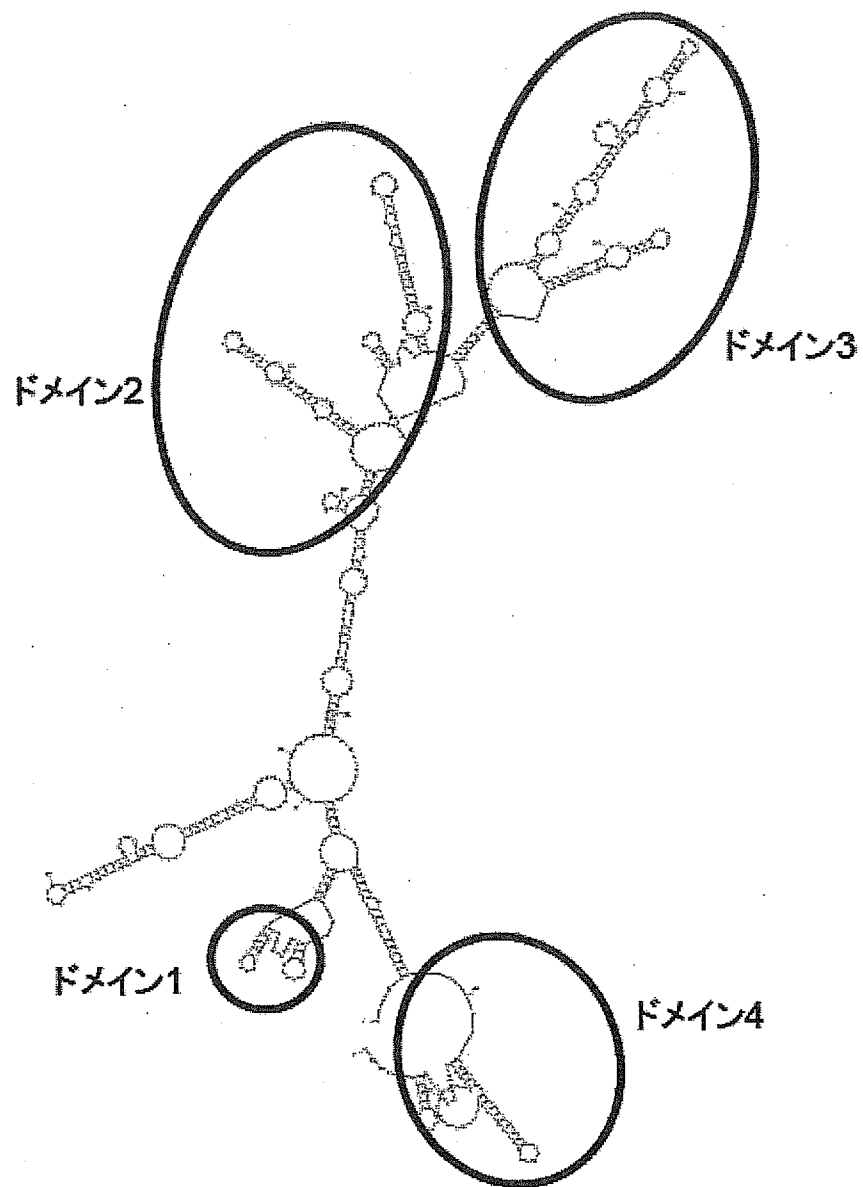
[図3A]

CX3CL1 3'UTR
(nt1098-1855)

1855

[図4A]

IL-23A 3'UTR



[図4B]

<ドメイン1>

+++ ++++++ ++++++

GGATGCCAG GTTCCCATGG CTACAGTGAT AAACTAATC CATCAATGCA GACATCTGCA AGCTAATTAA CCCATCAGGA CTTTCTCTGT TCTTGTITTTG 100
 IL23-Se1

++++++

TATGTTTTGT GTGAAGGGCA AGGACACCAT TATTAAGAG AAAAGCAACA AAGCCAGAC GGCAGTCAC TAGAGGGAGG AGATGGAGAA GAGGAATCAA 200

<ドメイン2>

++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++

GTCAAGCCT TGGCCTTGA AGCTGGCAGA CAGCTGCATG GCAGAAGGGG AAGGGGGTGG AGACATCGGA GAACTGTGA GAAGCCTGGA GCATCAGGAA 300
 IL23-Se2

+++

+ ++++++ ++++++

AAGTGAGCCT AGGCTTTGGC CAGAATCTGT AAGTAAACA AGAAAAGGG AATGTTATAC TTTTCTGAGT GATTGGGGGA AATGTGAAGA CTCACAGTGC 400

<ドメイン3>

++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++

TCCAGAGGGA AGCTCTGTAA CTGCTGCTT AGTCCTTCAG TTCTAACAGA ACCCAGCACT AAGAAGTAAC AGAACTACCA ACATGGACTG ACTCGCGATA 500
 IL23-Se3

<ドメイン4>

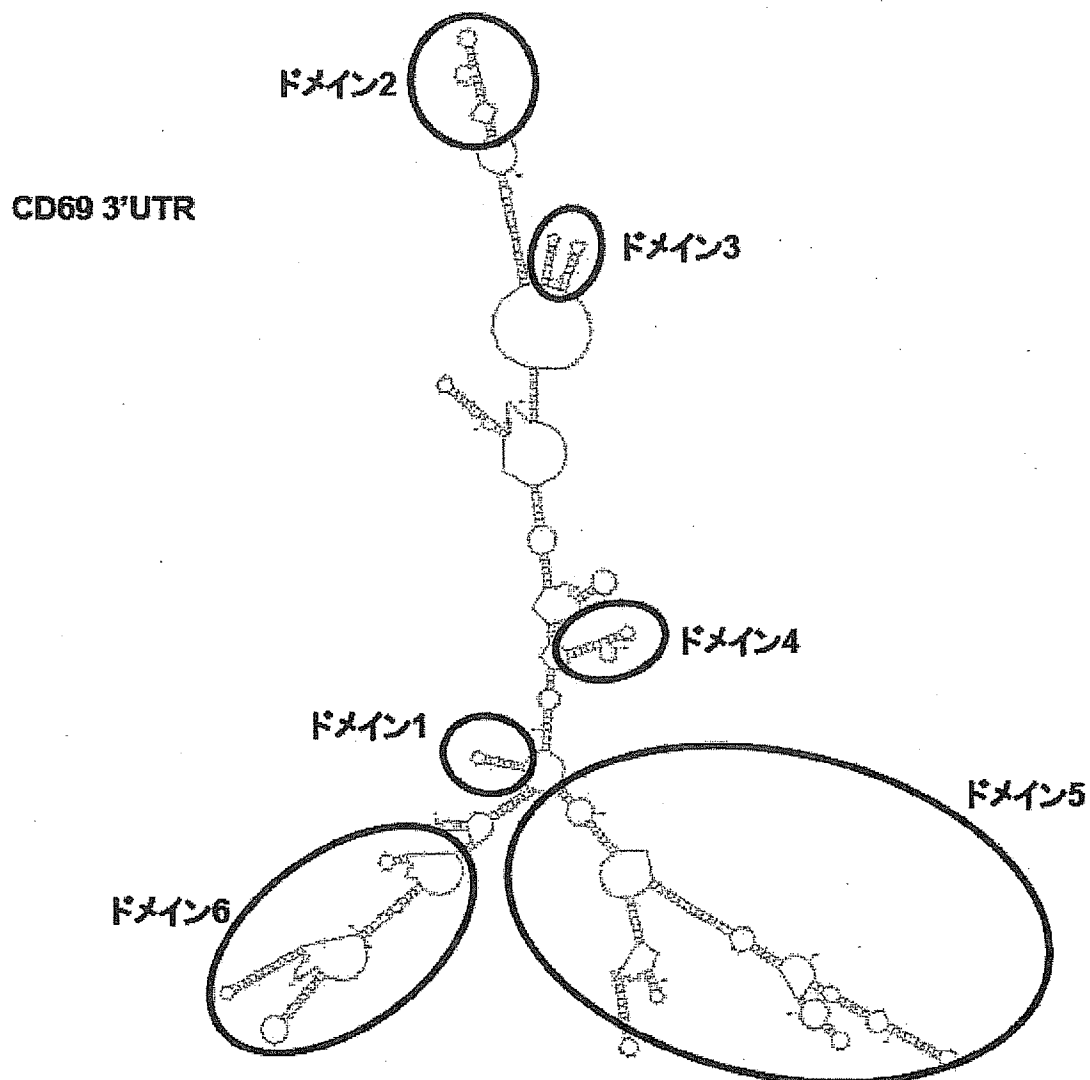
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++

CCGACCTGTG ACAAAGCTGC GTATTATTA AGTGGGAAGG GAAATTTTGG TATTATTAT CCTGTGAAGA GTTAGAGGA TTGTATTATTA TTATATTAT 600
 IL23-Se4

GAGGAATTAT GTATTTTTTT AATAAGATT TATTTATGTG GC

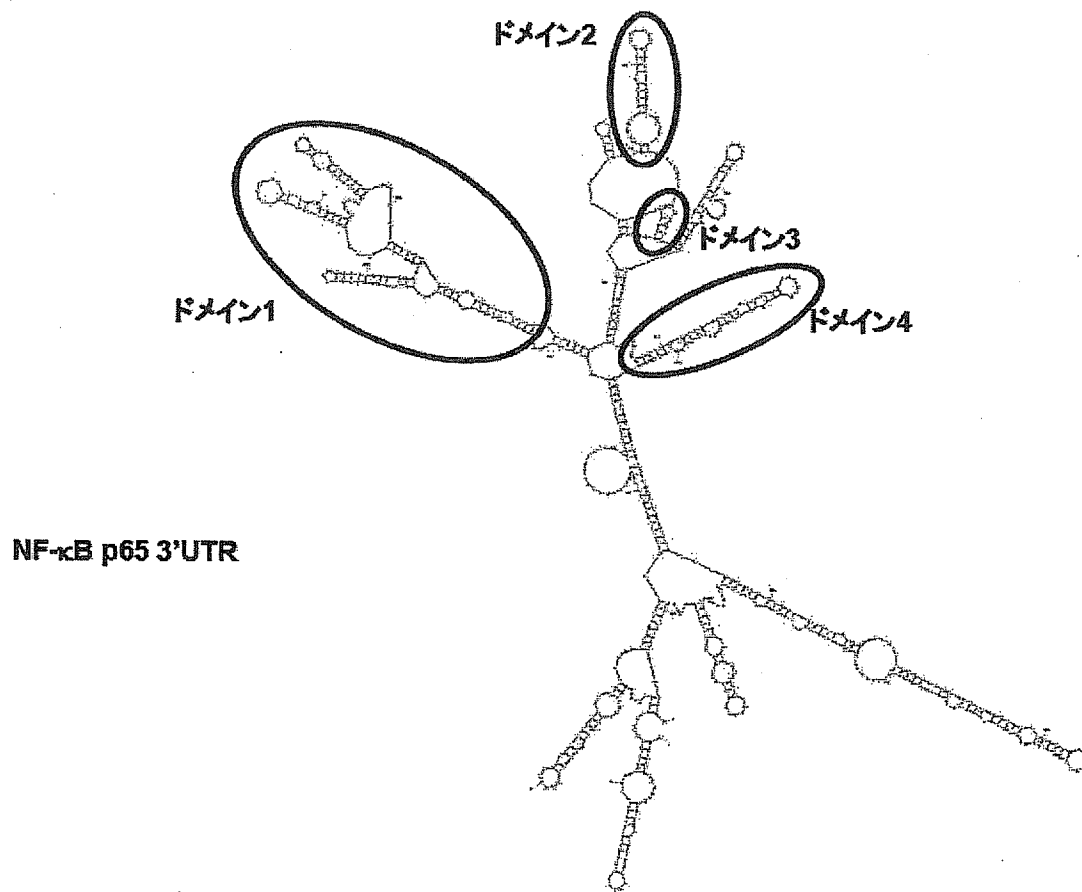
642

[図5A]



TGTTTCTATG TATGTGAAAA TAAAAGAACA GACAAACGGT 940

[図6A]



[図6B]

GGCACTGATG GTGACCGTGC TCAGAGTGGG GCACTGAAGC CTCTCTGAAG CATGTACAGA TTCTGGGGAG TGTGCACCAA CTGCCCCCAA CTCTTTTGGG 100

+++++ +++++ +++++ +++++
TGATATCTCC TGGGGGTGGC ACATTTTATT CTTTATCAG CAATATCTCA CTCTCTTTT GAGGTGCTT AAGCAGAAGC ATTAACTCC CTGAAGTGA 200

<ドメイン1>

+++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
GCTAGGAGGA CTGGGCTCT TCCCTGTAG GATAGTGGC TCTCTTTTG GTAGGSACT CTGAGACC TGCITCCATC CTCAGCTTC TAGCACTCTC 300
p65-Se1

<ドメイン2>

+ +++++ +++++ +++++ +++++
CTAGAGAGGG GCAGACTGGA GCTGTGGCT TCAGGCCGTA AAGCCTTATA TCCAGTGTCT TCCTGACAT GGATCCCTGC ACACCTTGAT CCAAAGCAAC 400
p65-Se2

<ドメイン3>

<ドメイン4>

+++++ ++ +++++ +++++ +++++ +++++
GCTCCTAGGA GCAGCCCCA TGAGTCTGC CTGACCCAG CATTGAGGG GGCACTTTC TGTCTGTGG AGCTCTGCG CTGCCAACTC TCCATGCTGA 500
p65-Se3 p65-Se4

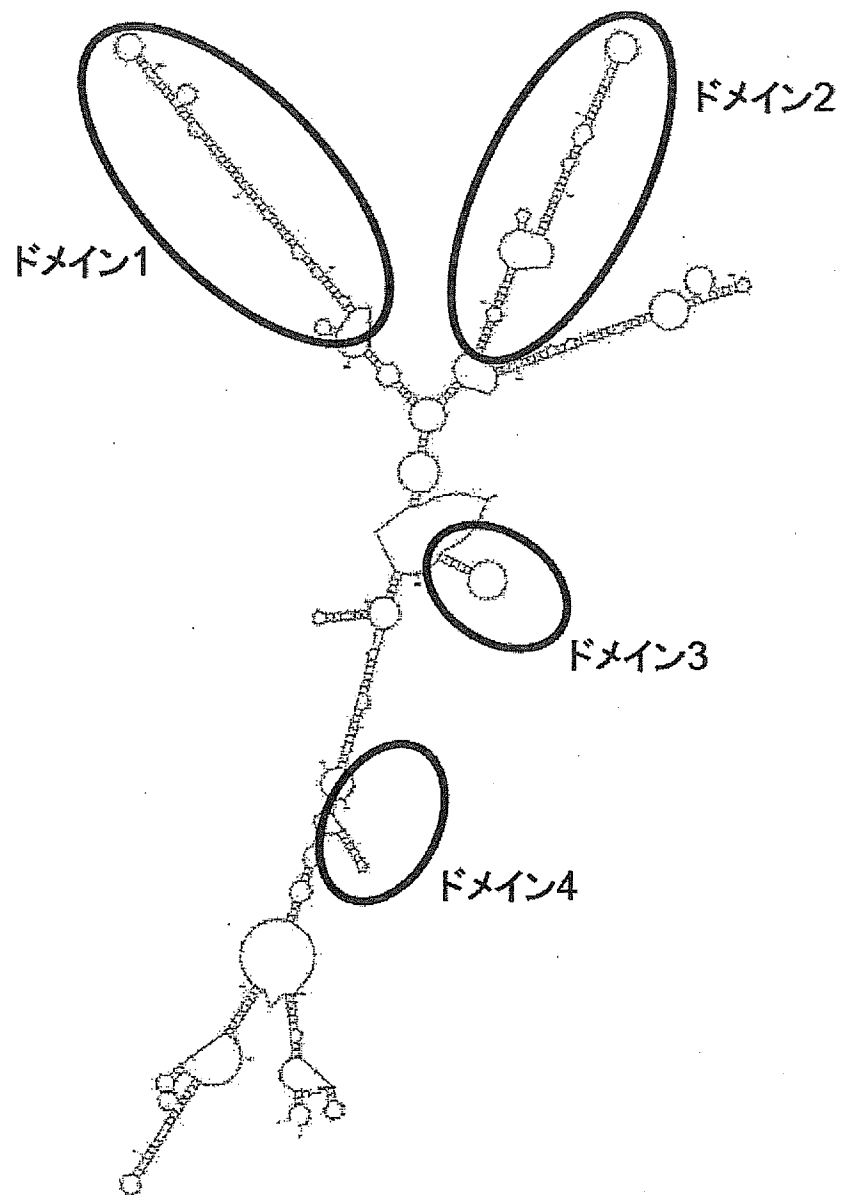
+++++ +++++ ++
GCACTGGCTG AGGGGACAG GAGGGACAT TGTGGCTGC CTTAGGACC GTGAGCTGT TTGTTTGAG ACATCCCTGC TTCCCTTTC TCAAGTGGCT 600

TAATAGCAGG GCAAATTGAG TAGAGTCAGG AGGCGAGACC AGACCTCAGC CATAAGACAG TCTTTACTCA AAAAGCTATT GAGCTCTGC TCTTTCTAGG 700

TCTGAACATA TAAATGTATT ACCACGCTG

729

[図7A]

TNF- α 3'UTR

[図7B]

GGGAGTGGG GTGTTCATCC GTTCTCTACC CAGCCCTGT CCGGACTCT GACCCCATC ACTCTGACC GTTATCGTC TACTCTCAG AGCCCAAT 100

CTGTGCTT CTAAGTAGA AAGGAATTG TGGTCAGGG TCAACTCCG GGTGAGAT TTGGAACAAC TACGATGTC AGAAACACAG GAGATGCTGA 200

AGTAGTGGC TGGATTGGG GCTGCTCATG AGCCGCCACC GGAAGGATT CCAATGGCT TTGGAACCTC ACTGATCCC CGAATGTGA TGCTGAGTG 300

<ドメイン1>

+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
 GATCGGGGA GTGAGGGGG GAGTGGATCA GGTGTCTCT GGTGACAAG GCTGCTGAG ATGCTCAGG CCTCCCTCC TTGCTTCTT CCTCCCTCA 400
 TNF-Se1

<ドメイン2>

++++ + ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
 GAGCTTCCA GACTGTTCC TGAGGCACAG CGCCAGCTT TCCTTACGA ACCCCTATA TTTATAATTG CACCTGTGAC TATTTATTA TTATTTATTA 500
 TNF-Se2 TNF-Se3

+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
 TTTATTTATT TGCTTATGAA TGTATTTATT TGAAGGCCG GGGGTCCTG GAGGACCCAG CGTTGGGAAG GTGTCTCAG GCCAACATGT TTTCTGTGAA 600
 TNF-Se4

<ドメイン3>

++++ ++++++
AACGAGCTA AACTACCAGC TATCCCATC TGGTCCCCA CCGCGGCTC GTTGCTCCC CCTTTCTTT TGCTTATGTT TAAACAAGA TATTTATCTA 700
 TNF-Se5

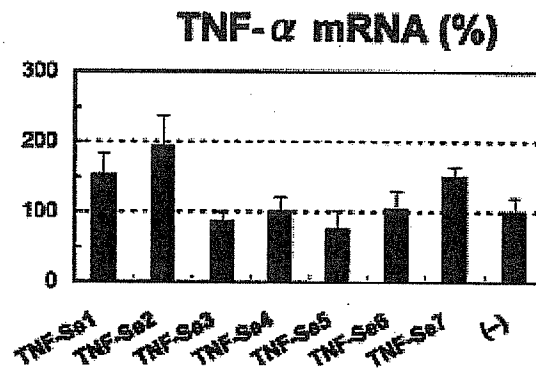
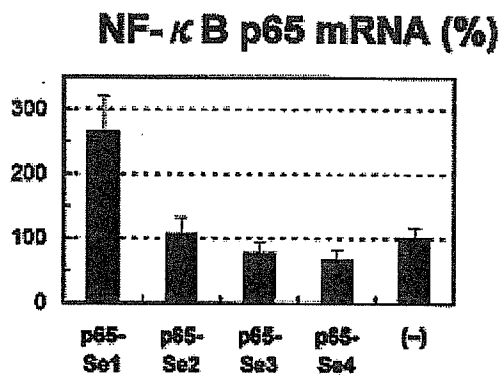
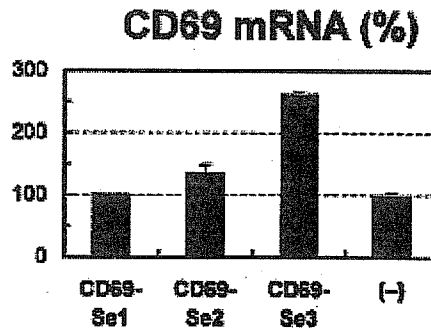
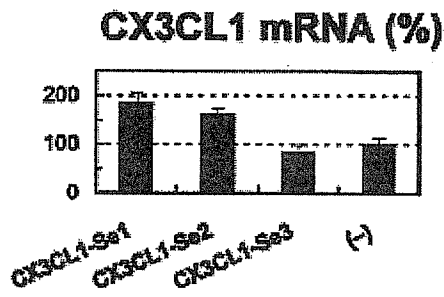
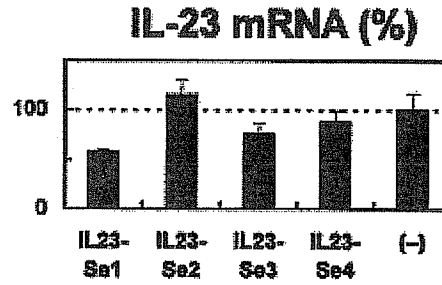
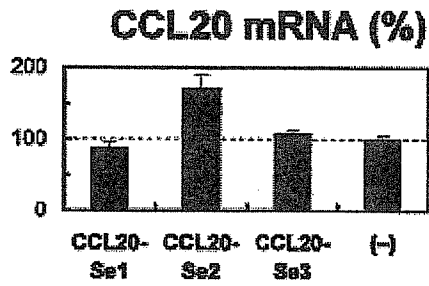
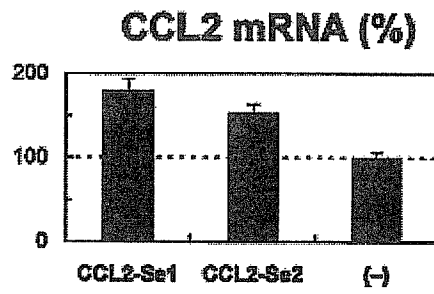
<ドメイン4>

+++++ +++ ++++++ ++++++ ++++++
ACCGAGTTGT CTTAATAATG CTGATTGGT GACCAAGCTG TGCTACATC ACTGAACCTC TGCTCCAC GGGAGCGTG ACTGTAATCG CCTACGGGT 800
 TNF-Se6 TNF-Se7

CATTGAGAGA AATAAGTTC GCTTGAAGA G

831

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09</i> (2006.01)i, <i>A61K31/7088</i> (2006.01)i, <i>A61K48/00</i> (2006.01)i, <i>A61P29/00</i> (2006.01)i, <i>A61P31/00</i> (2006.01)i, <i>C12N15/113</i> (2010.01)i, <i>C12Q1/68</i> (2006.01)i, <i>G01N33/15</i> (2006.01)i, <i>G01N33/50</i> (2006.01)i, <i>G01N33/68</i> (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) <i>C12N15/09</i> , <i>A61K31/7088</i> , <i>A61K48/00</i> , <i>A61P29/00</i> , <i>A61P31/00</i> , <i>C12N15/113</i> , <i>C12Q1/68</i> , <i>G01N33/15</i> , <i>G01N33/50</i> , <i>G01N33/68</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/142303 A1 (Amino Up Chemical Co., Ltd., Kansai Medical University), 13 December 2007 (13.12.2007), paragraphs [0019], [0027] to [0041], [0055] to [0067] & US 2010/0227318 A1 & EP 2031056 A1 & AU 2007255731 A & KR 10-2009-0023464 A1 & CN 101466835 A & TW 200815595 A	1-11
☒ 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 20 August, 2012 (20.08.12)		Date of mailing of the international search report 28 August, 2012 (28.08.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062230

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/142304 A1 (Amino Up Chemical Co., Ltd., Kansai Medical University), 13 December 2007 (13.12.2007), paragraphs [0020], [0028] to [0042], [0056] to [0068] & US 2010/0248364 A1 & EP 2031057 A1 & AU 2007255732 A1 & NZ 574034 A & KR 10-2009-0018859 A & CN 101460624 A & TW 200808820 A	1-11
Y	MATSUI, Kosuke et al., Natural antisense transcript stabilizes inducible nitric oxide synthase messenger RNA in rat hepatocytes., Hepatology, 2008, Vol. 47, No. 2, p. 686-697, page 691, left column, line 3 to page 693, right column, line 15	1-11
Y	JP 2010-104280 A (Ritsumeikan et al.), 13 May 2010 (13.05.2010), paragraphs [0009], [0052] to [0054] (Family: none)	1-11
Y	SAUER, Ines et al., Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin., Blood, 2006, Vol. 107, No. 12, p. 4790-4797, page 4795, right column, lines 1 to 26	1-11
Y	LACHANCE, Claude et al., Posttranscriptional gene expression regulation in CpG-activated macrophages depends on FXR1P RNA-binding protein., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, Vol.51, No. 2, p. 422-430, page 426, left column, line 27 to page 427, left column, line 17, Table 2, 3.	1-11
Y	Database Nucleotide, The National Center for Biotechnology Information, Accession No. NM_031530, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13928713?sat=14&satkey=6568607 >, 10-APR-2011 uploaded, [retrieved on 2012-08-20], Definition: Rattus norvegicus chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2), mRNA	1-11
Y	GHISOLFI, Laura et al., Increased Bcl2 expression by antisense oligoribonucleotides targeting the adenine-uridine-rich element motif., Mol. Pharmacol., 2005, Vol. 68, No. 3, p. 816-821, page 818, left column, line 44 to right column, line 4, fig. 4.	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062230

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BEVILACQUA, Annamaria et al., Stabilization of cellular mRNAs and up-regulation of proteins by oligoribonucleotides homologous to the Bcl2 adenine-uridine rich element motif., Mol. Pharmacol., 2007, Vol. 71, No. 2, p. 531-538, page 535, right column, line 4 to page 536, left column, line 9, fig. 4.	5-9
X/Y	NAKAMACHI, Yuji et al., MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis., Arthritis Rheum., 2009, Vol. 60, No. 5, p. 1294-1304, page 1298, left column, line 15 to right column, line 5, page 1300, right column, line 1 to page 1301, left column, line 13	1-4/5,6
Y	JP 2011-504110 A (Panagene Inc.), 03 February 2011 (03.02.2011), claims; examples & US 2010/0240058 A1 & EP 2215228 A2 & WO 2009/066967 A2 & KR 10-2009-0053743 A	5,6
Y	MEI, Mei et al., Suppression of breast cancer cells in vitro by polyamidoamine-dendrimer-mediated 5-fluorouracil chemotherapy combined with antisense micro-RNA 21 gene therapy., Journal of Applied Polymer Science, 2009, Vol. 114, p. 3760-3766, Figure 4-6	5,6
Y	LAL, Ashish et al., p16(INK4a) translation suppressed by miR-24., PLoS One, 2008, Volume 3, Issue 3, e1864, p. 1-11, Figure 7.	5,6
A	Emi YOSHIKAI et al., "Sense Oligo o Mochiita NATRE Technology ni yoru Messenger RNA Ryo no Chosetsu", Antisense Symposium Koen Yoshishu, 2010, page 36	1-11
A	ZHANG, Yong et al., Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species., Nucleic Acids Res., 2006, Vol. 34, No. 12, p. 3465-3475	1-11
A	ZHANG, Yong et al., NATsDB: Natural Antisense Transcripts DataBase., Nucleic Acids Res., 2007, Vol. 35, p. D156-D161	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/062230

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.:
Among the inventions of claims 1-11, parts related to CCL2 gene.

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/JP2012/062230

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

Among the inventions of claims 1-11, parts related to CCL2 gene (Invention group 1), parts related to CCL20 gene (Invention group 2), parts related to CX3CL1 gene (Invention group 3), parts related to IL-23A gene (Invention group 4), parts related to CD69 gene (Invention group 5), parts related to NF- κ Bp65 gene (Invention group 6), and parts related to TNF- α gene (Invention group 7); among the inventions of claims 1, 3-5 and 8-11, parts related to Fam89a gene (Invention group 8), parts related to Grk5 gene (Invention group 9), parts related to phospholipid scramblase 1 gene (Invention group 10), parts related to Runx1 gene (Invention group 11), parts related to semaphorin 4A gene (Invention group 12), parts related to Steap4 gene (Invention group 13), parts related to lymphotoxin β gene (Invention group 14), parts related to Psmb10 gene (Invention group 15), and parts related to TLR2 gene (Invention group 16).

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, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(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, A61K31/7088, A61K48/00, A61P29/00, A61P31/00, C12N15/113, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/68			
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			
日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 2 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 2 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 2 年			
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/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI			
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	WO 2007/142303 A1 (株式会社アミノアップ化学、学校法人関西医科大学) 2007.12.13, 段落【0019】、【0027】－【0041】、【0055】－【0067】、& US 2010/0227318 A1 & EP 2031056 A1 & AU 2007255731 A & KR 10-2009-0023464 A1 & CN 101466835 A & TW 200815595 A	1 - 1 1	
Y	WO 2007/142304 A1 (株式会社アミノアップ化学、学校法人関西医科大学) 2007.12.13, 段落【0020】、【0028】－【0042】、【0056】－【0068】 & US 2010/0248364 A1 & EP 2031057 A1	1 - 1 1	
☒ 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 2 0 . 0 8 . 2 0 1 2		国際調査報告の発送日 2 8 . 0 8 . 2 0 1 2	
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） 小倉 梢 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 4 5 0 4

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
	& AU 2007255732 A1 & NZ 574034 A & KR 10-2009-0018859 A & CN 101460624 A & TW 200808820 A	
Y	MATSUI, Kosuke et al., Natural antisense transcript stabilizes inducible nitric oxide synthase messenger RNA in rat hepatocytes., Hepatology, 2008, Vol. 47, No. 2, p. 686-697, 第 6 9 1 頁左欄第 3 行－第 6 9 3 頁右欄第 1 5 行	1－1 1
Y	JP 2010-104280 A (学校法人立命館他) 2010.05.13, 段落【0009】、【0052】－【0054】 (ファミリーなし)	1－1 1
Y	SAUER, Ines et al., Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin., Blood, 2006, Vol. 107, No. 12, p. 4790-4797, 第 4 7 9 5 頁右欄第 1－2 6 行	1－1 1
Y	LACHANCE, Claude et al., Posttranscriptional gene expression regulation in CpG-activated macrophages depends on FXR1P RNA-binding protein., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, Vol. 51, No. 2, p. 422-430, 第 4 2 6 頁左欄第 2 7 行－第 4 2 7 頁左欄第 1 7 行、Table 2, 3.	1－1 1
Y	Database Nucleotide, The National Center for Biotechnology Information, Accession No. NM_031530, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13928713?sat=14&satkey=6568607 >, 10-APR-2011 uploaded, [retrieved on 2012-08-20], Definition: Rattus norvegicus chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2), mRNA	1－1 1
Y	GHISOLFI, Laura et al., Increased Bcl2 expression by antisense oligoribonucleotides targeting the adenine-uridine-rich element motif., Mol. Pharmacol., 2005, Vol. 68, No. 3, p. 816-821, 第 8 1 8 頁左欄第 4 4 行－右欄第 4 行、Fig. 4.	1－4
Y	BEVILACQUA, Annamaria et al., Stabilization of cellular mRNAs and up-regulation of proteins by oligoribonucleotides homologous to the Bcl2 adenine-uridine rich element motif., Mol. Pharmacol., 2007, Vol. 71, No. 2, p. 531-538, 第 5 3 5 頁右欄第 4 行－第 5 3 6 頁左欄第 9 行、Fig. 4.	5－9
X/Y	NAKAMACHI, Yuji et al., MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion	1－4／5、6

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
	in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis., Arthritis Rheum., 2009, Vol. 60, No. 5, p. 1294-1304, 第1298頁左欄第15行ー右欄第5行、第1300頁右欄第1行ー第1301頁左欄第13行	
Y	JP 2011-504110 A (パナジェン インコーポレイテッド) 2011.02.03, 特許請求の範囲、実施例 & US 2010/0240058 A1 & EP 2215228 A2 & WO 2009/066967 A2 & KR 10-2009-0053743 A	5、6
Y	MEI, Mei et al., Suppression of breast cancer cells in vitro by polyamidoamine-dendrimer-mediated 5-fluorouracil chemotherapy combined with antisense micro-RNA 21 gene therapy., Journal of Applied Polymer Science, 2009, Vol. 114, p. 3760-3766, Figure 4-6	5、6
Y	LAL, Ashish et al., p16(INK4a) translation suppressed by miR-24., PLoS One, 2008, Volume 3, Issue 3, e1864, p. 1-11, Figure 7.	5、6
A	吉開会美他, センスオリゴを用いたNATREテクノロジーによるメッセンジャー-RNA 量の調節, アンチセンスシンポジウム講演要旨集, 2010, p. 36	1-11
A	ZHANG, Yong et al., Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species., Nucleic Acids Res., 2006, Vol. 34, No. 12, p. 3465-3475	1-11
A	ZHANG, Yong et al., NATsDB: Natural Antisense Transcripts DataBase., Nucleic Acids Res., 2007, Vol. 35, p. D156-D161	1-11

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

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

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査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PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項1-11に係る発明のうち、CCL2遺伝子に関するもの（発明1）、CCL20遺伝子に関するもの（発明2）、CX3CL1遺伝子に関するもの（発明3）、IL-23A遺伝子に関するもの（発明4）、CD69遺伝子に関するもの（発明5）、NF- κ B p65遺伝子に関するもの（発明6）、TNF- α 遺伝子に関するもの（発明7）

請求項1、3-5、8-11に係る発明のうち、Fam89a遺伝子に関するもの（発明8）、Grk5遺伝子に関するもの（発明9）、phospholipid scramblase 1遺伝子に関するもの（発明10）、Runx1遺伝子に関するもの（発明11）、semaphorin 4A遺伝子に関するもの（発明12）、Steap4遺伝子に関するもの（発明13）、lymphotoxin β 遺伝子に関するもの（発明14）、Psmb10遺伝子に関するもの（発明15）、TLR2遺伝子に関するもの（発明16）

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項について作成した。

請求項1-11に係る発明のうち、CCL2遺伝子に関するもの

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。