(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
2003 年1 月30 日 (30.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/008577 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/10, C12Q 1/02, A61K 45/00, 48/00, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/07182

(22) 国際出願日: 2002 年7 月15 日 (15.07.2002)

(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2001-215576 2001 年7 月16 日 (16.07.2001) JP
特願2001-286412 2001 年9 月20 日 (20.09.2001) JP

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 石川 冬木 (ISHIKAWA,Fuyuki) [JP/JP]; 〒606-0804 京都府 京都市 左京区下鴨松原町４３番地 グランシティオ下鴨２０１ Kyoto (JP).

(74) 代理人: 小栗 昌平，外(OGURI,Shohei et al.); 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目１２番３２号 アーク森ビル２８階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (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

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:** NOVEL TRANSFORMED CELLS, METHOD OF SCREENING ANTIAGING AGENT AND ANTIAGING AGENTS

(54) 発明の名称: 新規の形質転換細胞、抗老化剤のスクリーニング方法および抗老化剤

(57) **Abstract:** Novel transformed cells which are useful in constructing a system of screening an antiaging agent; a screening method using the same; and antiaging agents. Namely, transformed cells constructed by transferring into normal cells a gene encoding (a) a protein capable of phosphorylating p38 protein, or (b) the p38 protein, a variant of the p38 protein, the kinase domain of the p38 protein, the kinase domain of a p38 protein variant or a fused protein containing the same; a screening method using these transformed cells; and antiagaing agents containing as the active ingredient compounds obtained by the screening method.

(57) 要約:

抗老化剤のスクリーニング系を構築するのに有用な新規の形質転換細胞、それを用いたスクリーニング方法および抗老化剤を提供し、正常な細胞に、(a)p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質、もしくは、(b)p38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメイン、p38タンパク質変異体のキナーゼドメイン、またはそれらを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換細胞、この形質転換細胞を利用するスクリーニング方法およびスクリーニング方法により得られる化合物を有効成分とする抗老化剤に関する。

WO 03/008577 A1

明細書

新規の形質転換細胞、抗老化剤のスクリーニング方法および抗老化剤

技術分野

本発明は、新規の形質転換細胞、抗老化剤のスクリーニング方法および抗老化剤に関する。

背景技術

細胞老化は、本来、細胞増殖を行うべき細胞が、増殖刺激に反応して細胞分裂を行えない状態を示す。老化細胞は、大きく扁平な核をもち、細胞老化特異的β-ガラクトシダーゼ(senescence-associated β-galactosidase ; SA-β-galactosidase)活性をもつことを特徴とする。細胞老化した細胞(老化細胞)は、形態学的な変化の他にも、遺伝子発現パターンなどに特徴的な変化を示す。

細胞老化が引き起こされる原因は様々である。例えば、ヒト正常線維芽細胞は、細胞老化の研究に最も汎用される細胞であるが、これに電離放射線を作用させたり、これを高酸素分圧下で培養すると、細胞老化が引き起こされることが知られている。また、近年では、ヒト正常線維芽細胞に活性化癌遺伝子RASを強制発現すると、細胞老化が１週間程度で急速に誘導されることが報告されている。

しかしながら、最も良く研究されている細胞老化は、正常な細胞が有限回の分裂の後に老化細胞に至る分裂寿命(テロメア依存的)による細胞老化である。

これらの異なる原因により生じる細胞老化は、最終的には同じ表現型を示すため、同一の分子機序により生じるものと考えられているが、その詳細については明らかでない。

分裂寿命に基づく細胞老化は、正常な細胞であれば、細胞の種類によって異なる細胞分裂回数の後に老化細胞となる現象である。最もよく用いられるヒト正常線維芽細胞であれば、胎児由来の細胞の場合、約60～80回の細胞分裂の後に、老化表現型を示す。この現象は、1962年にヘイフリック(Hayflick)によって報告されたが、長らく、細胞内でどのような機構によって分裂回数が記録されているのかは不明であった。近年、染色体末端テロメアのDNA複製がいわゆる「末端複製問題」のために完全ではなく、細胞分裂のたびにテロメア長は約50～200塩基対程度

短小化すること、そして、この短小化がある閾値に達すると、細胞老化が引き起こされることが示された。しかしながら、テロメア長の短小化によりどのようにして細胞老化が起こるのか、また、その分子機構が他の原因で生じる細胞老化と同一なのかどうか明らかでない。

一方、MAPK(Mitogen-activated protein kinase)経路は、細胞質内にあって細胞内外の刺激によって活性化され、下流にある不活型のタンパク質キナーゼをリン酸化して活性化するタンパク質キナーゼのカスケードである。最終標的キナーゼのMAPKは、特定の転写因子をリン酸化して活性化し、その転写因子によって一群の遺伝子の発現が誘導されることで、細胞は刺激に対して反応する。

最終標的キナーゼMAPKをリン酸化する上流のキナーゼは、MAPKK(MAP2K)と呼ばれ、前記MAPKKをリン酸化する上流のキナーゼは、MAPKKK(MAP3K)と呼ばれる。複数のMAPK経路が存在し、それぞれに、MAPK、MAPKKおよびMAPKKKが知られている。

最も早く発見され、解析されている古典的MAPK経路は、Raf-Mek-Erkからなり、主に増殖因子などの細胞外刺激に反応して、Rasを介した後、活性化される。Mekの特異的阻害剤としては、PD98059が知られている。

一方、ストレスやアポトーシスを誘導する腫瘍壊死因子(TNF)などのサイトカインによって誘導されるMAPKとして、JNK(c-Jun N-terminal kinase)およびp38タンパク質が知られている。また、JNKおよびp38タンパク質のMAPKKおよびMAPKKKは、単一ではなく、それぞれ複数が知られている。

p38タンパク質の機能を特異的に阻害する化合物として、SB203580が知られており、この化合物は、炎症性のサイトカインであるインターロイキン-1、インターロイキン-6、インターロイキン-8またはTNFの産生を抑制し、炎症性疾患の治療剤として有用であることが知られている(WO97/33883)。

発明の開示

本発明者は、細胞老化が引き起こされる原因を鋭意探求したところ、複数の原因による細胞老化誘導において、p38MAPK経路が直接的な役割を果たすことを見出した。p38MAPK経路は、先述のように、ストレスまたはアポトーシスを誘導するMAPK経路として知られていたものの、細胞老化との関係はこれまで全く知ら

れていなかった。

さらに、本発明者は、この知見を元に、p38タンパク質をリン酸化することにより活性化することのできるタンパク質をコードする遺伝子を、若い細胞に導入することによって、前記若年細胞に細胞老化を急速に誘導することができることも見出した。

このようにして得られる新規老化細胞は、数十回以上の自然分裂を経て得られる天然の老化細胞に比べて、遥かに短時間で調製することが可能であり、抗老化剤のスクリーニング系を構築する上で、非常に有用である。

さらに、本発明者は、p38タンパク質に対する公知の阻害剤が、前記の新規老化細胞および天然の老化細胞に対して抗老化作用を示すことも新たに見出した。本発明は、これらの知見に基づくものである。

本発明の目的は、抗老化剤のスクリーニング系を構築するのに有用な新規の形質転換細胞、それを用いることのできるスクリーニング方法および抗老化剤を提供することにある。

さらに詳しくは、本発明の目的は、正常な細胞に、

(a) p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質、あるいは、

(b) p38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメイン、p38タンパク質変異体のキナーゼドメイン、またはそれらを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換細胞を提供することにある。

また、本発明の別の目的は、正常な老化細胞または細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞と

(1) 被検物質を接触させる工程

(2) 細胞における老化指標を分析する工程

を含む化合物のスクリーニング方法を提供することにある。

さらに、本発明の別の目的は、上記のスクリーニング方法により得られる化合物を含有する抗老化剤およびp38タンパク質の阻害剤を有効成分として含有する、抗老化剤を提供することにある。

図面の簡単な説明

図1 ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞におけるβガラクト

シダーゼ活性の有無を示す図面に代わる顕微鏡写真である。

図2　抗p38抗体を用いる、図1に示す各細胞溶解液のウエスタンブロッティングの結果を示す図面に代わる写真である。

図3　p38タンパク質阻害剤SB203580の存在下または不在下における、ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞の細胞増殖曲線を示すグラフである。

図4　p38タンパク質阻害剤SB203580の存在下または不在下での、ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞における、S期細胞の割合を示すグラフである。

図5　p38タンパク質阻害剤SB203580の不在下[グラフ(a)]または存在下[グラフ(b)]における、本発明の形質転換細胞の細胞増殖曲線を示すグラフである。

図6　FACS解析による、本発明の形質転換細胞のS期細胞の割合を示すグラフである。

図7　本発明の形質転換細胞におけるβガラクトシダーゼ活性の有無を示す図面に代わる顕微鏡写真である。

図8　本発明の形質転換細胞におけるβガラクトシダーゼ活性を定量化した結果を示すグラフである。

図9　本発明の形質転換細胞のウエスタンブロッティングの結果を示す図面に代わる写真である。

図10　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェン添加濃度による形態変化を示す図面に代わる顕微鏡写真である。

図11　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェン添加濃度による、活性化Rafの誘導による増殖割合の経日変化を示すグラフである。

図12　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェンおよびPD98059の添加有無による増殖割合の経日変化を示すグラフである。

図13　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェンおよびPD98059の添加有無によるβガラクトシダーゼを定量化した結果を示すグラフである。

図14　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェンおよびSB203580の添加有無による増殖割合の経日変化を示すグラフである。

図15　本発明の形質転換細胞におけるタモキシフェンおよびSB203580の添加

有無によるβガラクトシダーゼを定量化した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の形質転換細胞は、正常な細胞に、

(a) p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質、あるいは、

(b) p38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメインまたはp38タンパク質変異体のキナーゼドメインまたはp38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメイン、もしくは、p38タンパク質変異体のキナーゼドメインを含む融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、形質転換させることにより、取得することができる。

本明細書において「p38タンパク質」とは、細胞内シグナル伝達を担う、MAPキナーゼスーパーファミリーに属するセリン／スレオニンキナーゼの1つであって、分子量約38000の触媒サブユニットからなる単量体の酵素を意味する。本発明の形質転換細胞を調製するために用いることのできる宿主細胞は、p38を発現する細胞であり、本発明で用いることのできる特定の遺伝子を導入することにより(必要に応じて、適当なリガンドを更に作用させることにより)細胞老化が誘導される前記細胞である限り、例えば、動物の種類、由来する組織、あるいは、細胞の分裂回数(すなわち、若い細胞であるか、老化細胞であるか)についても、特に限定されるものではない。

宿主細胞は、例えば、哺乳動物由来の細胞が好ましく、哺乳動物由来の正常な細胞がより好ましい。哺乳動物由来の正常な細胞としては、例えば、ヒト、サル、マウス、ラットまたはハムスター由来の正常な細胞(例えば、正常線維芽細胞、正常ケラチノサイト、正常乳腺上皮細胞または正常血管内皮細胞など)を挙げることができる。さらに前記宿主細胞としては、ヒト由来の正常な細胞を用いることが好ましく、ヒト正常線維芽細胞を用いることがより好ましい。ヒト正常線維芽細胞としては、例えば、WI-38(ATCC:CCL-75)、MRC-5(ATCC:CCL-171)、MBC-5またはIMR-90(ATCC:CCL-186)を挙げることができる。

また、「正常な細胞」とは、癌化していない状態の細胞、すなわち、有限寿命を有する細胞を意味する。

ある細胞が若い細胞であるか、老化細胞であるかは、例えば、単位「PD」により表わすことができる。

本明細書において「PD」とは、population doublingsの略であり、細胞がこれまでに行なった細胞分裂回数を示す単位として使用する。なお、各細胞の分裂回数は、通常、ばらつきを有するので、PDは、細胞集団の個々の細胞における平均値である。例えば、ヒト線維芽細胞の場合、一般に、若い細胞とは、0～50PDの細胞(好ましくは、30～45PDの細胞)を意味し、老化細胞とは、60～80PDの細胞(好ましくは、60～65PDの細胞)を意味する。

宿主細胞としては、若い細胞または老化細胞のどちらも使用することが可能であるが、細胞分裂可能な若い細胞(すなわち、分裂寿命を迎えておらず、細胞分裂を活発に行なう能力を保持している細胞)を用いることが好ましい。以下に示す遺伝子導入により急速に得られる老化表現型が、遺伝子導入前の表現型と大きく異なり、判別が容易であるからである。

本発明の形質転換細胞を調製するのに用いることのできる導入遺伝子は、

(a) p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質(以下、「p38タンパク質キナーゼ」と称する)、あるいは、

(b) p38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメイン、p38タンパク質変異体のキナーゼドメイン、またはそれらを含む融合タンパク質(以下、「p38タンパク質またはその誘導体」と称する)をコードすることのできる遺伝子である限り、特に限定されるものではない。

p38タンパク質キナーゼ(a)としては、p38タンパク質をリン酸化することができる限り、特に限定されるものではないが、例えば、

(a1) p38MAPK経路においてp38タンパク質を直接リン酸化するMAPKとして公知である、MKK6タンパク質またはMKK3タンパク質；

(a2) MKK6タンパク質またはMKK3タンパク質(a1)の天然または人工の変異体であって、p38タンパク質をリン酸化する活性が維持または増強されたMKK6タンパク質変異体またはMKK3タンパク質変異体；

(a3) MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質(a1)の各キナーゼドメインまたはMKK6タンパク質変異体若しくはMKK3タンパク質変異体(a2)の各キナーゼド

メイン；

(a4) MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質(a1)と、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質またはMKK6タンパク質変異体若しくはMKK3タンパク質変異体(a2)と、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質；あるいは、

(a5) MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質の各キナーゼドメインと、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質またはMKK6タンパク質変異体若しくはMKK3タンパク質変異体の各キナーゼドメインと、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質

を挙げることができる。

なお、本明細書において「p38タンパク質をリン酸化する」とは、p38タンパク質それ自体を直接リン酸化することを意味する。

前記のMKK6タンパク質またはMKK3タンパク質(a1)としては、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、サル、マウス、ラットまたはハムスター)由来のMKK6タンパク質またはMKK3タンパク質を挙げることができ、ヒトまたはマウスMKK6タンパク質またはMKK3タンパク質を用いることが好ましく、ヒトまたはマウスMKK6タンパク質を用いることがより好ましく、ヒトMKK6タンパク質を用いることが特に好ましい。例えば、ヒトMKK6タンパク質では、53番目～314番目のアミノ酸残基からなる領域が、キナーゼドメインであり、ヒトMKK3タンパク質では、35番目～269番目のアミノ酸残基からなる領域が、キナーゼドメインである。

前記のMKK6タンパク質変異体またはMKK3タンパク質変異体(a2)としては、例えば、MKK6タンパク質またはMKK3タンパク質の天然のアレル変異体、あるいは、公知の遺伝子工学的手法［例えば、部位特異的突然変異誘発法(site-specific mutagenesis; Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 81: 5662-5666, 1984)］により人工的に変異を導入した変異体などを挙げることができる。より具体的には、ヒトMKK6タンパク質における207番目のセリン(Ser207)および211番目のスレオニン(Thr211)が、それぞれグルタミン酸(Glu; E)に置換されている構成的活性型変異体(Mol. Cell. Biol., 16: 1247-1255, 1996)を挙げることができる。

MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質またはそれらの変異体の各キナー

ゼドメイン(a3)としては、例えば、ヒトMKK6タンパク質における53番目～314番目のアミノ酸残基からなる配列を含むヒトMKK6タンパク質断片(好ましくは、ヒトMKK6タンパク質における53番目～314番目のアミノ酸残基からなる配列からなるヒトMKK6タンパク質断片)、あるいは、ヒトMKK3タンパク質における35番目～269番目のアミノ酸残基からなる配列を含むヒトMKK3タンパク質断片(好ましくは、ヒトMKK3タンパク質における35番目～269番目のアミノ酸残基からなる配列からなるヒトMKK3タンパク質断片)を挙げることができる。

MKK6タンパク質もしくはMKK3タンパク質またはそれらの変異体と受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質(a4)、あるいは、MKK6タンパク質もしくはMKK3タンパク質またはそれらの変異体の各キナーゼドメインと受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質(a4)における、前記受容体は、前記融合タンパク質を宿主細胞中で発現させた場合に、受容体の活性化(すなわち、リガンドの受容体リガンド結合ドメインへの結合)により、融合タンパク質のもう1つの構成成分(例えば、MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質またはそれらの変異体、あるいは、MKK6タンパク質若しくはMKK3タンパク質またはそれらの変異体の各キナーゼドメイン)を活性化することができる受容体である限り、特に限定されるものではない。このような受容体としては、例えば、ステロイド受容体(例えば、エストロゲン受容体)を挙げることができ、例えば、ヒトエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインは、ヒトエストロゲン受容体の282番目～595番目のアミノ酸残基からなる領域である。

p38タンパク質またはその誘導体(b)としては、例えば、

(b1) p38タンパク質；

(b2) p38タンパク質(b1)の天然または人工の変異体であって、p38タンパク質のリン酸化能(すなわち、p38タンパク質が、その下流のタンパク質をリン酸化する活性)が維持または増強されたp38タンパク質変異体；

(b3) p38タンパク質(b1)のキナーゼドメインまたはp38タンパク質変異体(b2)のキナーゼドメイン；

(b4) p38タンパク質(b1)またはp38タンパク質変異体(b2)と、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質；あるいは、

(b5) p38タンパク質またはp38タンパク質変異体の各キナーゼドメイン(b3)と、受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質

を挙げることができる。

前記のp38タンパク質(b1)としては、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、サル、マウス、ラットまたはハムスター)由来のp38タンパク質を挙げることができ、ヒトp38タンパク質を用いることが好ましい。例えば、ヒトp38タンパク質では、24番目～388番目のアミノ酸残基からなる領域が、キナーゼドメインである。

前記のp38タンパク質変異体(b2)としては、例えば、p38タンパク質の天然のアレル変異体、あるいは、公知の遺伝子工学的手法(例えば、部位特異的突然変異誘発法)により人工的に変異を導入した変異体などを挙げることができる。

前記のp38タンパク質またはp38タンパク質変異体の各キナーゼドメイン(b3)としては、例えば、ヒトp38タンパク質における24番目～388番目のアミノ酸残基からなる配列を含むヒトp38タンパク質断片(好ましくは、ヒトp38タンパク質における24番目～388番目のアミノ酸残基からなる配列からなるヒトp38タンパク質断片)を挙げることができる。

p38タンパク質またはp38タンパク質変異体と受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質(b4)、あるいは、p38タンパク質またはp38タンパク質変異体の各キナーゼドメインと受容体のリガンド結合ドメインとの各融合タンパク質(b5)において、前記受容体は、前記融合タンパク質を宿主細胞中で発現させた場合に、受容体の活性化(すなわち、リガンドの受容体リガンド結合ドメインへの結合)により、融合タンパク質のもう１つの構成成分であるp38タンパク質もしくはその変異体またはそれらのキナーゼドメインを活性化することができる受容体である限り、特に限定されるものではない。このような受容体としては、例えば、ステロイド受容体(例えば、エストロゲン受容体)を挙げることができる。

本発明の形質転換細胞を調製する際に、導入遺伝子を宿主細胞に導入する方法は、特に限定されるものではなく、公知の遺伝子導入法を用いて実施することができる。公知の遺伝子導入法としては、例えば、レトロウイルスを用いる方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9146-1950, 1995)、アデノウイルスベクターを用いる方法、DEAE-デキストラン法(Nucleic Acids Res., 11: 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム

-DNA共沈殿法(Virology, 52: 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬(例えば、FuGENETM 6 Transfection Reagent; Roche Diagnostics社)を用いた方法、あるいは、電気パスル穿孔法(EMBOJ., 1: 841-845, 1982)等を挙げることができる。

本発明の形質転換細胞は、

(a) p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質若しくはそのキナーゼドメインまたはそれらを含む融合タンパク質、あるいは、

(b) p38タンパク質若しくはそのキナーゼドメインまたはそれらを含む融合タンパク質をコードする遺伝子が導入されているため、前記遺伝子導入前には、細胞分裂を活発に行なう能力を保持していたにもかかわらず、細胞老化が急速に誘導され、細胞分裂を行なう能力が失われている。

なお、導入遺伝子として、受容体との融合タンパク質をコードする遺伝子を用いる場合には、前記受容体のリガンドを形質転換細胞に作用させることが、細胞老化の誘導に必要である。

本発明の形質転換細胞は、数十回以上の自然分裂を経て得られる天然の老化細胞に比べて、遥かに短時間で調製することが可能であり、抗老化剤のスクリーニング系を構築する上で、非常に有用である。

本発明における抗老化剤のスクリーニング方法は、正常な老化細胞または細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞と

(1) 被検物質を接触させる工程

(2) 細胞における老化指標を分析する工程

を含む。

本発明のクリーニング方法に使用できる細胞としては、p38を発現できる細胞であれば特に限定されないが、例えば、正常な老化細胞、前記の形質転換細胞および正常な細胞に、

(c) p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質の変異体、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質のキナーゼドメイン、若しくは、それらを含む融合タンパク質、あるいは、

(d) p38MAPK経路を活性化するタンパク質またはその融合タンパク質をコードす

る遺伝子を導入した形質転換細胞を挙げることができる。

上記の形質転換細胞(c)および(d)を調製するのに用いることのできる導入遺伝子は、

(c) p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質の変異体、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質のキナーゼドメインもしくはそれらを含む融合タンパク質、あるいは、

(d) p38MAPK経路を活性化するタンパク質をコードすることのできる遺伝子である限り、特に限定されるものではない。

p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質とは、p38経路のMAPKKタンパク質を直接的または間接的にリン酸化することができるp38MAPK経路に含まれるタンパク質である限り、特に限定されるものではないが、例えば、MLK、MELK、ASK1、TAK1およびMTK1などのMAP3Kなどのタンパク質などを挙げることができる。

また、p38MAPK経路のMAPKKタンパク質とは、例えば、MMK3、MMK6およびMMK4などのp38タンパク質をリン酸化するタンパク質を意味する。

本発明においてp38MAPK経路を活性化するタンパク質とは、p38MAPK経路を活性化するp38MAPK経路に属さないタンパク質であれば、特に限定されないが、例えば、p38MAPK経路を活性化するサイトカイン、PAK1およびGCKなどのMAPKKKキナーゼ、古典的MAPK経路に含まれるタンパク質およびそれらの変異体並びにそれらを含む融合タンパク質などが挙げられ、好ましくは、RafおよびRafを含む融合タンパク質を挙げることができる。

本発明のスクリーニング方法に使用することのできる被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物、種々の公知化合物、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Tetrahedron, 51: 8135-8173, 1995)によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物を化学的または生物学的に修飾した化合物を挙げることができる。

本発明のスクリーニング方法において、正常な老化細胞または細胞老化を誘導

する遺伝子を導入した正常な細胞と被検物質とを接触させる方法は、特に限定されるものではないが、例えば、上記細胞を培養中の培地に、被検物質を添加することにより、あるいは、通常の培地(すなわち、被検物質不含培地)を、予め被検物質を添加した培地に、置き換えることにより、あるいは、予め被検物質を添加した培地に、上記細胞を加えることにより、実施することができる。なお、導入遺伝子として、受容体との融合タンパク質をコードする遺伝子を用いる場合には、被検物質と接触させる前に、予め、前記受容体のリガンドを形質転換細胞に作用させることにより、細胞老化を誘導しておくことが必要である。

本発明のスクリーニング方法では、正常な老化細胞または細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞と被検物質とを接触させた後、前記細胞における老化指標の変化を観察することにより、前記被検物質が抗老化作用を有するか否かを判定することができる。この際、コントロールとして、被検物質と未接触の正常な老化細胞または細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞を一緒に用いると、老化指標の変化がより明確になるので好ましい。

本明細書において、「抗老化作用」とは、抗細胞老化作用を意味し、ここで、「細胞老化」とは、分裂寿命による細胞老化、すなわち、細胞分裂寿命により細胞増殖を停止することを意味する。

前記「抗細胞老化作用」には、例えば、

(1) 細胞分裂能を失った老化細胞において、細胞分裂能を再生させる細胞分裂作再生作用と、

(2) 細胞分裂能の低下速度を遅らせる細胞老化遅延作用とが含まれる。

本発明のスクリーニング方法で観察することのできる「老化指標」としては、細胞老化の有無または程度を示す指標である限り、特に限定されるものではなく、例えば、細胞増殖速度、細胞質の形態変化、細胞老化特異的な酵素活性の変化またはＳ期細胞の割合などを挙げることができる。

具体的には、老化指標として細胞増殖速度を分析する場合には、被検物質と接触させた場合の細胞増殖速度が、コントロール(被検物質と未接触の老化細胞)に比べて速くなれば、前記被検物質が抗老化作用を有すると判定することができる。

老化指標として細胞質の形態変化を分析する場合には、老化細胞の細胞質は一

般に扁平な形状をとるため、被検物質と接触させた場合に、扁平な細胞質が細くなれば、前記被検物質が抗老化作用を有すると判定することができる。

老化指標として細胞老化特異的な酵素活性の変化を分析する場合には、細胞老化特異的な酵素としては、例えば、β－ガラクトシダーゼを挙げることができる。

被検物質と接触させた場合の細胞老化特異的な酵素(例えば、β－ガラクトシダーゼ)の活性が、コントロール(被検物質と未接触の老化細胞)に比べて低下すれば、前記被検物質が抗老化作用を有すると判定することができる。

老化指標としてＳ期細胞の割合を分析する場合には、細胞増殖が活発な細胞群では、通常、Ｓ期細胞の割合が高いため、被検物質と接触させた場合に、Ｓ期細胞の割合が、コントロール(被検物質と未接触の老化細胞)に比べて高くなれば、前記被検物質が抗老化作用を有すると判定することができる。

本発明のスクリーニング方法により得られた物質は、抗老化作用、すなわち、細胞分裂再生作用および／または細胞老化遅延作用を有し、従って、抗老化剤、すなわち、細胞分裂再生剤または細胞老化遅延剤の有効成分として有用である。

より具体的には、本発明のスクリーニング方法により得られた物質は、例えば、p38タンパク質の阻害作用、あるいは、p38タンパク質より下流の細胞老化シグナル伝達カスケードを構成する細胞老化シグナル伝達分子の阻害作用を有する。

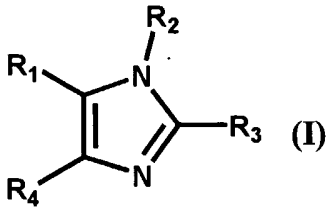
本発明の抗老化剤は、有効成分として、p38タンパク質の阻害剤を含有する。

p38タンパク質の阻害剤としては、種々の化合物が知られており、例えば、WO95/31451に記載のピラゾール化合物、WO97/33883に記載のピリミジン化合物、あるいは、WO98/27098に記載の窒素含有ヘテロ環誘導体を挙げることができる。

公知のp38タンパク質阻害剤としては、より具体的には、例えば、VX-745、VX-954、VX-702、SB203580 " 4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルフイニル)フェニル]-1H-イミダゾール-5-イル]-ピリジン"、SB220025、RWJ-68354、RPR-68354、RPR-200765A、SC-XX906、HEP-689(SB-235699)またはLL-Z-16402を挙げることができる。

本発明の抗老化剤の有効成分であるp38タンパク質阻害剤としては、

一般式(1)



(I)

[式中、R_1は、場合により炭素数1～4のアルキル基、ハロゲン原子、炭素数1～4のアルコキシ基、炭素数1～4のアルキルチオ基、アミノ基およびモノーまたはジーアルキル(各アルキル部分の炭素数＝1～6)アミノ基からなる群から独立して選んだ置換基1または2で置換されていることのあるピリジル基であり；R_2は、水素原子または炭素数1～10のアルキル基であり；R_3は、場合によりハロゲン原子、炭素数1～5のアルキル基および$-(CH_2)_nY$からなる群から独立して選んだ置換基1～3で置換されていることのあるフェニル基であり；R_4は、場合によりハロゲン原子1または2で置換されていることのあるフェニル基であり；Yは、$-S(O)_mR_5$または$-NR_6R_7$であり;R_6は、水素原子または炭素数1～10のアルキル基であり、R_7は、水素原子、ベンジル基または炭素数1～10のアルキル基であるか、あるいは、R_6およびR_7は、それらが結合している窒素原子と一緒になって、場合により酸素原子を有していることのある6員の複素環式環を形成することができ;R_5は、炭素数1～10のアルキル基であり；mは、0、1または2であり;nは、0または1である]で表される化合物が好ましい。

さらに、本発明の抗老化剤の有効成分であるp38タンパク質阻害剤としては、前記一般式(1)において、R_1が非置換の4-ピリジル基であり、R_2が水素原子であり、R_3が、$-S(O)_mR_5$(但し、mは1または2であり、R_5は炭素数1～4のアルキル基である)で置換されたフェニル基であり、R_4が、ハロゲン原子で置換されたフェニル基である化合物が好ましく；更に、R_3およびR_4における置換基が、それぞれパラ位に結合している化合物がより好ましく；更に、R_3が、$-SOR_5$(但し、R_5が炭素数1～4のアルキル基である)で置換されたフェニル基であり、R_4が、フツ素原子、塩素原子またはヨウ素原子で置換されたフェニル基である化合物が更に好ましく;更に、R_3が、$-SOCH_3$で置換されたフェニル基であり、R_4が、フッ素原子で置換されたフェニル基である化合物(すなわち、SB203580)が特に好ましい。

本発明の抗老化剤には、細胞分裂再生剤と細胞老化遅延剤とが含まれる。

細胞分裂再生剤としては、具体的には、例えば、創傷部位の回復を促進させる創傷治療剤；血管内皮細胞の脱落および／または損傷などが原因となりうる動脈硬化症(特に閉塞性動脈硬化症)の予防および／または治療剤；再生医療における組織培養の増殖促進剤；肝硬変などにおける肝機能回復剤；高齢者貧血などにおける貧血改善剤；高齢者免疫不全などにおける免疫回復剤；慢性炎症消化管疾患などにおける粘膜上皮機能回復剤；あるいは、発毛・養毛剤などを挙げることができる。

細胞老化遅延剤としては、例えば、動脈硬化防止剤；肝硬変などにおける肝機能低下防止剤；高齢者などにおける貧血防止剤；高齢者などにおける免疫低下防止剤；慢性炎症消化管疾患などにおける粘膜上皮機能低下防止剤；あるいは、脱毛防止・養毛剤などを挙げることができる。

本発明の抗老化剤は、適当な製剤用担体を用いて通常の方法に従い、製剤組成物として調製することができる。担体としては、通常の薬剤に汎用される各種の担体、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤または界面活性剤等を使用することができる。

本発明の抗老化剤の投与形態は、特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択することができる。具体的には、注射剤、坐剤、外用剤(軟膏剤、貼付剤等)等の非経口剤；エアゾール剤等；錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、丸剤、懸濁剤、シロップ剤、乳剤等の経口剤を挙げることができる。

前記各種薬剤は、通常の方法により製剤化することができる。

錠剤、散剤、細粒剤または顆粒剤等の経口用固形製剤の形態に成形するに際しては、担体として、例えば、賦形剤(乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、無水第二リン酸カルシウム、アルギン酸等)；結合剤(単シロップ、ブドウ糖液、デンプン溶液、ゼラチン溶液；、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース並びにこれらの水および／またはエタノール溶液

等）；崩壊剤（デンプン、アルギン酸、架橋ポリビニルピロリドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、デンプングリコール酸ナトリウム等）；放出制御剤（高級脂肪酸，高級脂肪族アルコール、カカオ脂、水素添加油、水溶性高分子、胃溶性高分子、腸溶性高分子等）；吸収促進剤（第４級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンモノオレエート等の界面活性剤等）；吸着剤（デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、無水ケイ酸、含水二酸化ケイ素、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、コロイド状ケイ酸等）；滑沢剤（精製タルク、ステアリン酸塩、ケイ酸類、ポリエチレングリコール等）を使用することができる。

錠剤は、必要に応じ、通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、胃溶性被覆錠、腸溶性被覆錠または水溶性フィルムコーティング錠とすることができる。

カプセル剤は、上記で例示した各種の担体と混合し、硬質ゼラチンカプセルまたは軟質カプセル等に充填して調製することができる。

液体製剤は、水性または油性の懸濁液、溶液、シロップまたはエリキシル剤であることができ、これらは通常の添加剤を用いて常法に従い、調製することができる。

坐剤の形態に成形するに際しては、担体として、例えば、ポリエチレングリコール、カカオ脂、ラノリン、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、ハードファット等に適当な吸収促進剤を添加して使用することができる。

注射剤の形態に成形するに際しては、担体として、例えば、希釈剤（水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール等）；ｐＨ調整剤または緩衝剤（クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、およびこれらの塩；硫酸、水酸化ナトリウム等）；安定化剤（ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸、チオ乳酸等）を使用することができる。なお、この場合、等張性の溶液を調整するに充分な量の食塩、ブドウ糖、マンニトールまたはグリセリンを医薬製剤中に含有することができ、通常の溶解補助剤、無痛化剤または局所麻酔剤等を添加することもできる。

軟膏剤、例えば、ペースト、クリームまたはゲルの形態に調整する際には、通

常使用される基剤、安定剤、湿潤剤または保存剤等が必要に応じて配合され、常法により混合および製剤化することができる。基剤としては、例えば、白色ワセリン、ポリエチレン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、ジメチルポリシロキサン類、カルボキシビニルポリマーまたはベントナイト等を使用することができる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類等を使用することができる。

貼付剤を製造する場合には、通常の支持体に、前記軟膏、クリーム、ゲルまたはペースト等を常法により塗布することができる。支持体としては、綿；スフ；化学繊維からなる織布または不織布；軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルム等を使用することができる。

本発明の抗老化剤の投与方法は、特に限定されないが、例えば、製剤の形態、患者の年齢、性別、若しくはその他の条件または患者の症状の程度に応じて、適宜、経口または非経口投与することができる。

本発明の抗老化剤の有効成分の投与量は、例えば、用法、患者の年齢、性別、疾患の形態またはその他の条件等に応じて適宜選択することができるが、通常成人に対して1日1～2000mgを1回から数回に分割して投与することができる。

実施例

以下、参考例および実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

参考例1

(1) 細胞の培養

本参考例では、ヒト正常線維芽細胞WI-38(JCRB細胞バンクより購入)を用いて、細胞採取後42回分裂を行なった活発に増殖をする若い細胞と、61回分裂した老化細胞との間の、種々の老化指標の違いを確認した。

なお、前記細胞は、10%牛胎児血清(FCS)含有DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)を用いて培養し、継代培養は1:4比で行なった。この際、1回の継代を2PDとした。これに従い、30～40PDの細胞を若年細胞とし、60PDの細胞を老化細胞とした。

(2) 細胞老化特異的βガラクトシダーゼ(senescence-associated β

-galactosidase)活性の検出

細胞老化特異的βガラクトシダーゼ活性は、Dimriらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9363-9363, 1995)により検出した。

具体的には、ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞を、それぞれ、PBSで洗浄した後、0.5%グルタルアルデヒド水溶液で固定した。固定後、染色液[リン酸緩衝食塩水(PBS;pH6.0)中に、1 mg/mLのX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシダーゼ)、5 mmol/Lフェロシアン化カリウム、5 mmol/Lフェリシアン化カリウムおよび1 mmol／L塩化マグネシウムを溶解したもの]中に細胞を浸漬し、37℃で5時間以上反応させた。

染色した各細胞の顕微鏡写真を図1に示す。図1において、写真(a)は若年細胞(42回分裂)の結果であり、写真(b)は老化細胞(61回分裂)の結果である。βガラクトシダーゼ活性を有すると、実際には、細胞が青色に染色されるが、図1に示す白黒写真では、黒色で示される。

図1に示すように、老化細胞[写真(b)]は、若い細胞[写真(a)]に比べて細胞質が扁平であり、しかも、βガラクトシダーゼ活性が確認された。

(3) p38タンパク質のリン酸化状態の確認

本参考例では、全p38タンパク質を検出可能な抗体と、リン酸化型p38タンパク質(すなわち、活性型p38タンパク質)のみを特異的に検出可能な抗体とを、それぞれ用いたウエスタンプロッティングにより、ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞中のp38タンパク質のリン酸化状態を確認した。

具体的には、参考例1(1)と同様にして培養したヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞および老化細胞(約5×10^6個)を、それぞれ、溶解用緩衝液[lysis Buffer; 150 mmol/L塩化ナトリウム, 0.5%NP-40、50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 3 mmol/L EDTA、3 mmol/L EGTA, 3 mmol/Lグリセロリン酸, 0.1μ/L Na_3VO_4, 1μg/mLロイペプチン, 1 mmol/Lフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)]0.1 mLで溶解した。

続いて、タンパク質量として30μgに相当する各抽出サンプルを、常法により、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、膜(Immobilon-P膜; Millipore社)に転写した。市販のブロッキング剤(ブロックエース；大日本製薬)を用いて、膜をブッロキング処理した後、一次抗体反応および二次抗体反応を順次実施した。

なお、一次抗体としては、ウサギ抗p38抗体(NEB社；リン酸化の有無を問わず、全てのp38タンパク質と反応する抗体)およびウサギ抗リン酸化p38抗体(NEB社；リン酸化されたp38タンパク質と反応するが、リン酸化されていないp38タンパク質とは反応しない抗体)を使用し、二次抗体としては、西洋わさびペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase)標識化抗ウサギIgG抗体(Amersham社)を使用した。ペルオキシダーゼ活性の検出は、市販の検出用キット(ECL; Amersham社)およびX線フィルム(Amersham社)を用いて実施した。

結果を図２に示す。なお、陽性対照として、若年細胞(42PD)をアニソマイシン(anisomycin)処理した細胞の結果も併せて示す。細胞をアニソマイシン処理すると、p38タンパク質が活性化(リン酸化)されることが知られている。細胞のアニソマイシン処理は、溶解用緩衝液で溶解する前に、30μmol/Lアニソマイシンおよび10%FCS含有DMEM中で30分間培養することにより実施した。

図2において、レーン1は、若年細胞(42PD)の結果を示し、レーン2は、老化細胞(61PD)の結果を示し、レーン3は、陽性対照(すなわち、アニソマイシン処理した若年細胞)の結果を示す。

図2に示すように、3種類の細胞の間で、全p38タンパク質の発現量に差は見られなかった。一方、活性型p38タンパク質については、若年細胞では少なく、アニソマイシン処理した若年細胞では増加しており、老化細胞では、それ以上に顕著に増加していた。よって、p38タンパク質は、分裂寿命によって生じるヒト正常線維芽細胞の細胞老化において活性化されていることが示された。

実施例1

(1) ヒト正常線維芽細胞におけるp38タンパク質阻害剤の効果

本実施例では、前記参考例1で用いたのと同じヒト正常線維芽細胞WI-38の若い細胞(42回分裂)および老化細胞(61回分裂)を用いて、p38タンパク質阻害剤であるSB203580の効果を比較した。具体的には、形質転換細胞の代わりに、参考例1(1)と同様にして培養したヒト正常線維芽細胞WI-38の若い細胞(42回分裂)および老化細胞(61回分裂)を用いたこと以外は、後述の実施例2(2)の操作を繰り返した。

結果を図3に示す。図3において、折れ線aは、SB203580存在下における若い細胞の細胞増殖曲線であり、折れ線bは、SB203580不在下における若い細胞の細胞増

殖曲線であり、折れ線cは、SB203580存在下における老化細胞の細胞増殖曲線であり、折れ線dは、SB203580不在下における老化細胞の細胞増殖曲線である。図3における記号「+SB」は、10μmol/LのSB203580で処理したことを意味する。

また、各処理群におけるS期細胞の割合を、後述の実施例2(3-a)に記載の手順に従って、FACS解析により決定した結果を、図4に示す。図4における記号「+」は、10μmol/LのSB203580で処理したことを意味する。

さらに、参考例1(2)に記載の手順に従って、各処理群の細胞形状およびβガラクトシダーゼ活性を分析した。

若い細胞は、図3(折れ線aおよび折れ線b)に示すように、SB203580の有無に関わらず、良く増殖(倍化時間=2日間程度)し、図4に示すように、S期の細胞も20%程度あった。SB203580未処理の老化細胞は、ゆっくりと増殖(倍化時間=6日間程度)し(図3の折れ線d参照)、S期の細胞は5%程度であり(図4参照)、具体的データは示さないが、形態的にも細胞老化特異的βガラクトシダーゼ陽性の扁平な細胞質をもつ特徴的な形態を示した。一方、SB203580で処理した老化細胞は、未処理の場合に比べて増殖が亢進し(図3の折れ線c参照)、72時間のブロモデオキシウリジン(BrdU)標識で示されるS期の細胞は25%程度と有意に増加し(図4参照)、形態的にも細胞老化特異的βガラクトシダーゼ陽性の程度が低く、扁平な細胞質が細くなり、若い細胞に類似した形態をとった。これらの結果から、p38タンパク質阻害作用を有する化合物であるSB203580が、分裂寿命を迎えた細胞に細胞増殖を部分的に再開させることが示された。

実施例2

(1) 本発明の形質転換細胞の作製

本実施例では、以下に述べる手順に従って、ヒトMKK6タンパク質をコードするヒトMKK6遺伝子、あるいは、前記MKK6の構成的活性型変異体(以下、MKK6EEタンパク質と称する)をコードするMKK6EE遺伝子を、レトロウイルスを用いる遺伝子導入法により、ヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞に導入し、本発明の形質転換細胞を作製した。

ここで、MKK6タンパク質とは、p38タンパク質をリン酸化して活性化するMAPKキナーゼ(MAPKK)である。また、MKK6EEタンパク質は、MKK6タンパク

質における207番目のセリン(Ser207)および211番目のスレオニン(Thr211)が、それぞれグルタミン酸(Glu;E)に置換されている変異体(Mol. Cell. Biol., 16: 1247-1255, 1996)である。

MKK6遺伝子は、鋳型としてプラスミドpSRα-MKK6 (J. Biol. Chem., 271: 13675-13679, 1996)を用い、配列番号1で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと配列番号2で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせを用いるPCR法によって、約1kbpのDNA断片を増幅することにより取得した。なお、前記PCRは、94℃(5分間)の保温の後、94℃(30秒間)と52℃(30秒間)と72℃(1分間)とからなるサイクルを15回繰り返し、最後に72℃(10分間)保温することにより実施した。また、MKK6EE遺伝子は、常法、すなわち、部位特異的突然変異誘発法(site-specific mutagenesis; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5662-5666, 1984)に従って、前記MKK6遺伝子を遺伝子工学的に改変することにより取得した。

得られたMKK6遺伝子およびMKK6EE遺伝子を、それぞれ、ピューロマイシン耐性遺伝子を有するレトロウイルスベクターpMXpuro(Exp. Hematol., 24: 324-329, 1996)にサブクローニングした。

レトロウイルスによる遺伝子導入は、公知方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9146-9150, 1995)に従って実施した。すなわち、各遺伝子を含むレトロウイルスDNA(あるいは、対照としてのレトロウイルベクターpMXpuro)6μgを、パッケージング細胞であるNX細胞[4×10^6個/10cmディッシュ(J. Virol., 38: 895-905, 1981)]にトランスフェクションした。48時間後、培養上清を回収し、ウイルス溶液として使用した。

ターゲット細胞であるヒト正常線維芽細胞WI-38の若年細胞(42PD; 5×10^5個/10cmディッシュ)を、ポリブレン(終濃度=8μg/mL)添加したウイルス上清中で、8時間培養した。ウイルス上清を一度除去した後、新しいウイルス上清[ポリブレン(終濃度=8μg/mL)含有]を再び添加し、更に8時間培養した。感染操作を実施した各細胞を、ピューロマイシン(2.5μg/mL)含有DMEM中で3日間培養した。

感染操作を実施してから4日目に、培地を、2.5%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含有するDMEMに置き換え、更に、6日間培養した。なお、6日間の培養期間中は、毎日、培地交換を実施した。この6日間における1日おきの相対的細胞数を、

市販のキット[Cell Counting Kit(WST-1 assay)、DOJINDO社]を用いて測定した。

WST-1法は、細胞内の乳酸脱水素酵素などの関与する脱水素反応の活性を比色定量することを利用して、間接的に細胞増殖能の程度を知る方法である。

具体的な測定方法および相対細胞数の算出は、以下の方法で行なった。すなわち、96ウェルプレートの各ウェルに対して、それぞれ、1000個の細胞を24時間前培養した。培養液にWST-1試薬を添加し、CO_2インキュベーターで4時間、呈色反応を行なった。反応後、プレートリーダーで測定した(測定波長=450nm)。これらは、増殖期間中の各測定日(0日目、2日目、4日目および6日目)で各3検体について測定し、平均値を各測定日のデータとした。各測定日での測定値の相対細胞数は、0日目の測定値の平均を1とし、算出した。結果を図5(a)に示す。

図5では、感染操作を実施してから4日目を「0日」とした。また、図5において、記号「WT」は、MKK6遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、記号「EE」は、MKK6EE遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、記号「V」は、ベクターのみ(レトロウイルベクターpMXpuro)を導入した細胞(対照)の結果であることを表わす。

図5(a)に示すように、4日目には、MKK6遺伝子を発現している本発明細胞(WT)と、MKK6EE遺伝子を発現している本発明細胞(EE)とは、ベクターのみを感染させた対照細胞(V)に比べて、有意に細胞増殖速度が低下した。また、MKK6EE遺伝子を発現している本発明細胞(EE)の場合には、細胞がコンフルエントとなる前に完全に増殖停止した。

(2) 本発明の形質転換細胞における、p38タンパク質阻害剤の効果

本実施例では、実施例2(1)で得られた本発明の形質転換細胞2種における、p38タンパク質阻害剤であるSB203580の効果を確認した。

具体的には、感染操作を実施してから4日目に、10 μ mol/L-SB203580(シグマ社)を含有するDMEMに置き換えたこと以外は、実施例2(1)に記載のレトロウイルス感染操作および前記操作により得られた細胞の培養操作を繰り返した。結果を図5(b)に示す。

図5(b)の記号「+SB」は、培地にSB203580を添加した場合の結果であることを表わす。なお、図5(a)の記号「-SB」は、培地にSB203580を添加しなかった場合の結果

であることを表わす。

図5(a)に示すMKK6遺伝子またはMKK6EE遺伝子による増殖抑制効果は、図5(b)に示すように、p38タンパク質阻害剤であるSB203580により阻害された。

また、具体的なデータは示さないが、参考例1(1)と同様にして培養したヒト正常線維芽細胞WI-38の老化細胞(61PD)に対しても、SB203580は抗老化作用を示した。

(3) 本発明の形質転換細胞における各種老化指標の確認

(3-a) FACS解析によるS期細胞の割合

実施例2(1)と同様の操作を繰り返して得られた、本発明の形質転換細胞2種およびベクターのみを導入した対照細胞1種について、蛍光標示式細胞分取器(fluorescence-activated cell sorter; FACS)解析により、S期細胞の割合を確認した。各細胞としては、6日間の培養期間経過後の細胞、すなわち、図5における「6日間」の細胞を使用した。

具体的には、6日間の培養期間経過後の各細胞を、10μmol/Lブロモデオキシウリジン(BrdU)含有のDMEM培地中で、4時間標識した。続いて、細胞を70%エタノールで固定し、2 mol/L塩酸で30分間処理した。次いで、0.1 mol/Lホウ酸ナトリウムで中和した後、FITC標識化抗BrdU抗体(BECTON DICKINSON)で1時間反応した。反応終了後、細胞を洗浄バッファー[0.5%Tween20および1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBS]で洗浄し、5μg/mLヨウ化プロピジウム(ProPidium Iodide;PI)含有PBS溶液に懸濁させた。サンプルは、2次元フローサイトメトリーによって解析した。結果を図6に示す。

図6(a)の記号「Vector」は、ベクターのみ(レトロウイルベクターpMXpuro)を導入した細胞(対照)の結果であることを表わし、図6(b)の記号「MKK6WT」は、MKK6遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、図6(c)の記号「MKK6EE」は、MKK6EE遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わす。図6における各縦軸は、BrdU染色度を示し、各横軸は、PI染色度を示す。

図6に示すように、MKK6遺伝子を発現している本発明細胞(MKK6WT)と、MKK6EE遺伝子を発現している本発明細胞(MKK6EE)とは、ベクターのみを感染させた対照細胞(Vector)に比べて、S期細胞の割合が有意に減少した。

(3-b) 細胞老化特異的βガラクトシダーゼ活性

実施例2(1)と同様の操作を繰り返して得られた、本発明の形質転換細胞2種およびベクターのみを導入した対照細胞1種(いずれも、6日間の培養期間経過後の各細胞、すなわち、図5における「6日目」の各細胞)を用いたこと以外は、参考例1(2)に記載の操作を繰り返した。結果を図7に示す。

図7(a)の記号「Vector」は、ベクターのみ(レトロウイルベクターpMXpuro)を導入した細胞(対照)の結果であることを表わし、図7(b)の記号「MKK6WT」は、MKK6遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、図7(c)の記号「MKK6EE」は、MKK6EE遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わす。

図7に示すように、MKK6遺伝子を発現している本発明細胞(MKK6WT)と、MKK6EE遺伝子を発現している本発明細胞(MKK6EE)とは、扁平な形態を示し、しかも、細胞老化特異的βガラクトシダーゼ活性が著しく増加していた。

次に、実施例2(1)と同様の操作を繰り返して得られた、本発明の形質転換細胞2種およびベクターのみを導入した対照細胞1種(いずれも、6日間の培養期間経過後の各細胞；SB203580未処理細胞)と、実施例2(2)と同様の操作を繰り返して得られた、本発明の形質転換細胞2種およびベクターのみを導入した対照細胞1種(いずれも、6日間の培養期間経過後の各細胞；SB203580処理細胞)とを用いたこと以外は、参考例1(2)に記載の操作を繰り返した後、各群当たり、独立した3検体について、顕微鏡下で、それぞれ任意に200個の細胞を選択し、その中に含まれるβガラクトシダーゼ陽性細胞の数をカウントすることにより、βガラクトシダーゼ陽性細胞の割合を算出した。結果を図8に示す。

図8において、記号「V」は、ベクターのみ(レトロウイルベクターpMXpuro)を導入した細胞(対照)の結果であることを表わし、記号「WT」は、MKK6遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、記号「EE」は、MKK6EE遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わす。また、図8の横軸に示す「SB」列において、記号「+」は、SB203580処理細胞の結果であることを表わし、記号「-」は、SB203580未処理細胞の結果であることを表わす。

図8に示すように、細胞老化特異的βガラクトシダーゼ陽性細胞の増加は、

SB203580により阻害されることが判明した。

(3-c) p38タンパク質のリン酸化状態

実施例2(1)と同様の操作を繰り返して得られた、本発明の形質転換細胞２種およびベクターのみを導入した対照細胞1種(いずれも、6日間の培養期間経過後の各細胞)を用いたこと、そして、一次抗体として、更に、抗MKK6抗体(sc-1992; Santa Cruz社)、抗p16抗体(sc-468; Santa Cruz社)、抗p21抗体(sc-817; Santa Cruz社)、抗p53抗体(sc-263; Santa Cruz社)および抗アクチン抗体(ベーリンガーマンハイム社)を用いたこと以外は、参考例1(3)に記載の操作を繰り返した。なお、p16タンパク質およびp21タンパク質は、それぞれ、老化細胞に特徴的なタンパク質として公知のタンパク質である。また、アクチンは、若年細胞と老化細胞とで発現量に差異が認められないことが知られているタンパク質である。結果を図9に示す。

図9において、記号「mock」は、ベクターのみ(レトロウイルベクターpMXpuro)を導入した細胞(対照)の結果であることを表わし、記号「MKK6WT」は、MKK6遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わし、記号「MKK6EE」は、MKK6EE遺伝子を導入した本発明の細胞の結果であることを表わす。

図9に示すように、MKK6またはMKK6EE遺伝子導入細胞では、対照に比べ、大量のMKK6タンパク質を発現していた。全p38タンパク質の発現量は、3種類の細胞で変化はなかったのに対して、活性型p38タンパク質の発現量は、対照に比べてMKK6遺伝子導入細胞で有意に増加し、MKK6EE遺伝子導入細胞では著しく増加していた。また、老化細胞に特徴的なp16タンパク質およびp21タンパク質の各発現量が、MKK6またはMKK6EE遺伝子導入細胞で増加していた。これらの結果より、p38タンパク質の活性化によって、細胞老化が若い細胞に直接的に誘導されることが明らかとなった。

実施例3

活性化Rasの強制発現によりヒト正常線維芽細胞が急速に細胞老化表現型を示すことは、既に報告されている(Cell, 88: 1593-602, 1997)。この過程は、Rasの下流にある古典的MAPK、すなわち、Raf-Mek-Erkを経て誘導されることが示されている(Genes Dev., 12: 3008-3019, 1998、Genes Dev., 12: 2997-3007, 1998)。このことを利用して、Zhuらは、エストロゲンあるいはタモキシフェンによってRafを活性化

し、細胞老化を誘導する系を報告した(Genes Dev., 12: 2997-3007, 1998)。これは、エストロジェンレセプター遺伝子と活性化Raf遺伝子のキナーゼ領域をコードする配列を融合させたものである。

(1)上記方法に準じ、WI-38細胞に遺伝子導入し、タモキシフェン投与によって細胞老化が誘導できる系を構築し、細胞老化の誘導を試験した。

結果を図10および図11に示す。1 nM以上のタモキシフェンを投与することにより、細胞増殖の停止、細胞老化特異的βガラクトシダーゼ陽性細胞の増加が認められ、細胞老化が誘導された。図10は、タモキシフェン(4-HT)の投与濃度による細胞の形態の変化であり、図11は、投与したタモキシフェン(4-HT)の濃度と最初の細胞数を1とした相対的な細胞数を示している。

(2) (1)で構築した系を用いて、10 nMのタモキシフェンによってRafの活性化を誘導し、同時に25μMのPD98059(Mek阻害剤)とSB203580(p38阻害剤)を添加し、両者のRaf誘導性細胞老化誘導に対する影響を観察した。結果を図12、図13、図14および図15に示す。

図12は、活性化Rafの誘導後の各細胞における細胞増殖の割合を示す。図12においてタモキシフェンは、記号「4-HT」で示され、25μMのPD98059を投与した系は、記号「+PD」で示される。

図13は、活性化Rafの誘導後の各細胞におけるβガラクトシダーゼ陽性細胞の割合を示す。図13においてタモキシフェンは、記号「4-HT」で示され、25μMのPD98059を投与した系は、記号「+」で示される。

図14は、活性化Rafの誘導後の各細胞における細胞増殖の割合を示す。図14においてタモキシフェンは、記号「4-HT」で示され、25μMのSB203580を投与した系は、記号「+SB」で示される。

図15は、活性化Rafの誘導後の各細胞におけるβガラクトシダーゼ陽性細胞の割合を示す。図15においてタモキシフェンは、記号「4-HT」で示され、25μMのSB203580を投与した系は、記号「+」で示される。

PD98059は、Rafの活性化により誘導される細胞増殖の停止および細胞老化特異的βガラクトシダーゼ陽性細胞の増加を部分的に抑制した。しかしながら、SB203580は、Rafの活性化により誘導される細胞増殖の停止および細胞老化特異

的βガラクトシダーゼ陽性細胞の増加をPD98059より強く抑制した。この知見より、Rafの活性化により誘導される細胞老化に、古典的MAPKとストレス誘導性MAPKp38の両者が関与しているが、特にp38の関与が大きいことが明確になった。

産業上の利用可能性

本発明の形質転換細胞は、本発明のスクリーニング系を構築するのに有用な細胞であり、また、本発明のスクリーニング方法によれば、抗老化剤として有効な物質をスクリーニングすることができる。さらに本発明のスクリーニング方法で選択された化合物は抗老化剤として有用である。

請求の範囲

1. 正常な細胞に、

(a) p38タンパク質をリン酸化することのできるタンパク質、もしくは、

(b) p38タンパク質、p38タンパク質の変異体、p38タンパク質のキナーゼドメイン、p38タンパク質変異体のキナーゼドメイン、またはそれらを含む融合タンパク質をコードする遺伝子

を導入した形質転換細胞。

2. 正常な老化細胞または細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞と

(1) 被検物質を接触させる工程

(2) 細胞における老化指標を分析する工程

を含む化合物のスクリーニング方法。

3. 細胞における老化指標を分析する工程が、被験物質を接触させない細胞を比較対照として細胞の老化指標を分析する工程である請求項2記載のスクリーニング方法。

4. 老化指標が、S期細胞の割合変化、細胞の形態変化、細胞老化特異的な酵素活性の変化、増殖能の変化である請求項2または3記載のスクリーニング方法。

5. 細胞老化を誘導する遺伝子を導入した正常な細胞が、請求項1記載の形質転換細胞または正常な細胞に、

(c) p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質の変異体、p38経路のMAPKKタンパク質の上流に位置するタンパク質のキナーゼドメイン若しくはそれらを含む融合タンパク質、あるいは、

(d) p38MAPK経路を活性化するタンパク質またはその融合タンパク質をコードする遺伝子

を導入した形質転換細胞である請求項2～4記載のスクリーニング方法。

6. 請求項2～5の何れかのスクリーニング方法により得られる化合物を含有する抗老化剤。

7. 請求項2～5の何れかのスクリーニング方法により得られる化合物がp38タンパク質またはp38MAPK経路においてp38タンパク質の下流に位置する分子の阻害

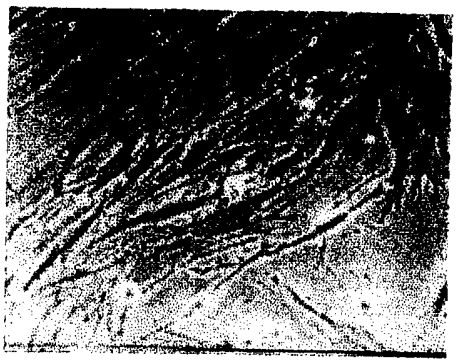
作用を有する化合物である請求項6記載の抗老化剤。

8. 阻害剤がp38タンパク質の阻害剤である請求項7記載の抗老化剤。

9. 請求項2～5の何れかのスクリーニング方法により得られる化合物がp38タンパク質またはp38MAPK経路においてp38タンパク質の下流に位置する分子の阻害剤を有効成分とする抗老化医薬組成物。

図 1

(a)



(b)



図 2

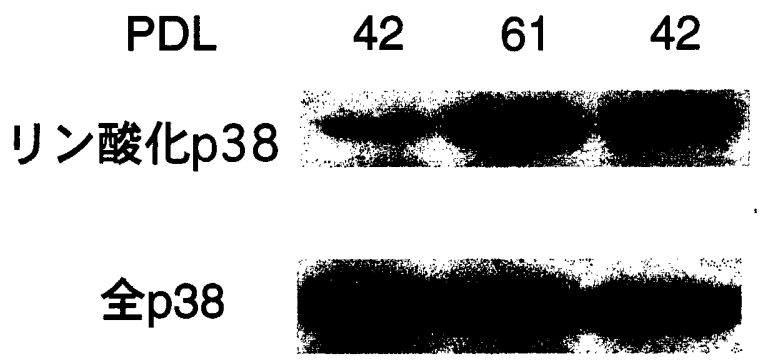


図 3

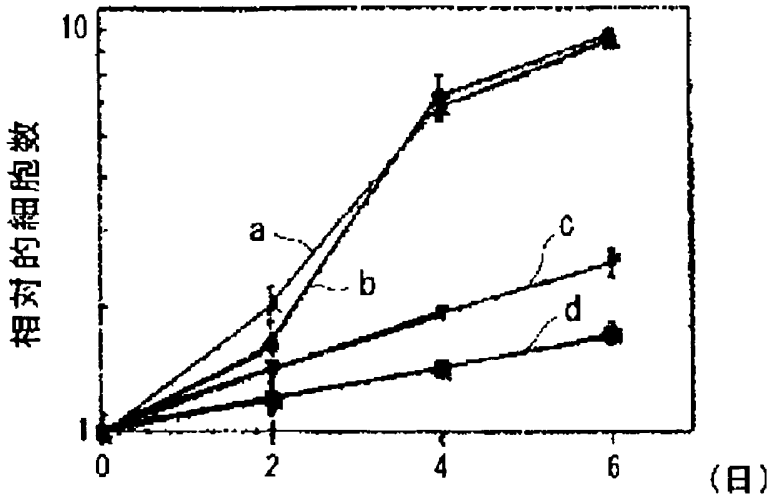

10
1
相対的細胞数
a
b
c
d
0
2
4
6
(日)

図 4

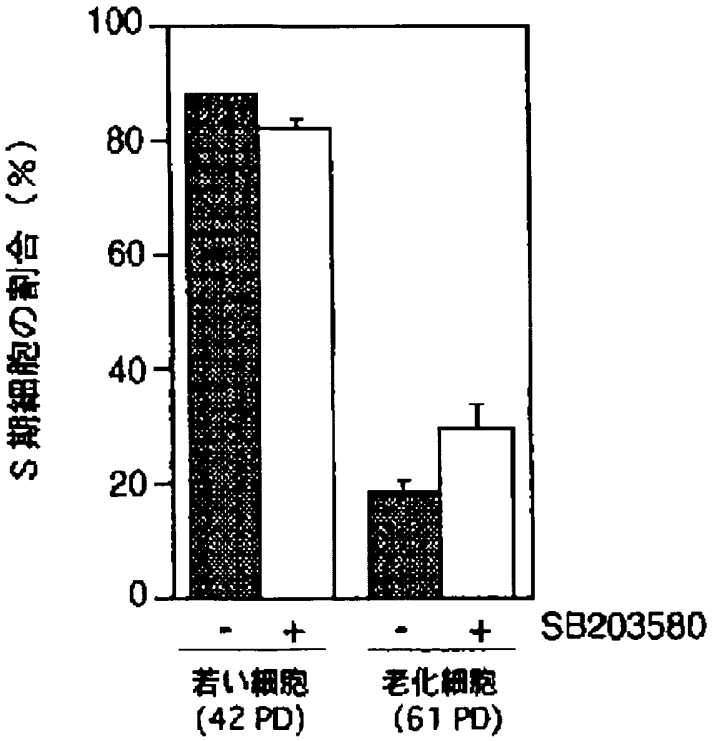

100
80
60
40
20
0
S期細胞の割合（%）
-
+
-
+
SB203580
若い細胞
(42 PD)
老化細胞
(61 PD)

図 5

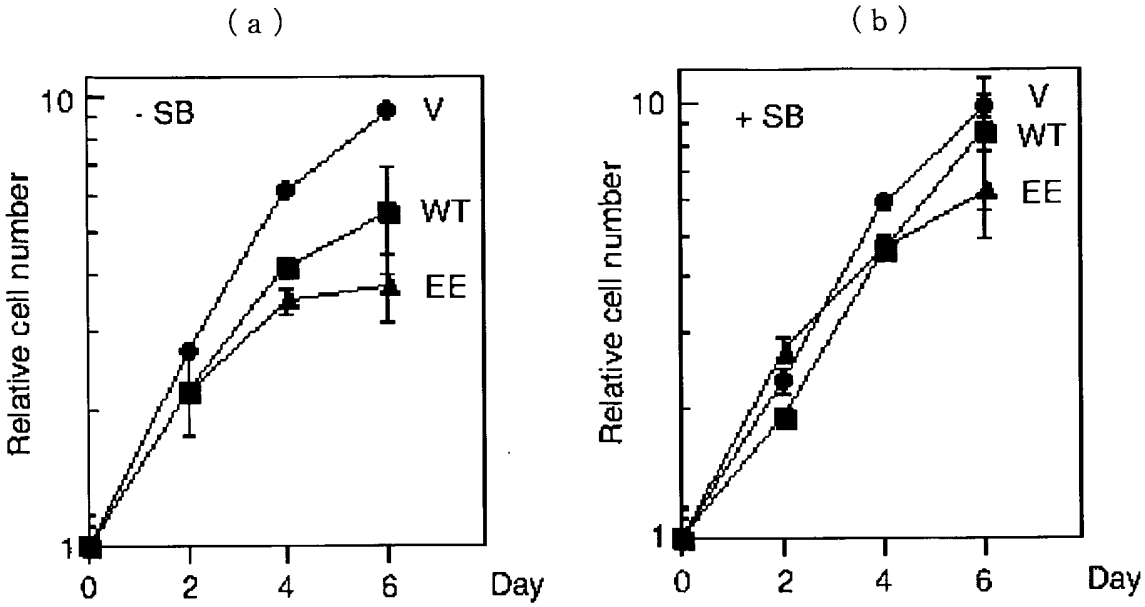

(a)
(b)
- SB
+ SB
V
WT
EE
Relative cell number
10
1
0
2
4
6
Day

図 6

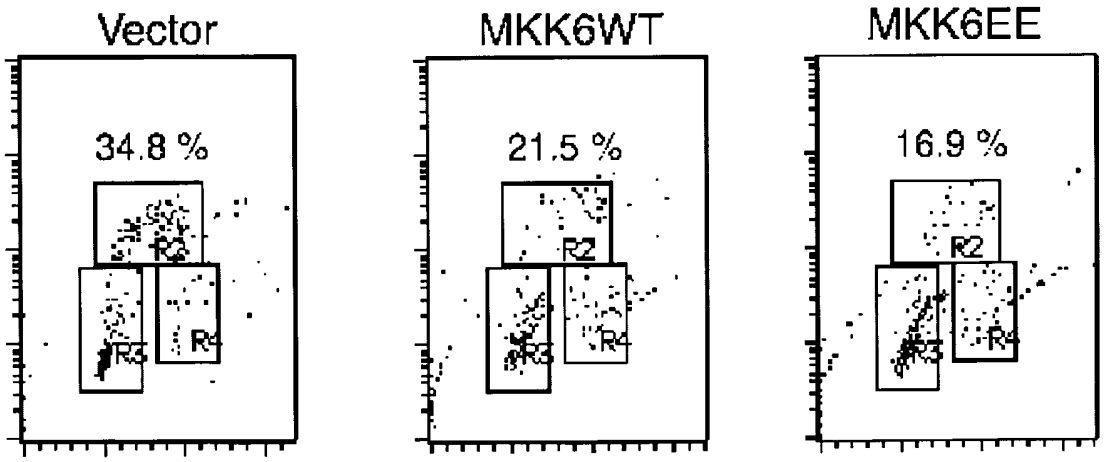

Vector
MKK6WT
MKK6EE
34.8 %
21.5 %
16.9 %
R2
R3
R4

図 7



図 8

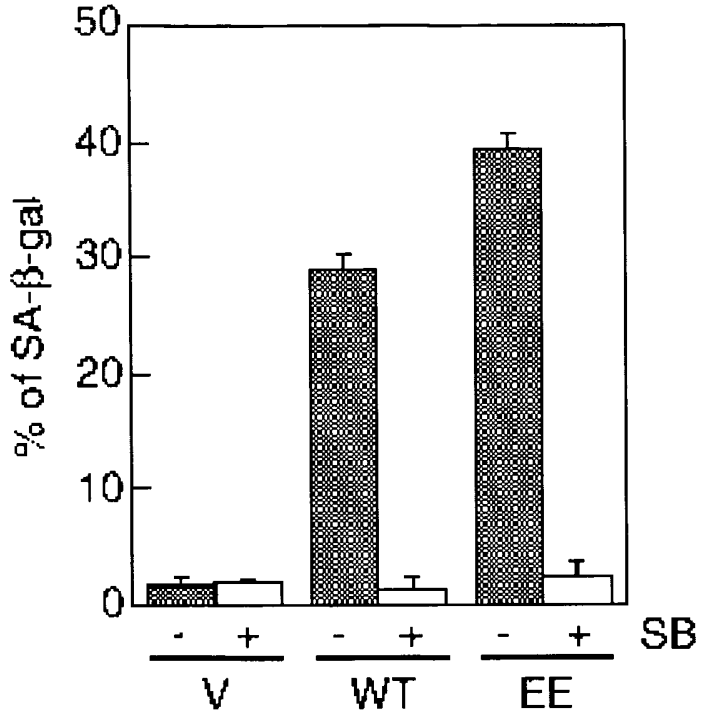


図 9

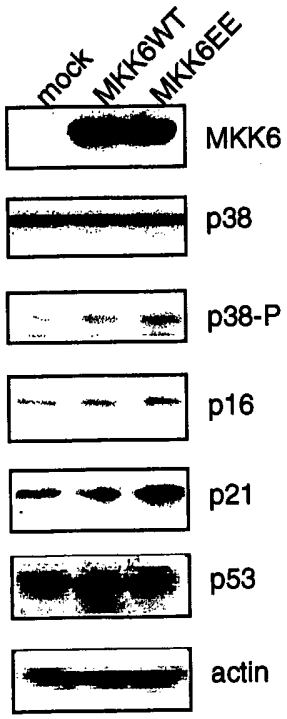


図１０

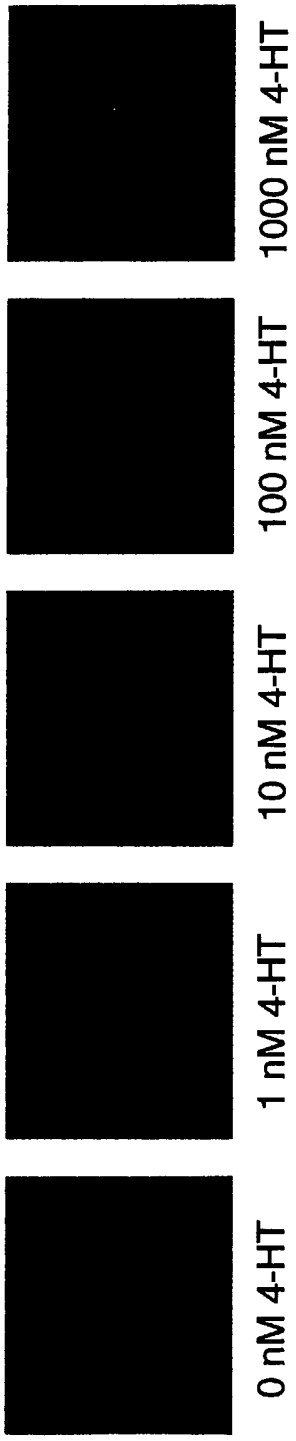


図１１

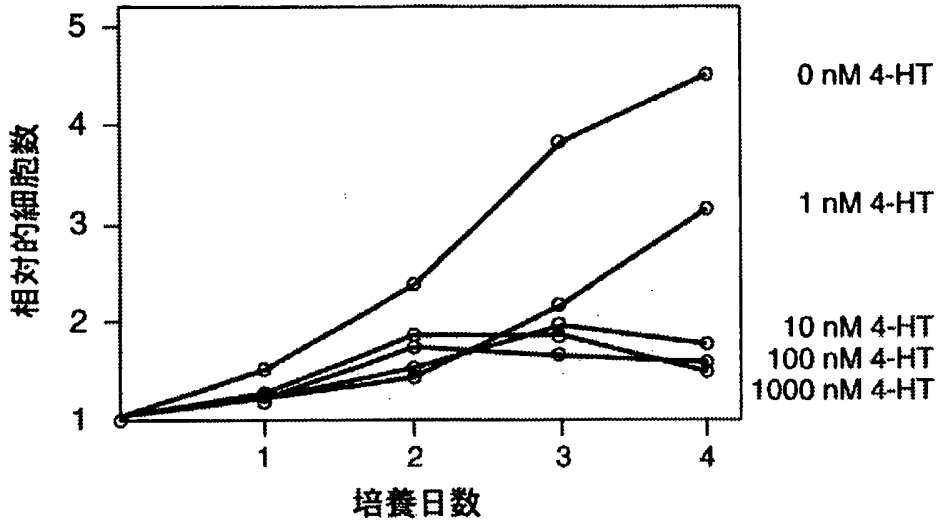

5
4
3
2
1
相対的細胞数
1
2
3
4
培養日数
0 nM 4-HT
1 nM 4-HT
10 nM 4-HT
100 nM 4-HT
1000 nM 4-HT

図１２

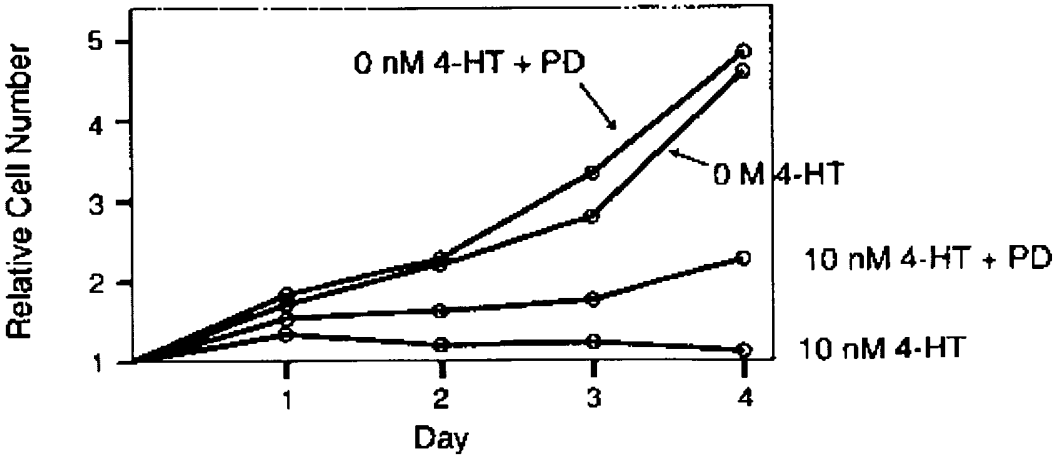

Relative Cell Number
5
4
3
2
1
1
2
3
4
Day
0 nM 4-HT + PD
0 M 4-HT
10 nM 4-HT + PD
10 nM 4-HT

図１３

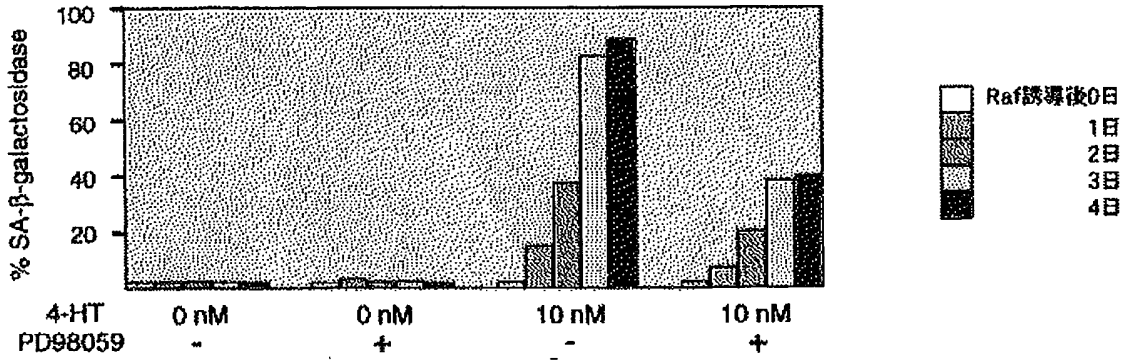

% SA-β-galactosidase
100
80
60
40
20
4-HT 0 nM 0 nM 10 nM 10 nM
PD98059 - + - +
Raf誘導後0日
1日
2日
3日
4日

図１４

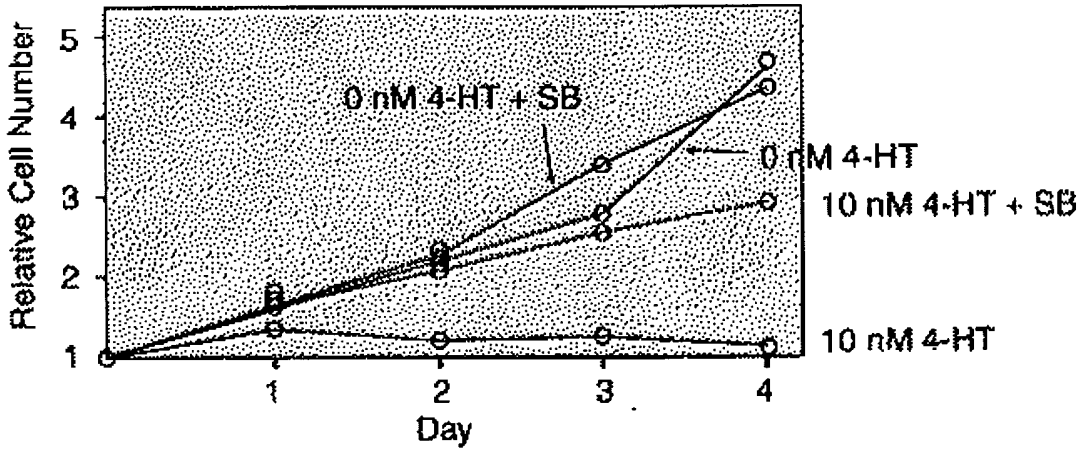
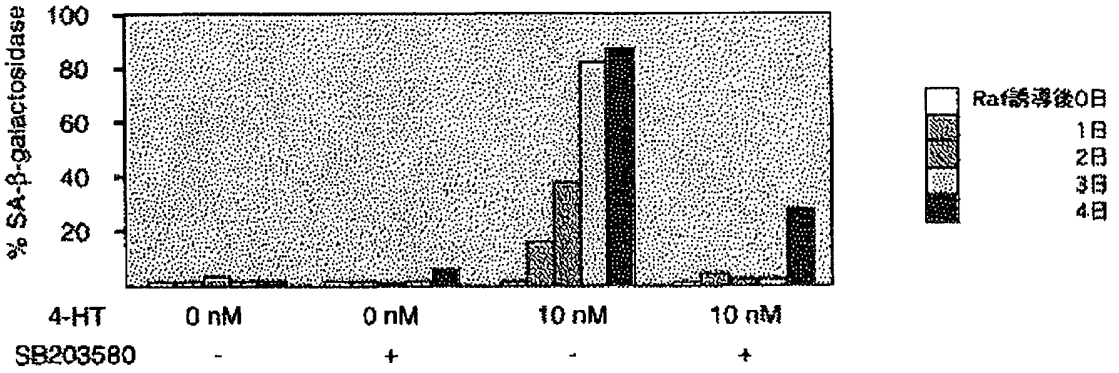

Relative Cell Number
5
4
3
2
1
1
2
3
4
Day
0 nM 4-HT + SB
0 nM 4-HT
10 nM 4-HT + SB
10 nM 4-HT

図１５


% SA-β-galactosidase
100
80
60
40
20
4-HT 0 nM 0 nM 10 nM 10 nM
SB203580 - + - +
Raf誘導後0日
1日
2日
3日
4日

SEQUENCE LISTING

<110> ISHIKAWA Fuyuki

<120> Novel transformed cell, method for screening anti-aging agent, and anti-aging agent

<130> P-41993

<150> JP 2001-215576

<151> 2001-07-16

<150> JP 2001-286412

<151> 2001-09-20

<160> 2

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 1

atagatatca tgtctcagtc gaaaggca 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

aatgcggccg cttagtctcc aagaatca 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/07182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61K48/00, A61P43/00

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)
Int.Cl[7] C12N15/10, C12Q1/02

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)
MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST FILE(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MORIGUCHI, T. et al., A Novel Kinase Cascade Mediated by Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 6 and MKK3, J. Biol. Chem. (1996), Vol.271, No.23, pages 13675 to 13679	1 5-8
X A	RAINGEAUD, J. et al., MKK3- and MKK6- Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway, Mol. Cell. Biol. (1996), Vol.16, No.3, pages 1247 to 1255	1 5-8
X Y	WO 00/00491 A1 (Univ. California), 06 January, 2000 (06.01.00), Full text & AU 9948307 A & EP 1091960 A1	6-8 5

[X] 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 document 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
06 September, 2002 (06.09.02)	24 September, 2002 (24.09.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/07182

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 98/14592 A2 (Geron Corp.), 09 April, 1998 (09.04.98), Full text & GB 2317891 A & WO 98/14593 A2 & EP 841396 A1 & FR 2757177 A1 & AU 9748036 A & AU 9748073 A & DE 19743497 A1 & JP 10-234384 A & NO 9901588 A & EP 932686 A2 & FI 9900655 A & CH 689672 A5 & JP 11-253177 A & EP 954585 A2 & JP 11-313689 A & HU 9903367 A2 & BR 9711844 A & BR 9712254 A & US 6093809 A & CN 1254376 A & MX 9903063 A1 & US 6166178 A & KR 2000048820 A & KR 2000048839 A & JP 2001-081042 A & MX 9902841 A1 & CN 1291231 A & NZ 334709 A & JP 2001-510985 A & AU 200147992 A & AU 200165518 A & JP 2001-523947 A & NZ 510761 A	2-4 5
X Y	JP 9-271395 A (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.), 21 October, 1997 (21.10.97), Full text (Family: none)	2-4 5
X Y	WO 98/05761 A1 (Gen Hospital Corp.), 12 February, 1998 (12.02.98), Full text & EP 964917 A1 & CN 1232497 A & JP 2000-515749 A & US 20010016332 A1	2-4 5
P,Y	Suh, Y. et al., Differential activation of mitogen-activated protein kinases by methyl methanesulfonate in the kidney of young and old rats, Mutation Research, 18 October, 2001 (18.10.01), Vol.497, No.1/2, pages 11 to 18	5-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０７１８２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl⁷　C12N 15/10,C12Q 1/02,A61K 45/00,A61K 48/00,A61P 43/00

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.Cl⁷　C12N 15/10,C12Q 1/02

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）
MEDLINE(STN),WPI(DIALOG),BIOSIS(DIALOG),JICSTファイル(JOIS),GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,SwissProt/PIR/GeneSeq

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 A	MORIGUCHI, T. et al. A Novel Kinase Cascade Mediated by Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 6 and MKK3, J.Biol.Chem.(1996)Vol.271, No.23, p.13675-13679	1 5－8
X A	RAINGEAUD, J. et al. MKK3- and MKK6- Regulated Gene Expression Is Mediated by the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway, Mol.Cell.BIol.(1996)Vol.16, No.3, p.1247-1255	1 5－8

☒ 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
０６．０９．０２	24.09.02

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	北村　弘樹	４Ｎ	３０３８
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	WO 00／00491 A1 (UNIV CALIFORNIA) 2000.01.06, 全文 & AU 9948307 A & EP 1091960 A1	6－8 5
X Y	WO 98／14592 A2 (GERON CORP) 1998.04.09, 全文 & GB 2317891 A & WO 98／14593 A2 & EP 841396 A1 & FR 2757177 A1 & AU 9748036 A & AU 9748073 A & DE 19743497 A1 & JP 10－234384 A & NO 9901588 A & EP 932686 A2 & FI 9900655 A & CH 689672 A5 & JP 11－253177 A & EP 954585 A2 & JP 11－313689 A & HU 9903367 A2 & BR 9711844 A & BR 9712254 A & US 6093809 A & CN 1254376 A & MX 9903063 A1 & US 6166178 A & KR 20000048820 A & KR 20000048839 A & JP 2001－081042 A & MX 9902841 A1 & CN 1291231 A & NZ 334709 A & JP 2001－510985 A & AU 200147992 A & AU 200165518 A & JP 2001－523947 A & NZ 510761 A	2－4 5
X Y	JP 9－271395 A (日本臓器製薬株式会社) 1997.10.21, 全文 (ファミリーなし)	2－4 5
X Y	WO 98／05761 A1 (GEN HOSPITAL CORP) 1998.02.12, 全文 & EP 964917 A1 & CN 1232497 A & JP 2000－515749 A & US 20010016332 A1	2－4 5
P, Y	Suh, Y. et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by methyl methanesulfonate in the kidney of young and old rats, Mutation Research(2001.10.18)Vol.497, No.1/2, p.11-18	5－8