(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
2007 年2 月15 日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/018236 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/315736

(22) 国際出願日: 2006 年8 月9 日 (09.08.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-233435 2005 年8 月11 日 (11.08.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒8410017 佐賀県鳥栖市田代大官町４０８ Saga (JP). 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒2608667 千葉県千葉市中央区市場町１番１号 Chiba (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原 章 (NAKAGAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒2600801 千葉県千葉市中央区仁戸名町６６６－２千葉県がんセンター内 Chiba (JP). 竹永 啓三 (TAKENAGA, Keizo) [JP/JP]; 〒2600801 千葉県千葉市中央区仁戸名町６６６－２千葉県がんセンター内 Chiba (JP). 望月 重信 (MOCHIZUKI, Shigenobu) [JP/JP]; 〒2600801 千葉県千葉市中央区仁戸名町６６６－２千葉県がんセンター内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒1040061 東京都中央区銀座一丁目１０番６号銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

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

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

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

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

(54) Title: SCREENING METHOD FOR COMPOUND INHIBITING DEVELOPMENT OR PROGRESSION OF FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND DIAGNOSTIC METHOD FOR FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

(54) 発明の名称: 家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法、及び家族性筋萎縮性側索硬化症の診断方法

(57) Abstract: A screening method comprising the following steps of: culturing a cell in each condition of the presence or absence of a test compound; measuring the expression level of HIF-1α in the cell cultured in each condition; and in the case where the expression level of HIF-1α in the cell cultured in the presence of the test compound is less than the expression level of HIF-1α in the cell cultured in the absence of the test compound, determining that the test compound is a compound inhibiting development or progression of familial amyotrophic lateral sclerosis.

(57) 要約: 以下の工程を備えるスクリーニング方法：被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件において細胞を培養する工程；培養したそれぞれの細胞における、ＨＩＦ－１αの発現量を測定する工程；及び被検化合物の存在下において培養した細胞におけるＨＩＦ－１αの発現量が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるＨＩＦ－１αの発現量よりも少ない場合に、当該被検化合物を家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物であると判定する工程。

WO 2007/018236 A1

明 細 書

家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法、及び家族性筋萎縮性側索硬化症の診断方法

技術分野

[0001] 本発明は、家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法に関する。また、本発明は、家族性筋萎縮性側索硬化症の診断方法に関する。

背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症(ALS;Amyotrophic Lateral Sclerosis)は神経難病の一つであり、脊髄の運動ニューロンの脱落により発症後数年で歩行困難となり、最後には死に至る悲惨な疾患である。ALSの原因はいまだ不明であり、予防・治療法もないのが現状である。1993年にポジショナルクローニングにより、常染色体優性遺伝の家族性ALS(FALS;Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis)の約20%がスーパーオキシドジスムターゼ－1(SOD－1)の変異で発症することが報告された(非特許文献1)。SOD－1は細胞質で活性酸素腫(ROS;Reactive Oxygen Species)から過酸化水素への反応を触媒する酵素である。しかし、FALSにおいて、SOD－1活性レベルと病状との間に相関が見出されないことから(非特許文献2)、変異SOD－1の示すtoxic-gain-of-functionがFALSの原因であろうと考えられ、原因解明が大きな注目を集めている。

[0003] FALSにおいてSOD－1活性レベルと病状との間に相関が認められないが、運動ニューロンにおいては、酸化還元系の以上のためにROSが過剰に産生されており、これがFALSの発症に深く関与していることを示す報告がなされている(非特許文献3、4)。また、ROSの発生を抑制する抗酸化剤がALSの発症を遅延させる可能性も指摘されている(非特許文献5、6)。

[0004] FALSモデルマウスの脊髄中には、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子α(TNFα)やインターロイキン1(IL1)が発症前に多く含まれていることが報告されており、運動ニューロンの細胞死に炎症反応が関与していることが示唆されている(非特許

文献7、8)。

[0005] 最近、変異SOD－1と結合し、ユビキチン化するHECT型E3リガーゼとしてNEDL1が発見された(非特許文献9)。NEDL1は変異SOD－1をユビキチン化しプロテアソームにおける分解を促進するが、野生型SOD－1をユビキチン化しない。また、数種の異なる変異SOD－1により発症したFALSの重症度と、各々の変異SOD－1とNEDL1との結合の程度とが、正の相関を示した。以前から、変異SOD－1は粗面小胞体上の親水性チャネル(translocon)の成分の一つであるtranslocon-associated protein-δ(TRAP－δ)と結合することが知られていたが、NEDL1もTRAP－δと結合する。一方、NEDL1はWntシグナル伝達系の鍵分子であるDishevelled-1(DVL1)とも結合し、ユビキチン化することが明らかになった。これらの結果から、NEDL1は変異SOD、TRAP－δ、Dvl1とユビキチン化複合体を形成し、この複合体が有する毒性のために運動ニューロンが死に至るのではないかと推測されている。

[0006] 一方、細胞が低酸素条件に曝露されると、低酸素応答シグナル伝達経路の鍵分子であるhypoxia-inducible factor-1(HIF－1)が誘導されることが知られている(非特許文献10)HIF－1は、HIF－1αとHIF1－β／ARNT(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)の2つのサブユニットで構成され、両サブユニットともにPASドメインを有するbasic helix-loop-helix(bHLH)型転写因子サブファミリーに属する(非特許文献11)。HIF－1α分子中には2ヶ所の転写活性化領域が存在する。HIF－1αは、mRNAレベルでは常に発現しているが、タンパク質は合成されるとすぐに分解されるため、通常は検出限界以下である。これに対して、HIF－1βは恒常的に発現している。HIF－1αの分解には、HIF prolyl hydroxylase(PDH)が関与している。現在までに4つのPDH(PDH1～4)が発見されている。PDHはHIF－1αタンパク質中の402番目と564番目のプロリン残基を水酸化する。プロリン残基が水酸化されたHIF－1αは、von Hippel Lindauタンパク質(pVHL)、elongin B、elongin C、CUL及びRBX1からなるE3－ユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン化され、26Sプロテアソームで速やかに分解される。しかし、低酸素下では、酸素分子要求性のPDHの活性が低下するためにHIF－1αが分解されなくなり、タンパク質として検出されるようになる。また、PHDを抑制する作用を有するデスフェリオキサミン(DFO)に細

胞を曝露すると、通常酸素下でもHIF－１αが検出されるようになる（非特許文献12）。402番目と564番目のプロリンをアラニンに変換させたHIF－１α（HIF－１$\alpha^{P402A/P564A}$）は、もはやPDHにより水酸化されなくなるため分解されず、いわゆる構成的活性化変異体（constitutive active mutant）としての挙動を示す（非特許文献13）。

[0007] HIF－１αの安定化にROSが関与しているという報告がなされている。低酸素下では、ミトコンドリアにおけるROSの発生が増加し、これがHIF－１αの安定化に寄与することが見出された（非特許文献14）。ミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤の中で、ROSの産生を抑制する阻害剤を細胞に作用させると、HIF－1活性が阻害され、逆にROSの産生を促進する阻害剤を細胞に作用させると、HIF－1活性が通常酸素下でも増加した（非特許文献14）。また、ミトコンドリアDNA欠損細胞では、低酸素下でもHIF－1の活性化は起こらなかった。さらに、過酸化水素の産生を増加させるSODを細胞で過剰発現させるとHIF－1が活性化された。これらの結果は、HIF－１αの安定化にROSが関与していることを示している。

[0008] HIF－１αはいくつかの増殖因子（例えばインスリン、インスリン様増殖因子1及び2、上皮細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子2、血小板由来増殖因子、トランスフォーミング増殖因子β1など）及び炎症性サイトカイン（例えば、IL1、TNFαなど）などにより、通常酸素下においても発現が誘導される（非特許文献11、15）。

[0009] これまでに、HIF－1により転写が活性化される遺伝子が数多く見出されている。例えば、血管新生を促進する血管内皮増殖因子、赤血球産生を促進するエリスロポエチン、エネルギー代謝に関与する解糖系酵素（乳酸デヒドロゲナーゼやアルドラーゼAなど）やグルコーストランスポーター1、アポトーシスを促進するBNIP3などの遺伝子の転写が活性化される。これらの多くの遺伝子の中に、HIF－1結合配列5'-(A/G)CGTG-3'が存在することが報告されている（非特許文献11）。

[0010] 上記のように、FALSの発症には、変異SOD1、NEDL1、ROS及び炎症性サイトカイン（IL1やTNFαなど）が密接に関与していることが考えられる。しかし、FALSの発症には、これらの分子それぞれ単独では不十分であると考えられ、これらの物質を機能的に結びつける何らかの分子が存在することが予想される。

[0011] 非特許文献1：Rosen DR et al. Nature 364:59-62,1993

非特許文献2:Wong PC et al. Neuron 14:1105-1116, 1995

非特許文献3:Liu D et al., FASEB J. 13: 2318-2328, 1999

非特許文献4:Said Ahmed M et al., J Neurol Sci. 176: 88-94, 2000

非特許文献5:Jung C et al., Neurosci Lett. 304: 157-160, 2001

非特許文献6:Di Matteo V and Esposito E., Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2: 95-107, 2003

非特許文献7:Hensley K et al., J Neurochem. 82: 365-374, 2002

非特許文献8:Yoshihara T et al., J Neurochem. 80: 158-167, 2002

非特許文献9:Miyazaki K et al., J Biol Chem. 279: 11327-11335, 2004

非特許文献10:Wang GL and Semenza GL. J. Biol Chem. 268: 21513-21518, 1993

非特許文献11:Zagorska A and Dulak J. Acta Biochim. Pol. 51: 563-585, 2004

非特許文献12:Wang GL and Semenza GL.Blood 82: 3610-3615, 1993

非特許文献13:Yu F et al. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 9630-9635, 2001

非特許文献14:Chandel NS et al. Proc Natl Acad Sci USA. 95:11715-11720, 1998

非特許文献15:T Hell-B et al.,Blood 94:1561-1567,1999

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0012] NEDL1の発現を制御する経路を見出すことができれば、FALSの治療・予防薬の開発につながる可能性がある。したがって、本発明の目的の一つは、NEDL1の発現を制御する経路を見出すことである。また、本発明の別の目的は、FALSの発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法を提供することである。さらに、本発明の別の目的は、FALSの診断方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、ヒト神経芽腫におけるHIF－1の標的遺伝子を探索する目的で、低酸素で発現の変化する遺伝子をDNAチップ(神経芽腫由来の約11，000個の遺伝子を搭載)を用いて検討したところ、驚いたことにNEDL1遺伝子の発現が増加することを見出した。さらにRT－PCR法などを用いた実験結果から、NEDL1の発現がHIF－1の下流で制御されていることを見出した。そして、以上の知見から、本発明

者らは本発明を完成するに至った。

[0014] すなわち、本発明は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件において細胞を培養する工程と、培養したそれぞれの細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量よりも少ない場合に、当該被検化合物をFALSの発症又は進行を抑える化合物であると判定する工程と、を備えるFALSの発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、NEDL1の発現がHIF－1の下流で制御されているというメカニズムに基づくものである。このスクリーニング方法により、今までとは作用機序が異なるFALSの発症又は進行を抑える化合物を得ることが可能である。かかる化合物は、FALSの治療・予防薬に応用することが可能である。

[0015] また、本発明は、患者から採取した神経細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、HIF－１αの発現量が多い患者をFALSに罹患していると判定する工程と、を備えるFALSの診断方法を提供する。この診断方法は、NEDL1の発現がHIF－1の下流で制御されているというメカニズムに基づくものである。今までとは異なる判断基準でFALSの診断を下すことが可能である。

発明の効果

[0016] 本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が異なるFALSの発症又は進行を抑える化合物を得ることが可能である。また、本発明のFALSの診断方法によれば、今までとは異なる判断基準によりFALSの診断を下せ、FALSの初期段階の診断に利用できる可能性がある。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]低酸素下（2%酸素）で培養したSK－N－BE（2）C細胞におけるNEDL1 mRNAの発現量を表す図である。

[図2]様々な条件下で培養したSK－N－BE（2）C細胞におけるNEDL1 mRNAの発現量を表す図である。

[図3]野生型及び構成的活性化型のHIF－１αを発現させたときのSK－N－BE（2

)C細胞におけるNEDL1　mRNAの発現量を表す図である。

[図4]HIF－1及びNEDL1との関係を表す、本発明の概略図である。

発明を実施するための最良の形態

[0018]　以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0019]　(FALSの発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法)

本発明のFALSの発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法は、被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件において細胞を培養する工程と、培養したそれぞれの細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量よりも少ない場合に、当該被検化合物をFALSの発症又は進行を抑える化合物であると判定する工程と、を備える。

[0020]　本スクリーニング方法に用いる細胞は、HIF－１αを発現する細胞であれば特に限定されず、例えば、ヒト神経芽腫のSK－N－BE(2)C細胞が挙げられる。この細胞を被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件下で培養する。

[0021]　次に、培養したそれぞれの細胞におけるHIF－１αの発現量を測定する。ここで、HIF－１αの発現量とは、HIF－１α　mRNA及び／又はHIF－１α　タンパク質の発現量を指す。HIF－１αの発現量の測定は、当業者にとって公知の方法で行うことができる。例えば、mRNAの測定は、ノーザンブロッティング、定量的又は半定量的RT－PCR、RNaseプロテクションアッセイなどで行うことができる。また、タンパク質の測定は、ウエスタンブロットなどで行うことができる。

[0022]　測定の結果、被検化合物の存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量よりも少ない場合に、当該被検化合物をFALSの発症又は進行を抑える化合物であると判定できる。

[0023]　(FALSの診断方法)

本発明のFALSの診断方法は、患者から採取した神経細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、HIF－１αの発現量が多い患者をFALSに罹患してい

ると判定する工程と、を備える。

[0024] 当業者にとって公知の方法に従い、患者から神経細胞を採取する。次に、上述のHIF－1αの発現量の測定方法により、HIF－1αの発現量を測定し、発現量に応じてFALSか否かを判定する。例えば、健常者から採取した神経細胞におけるHIF－1αの発現量を基準値として、患者のHIF－1αの発現量が基準値の所定倍数上回っている場合に、その患者をFALSであると判定できる。

実施例

[0025] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0026] (HIF－1α発現ベクターの作製)

pBluescript KS(－)にクローニングされたヒトHIF－1α cDNA(GenBank受入番号:NM_001530)は、Gassmann博士から入手した。このプラスミドからHIF－1α cDNAをEcoRVとNotIを用いて切り出し、アガロースゲルで電気泳動した後、Gel Extraction Kit(キアゲン社)を用いて精製した。これをpcDNA3.1(＋)(インビトロジェン社)のEcoRV／NotI部位にサブクローニングし、プラスミドpcDNA3／HIF－1αを作製した。

[0027] 402番目及び564番目のプロリン(P)をアラニン(A)に変換したHIF－1α$^{P402A/P564A}$を以下の方法で作製した。まず、Quick Change Site－Directed Mutagenesis Kit(ストラタジーン社)と変異導入用プライマー5'-CTTGGAGATGTTAGCTGCCTATATCCCAATGGATGA-3'(配列番号1)及び5'-TCATCCATTGGGATATAGGCAGCTAACATCTCCAAG-3'(配列番号2)を用いて、製造業者の使用説明書に従ってpcDNA3／HIF－1αの564番目のプロリンをアラニンに変換したpcDNA3／HIF－1α^{P564A}を作製した。次に、pcDNA3／HIF－1α^{P564A}の402番目のプロリンをアラニンに変換したpcDNA3／HIF－1α$^{P402A/P564A}$を、変異導入用プライマー5'-CTTTGCTGGCCGCAGCCGCTGGAG-3'(配列番号3)及び5'-CTCCAGCGGCTGCGGCCAGCAAAG-3'(配列番号4)を用いて同様の方法で作製した。

[0028] (細胞培養)

ヒト神経芽腫SK－N－BE(2)C細胞は、10%熱処理済みウシ胎児血清(FBS)を

含むダルベッコ最小必須培地（DMEM）中で培養した。低酸素下培養は、細胞をナプコ自動O_2／CO_2細胞培養装置（和研薬株式会社）中に入れ、2%酸素濃度下で行った。DFO（シグマ社）処理は、細胞を250μMのDFOに24時間さらすことにより行った。

[0029] （遺伝子導入）

細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine2000（インビトロジェン社）を用いて、以下の手順で行った。遺伝子導入時に約70%の密度になるように細胞を直径6cmの培養シャーレ（＃3002;ファルコン社）に播き、37℃で一晩培養した。4μLのLipofectamine2000をポリスチレンチューブ（＃2058;ファルコン社）中の100μLのOpti－MEM培地（インビトロジェン社）に加え、室温で5分静置した。これに、100μLのOpti－MEM培地に溶解した2．5μgのプラスミドDNA（pcDNA3．1、pcDNA3／HIF－1α又はpcDNA3／HIF－1$\alpha^{P402A/P564A}$）を加え、室温で15分間静置し、DNA－リポソーム複合体を形成させた。細胞の培地を3mLのOpti－MEM培地に交換し、そこにDNA－リポソーム複合体を培養シャーレ全面にいきわたるように添加した。37℃で5時間培養した後、0．6mLのFBSと2．4mLのOpti－MEM培地を添加した。翌日に、培地を10%FBSを含むDMEM培地に交換し、さらに48時間培養した。

[0030] （逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT－PCR））

TRIZOL試薬（インビトロジェン社）を用いて、製造業者の使用説明書に従って、未処理、低酸素処理、DFO処理した細胞及び遺伝子導入細胞から全RNAを調製した。RT－PCRは以下の手順で行った。調製した全RNA（1μg／2．5μL）を75℃で5分間インキュベートし、その後、氷上で5分間静置した。0．5μLのRNase阻害剤（40ユニット／μL;東洋紡社）0．5μLのM－MLV逆転写酵素（200ユニット／μL;インビトロジェン社）、1μLの50×dNTPs（各2mM）、0．5μLのオリゴ（dT）プライマー（0．5mg／mL;インビトロジェン社）、2μLの5×ファーストストランド緩衝液（インビトロジェン社）及び1μLの0．1Mジチオスレイトールの混合液に、用意したRNAを加え、室温で10分間、37℃で45分間、95℃で3分間インキュベートし、cDNAを作製した。作製したcDNAを鋳型にして、下記のPCR条件とプライマーを用いて、N

EDL1及びβ－アクチン遺伝子のcDNA断片を増幅した。1μLのcDNA、2μLの5×緩衝液、0．5μLのdNTPs（各2mM）、0．05μLのGoTaqDNAポリメラーゼ（5ユニット／mL；プロメガ社）及び0．5μLずつのセンス及びアンチセンスプライマー（10μM）を混合し、水を加えて全量を10μLにした。PCRはGeneAmp PCT System 9700（アプライドバイオシステムズ社）を用いて行った。PCRの条件は、まず、95℃で2分間熱変性を行った後、熱変性（95℃、15秒）、アニーリング（60℃、15秒）及び伸長（72℃、20秒）のサイクルを32～35回行い、72℃で6分間インキュベートした後、10℃に冷却した。用いたプライマーの塩基配列は次の通りである。

NEDL1 センスプライマー：5'-CCAGGGAACCAAAGCATAGA-3'（配列番号5）

アンチセンスプライマー：5'-GTGGATGCGGATGTAGTGCG-3'（配列番号6）

β－アクチン センスプライマー：5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'（配列番号7）

アンチセンスプライマー：5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'（配列番号8）

増幅したPCR産物を、エチジウムブロミドを含む1％アガロースゲルで電気泳動した後、UVイルミネーター中でDNAバンドを観察した。

[0031] （実施例1）

正常酸素下及び低酸素下（2％酸素）で24時間培養したSK－N－BE（2）C細胞から調製した全RNAを用いて、発現の変化している遺伝子をDNAチップを用いて解析したところ、NEDL1遺伝子の発現が増加していた（データは示さない）。

[0032] 次に、2％酸素濃度下で、0、3、6、12及び24時間培養したSK－N－BE（2）C細胞から全RNAを調製し、NEDL1 mRNAの発現を半定量RT－PCRを用いて検討したところ、低酸素に応答してNEDL1 mRNAの発現が増加することが確認された（図1）。また、1％酸素の条件やDFO処理によっても、NEDL1 mRNAの発現が増加した（図2）。

[0033] NEDL1 mRNAの発現亢進がHIF－1を介するものかどうかを検討するため、細胞に野生型又は構成的活性化型HIF－1αを発現するベクターであるpcDNA3／HIF1－α又はpcDNA3／HIF1－$\alpha^{P402A/P564A}$を遺伝子導入した後にNEDL1遺

伝子の発現を調べた。その結果、pcDNA3／HIF1－α$^{P402A/P564A}$を導入した細胞において、明らかなNEDL1 mRNAの発現亢進が認められた(図3)。pcDNA3／HIF－1αを導入した細胞では発現亢進が認められなかったが、これは、野生型HIF－1αが分解されるためだと考えられる。

産業上の利用可能性

[0034] 本発明のスクリーニング方法によれば、今までとは作用機序が異なるFALSの発症又は進行を抑える化合物を得ることが可能である。また、本発明のFALSの診断方法によれば、今までとは異なる判断基準によりFALSの診断を下せ、FALSの初期段階の診断に利用できる可能性がある。

請求の範囲

[1] 被検化合物の存在下及び非存在下のそれぞれの条件において細胞を培養する工程と、

培養したそれぞれの細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、

被検化合物の存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量が、被検化合物の非存在下において培養した細胞におけるHIF－１αの発現量よりも少ない場合に、当該被検化合物を家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物であると判定する工程と、

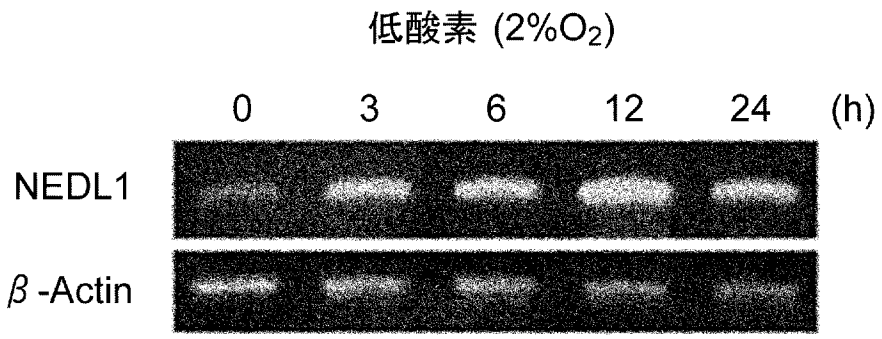
を備える、家族性筋萎縮性側索硬化症の発症又は進行を抑える化合物のスクリーニング方法。

[2] 患者から採取した神経細胞における、HIF－１αの発現量を測定する工程と、

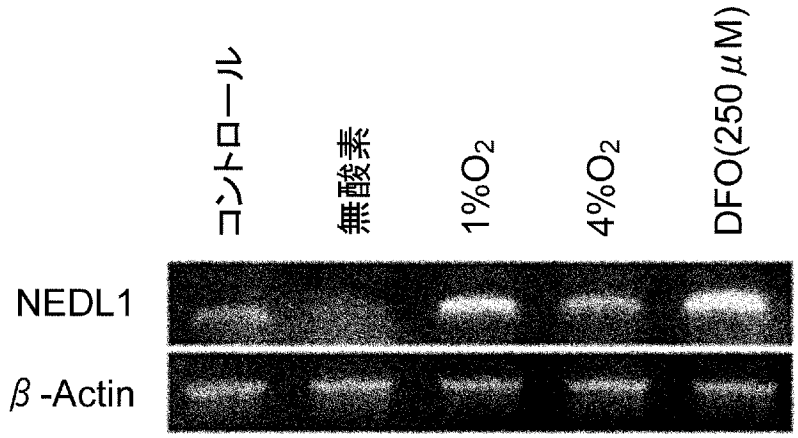
HIF－１αの発現量が多い患者を家族性筋萎縮性側索硬化症に罹患していると判定する工程と、

を備える、家族性筋萎縮性側索硬化症の診断方法。

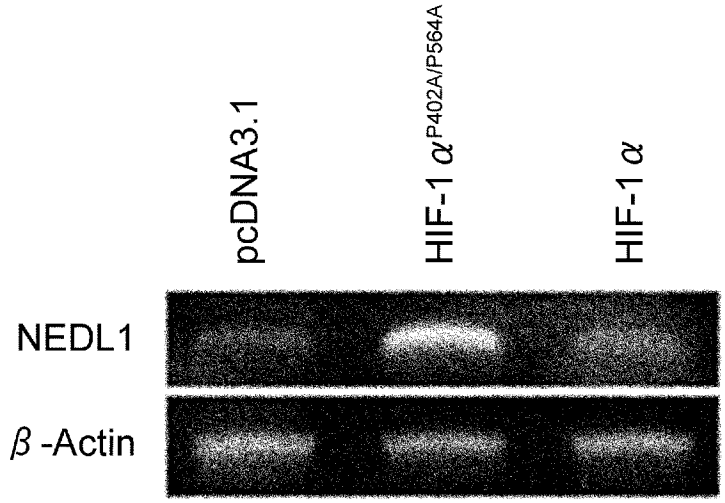
[図1]



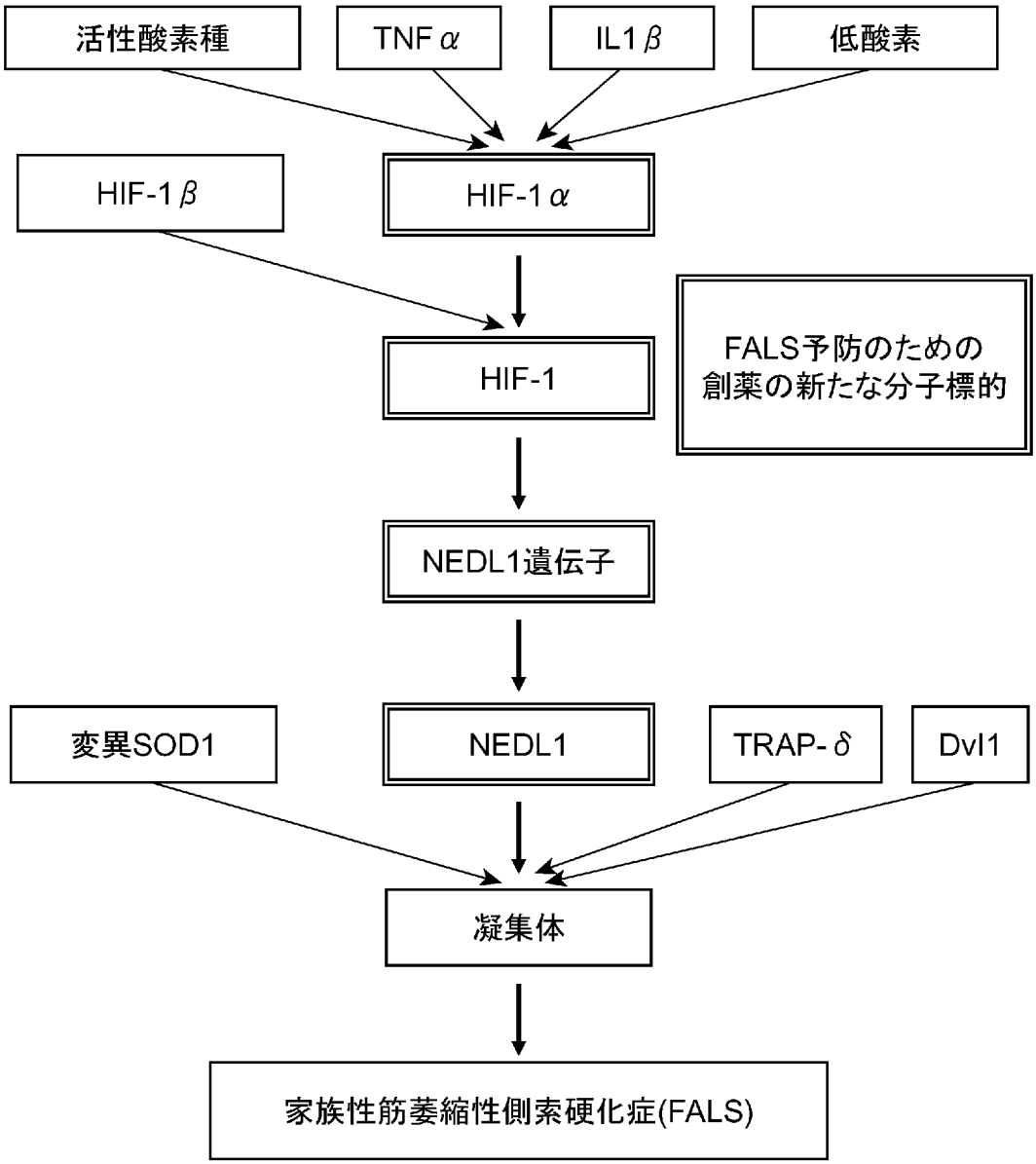
[図2]



[図3]



[図4]


活性酸素種
TNF α
IL1 β
低酸素
HIF-1 β
HIF-1 α
HIF-1
FALS予防のための
創薬の新たな分子標的
NEDL1遺伝子
変異SOD1
NEDL1
TRAP- δ
Dvl1
凝集体
家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/315736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, *C12N15/09*(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)
C12Q1/68, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/JICST-EPLUS/CA/SCISEARCH(STN),
JSTPlus/JMEDPlus(JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Misao OKI, "Gan-Centor (Kenkyukyoku) Kadai Hyoka Senmon Bukai Heisei 17 Nendo Kadai Hyoka Kekka Hokoku", [online], 04 July, 2005 (04.07.05, [Retrieval date 12 September, 2006 (12.09.06], internet<URL:http://www.pref.chiba.jp/syozoku/b_soukei/keikaku/kenkyu/houkoku17/gan17h.pdf#search=%22%E4%B8%AD%E5%B7%9D%E5%8E%9F%E7%AB%A0%E3%80%80%E5%AE%B6%E6%97%8F%E6%80%A7%E7%AD%8B%E8%90%8E%E7%B8%AE%E6%80%A7%E5%81%B4%E7%B4%A2%E7%A1%AC%E5%8C%96%22>, particularly, page 12	1

☒ 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	Date of mailing of the international search report
12 September, 2006 (12.09.06)	19 September, 2006 (19.09.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/315736

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Akira NAKAGAWARA, "Kin Ishukusei Sokusaku Kokasho ni Taisuru Kansaibo Zoshoku Inshi (HGF) o Mochiita Chosenteki Chiryoho no Kaihatsu to Sono Kiban Kenkyu Dishevelled-1 o Target to suru Novel Human Ubiquitin Ligase NEDL1 no Dotei to Sono SOD1 Hen'itai tono Ketsugo Oyobi Bunkai ni Kansuru Kenkyu", Kin Ishukusei Sokusaku Kokasho ni Taisuru Kansaibo Zoshoku Inshi (HGF) o Mochiita Chosenteki Chiryoho no Kaihatsu to Sono Kiban Kenkyu, Heisei 15 Nendo Kenkyu Hokokusho, 18 March, 2005 (18.03.05), pages 12 to 14	1
Y	JP 2003-135063 A (Chiba-Ken et al.), 13 May, 2003 (13.05.03), Full text & EP 1428891 A1 & US 2005/0064411 A1 & WO 2003/018842 A1	1
Y	PATEL, Yogesh, et al., Neuroprotective effects of copper/zinc-dependent superoxide dismutase against a wide variety of death-inducing stimuli and proapoptotic effect of familial amyotrophic lateral sclerosis mutations., Molecular brain research. 2002, Vol.109, No.1-2, p. 189-197.	1
Y	WO 2005/056822 A1 (Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc. et al.), 23 June, 2005 (23.06.05), Full text (Family: none)	1
Y	MIYAZAKI Kou, et al., NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1., The Journal of biological chemistry. 2004, Vol.279, No.12, pages 11327-11335.	1
Y	YANG, Zhi-Zhang, et al., Redox regulation of HIF-1alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells., American journal of physiology. Renal physiology. 2003, Vol.284, No.6, pages F1207-F1215.	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/315736

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. [X] Claims Nos.: 2
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 2 pertains to methods for diagnosing specific disease of patients and is relevant to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods. Thus, claim 2 relates to a subject matter which this International Searching Authority (continued to extra sheet)

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:

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

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

Remark on Protest

the

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１５７３６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

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

Int.Cl.　C12Q1/68, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/JICST-EPLUS/CA/SCISEARCH(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDream2),
医学･薬学予稿集全文データベース

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	大木操,”がんセンター（研究局）課題評価専門部会　平成１７年度課題評価結果報告”, [online], ２００５．０７．０４, [検索日　２００６．０９．１２], internet<URL:http://www.pref.chiba.jp/syozoku/b_soukei/keikaku/kenkyu/houkoku17/gan17h.pdf#search=%22%E4%B8%AD%E5%B7%9D%E5%8E%9F%E7%AB%A0%E3%80%80%E5%AE%B6%E6%97%8F%E6%80%A7%E7%AD%8B%E8%90%8E%E7%B8%AE%E6%80%A7%E5%81%B4%E7%B4%A2%E7%A1%AC%E5%8C%96%22>, 特に、ｐ．１２	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	国際調査報告の発送日
１２．０９．２００６	１９．０９．２００６

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	清水　晋治	４Ｂ	３５３５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｙ	中川原章，筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子(HGF)を用いた挑戦的治療法の開発とその基盤研究Dishevelled-1をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼNEDL1の同定とそのSOD1変異体との結合および分解に関する研究，筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子(HGF)を用いた挑戦的治療法の開発とその基盤研究　平成１５年度　研究報告書，２００５．０３．１８，ｐ．１２－１４	1
Ｙ	ＪＰ　２００３－１３５０６３　Ａ（千葉県　外１名）２００３．０５．１３，全文　＆　ＥＰ　１４２８８９１　Ａ１　＆　ＵＳ　２００５／００６４４１１　Ａ１　＆　ＷＯ　２００３／０１８８４２　Ａ１	1
Ｙ	PATEL, Yogesh, et al., Neuroprotective effects of copper/zinc-dependent superoxide dismutase against a wide variety of death-inducing stimuli and proapoptotic effect of familial amyotrophic lateral sclerosis mutations., Molecular brain research. 2002, Vol.109, No.1-2, pages 189-197.	1
Ｙ	ＷＯ　２００５／０５６８２２　Ａ１（久光製薬株式会社　外１名）２００５．０６．２３，全文（ファミリーなし）	1
Ｙ	MIYAZAKI Kou, et al., NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1., The Journal of biological chemistry. 2004, Vol.279, No.12, pages 11327-11335.	1
Ｙ	YANG, Zhi-Zhang, et al., Redox regulation of HIF-1alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells., American journal of physiology. Renal physiology. 2003, Vol.284, No.6, pages F1207-F1215.	1

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１５７３６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

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

１．☑ 請求の範囲 2 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、
請求の範囲２は、患者における特定疾患の診断方法であり、手術又は治療による人体の処置方法及び人体の診断方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。