

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 2 月 9 日 (09.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/014013 A1

(51) 国際特許分類⁷: **C12N 15/12, A61K**
38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 19/02, 19/08, 35/00,
C12Q 1/68, G01N 33/15, 33/50 // C07K 14:47

本谷 英之 (MOTOTANI, Hideyuki) [JP/JP]; 〒5328686
大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目 1 7 番 8 5 号
武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014612

(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).

(22) 国際出願日: 2005 年 8 月 3 日 (03.08.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(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, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-228745 2004 年 8 月 4 日 (04.08.2004) JP
特願2004-324372 2004 年 11 月 8 日 (08.11.2004) JP
特願2005-070103 2005 年 3 月 11 日 (11.03.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行
政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉
県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 武田薬品工業株
式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY
LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道
修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(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), ユーロシア (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).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 池川 志郎 (IKEGAWA, Shiro) [JP/JP]; 〒
1410021 東京都品川区上大崎 1 - 1 2 - 2 2 -
2 0 1 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木澤 秀樹
(KIZAWA, Hideki) [JP/JP]; 〒3004293 茨城県つくば市
和台 1 0 番地 武田薬品工業株式会社内 Ibaraki (JP).

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: BONE/JOINT DISEASE SENSITIVITY GENE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 骨・関節疾患感受性遺伝子およびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide a method of preventing and treating bone/joint diseases by controlling the expression or activity of calmodulin; a method of preventing and treating bone/joint diseases by controlling the expression or activity of asporin; a method of diagnosing genetic sensitivity to bone/joint diseases by detecting a polymorphism in CALM1 gene and/or asporin gene; and so on.

(57) 要約: 本発明は、カルモジュリンの発現もしくは活性を調節することによる骨・関節疾患の予防および治療、アスポリンの発現もしくは活性を調節することによる骨・関節疾患の予防および治療、並びに CALM1 遺伝子内および/またはアスポリン遺伝子内の多型を検出することによる骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法等を提供する。

WO 2006/014013 A1

明 細 書

骨・関節疾患感受性遺伝子およびその用途

5 技術分野

本発明は、変形性関節症などの骨・関節疾患 (bone and joint diseases) に関連する遺伝子および該疾患と相関する該遺伝子内の多型の同定、並びにそれらに基づく骨・関節疾患の予防・治療、該疾患に対する遺伝的感受性の診断などに関する。

10

背景技術

糖尿病・高血圧などの生活習慣病をはじめとする頻度の高いありふれた疾患 (いわゆる common disease; CD) は、浸透率 (penetrance; ある遺伝子に変異を有する個体がある疾患を発症する割合) の低い複数の疾患関連遺伝子の変異と、
15 運動・栄養などの複数の環境因子との相互作用により発症に至る多因子性疾患であると考えられている。CDの疾患関連遺伝子の変異は頻度の高い遺伝子多型 (common variant; CV) であり、健常者にも存在するが、患者における保有率が有意に高いものであるとの仮説 (Common Disease-Common Variant (CD-CV) hypothesis) が提唱されている。有名な一例としては、アポリポ蛋白E遺伝子 ε
20 4における一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) がアルツハイマー病の発症と相関することが知られている。

わが国では、2000年度から、ミレニアム・ゲノム・プロジェクトの一環として、ヒトゲノムの遺伝子領域にある約20万個のSNPを同定し (それらはJSNPデータベースとして<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>上で公開されている)、これら
25 のSNPについて代表的なCDとの相関を解析することにより、CDに対する感受性 (易罹患性) を規定する遺伝子群を同定しようとする研究が進められており、既に心筋梗塞や関節リウマチのなり易さに関連する遺伝子が発見されている (非

特許文献1, 2)。

骨・関節の生活習慣病は、直接命に影響を及ぼすことは少ないが、痛みや歩行障害などのために日常生活動作（ADL）に支障をきたすことから、高齢者のQOLを損なう最大の原因となっている。また、これらの疾患は加齢とともに発症頻度が急増し且つ慢性に経過することから、国民医療経済にも重大な負担を課すこととなり、高齢化社会においては社会全体で克服すべき重要な課題である。世界保健機関（WHO）も21世紀の最初の10年を“骨と関節の10年（the Bone and Joint Decade; BJD）”と位置付けて骨・関節疾患の制圧に乗り出している。

変形性関節症（osteoarthritis; OA）は慢性の関節炎を伴う骨・関節疾患で、軟骨の退行変性により軟骨の破壊と骨や軟骨の増殖性変化をきたす病気である。その患者数は日本だけでも500万～700万人にのぼり、60歳以上では、80%以上が膝・肘・股関節や脊椎に変形性関節症の症状を呈すると言われている、代表的な common disease である。現在のところ、OAの根本的な治療手段はなく、非ステロイド性消炎鎮痛剤やヒアルロン酸、ステロイド剤の投与など、痛みを抑制する対症療法が中心となっている。進行した場合、関節鏡視下手術・骨切り術・人工関節置換などの手術適応となるが、人工関節には寿命があるため55歳位まではこの手術を避けることが望ましいと考えられている。従って、関節の退行性変化を抑制する治療方法の開発が望まれている。上記のCD-CV仮説に基づいてOAに対する感受性を規定する遺伝子を同定することは、OAの根本的な治療方法を開発する上で有用な情報を提供するものと期待される。

OA感受性遺伝子の探索は、当初、骨軟骨異形成症に分類される種々の疾患における変異遺伝子（例：II型コラーゲンをコードするCol2a1遺伝子）や骨密度を制御するタンパク質（例：ビタミンDレセプター）をコードする遺伝子等の、疾患との関連性が予期され得る限られた候補遺伝子を対象とした相関解析（random association）により行われていたが、これらの結果は概して否定的であった。そこで、前もって候補遺伝子を予測せずにゲノム全域での多型解析により体系的に遺伝子マッピングを行う手法（ゲノムワイドスクリーニング）が用

いられるようになった。

欧米では、オックスフォード大学のJ. Loughlinらのグループをはじめとして、いくつかのグループからゲノムワイド連鎖解析によるOA感受性遺伝子座のマッピングに関する報告がなされている（例えば、非特許文献3を参照）。例えば、

5 Loughlinらは、2, 4, 6, 11および16番染色体上にOA感受性遺伝子座が存在すること、2番染色体上に位置するインターロイキン-1（IL-1）遺伝子クラスターおよびインターロイキン-4レセプター（IL-4R） α 鎖遺伝子内における頻度の高い多型（CV）が、それぞれ膝関節OAおよび股関節OAと相関することを報告している（非特許文献4, 5）。一方で、6番染色体上のOA感受性領域内に存在する

10 COL9A1遺伝子（関節軟骨の基質タンパク質IX型コラーゲンをコードする）およびBMP5遺伝子（骨形成タンパク質（BMP）遺伝子ファミリーに属する）は、それらの機能からOAとの関連が予測されたが、これらの遺伝子内にはOAと相関するSNPは見出されなかった。

CALM1遺伝子はカルモジュリン（CaM）と呼ばれる細胞内カルシウム結合タン

15 パク質をコードし、軟骨細胞を含む種々の組織でユビキタスに発現している。細胞内カルシウム濃度の上昇が軟骨細胞分化を促進することが知られている（非特許文献6）。主要な軟骨基質の1つであるアグリカンにコードする遺伝子の発現は力学的刺激によって上昇するが、この発現はCaM阻害剤の存在下で抑制されることが報告されている（非特許文献7）。これらの知見に基づいて、CaMがカルシ

20 ニューリンやCaM依存性キナーゼIIを介してアグリカン遺伝子の転写を活性化するとのモデルが提唱されている。また、CaMが軟骨細胞分化のマスター遺伝子であるSOX9にコードされるタンパク質に結合してその核内移行を制御するとの報告もある（非特許文献8）。

アスポリンはSmall Leucine-rich Repeat Proteoglycan（SLRP）ファミリー

25 に属するタンパク質であり、細胞外基質タンパク質の1つである。その生理機能は不明であるが、OA軟骨で高発現していることが報告されている（非特許文献9）。アスポリンは、SLRPファミリーに属する他のプロテオグリカンとは異なり、

N末端側に特徴的なアスパラギン酸の繰り返し（D-リピート）多型を有する。

アスポリンと同じSLRPファミリーに属するデコリン、バイグリカンおよびフィブロモジュリンは、軟骨分化の重要な調節因子として知られるTGF- β と相互作用することが報告されている（非特許文献10）。

- 5 しかしながら、CALM1遺伝子やアスポリン遺伝子における異常がOAの発症もしくは進行に関連しているとの報告は皆無である。

[非特許文献1] Ozaki et al., *Nat. Genet.*, 32: 650-4 (2002)

[非特許文献2] Tokuhiko et al., *Nat. Genet.*, 35: 341-8 (2003)

[非特許文献3] J. Loughlin, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3: 295-9 (2003)

- 10 [非特許文献4] Loughlin et al., *Arthritis Rheum.*, 46: 1519-27 (2002)

[非特許文献5] Forster et al., *Hum. Genet.*, 114: 391-5 (2004)

[非特許文献6] Valhmu and Raia, *Biochem. J.*, 361: 689-96 (2002)

[非特許文献7] Tomita et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 42214-8 (2002)

[非特許文献8] Argentaro et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 33839-47 (2003)

- 15 [非特許文献9] Lorenzo et al., *J. Biol. Chem.*, 276: 12201-11 (2001)

[非特許文献10] Burton-Wurster et al., *Osteoarthr. Cartil.*, 11: 167-76 (2003)

発明の開示

- 20 本発明の目的は、変形性関節症をはじめとする骨・関節疾患の発症・進行に関与する遺伝子を同定し、その機能を解明することにより、当該疾患の新規且つ根本的な予防・治療手段を提供することである。また、本発明の別の目的は、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の簡便且つ高確度な診断方法を提供することである。

- 25 本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、

[1] 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治

療剤；

(a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩

(b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩

10 [2] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [1] 記載の剤；

[3] 哺乳動物における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を増強することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法；

[4] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [3] 記載の方法；

20 [5] 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用；

(a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩

(b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩

[6] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな

5 なる群より選択される上記 [5] 記載の使用；

[7] 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤；

(a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一

10 部を含む核酸

(b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

(c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

15 活性を抑制する化合物またはその塩

[8] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [7] 記載の剤；

[9] 哺乳動物における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を低減することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法；

20 [10] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [9] 記載の方法；

25 [11] 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用；

(a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

(b) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗

5 体

(c) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

10 [12] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [11] 記載の使用;

[13] 下記 (a) または (b) の物質を含有してなる骨・関節疾患の診断剤;

(a) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

15 (b) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

[14] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [13] 記載の剤;

20 [15] 被験動物における、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現変動を調べることを含む、骨・関節疾患の診断方法;

[16] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [15] 記載の方法;

25 [17] 骨・関節疾患の診断剤の製造のための下記 (a) または (b) の物質の使用;

(a) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

(b) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

[18] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、

5 滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [17] 記載の使用;

[19] 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法;

10 [20] 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸、あるいは該タンパク質もしくは該部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法;

[21] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、

15 滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [19] または [20] 記載の方法;

[22] 配列番号: 5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）を含む該塩基配列の部分配列であって、約15塩基以上の

20 連続した塩基配列を含む核酸;

[23] 配列番号: 5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基がそれぞれチミン、シトシン、グアニンおよびチミンであるハプロタイプの塩基配列を含む核酸;

[24] 配列番号: 5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上の塩基における多型を検出することを含む、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法;

[25] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、

滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍
および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [24] 記載の方法；

[26] 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該
塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸

5 を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤；

[27] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、
滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな
る群より選択される上記 [26] 記載の剤；

[28] 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該
10 塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸
を哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治
療方法；

[29] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、
滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな
15 る群より選択される上記 [28] 記載の方法；

[30] 骨・関節疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：5で表される塩
基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそ
れに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸の使用；

[31] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、
20 滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな
る群より選択される上記 [30] 記載の使用；

[32] 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該
塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸
と、該塩基配列に選択的に結合する転写調節因子とを用いることを特徴とする
25 骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；

[33] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、
滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍

および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [32] 記載の方法;

[34] 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤;

- (a) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩
- (b) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸
- (c) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩

- [35] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [34] 記載の剤;

[36] 哺乳動物における、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を増強することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法;

- [37] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [36] 記載の方法;

[38] 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用;

- (a) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩
- (b) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミ

ノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

- (c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩

[39] 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される上記 [38] 記載の使用；

- [40] 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤；

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

- (b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

- (c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

[41] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [40] 記載の剤；

- [42] 哺乳動物における、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を低減することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法；

[43] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [42] 記載の方法;

[44] 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の物質の使用;

(a) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

(b) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

(c) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

[45] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [44] 記載の使用;

[46] 下記 (a) または (b) の物質を含有してなる骨・関節疾患の診断剤;

(a) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

(b) 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

[47] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [46] 記載の剤;

[48] 被験動物における、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現変動を調べることを含む、骨・関節疾患の診断方法；

- 5 [49] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [48] 記載の方法；

[50] 骨・関節疾患の診断剤の製造のための下記 (a) または (b) の物質の使用；

- 10 (a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

- 15 [51] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [50] 記載の使用；

[52] 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくは

- 20 はその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；

[53] 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸、あるいは該タンパク質もしくは該部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いる

- 25 ことを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法；

[54] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍

および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [52] または [53] 記載の方法;

[55] 配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中N末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し残基数における多型を検出することを含む、骨・関節疾患に対する

5 遺伝的感受性の診断方法;

[56] 配列番号: 5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上の塩基における多型を検出することをさらに含む、上記 [55] 記載の方法; および

[57] 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、
10 滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍
および先天性骨系統疾患からなる群より選択される上記 [55] または [56] 記載の方法;

などを提供する。

カルモジュリンは軟骨基質遺伝子の発現を増加させ、軟骨前駆細胞から軟骨細胞
15 への分化を促進する機能を有することにより、骨・関節疾患、特に軟骨基質の
変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患に対して予防・治療効果を奏する。また、アスポリンは軟骨基質遺伝子の発現を低下させ、軟骨前
駆細胞から軟骨細胞への分化を抑制する機能を有するので、アスポリンの発現も
しくは活性を阻害することにより上記骨・関節疾患の予防・治療効果が得られ
20 う。さらに、CALM1遺伝子およびアスポリン遺伝子における多型が骨・関節疾患
と相関することから、該多型は骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の簡便な判定
に利用することができる。

図面の簡単な説明

25 図1は、IVS3-293C>Tを中心とした連鎖不平衡領域の解析結果を示す。グラフ
の縦軸は連鎖不平衡定数 D' を、横軸は第14番染色体上のIVS3-293C>T付近の相
対位置（左がセントロメア側、右がテロメア側）をそれぞれ示す。また、下の

模式図は、グラフの横軸と対応し、遺伝子およびユニジェンの存在位置を示す。矢印は遺伝子の転写方向を示す。IVS3-293C>Tと完全連鎖 ($D' = 1$) するSNPはCALM1遺伝子領域に集中している。

図2は、CALM1遺伝子のエクソン-イントロン構造およびSNPの存在位置 (a)、
5 並びにコモンハプロタイプ構造およびそれらの股関節OA患者、非OA患者における頻度 (b) を示す。図2a中、ボックスはエクソン (白抜きは非翻訳領域、黒塗りはコード領域) を、線はイントロンを示し、ATGおよびStopはそれぞれ開始および終止コドンを示す。下の縦棒は既知のJSNP (*はマイナーアレル頻度が10%以上であることを示し、5' 側よりそれぞれCALM_1~CALM_11のSNP IDが付されている (図2b)) を、矢印は実施例1において発見された新規JSNPの位置をそれぞれ示す。IVS3-293C>TはCALM_9に相当する。

図3は、軟骨細胞におけるCALM1の発現解析結果を示す。NHAC-knは正常ヒト膝関節軟骨細胞NHAC-knから、OA軟骨1~4は人工膝関節置換術時に膝関節OA患者より切除した関節軟骨から、それぞれ抽出した総RNAを鋳型とするRT-PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色したものである。
15

図4は、-16C>Tの転写活性に及ぼす影響を示すルシフェラーゼアッセイの結果を示す。図4aは、図4bの最上段のコンストラクト (転写開始点の上流1231 bpおよび5' 非翻訳領域202 bpを含む) を導入したOUMS-27細胞におけるルシフェラーゼ活性の、-16Cアレルと-16Tアレルでの比較を示す (**: $p < 0.01$)。図4bは、長さの異なるCALM1遺伝子の発現調節領域を含む4種のコンストラクトを導入したHuh-7細胞におけるルシフェラーゼ活性の、-16Cアレルと-16Tアレルでの比較を示す (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。模式図中、TATAはTATAボックスを、5' UTRは5' 非翻訳領域を、Lucはルシフェラーゼコード領域をそれぞれ示す。活性比は-16Cアレルの活性を100%とした相対活性で示している。
25

図5は、-16C>Tおよびその周辺のCALM1遺伝子配列に結合する核内因子の存在を示すゲルシフトアッセイの結果を示す。これらの核内因子は、-16Cアレルよ

りも-16Tアレルに強く結合する（矢尻）。

図6は、ATDC5細胞の軟骨細胞分化に及ぼすカルモジュリン阻害剤W-7の影響を示す。図6a, bおよびcは、それぞれII型コラーゲン遺伝子、アグリカン遺伝子およびX型コラーゲン遺伝子の発現量の経時変化を示す。縦軸は0日目を基準（=1）とした相対発現量を、横軸はインスリン添加後の日数をそれぞれ示す。
5 (-○-) インスリン非添加； (-■-) インスリン添加； (-▲-) インスリンおよびW-7添加。

図7は、イオノマイシン刺激後の軟骨基質遺伝子の発現上昇反応におけるカルモジュリンの関与を示す。図7aおよびbは、それぞれII型コラーゲン遺伝子およびアグリカン遺伝子の発現量の変化度（イオノマイシン非添加時の発現量を1とした相対値）を示す。
10

図8は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析による正常およびOA関節軟骨におけるアスボリンの発現量を比較した結果を示す。縦軸は標準化したシグナル強度を示す。

図9は、第9番染色体上のアスボリン遺伝子およびその周辺遺伝子領域の地図（図9a上段）およびアスボリン遺伝子内の一塩基多型（SNP）地図（図9a下段）、並びにアスボリン遺伝子およびその周辺遺伝子領域における連鎖不平衡地図（図9b）である。図9a上段において、ボックスは遺伝子領域、線は非遺伝子領域を示し、*ASPN* はアスボリン遺伝子を示す。図9a下段において、ボックスはエクソンを、線はイントロンを示し、C>T等は一塩基置換を、T/delは一塩基欠失を示す。D repeatはアスボリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し配列を示す。図9b中、D' は連鎖不平衡定数を示す。
15
20

図10は、アスボリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型におけるD14アレル保有者頻度と日本人膝関節OAの重症度との相関を調べた結果を示す。図10aは北大分類、図10bはKellgrenスコアの各スコアの患者におけるD14アレル保有者頻度（%）をそれぞれ示す。
25

図11は、ヒトアスボリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β

(TGF- β 1 (図11a), TGF- β 2 (図11b) およびTGF- β 3 (図11c)) 刺激によるアグリカン遺伝子発現量 ($\times 10^{-3}$ コピー/ μ g総RNA) を測定した結果を示す。

図12は、ヒトアスポリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β (TGF- β 1 (図12a), TGF- β 2 (図12b) およびTGF- β 3 (図12c)) 刺激によるII型コラーゲン遺伝子発現量 ($\times 10^{-5}$ コピー/ μ g総RNA) を測定した結果を示す。

図13は、ヒトアスポリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β (TGF- β 1 (図13a), TGF- β 2 (図13b) およびTGF- β 3 (図13c)) 刺激によるヒトアスポリン遺伝子発現量 ($\times 10^{-5}$ コピー/ μ g総RNA) を測定した結果を示す。

図14は、ヒトアスポリン一過性発現ATDC5細胞株におけるTGF- β 1刺激によるアグリカン (a), II型コラーゲン (b) およびヒトアスポリン (c) 遺伝子発現量 (単位: $\times 10^{-4}$ コピー/ μ g総RNA (a); $\times 10^{-6}$ コピー/ μ g総RNA (bおよびc)) を測定した結果を示す。白抜きのバーはTGF- β 1非刺激を、黒塗りのバーはTGF- β 1刺激を示す。

図15は、ヒトアスポリン安定発現ATDC5細胞株の軟骨分化培養過程におけるアグリカン (図15a), II型コラーゲン (図15b) およびヒトアスポリン (図15c) 遺伝子発現量 (単位: $\times 10^{-4}$ コピー/ μ g総RNA (図15aおよび図15c); $\times 10^{-6}$ コピー/ μ g総RNA (図15b)) を測定した結果を示す。各グラフ中、白抜きバーはMock、ハッチ入りバーはD13、黒塗りバーはD14をそれぞれ示し、グラフ横軸の数字は分化誘導後の日数を示す。

図16は、ヒトアスポリンD13とヒトアスポリンD14との間で、TGF- β 1刺激時のアグリカン (図16a) およびII型コラーゲン (図16b) 遺伝子発現の抑制活性を比較した結果を示す。縦軸は、単位アスポリンmRNA量あたりの遺伝子発現抑制率(TGF- β 1刺激時のアグリカンまたはII型コラーゲン遺伝子発現量/TGF- β 1非刺激時のアグリカンまたはII型コラーゲン遺伝子発現量)を示す。

図17は、ヒトアスポリンとTGF- β 1との結合試験の結果を示す。Sタグ付きヒトアスポリン成熟体は無細胞合成し、TGF- β 1と混合した後、S-プロテインアガロースレジンをういてアフィニティー精製し、SDS-PAGEにかけた後、アスポリ

ン（上パネル），TGF- β 1（下パネル）をそれぞれ検出した。

図18は、大腸菌組換え型マウスアスボリンの部分精製品をSDS-PAGEにかけた後、クマシー染色によりタンパク質を検出した結果（a）およびS-プロテイン-HRPを用いたウエスタンブロッティングによりSタグ付きマウスアスボリンを検出した結果（b）を示す。矢印はアスボリンに相当するバンドを示す。

図19は、マウスアスボリンとTGF- β 1との結合試験の結果を示す。図19aは、ビオチン化デコリンとTGF- β 1との結合阻害を指標とした結合試験の結果を示し、図19bは、Sタグ付きマウスアスボリンとTGF- β 1との結合を、S-プロテイン-HRPを用いて検出した結果を示す。各図の縦軸は、ビオチン化デコリン（図19a）またはSタグ付きマウスアスボリン（図19b）のTGF- β 1固相への結合量を、最大結合量に対する%で示している。

図20は、N末にHAタグを付与したヒトアスボリンを一過性に発現させたCOS7細胞株の培養上清（右パネル）および細胞抽出画分（左パネル）に発現したアスボリンを、抗HA抗体を用いてウエスタンブロッティングで検出した結果を示す。

図21は、アスボリンとI型およびII型コラーゲンとの結合試験の結果を示す（パネルa）。Sタグ付きヒトアスボリン成熟体を無細胞合成し（リジン残基がビオチン化されている）、コラーゲンと混合した後、SDS-PAGEにかけ、ストレプトアビジン-HRPを用いて検出した。パネルbは、ポジティブコントロールとしてのデコリンおよびネガティブコントロールとしてのバイグリカンと、I型およびII型コラーゲンとの結合試験の結果を示す。

図22は、各種軟骨系細胞株におけるTGF- β 1によるアスボリン遺伝子発現の誘導能を調べた結果を示す。縦軸は遺伝子発現量（ $\times 10^{-5}$ コピー/ μ g総RNA）を示し、白抜きのバーはTGF- β 1非刺激を、黒塗りのバーはTGF- β 1刺激を示す。

図23は、ヒト膝関節OA軟骨組織およびヒト軟骨系細胞株におけるTGF- β アイソフォームの遺伝子発現量を比較した結果を示す。図23aはリアルタイムPCRでヒト膝関節OA軟骨組織、図23bはリアルタイムPCRでヒト軟骨系細胞株、図23cはマイクロアレイで正常およびOA関節軟骨組織におけるTGF- β 1（黒塗りバー），

TGF- β 2 (ハッチ入りバー) およびTGF- β 3 (白抜きバー) 遺伝子の発現量 (単位: $\times 10^{-4}$ コピー/ μ g総RNA (図23a); $\times 10^{-6}$ コピー/ μ g総RNA (図23b); 標準化したシグナル強度 (図23c)) を比較した結果をそれぞれ示す。

図24は、分化培地で培養開始後21日目のヒトアスボリン安定発現ATDC5細胞株
5 をアルシアンブルー染色した結果を示す。図24aは実際の染色像を示し、図24bは細胞を6M グアニジン塩酸で処理した抽出液の吸光度 (OD630) を示す。

図25は、大腸菌で発現させた組換え型マウスアスボリン精製物の、SDS-PAGE後のクマシーブリリアントブルー染色の結果を示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2は精製組換え型マウスアスボリンを示す。

10 図26は、精製組換え型マウスアスボリンとTGF- β 1との結合試験の結果を示す。沈殿物中のS-タグ付きマウスアスボリンはS-プロテインを、TGF- β 1は抗TGF- β 1抗体を、それぞれ用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

図27は、ATDC5細胞におけるTGF- β 1刺激によるアグリカン遺伝子 (図27a) およびII型コラーゲン遺伝子 (図27b) の発現上昇に及ぼす精製組換え型マウスア
15 スボリンの抑制作用を示す。図27aにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正したアグリカン遺伝子発現量 ($\times 10$)、横軸は添加した精製マウスアスボリン濃度 (μ g/ml) を示す。図27bにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正したII型コラーゲン遺伝子発現量 ($\times 10^2$)、横軸は添加した精製マウスアスボリン濃度 (μ g/ml) を示す。各図において、白抜きバーはTGF- β 1非刺激、黒塗りバーはTGF- β 1刺激
20 をそれぞれ示す。

図28は、マイクロプレートアッセイ法を用いたマウスアスボリンとTGF- β との結合試験の結果を示す。縦軸は、TGF- β を固相化したプレート (TGF- β 1(+)) またはTGF- β を固相化していないプレート (TGF- β 1(-)) へのビオチン化アスボリンの結合量をOD405 nmで示す。横軸は、溶液中へのビオチン化アスボリン
25 (上段) およびアスボリン (下段) の添加濃度 (mg/ml) を示す。

図29は、正常ヒト膝関節軟骨細胞 (NHAC) における精製組換え型マウスアスボリンのTGF- β 刺激II型コラーゲン (a) およびアグリカン (b) 遺伝子発現抑

制作用を調べた結果を示す。縦軸は遺伝子発現量（単位： $\times 10^{-5}$ コピー/ μ g総RNA）、横軸はマウスアスポリン濃度（ μ g/ml）を示す。白抜きのバーはTGF- β 1非刺激を、黒塗りのバーはTGF- β 1刺激を示す。

図30は、ATDC5細胞における精製組換え型マウスアスポリンのTGF- β 刺激
5 Smad2リン酸化抑制作用を調べた結果を示す。図中、aはリン酸化Smad2を、bはSmad2をそれぞれ示す。

図31は、リアルタイムPCR法により正常（非OA）およびOA関節軟骨におけるアスポリンmRNA発現量を比較した結果を示す（*： $p < 0.01$ （Student's t-test））。縦軸はGAPDH遺伝子で補正したアスポリン遺伝子発現量（ $\times 10$ ）を示す。

10 図32は、ATDC5細胞株におけるTGF- β 1刺激II型コラーゲン遺伝子発現に及ぼすヒトアスポリンD16およびD17の一過性発現の効果を調べた結果を示す（*： $p < 0.05$, **： $p < 0.01$ （Student's t-test））。縦軸はII型コラーゲン遺伝子の発現量（ $\times 10^{-6}$ コピー/ μ g総RNA）を示す。

図33は、各種細胞株（HuH7（a）、ATDC5（b）およびNHAC（c））培養上清にお
15 ける組換え型ヒトアスポリンの発現を調べた結果を示す。各パネルは抗HA抗体によるプロットを示す。

図34は、組換え型マウスアスポリンのATDC5細胞増殖抑制作用を調べた結果を示す。図34aは、アスポリンの細胞増殖抑制作用の濃度依存性を示す（*： $p < 0.05$, **： $p < 0.01$ （Student's t-test））。（-○-）アスポリン非添加；（-△-）
20 1.9 μ g/ml；（-□-）3.75 μ g/ml；（-●-）7.5 μ g/ml；（-▲-）15 μ g/ml；（-■-）30 μ g/ml。図34b中、左グラフはアスポリン非添加時、右グラフはアスポリン添加（10 μ g/ml）時における、bFGFの細胞増殖抑制作用を示す。（-○-）bFGF非添加；（-●-）1 ng/ml；（-▲-）2 ng/ml；（-■-）4 ng/ml；（-◆-）8 ng/ml；（-×-）16 ng/ml。各グラフにおいて、縦軸は細胞増殖をOD550 nmで示
25 し、横軸はアスポリンまたはbFGF添加後の日数を示す。

図35は、ATDC5細胞におけるbFGF刺激プロモデオキシウリジン（BrdU）取り込みに及ぼすマウスアスポリンの作用を調べた結果を示す（**： $p < 0.01$ ）。

(Student's t-test))。縦軸は、BrdUの取り込み量を、アスポリンおよびbFGF非添加時における値を1としたときの相対値として示す。

図36は、マイクロプレートアッセイ法を用いたマウスアスポリンとbFGFとの結合試験の結果を示す。縦軸は、bFGFを固相化したプレート (bFGF(+)) または bFGFを固相化していないプレート (bFGF(-)) へのビオチン化アスポリンの結合量をOD405 nmで示す。白抜きのバーはbFGF非添加を、黒塗りのバーはbFGF添加を示す。

図37は、ウエスタンブロッティングによる抗アスポリン抗体のヒト (a) およびマウスアスポリン (b) との反応性を調べた結果を示す。図中、aはHAタグ付きヒトアスポリン (D13またはD14) を発現するHuH7細胞の培養上清濃縮液を、bは精製組換え型マウスアスポリン (10または100 ng) をそれぞれSDS-PAGEにかけ、3種の抗体 (抗マウスアスポリン抗体 (2229-B01) (上パネル), 抗ヒトアスポリンペプチド抗体 (2210-B02) (中パネル), 抗ヒトアスポリンペプチド抗体 (2211-B02) (下パネル)) との反応性を調べた。

図38は、ヒトアスポリン (D13またはD14) 安定発現ATDC5細胞株の培養上清中におけるアスポリンタンパク質の発現を調べた結果を示す。抗マウスアスポリン抗体 (2229-B01) による免疫沈降物を、ビオチン化抗ヒトアスポリン抗体 (2210-B02) 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。

図39は、NHAC細胞におけるTGF- β 1の分化作用に対するアスポリンの抑制作用を示す。図中、aはTGF- β 1無添加で7日間培養後、bはTGF- β 1を添加して7日間培養後、cはTGF- β 1およびアスポリンを添加して7日間培養後のNHAC細胞の顕微鏡像をそれぞれ示す。

図40は、NHAC細胞におけるTGF- β 1刺激によるSmad2リン酸化に対するアスポリンの抑制作用を示す。P-Smad2はリン酸化Smad2に相当するバンドを示す。

図41は、NHAC細胞におけるTGF- β 1刺激によるSmad3特異的遺伝子転写に対するアスポリンの抑制作用を示す (*: $p < 0.05$)。縦軸は、ルシフェラーゼ活性を、Smad3/4結合配列を含まないルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞におけるアス

ポリリンおよびTGF- β 1非添加時の活性を1とした相対値で示す。白抜きのバーはTGF- β 1非添加を、黒塗りのバーはTGF- β 1添加を示す。

図42は、NHAC細胞培養上清中における内在性アスポリンの発現を示す。抗マウスアスポリン抗体 (2229-B01) による免疫沈降物を、ビオチン化抗ヒトアスポリン抗体 (2210-B02) 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。

図43は、NHAC細胞における内在性アスポリンの細胞外局在を示す。aおよびbは抗マウスアスポリン抗体 (2229-B01) による免疫染色像を、cおよびdは細胞内マーカーであるSmad2を検出するための抗Smad2抗体による免疫染色像をそれぞれ示す。aおよびcは界面活性剤による浸透化処理をしていない細胞、bおよびdは該処理を施した細胞である。

図44は、NHAC細胞におけるアスポリンとTGF- β 1のco-localizationを示す。a～dはビオチン化TGF- β 1を添加した細胞、e～hはビオチン化TGF- β 1を添加していない細胞における染色像である。aおよびeはアスポリンと核の二重染色像を、bおよびfはTGF- β 1の染色像を、cおよびgはアスポリンの染色像を、dおよびhはTGF- β 1とアスポリンの二重染色像をそれぞれ示す。

図45は、ヒトOA患者膝関節軟骨組織におけるアスポリンとTGF- β 1のco-localizationを示す。a～cはアスポリン、dおよびeはTGF- β 1についての免疫染色像である。aおよびdは病変部、bおよびeは非病変部の組織をそれぞれ示す。矢頭はアスポリンとTGF- β 1の染色が一致する部分を示す。尚、cにおいて、青く染色されている部分が病変部、赤く染色されている部分が非病変部に相当する。

図46は、NHAC細胞におけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子の一過性発現誘導を示す。各グラフにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正したアスポリン遺伝子発現量 (x10)、横軸はTGF- β 1添加後の時間 (a) または日数 (b) を示す。(-○-) TGF- β 1非添加; (-●-) TGF- β 1 (10 ng/ml) 添加。

図47は、NHAC細胞におけるTGF- β 1によるアスポリン (図47a), TGF- β 1 (図47b), II型コラーゲン (図47c) およびアグリカン (図47d) 遺伝子の発現誘導

に及ぼすSB431542の効果を示す (*: $p < 0.05$)。各グラフにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正した各遺伝子発現量 (単位: $\times 10$ (図47aおよびb); $\times 10^3$ (図47c); $\times 10^2$ (図47d)) を示し、横軸上段の数字はSB431542の添加濃度 (μM)、下段の数字はTGF- β 1の添加濃度 (ng/ml) をそれぞれ示す。

- 5 図48は、NHAC細胞におけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子の発現誘導に及ぼすシクロヘキシミド (CHX) の効果を示す。縦軸は、GAPDH遺伝子で補正したアスポリン遺伝子発現量 ($\times 10$) を示し、横軸の「時刻」は、TGF- β 1添加時を基準 (時刻0) としたときのCHX添加時刻 (時) を示す。

- 10 図49は、NHAC細胞におけるTGF- β 1刺激によるアスポリン (a) およびTGF- β 1 (b) 遺伝子発現に対するアスポリンの抑制作用を示す。各グラフにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正した各遺伝子発現量 (単位: $\times 10$) を、横軸はアスポリン添加濃度 ($\mu\text{g/ml}$) をそれぞれ示す。白抜きのバーはTGF- β 1非刺激を、黒塗りのバーはTGF- β 1刺激を示す。

- 15 図50は、NHAC細胞におけるアスポリン (a), II型コラーゲン (b), アグリカン (c) およびTGF- β 1 (d) 遺伝子発現に対するアスポリン特異的siRNAの調節作用を示す (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。各グラフにおいて、縦軸はGAPDH遺伝子で補正した各遺伝子発現量 (単位: $\times 10^3$ (a); $\times 10^4$ (b); $\times 10^2$ (cおよびd)) を示す。

- 20 図51は、NHAC細胞のTGF- β 1に依存した増殖に及ぼすアスポリンの効果を示す (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。縦軸はOD550 nmを示し、横軸上段の数字はTGF- β 1の添加濃度 (ng/ml)、下段の数字はアスポリンの添加濃度 ($\mu\text{g/ml}$) をそれぞれ示す。

- 25 図52は、自然発症OA病態モルモットモデルにおける関節軟骨でのアスポリン遺伝子発現の加齢変化を示す (*: $p < 0.05$ (Welch' s test))。縦軸は、GAPDH遺伝子で補正したアスポリン遺伝子発現量 ($\times 10^{-2}$) を示し、横軸は月齢を示す。

図53は、自然発症OA病態モルモットモデルにおける血清中アスポリン濃度の加齢変化を示す (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Dunnett' s test))。縦軸は血清中

アスポリン濃度 (ng/ml) を示し、横軸は月齢を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質（以下、「カルモジュリン」または「CaM」と称する場合がある）は、ヒトもしくは他の温血動物（例えば、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ニワトリなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など〕またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織もしくは器官〔例えば、脳、脳の各部位（例：嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例：大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織（例：褐色脂肪組織、白色脂肪組織）、骨格筋など〕に由来するタンパク質であってもよく、また、後述のように、化学的に、もしくは無細胞タンパク質合成系を用いて生化学的に合成されたタンパク質であってもよい。あるいは、上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってもよい。

配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、

最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列を含むタンパク質が配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するような配列をいう。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸（Phe, Trp, Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala, Leu, Ile, Val）、極性アミノ酸（Gln, Asn）、塩基性アミノ酸（Lys, Arg, His）、酸性アミノ酸（Glu, Asp）、水酸基を含むアミノ酸（Ser, Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly, Ala, Ser, Thr, Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている（例えば、Bowie et al., *Science*, 247: 1306-1310 (1990) を参照）。

アミノ酸配列の相同性を決定するためのアルゴリズムとしては、例えば、Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))], Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48:444-453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている], Myers and Miller, *CABIOS*, 4: 11-17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれている], Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988) に記

載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられるが、それらに限定されない。

実質的に同質の活性としては、例えば、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化促進活性、具体的には、軟骨細胞の分化マーカー [例: II型コラーゲン遺伝子 (Col2a1), アグリカン遺伝子 (Agc1) 等] の発現増強活性などが挙げられる。

「実質的に同質」とは、それらの性質が定性的に (例: 生理学的に、または薬理学的に) 同質であることを意味する。したがって、上記の活性の程度といった量的要素については同等であることが好ましいが、異なってもよい (例えば、約0.01~約100倍、好ましくは約0.1~約10倍、より好ましくは約0.5~約2倍)。

カルモジュリン (CaM) の活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができる。例えば、後記実施例において詳述するように、軟骨細胞分化モデルにおける上記マーカー遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。

また、本発明で用いられるカルモジュリンとしては、例えば、(1) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上 (好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上 (好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上 (好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上 (好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含むタンパク質であって、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質も含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、

欠失または置換の位置は、当該タンパク質の活性を損なわない限り、特に限定されない。

本明細書においてアミノ酸配列により特定されるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるカルモジュリンは、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例：メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH, -SH, アミノ基, イミダゾール基, インドール基, グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基, アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるヒトカルモジュリン（GenBank登録番号：NP_008819）などがあげられる。

- 本発明で用いられるカルモジュリンの部分ペプチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記した本発明で用いられるカルモジュリンと実質的に同質の活性を有するものであればいずれのものでもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同義である。また、「実質的に同質の活性」の測定は、上記と同様にして行うことができる。
- 10 具体的には、該部分ペプチドとしては、本発明で用いられるカルモジュリンの構成アミノ酸配列のうち少なくとも50個以上、好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列からなるペプチドなどが用いられる。また、本発明で用いられるカルモジュリンの部分ペプチドは、(1) そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のア
- 15 ミノ酸が欠失し、または、(2) そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加し、または、(3) そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が挿入され、または、(4) そのアミノ酸配列中の1または2個以上
- 20 （好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよく、あるいは(5) それらが組み合わされていてもよい。

- 本発明で用いられるカルモジュリンの部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、アミド ($-\text{CONH}_2$) またはエステル ($-\text{COOR}$) の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、カルモジュ
- 25 リンについて上記したと同様のものが挙げられる。また、該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、該カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられる

カルモジュリンの部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、C末端のエステルと同様のものが例示される。さらに、該部分ペプチドには、カルモジュリンの場合と同様に、N末端のアミノ酸残基（例：メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられるカルモジュリンまたはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例：無機酸，有機酸）や塩基（例：アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸，リン酸，臭化水素酸，硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸，ギ酸，プロピオン酸，フマル酸，マレイン酸，コハク酸，酒石酸，クエン酸，リンゴ酸，蔞酸，安息香酸，メタンスルホン酸，ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるカルモジュリンまたはその塩は、前述したヒトや他の温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって調製することができる。具体的には、該動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるカルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、「カルモジュリン類」と包括的に略記する場合がある）は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法，液相合成法のいずれであってもよい。本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を含む場合は保護基を脱離することにより、目的とするタンパク質を製造することができる。ここで、縮合や保護基の脱離は、自体

公知の方法、例えば、以下の (1) および (2) に記載された方法に従って行われる。

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

5 (2) Schroeder and Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)

本発明のカルモジュリン類の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM
10 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4' -ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4' -ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質等の配列通りに、自体公知の
15 各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC, N, N' -ジイソプロピルカルボジイミド, N-エチル-N' -
20 (3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt, HOOBt) とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、あるいは、対称酸無水物またはHOBtエステルもしくは
25 はHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に、樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質

縮合反応に使用しうるということが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、
N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン
などの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、
トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスル
5 ホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、
アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチ
ルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度
はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択
され、通常、約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸
10 誘導体は、通常、1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテス
トの結果、縮合が不十分な場合には、保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰
り返すことにより、十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な
縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反
応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにす
15 ることができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、並びにその保護基
の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは、公知の基または公知の手段から
適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z, Boc, t-ペンチルオキシカル
20 ボニル, イソボルニルオキシカルボニル, 4-メトキシベンジルオキシカルボニ
ル, Cl-Z, Br-Z, アダマンチルオキシカルボニル, トリフルオロアセチル, フ
タロイル, ホルミル, 2-ニトロフェニルスルフェニル, ジフェニルホスフィノ
チオイル, Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル, エチル,
25 プロピル, ブチル, t-ブチル, シクロペンチル, シクロヘキシル, シクロヘプ
チル, シクロオクチル, 2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状ア
ルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル, 4-ニ

トロベンジルエステル, 4-メトキシベンジルエステル, 4-クロロベンジルエステル, ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- 5 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 (C_{1-6}) アルカノイル基, ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基, エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基, テトラヒ
10 ドロピラニル基, *t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl, Cl_2 -Bzl, 2-ニトロベンジル, Br-Z, *t*-ブチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos, 4-メトキシ-
2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル, DNP, ベンジルオキシメチル, Bum, Boc,
15 Trt, Fmocなどが用いられる。

- 保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素, メタンスルホン酸, トリフルオロメタンスルホン酸, トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン, トリエチルア
20 ミン, ピペリジン, ピペラジンなどによる塩基処理、また、液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール, フェノール, チオアニソール, メタクレゾール, パラクレゾール, ジメチルスルフィド, 1, 4-ブタンジチオール, 1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用
25 いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタ

ンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

10 タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド (タンパク質) 鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分
15 ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画
20 分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合してアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタン
25 パク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられるカルモジュリンの部分ペプチドまたはその塩は、上述もしくは後述のいずれかの方法により得られるカルモジュリンまたはその塩を、適当

なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

このようにして得られた本発明のカルモジュリン類は、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

上記方法で得られるタンパク質または部分ペプチドが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にタンパク質が塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

10 本発明のカルモジュリン類は、カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養してカルモジュリン類を生成せしめ、得られる培養物からカルモジュリン類を分離・精製することによって製造することもできる。

カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸としては、前述した
15 本発明で用いられるカルモジュリンのアミノ酸配列もしくはその部分アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものでもよい。該核酸は、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。
20

カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、ゲノムDNA、ヒトもしくは他の温血動物（例えば、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ニワトリなど）の細胞
[例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、骨髄細胞、メサ
25 ンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩

基球，好酸球，単球），巨核球，滑膜細胞，軟骨細胞，骨細胞，骨芽細胞，破骨細胞，乳腺細胞，肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など] またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織もしくは器官 [例えば、脳，脳の各部位（例：嗅球，扁桃核，大脳基底球，海馬，視床，視床下部，大脳皮質，延髄，小脳），脊髄，下垂体，胃，膵臓，腎臓，肝臓，生殖腺，甲状腺，胆嚢，骨髓，副腎，皮膚，筋肉，肺，消化管（例：大腸，小腸），血管，心臓，胸腺，脾臓，顎下腺，末梢血，前立腺，睾丸，卵巢，胎盤，子宮，骨，関節，脂肪組織（例：褐色脂肪組織，白色脂肪組織），骨格筋など] 由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction（以下、「PCR法」と略称する）およびReverse Transcriptase-PCR（以下、「RT-PCR法」と略称する）によって直接増幅することもできる。あるいは、カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ，プラスミド，コスミド，ファージミドなどいずれであってもよい。

カルモジュリンをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1で表される塩基配列を含むDNA、あるいは配列番号：1で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含み、前記した配列番号：2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性（例えば、軟骨細胞分化促進活性など）を有するタンパク質もしくはペプチドをコードするDNAなどが挙げられる。

配列番号：1で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリ

ダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：1で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST
5 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

10 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、*Molecular Cloning*, 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、
15 は、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。

ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約19～約40 mM、好ましくは約19～約20 mMで、温度が約50～約70℃、好ましくは約60～約65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハ
20 イブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

カルモジュリンをコードするDNAは、好ましくは配列番号：1で表される塩基配列を含むヒトCALM1 cDNA (GenBank登録番号：NM_006888) もしくはそのアレ
25 ル変異体または他の温血動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）におけるそのオルソログ (ortholog) 等である。

カルモジュリンの部分ペプチドをコードするDNAは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、上記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。

5 具体的には、該部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

(1) 配列番号：1で表される塩基配列を含むDNAの部分塩基配列、または

(2) 配列番号：1で表される塩基配列を含むDNAとハイトリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、且つ該DNAにコードされるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性（例：軟骨細胞分化促進活性など）を

10 有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

配列番号：1で表される塩基配列を含むDNAとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、該塩基配列中の対応する部分と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

15 カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、該タンパク質またはペプチドをコードする塩基配列の一部分を含む合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、カルモジュリンの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションさせることによってクローニングすること
20 ができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、*Molecular Cloning*, 第2版（前述）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒
25 造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LAPCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA, TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドン
5 や翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

上記のカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該タンパク質またはペプチドを製造することができる。

カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクター
10 は、例えば、カルモジュリンをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例：pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例：pUB110, pTP5, pC194）、酵母由
15 来プラスミド（例：pSH19, pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

20 例えば、宿主が動物細胞である場合、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, HSV-tkプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMV Vプロモーター, SR α プロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター, lacプロモーター, 25 recAプロモーター, λ P_Lプロモーター, lppプロモーター, T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SP01プロモーター, SP02プロモーター,

penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PH05プロモーター、PGKプロモーター、PGKプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

5 宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、*dhfr*と略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、*Amp^r*と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、*Neo^r*と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、*dhfr*遺伝子欠損

10 チャイニーズハムスター細胞を用い、*dhfr*遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

15 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母で

20 ある場合、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

25 エシェリヒア属菌としては、例えば、*Escherichia coli* K12・DH1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 160 (1968)], JM103 [*Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981)], JA221 [*J. Mol. Biol.*, 120: 517 (1978)], HB101 [*J. Mol.*

Biol., 41: 459 (1969)], C600 [*Genetics*, 39: 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、*Bacillus subtilis* MI114 [*Gene*, 24: 255 (1983)], 207-21 [*J. Biochem.*, 95: 87 (1984)] などが用いられる。

- 5 酵母としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12; *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036; *Pichia pastoris* KM71などが用いられる。

- 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞), *Trichoplusia ni*の中腸由来の
10 MG1細胞, *Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five™細胞, *Mamestra brassicae*由来の細胞, *Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711), Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. et al., *In Vivo*, 13: 213-217 (1977)) などが用
15 いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [Maeda et al., *Nature*, 315: 592 (1985)]。

- 動物細胞としては、例えば、サル由来のCOS-7, Vero細胞、チャイニーズハムスター由来のCHO, dhfr遺伝子欠損CHO (CHO (dhfr⁻)) 細胞、マウス由来の
20 L, AtT-20, ミエローマ細胞、ラット由来のGH3細胞、ヒト由来のFL, HEK293, HepG2, HeLa細胞などが用いられる。

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

- エシェリヒア属菌は、例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972) や *Gene*, 17: 107 (1982) などに記載の方法に従って形質転換すること
25 ができる。

バチルス属菌は、例えば、*Mol. Gen. Genet.*, 168: 111 (1979) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、*Meth. Enzymol.*, 194: 182-187 (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929 (1978) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、*Biotechnology (N. Y.)*, 6: 47-55 (1988) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行), *Virology*, 52: 456 (1973) に記載の方法に従って形質転換することができる。

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5~8である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, J. Exp. Mol. Genet., 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15~43℃で、約3~24時間行われる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30～40℃で、約6～24時間行われる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、Burkholder最小培地 [Bostian, K.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～8である。培養は、通常約20℃～35℃で、約24～72時間行われる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium [Grace, T.C.C., *Nature*, 195: 788 (1962)] に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～6.4である。培養は、通常約27℃で、約3～5日間行われる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含むMEM培地 [*Science*, 122: 501 (1952)], DMEM培地 [*Virology*, 8: 396 (1959)], RPMI1640培地 [*J. Am. Med. Assoc.*, 199: 519 (1967)], 199培地 [*Proc. Soc. Biol. Med.*, 73: 1 (1950)] などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～8である。培養は、通常約30℃～40℃で、約15～60時間行われる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にカルモジュリン類を生成させることができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から、カルモジュリン類を自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、カルモジュリン類を培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性タンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いら

れる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100™などの界面活性剤を含んでいてもよい。

このようにして得られた可溶性画分中に含まれるカルモジュリン類の単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析
5 や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法
10 などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

かくして得られるカルモジュリンまたはその部分ペプチドが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該タンパク質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体
15 公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生するカルモジュリン類を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。
20

かくして得られるカルモジュリン類の存在は、特異的な抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

さらに、カルモジュリンまたはその部分ペプチドは、それをコードする DNA に
25 対応する RNA を鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞タンパク質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらに RNA ポリメ

- ラーゼを含む無細胞転写/翻訳系を用いて、カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞タンパク質(転写/) 翻訳系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には、大腸菌抽出液はPratt J.M. et al., “Transcription and
- 5 Tranlation”, Hames B.D. and Higgins S.J. eds., IRL Press, Oxford 179-209 (1984) に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の細胞ライセートとしては、大腸菌由来のものはE. coli S30 extract system (Promega社製) やRTS 500 Rapid Tranlation System (Roche社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製) 等、
- 10 さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO社製) 等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。コムギ胚芽ライセートの作製法としては、例えばJohnston F.B. et al., *Nature*, 179: 160-161 (1957) あるいはErickson A.H. et al., *Meth. Enzymol.*, 96: 38-50 (1996) 等に記載の方法を用いることができる。
- 15 タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 [Pratt, J.M. et al. (1984) 前述] や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム [Spirin A.S. et al., *Science*, 242: 1162-1164 (1988)]、透析法 (Kigawa et al., 第21回日本分子生物学会, WID6)、あるいは重層法 (PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein
- 20 synthesis core kit取扱説明書: TOYOBO社製) 等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特開2000-333673) 等を用いることができる。

- 「配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部」、あるいは「該
- 25 塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部」を含む核酸とは、前述のカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸だけではなく、コドンの読み枠の合わない部分塩基配列をも含む意味で用いられる。該核酸はDNAであっても

RNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

5 目的核酸の標的領域と相補的な塩基配列を含む核酸、即ち、目的核酸とハイブリダイズすることができる核酸は、該目的核酸に対して「アンチセンス」である
10 ということができる。一方、目的核酸の標的領域と相同性を有する塩基配列を含む核酸は、該目的核酸に対して「センス」であるということができる。ここで
「相同性を有する」または「相補的である」とは、塩基配列間で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性または相補性を有することをいう。

カルモジュリンをコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸（以下、「アンチセンスCALM1」ともいう）は、クローン化した、あるいは決定されたカルモジュリンをコードする核酸の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした核酸は、カルモジュリンをコードする遺伝子の複製または
15 発現を阻害することができる。即ち、アンチセンスCALM1は、カルモジュリンをコードする遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（タンパク質への翻訳）を阻害することができる。

アンチセンスCALM1の標的領域は、アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてカルモジュリンタンパク質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、該タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定され
25 ない。具体的には、例えば、カルモジュリンをコードする核酸の5' 端へアピ
ンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、翻訳開始コドン、
タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドロ

ーム領域および3' 端ヘアピンループが標的領域として選択しうるが、カルモジュリンをコードする遺伝子内の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。

さらに、アンチセンスCALM1は、カルモジュリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるカルモジュリンをコードする遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を含むその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含むその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含む）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、ア

- ルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含むのみでなく、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。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた、糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 好ましくは、アンチセンス核酸は、修飾されていてもよいRNAまたはDNAである。修飾された核酸（RNA, DNA）の具体例としては、核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンスCALM1は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、標的とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そして、もし毒性があるなら、アンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば、J. Kawakami et al., *Pharm Tech Japan*, Vol. 8, 247 (1992), 同 Vol. 8, 395 (1992); S.T. Crooke et al. ed., *Antisense Research and Applications*, CRC Press (1993) などに開示されている。

アンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していてもよく、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、遺伝子治療において適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレ

ステロールなど) といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂
質としては、コレステロールやその誘導体 (例えば、コレステリルクロホル
メート, コール酸など) が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは
5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付
5 着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に
特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌク
レアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の
基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコ
ールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに
10 限定されるものではない。

カルモジュリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内
部 (初期転写産物の場合はイントロン部分を含む) で特異的に切断し得るリボ
ザイムもまた、アンチセンスCALM1に包含され得る。「リボザイム」とは核酸を
切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列
15 を含むオリゴDNAも、同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているの
で、本明細書では、配列特異的な核酸切断活性を有する限り、DNAをも包含する
概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、
ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNA
があり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は
20 約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する
両端の数塩基ずつ (合わせて約10塩基程度) をmRNAの所望の切断部位と相補的
な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。
このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃する
ことがないというさらなる利点を有する。カルモジュリンmRNAが自身で二本鎖
25 構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来の
RNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列
を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-

5577 (2001)]]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

- 5 カルモジュリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な塩基配列を含む二本鎖オリゴRNA (siRNA) もまた、アンチセンスCALM1に包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAの一方の鎖に相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉 (RNAi) と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物
10 等で知られていたが、この現象が哺乳動物細胞でも起こることが確認されて以来 [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として広く利用されている。

- 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムは、カルモジュリンをコードするcDNA配列もしくはゲノムDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的領域を決定し、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。RNAi活性を有するsiRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約
15 1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

- アンチセンスCALM1の遺伝子発現阻害活性は、カルモジュリンをコードする核
25 酸を含む形質転換体、生体内や生体外のカルモジュリンをコードする遺伝子発現系またはカルモジュリンの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

本発明はまた、カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対す

る抗体（以下、「抗CaM抗体」と略記する場合がある）を提供する。抗CaM抗体は、カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対して特異的親和性を有するものであれば、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。該抗体は、カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（カルモジュリン類）を、哺乳動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

例えば、抗原で免疫された哺乳動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化カルモジュリンと抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法 [Nature, 256: 495 (1975)] に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくは PEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1などの哺乳動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞

胞（脾細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は、1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- 5 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例：マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する
- 10 方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したカルモジュリンを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などにより、スクリーニングすることができる。

- モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行
- 15 うことができる。モノクローナル抗体の選別は、通常HAT（ヒポキサンチン，アミノプテリン，チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。モノクローナル抗体の選別および育種用培地は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。このような培地としては、例えば、1～20%、好ましくは10～20%の胎仔ウシ血清を含むRPMI1640培地、1～10%の胎仔ウ
- 20 シ血清を含むGIT培地（和光純薬工業(株)）あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101，日水製薬(株)）などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測
- 25 定できる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例：塩析法，アルコール沈殿法，等電点沈殿法，

電気泳動法、イオン交換体（例：DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法」に従って分離精製することができる。

5 [ポリクローナル抗体の作製]

カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するポリクローナル抗体は、自体公知の方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（カルモジュリン類）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作製し、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様にして温血動物に免疫を行い、

- 10 該免疫動物から抗CaM抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

- 15 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

- 20 また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤、例えばグルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含む活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。

- 25 ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水、母乳など、鳥類の場合は血液、卵などから採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と

同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

カルモジュリンの部分ペプチドまたはその塩を抗原として用いる場合、そのカルモジュリン上の位置は特に限定されないが、例えば、各種温血動物間でよく保存された領域の部分アミノ酸配列を含むポリペプチドもしくはオリゴペプチドまたはその塩が挙げられる。

上記した(i) カルモジュリン類、(ii) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸（好ましくは、DNA）、(iii) 抗CaM抗体、(iv) アンチセンスCALM1は、例えば以下の用途を有する。

後記実施例において示される通り、カルモジュリンをコードするCALM1遺伝子の変形性関節症（OA）軟骨で発現が上昇し、また、軟骨細胞分化モデルであるATDC5細胞の軟骨細胞への分化（分化マーカー遺伝子の発現）はカルモジュリン阻害剤の存在下で抑制される。これらの事実は、カルモジュリンの発現または活性を調節（促進または阻害）し得る物質が、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常が関連する疾患の予防・治療に有効であることを示すものである。ここで「関連する疾患」とは、それに起因するか、あるいは結果としてそのような状態を生じる疾患をいう。

(1) 軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患の予防・治療剤

上記のように、カルモジュリンは軟骨基質遺伝子の発現を増加させ、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を促進する機能を有するので、生体内においてカルモジュリンまたはそれをコードする核酸（例：遺伝子、mRNA等）に異常があったり、これを欠損している場合、あるいはその発現量が異常に減少している場合、さらには、他の何らかの要因で軟骨基質の変性・消失が起こり、またその産生能が低下している場合、あるいは軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化が抑制されている場合に、a) カルモジュリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（カル

モジュリン類)を患者に投与してカルモジュリンの量を補充したり、b) (i) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを患者に投与して標的細胞内で発現させることによって、あるいは(ii) 単離した標的細胞にカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるカルモジュリンの量を増加させ、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を誘導し、軟骨基質の変性や消失を基盤とする疾患を予防・治療することができる。

したがって、a) カルモジュリン類、または b) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を、上記のような疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患 (例: 軟骨無形成症, 多発性骨端異形成症, 脊椎骨端異形成症, 骨幹端異形成症, Stickler症候群, 偽性軟骨無形成症等)] など、好ましくは変形関節症 (例: 股関節OA, 膝関節OA) の予防・治療剤として使用することができる。

カルモジュリン類を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を上記予防・治療剤として使用する場合は、該核酸を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイド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ができる。

例えば、a) カルモジュリン類、あるいはb) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ

以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) カルモジュリン類、あるいはb) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を、生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに、

5 一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無

10 菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。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（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アル

15 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）、非イオン性界面活性剤（例：ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

25 また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールな

ど)、保存剤 (例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物 (例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブ
5 タ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど) に対して投与
することができる。

カルモジュリン類の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、変形性関節症患者 (60 kg
として) においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50mg、よ
10 り好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量
は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤
の形では、通常、例えば変形性関節症患者 (60 kgとして) においては、一日に
つき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1
~10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに
15 換算した量を投与することができる。

カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸の投与量は、投与対
象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般
的に、例えば変形性関節症患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1
~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非
20 経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方
法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症
患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは
約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を投与するのが好都合で
ある。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

25 (2) 軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患の予防・治
療剤

上記のように、カルモジュリンは軟骨基質遺伝子の発現を増加させ、軟骨前駆

細胞から軟骨細胞への分化を促進する機能を有するので、生体内においてカルモジュリンまたはそれをコードする核酸（例：遺伝子， mRNA等）に異常がある（高活性変異体の出現）場合、あるいはその発現量が異常に増加している場合、さらには他の何らかの要因で軟骨の過形成が起こり、また軟骨基質の産生能が異常亢進している場合、あるいは軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化が異常亢進している場合に、a) 抗CaM抗体を患者に投与してカルモジュリンを不活性化（中和）したり、b) (i) アンチセンスCALM1を患者に投与して標的細胞内に導入する（および発現させる）ことによって、あるいは(ii) 単離した標的細胞にアンチセンスCALM1を導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるカルモジュリンの量を減少させ、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を抑制し、軟骨基質の過剰などを基盤とする疾患を予防・治療することができる。

したがって、a) 抗CaM抗体、または b) アンチセンスCALM1を、上記のような疾患、例えば先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫， 片側肥大， オリエール病， マフッチ症候群など）]，骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患の予防・治療剤として用いることができる。

抗CaM抗体を上記予防・治療剤として使用する場合、前記したカルモジュリン類を含有する医薬と同様にして製剤化することができる。また、アンチセンスCALM1を上記予防・治療剤として使用する場合、前記したカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含有する医薬と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット， マウス， ハムスター， ウサギ， ヒツジ， ヤギ， ブタ， ウシ， ウマ， ネコ， イヌ， サル， チンパンジー， トリなど）に対して投与することができる。

抗CaM抗体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）に

おいては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01~30
5 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

アンチセンスCALM1の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgと
10 して）においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg
15 程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(3) 骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング

上記のように、カルモジュリンの活性を調節（促進または阻害）し得る物質は、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常が関連する疾患の予防・治療に有効である。従って、本発明は、
20 カルモジュリン類を用いてその活性の変動を測定することによる、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

(a) 軟骨細胞分化マーカーである軟骨基質（例：II型コラーゲン、アグリカン
25 等）を産生する能力を有する細胞を、カルモジュリン類の存在下、またはカルモジュリン類および被験物質の存在下に培養し、両条件下におけるカルモジュリン類の活性を比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスク

リーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、カルモジュリン類は、前述のいずれかの方法により単離・精製されたものを添加してもよいし、あるいは、軟骨基質を産生する能力を有する細胞が、カルモジュリン類を産生する能力を同時に有していてもよい。カルモジュリンまたはその塩および軟骨基質を産生する能力を有する細胞としては、生来それらを発現しているヒトもしくは他の温血動物細胞またはそれを含む生体試料（例：関節液、関節軟骨等）であれば特に制限はないが、物理的または化学的刺激に応じてカルモジュリンの発現および/または活性化が誘導されるものが好ましく、例えば、ATDC5細胞等が挙げられるが、これに限定されない。非ヒト動物由来の細胞、組織等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。上記の遺伝子工学的手法により、軟骨基質遺伝子を産生する能力を有する細胞にカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を導入して得られる各種の形質転換体を用いることもできる。

被験物質としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

カルモジュリン類の活性の測定は、軟骨細胞分化マーカーである軟骨基質遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。例えば、一定期間（例えば、5～25日程度）培養した細胞から常法により総RNAを抽出して、定量的RT-PCRやノーザンハイブリダイゼーションにより軟骨基質遺伝子〔例：II型コラーゲン遺伝子（Col2a1）、アグリカン遺伝子（Agc1）等〕の発現量を定量する。あるいは、細胞から総タンパク質を抽出し、後述のカルモジュリン類の定量と同様の方法により、抗II型コラーゲン抗体、抗アグリカン抗体等を用いてこれらの軟骨基質を定量することによっても行うことができる。

上記（a）のスクリーニング法において、Col2a1やAgc1等の軟骨基質遺伝子の発現を増大させた被験物質を「カルモジュリン活性促進物質」、それらの発現を

- 低下させた被験物質を「カルモジュリン活性阻害物質」としてそれぞれ選択することができる。カルモジュリン活性促進物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患〔例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，
- 5 先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等））など]、好ましくは変形関節症（例：股関節OA，膝関節OA）の予防・治療剤として使用することができる。
- 10 一方、カルモジュリン活性阻害物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患〔例えば、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフツチ症候群等）），骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍など〕の予防・治療剤として用いることができる。
- 15 カルモジュリン活性促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したカルモジュリン類と同様にして製剤化することができる。
- このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット，マウス，ハムスター，ウサギ，ヒツジ，ヤギ，ブタ，ウシ，ウマ，ネコ，イヌ，サル，チンパンジー，トリなど）に対して投与すること
- 20 ができる。
- カルモジュリン活性促進物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その
- 25 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好まし

くは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

カルモジュリン活性阻害物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者
5 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約
10 0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

上述のように、カルモジュリンの発現を調節 (促進または阻害) する物質もまた、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常に関連する疾患の予防・治療に有効である。従って、本発明は、
15 カルモジュリン類を産生する能力を有する細胞におけるカルモジュリン類の発現を、被験物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

カルモジュリンの発現量は、カルモジュリンをコードする核酸とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸 (即ち、前記したカルモジュリンをコードする塩基配列またはその一部を含む核酸 (以下、「センスCALM1」ともいう) またはカルモジュリンをコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部 (アンチセンスCALM1)) を用いてそのmRNAを検出することにより、転写レベルで測定することもできる。あるいは、該発現量は、前記した抗CaM抗体を用いてタンパク質 (ペプチド) を検出することにより、翻訳レベルで測定
25 することもできる。

従って、より具体的には、本発明は、

(b) カルモジュリン類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および

非存在下に培養し、両条件下におけるカルモジュリン類をコードするmRNAの量を、センスもしくはアンチセンスCALM1を用いて測定、比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、および

- (c) カルモジュリン類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および
- 5 非存在下に培養し、両条件下におけるカルモジュリン類のタンパク質（ペプチド）量を、抗CaM抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

- 上記（b）および（c）のスクリーニング方法において、カルモジュリン類を産生する能力を有する細胞としては、上記（a）のスクリーニング方法において
- 10 用いられるのと同様のものが好ましく用いられる。

例えば、カルモジュリン類のmRNA量またはタンパク質（ペプチド）量の測定は、具体的には以下のようにして行うことができる。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリなど）に対して、薬剤ある
- 15 いは物理的刺激などを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的刺激と同時に被験物質を投与し、投与から一定時間が経過した後、関節液、関節軟骨などを採取する。得られた生体試料に含まれる細胞
- 20 において発現したCALM1のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、RT-PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、カルモジュリンタンパク質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種イムノアッセイ法を用いて定量することができる。
- 25 (ii) カルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を導入した形質転換体を上記の方法に従って作製し、該形質転換体を常法に従って培養する際に被験物質を培地中に添加し、一定時間培養後、該形質転換体に含まれるカルモジ

ユリン類のmRNA量またはタンパク質（ペプチド）量を定量、解析することにより行うことができる。

被験物質としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、

5 公知の物質であってもよい。

上記（c）のスクリーニング方法におけるカルモジュリン類の量の測定は、具体的には、例えば、

（i）抗CaM抗体と、試料液および標識化されたカルモジュリン類とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたカルモジュリン類を検出することにより
10 試料液中のカルモジュリン類を定量する方法や、

（ii）試料液と、担体上に不溶化した抗CaM抗体および標識化された別の抗CaM抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量（活性）を測定することにより、試料液中のカルモジュリン類を定量する方法等が挙げられる。

15 上記（ii）の定量法においては、2種の抗体はカルモジュリン類の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体がカルモジュリン類のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体としてカルモジュリン類のC端部と反応するものを用いることができる。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、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、
20 例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、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
25 レッセンイソチオシアネートなどが用いられる。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、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-（ストレプト）アビジン

系を用いることもできる。

試料液としては、カルモジュリン類が細胞内に局在する場合は、細胞を適当な緩衝液に懸濁した後、超音波処理または凍結融解などによって細胞を破壊して得られる細胞破碎液が、カルモジュリン類が細胞外に分泌される場合には、細胞培養上清がそれぞれ用いられる。必要に応じて、破碎液や培養上清からカルモジュリン類を分離・精製した後に定量を行ってもよい。また、標識剤の検出が可能である限り、無傷細胞を試料として用いてもよい。

抗CaM抗体を用いるカルモジュリン類の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化・固定化するのに用いられる化学結合を用いてもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコーン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した抗CaM抗体に試料液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の抗CaM抗体を反応させた（2次反応）後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中のカルモジュリン類を定量することができる。1次反応と2次反応は、逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は、前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相化抗体あるいは標識化抗体に用いられる抗体は、必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の

混合物を用いてもよい。

抗CaM抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどにも用いることができる。

競合法では、試料液中のカルモジュリン類と標識したカルモジュリン類とを抗体
5 体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原 (F) と、抗体と結合した
標識抗原 (B) とを分離し (B/F分離)、B, Fいずれかの標識量を測定することによ
り、試料液中のカルモジュリン類を定量する。本反応法には、抗体として可溶
性抗体を用い、ポリエチレングリコールや前記抗体 (1次抗体) に対する2次抗
10 体などを用いてB/F分離を行う液相法、および、1次抗体として固相化抗体を用
いるか (直接法)、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相
化抗体を用いる固相化法 (間接法) とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中のカルモジュリン類と固相化したカルモジ
ュリン類とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離
するか、あるいは試料液中のカルモジュリン類と過剰量の標識化抗体とを反応さ
15 せ、次に固相化したカルモジュリン類を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合
させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し、試料
液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じ
た不溶性の沈降物の量を測定する。試料液中のカルモジュリン類の量がわずかで
20 あり、少量の沈降物しか得られない場合にも、レーザーの散乱を利用するレーザ
ーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特
別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常
の条件、操作法に、当業者の通常の技術的配慮を加えて、カルモジュリン類の測定系を構
25 築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを
参照することができる。

例えば、*Meth. Enzymol.*, Vol. 70: (Immunochemical Techniques (Part

A)), 同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), 同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), 同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), 同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、Academic Press発行)などを参照することができる。

以上のようにして、抗CaM抗体を用いることによって、細胞におけるカルモジュリン類の生産量を感度よく定量することができる。

10 上記 (b) および (c) のスクリーニング法において、カルモジュリン類の発現量 (mRNA量またはタンパク質 (ペプチド) 量) を増加させた物質をカルモジュリン発現促進物質、発現量を減少させた物質をカルモジュリン発現阻害物質としてそれぞれ選択することができる。カルモジュリン発現促進物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下に関連する疾患 [例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患 (例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患 (例: 軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等)) など]、好ましくは変形関節症 (例: 股関節OA、膝関節

15 粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患 (例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患 (例: 軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等)) など]、好ましくは変形関節症 (例: 股関節OA、膝関節

20 OA) の予防・治療剤として使用することができる。

一方、カルモジュリン発現阻害物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進に関連する疾患 [例えば、先天性骨系統疾患 (例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患 (例: 多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等)), 骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍など] の予防・治療剤として用いる

25 ことができる。

カルモジュリン発現促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したカルモジュリン類の場合と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

- 5 カルモジュリン発現促進物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その
- 10 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg

- カルモジュリン発現阻害物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法
- 15 法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、
- 20 一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当

(4) 遺伝子診断剤

- カルモジュリンをコードする塩基配列またはその一部を含む核酸（以下、
- 25 「センスCALM1」ともいう）、あるいは該塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸（アンチセンスCALM1）は、プローブ等として使用することにより、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサ

ギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）におけるカルモジュリンをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAの損傷もしくは突然変異やmRNAのスプライシング異常あるいは発現低下、あるいは該DNAの増幅やmRNAの発現上昇などの遺伝子診断剤として有用である。カルモジュリンをコードする塩基配列の一部を含む核酸は、プローブとして必要な長さ（例えば、約15塩基以上）を有する限り特に制限されず、また、カルモジュリンの部分ペプチドをコードしている必要もない。

センスもしくはアンチセンスCALM1を用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、PCR-SSCP法、アレ

10 ル特異的PCR、PCR-SSOP法、DGGE法、RNaseプロテクション法、PCR-RFLP法などにより実施することができる。

上記のように、カルモジュリンは軟骨基質遺伝子の発現を増加させ、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を促進する機能を有するので、軟骨基質の変性・消

15 失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患に対して抑制的に作用する。そのため、そのような疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患するリスクが高い状態にあれば、CALM1遺伝子の発現が正常な状態に比して上昇していると考えられる。従って、例えば、被験温血動物の細胞から抽出したRNA画分についてのノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRの結果、CALM1遺伝子の発現上

20 昇が検出された場合は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患[例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨

25 幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）]などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

一方、ノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRによりCALM1遺伝子の

発現低下が検出された場合は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）〕，骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

前記した抗CaM抗体は、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット，マウス，ハムスター，ウサギ，ヒツジ，ヤギ，ブタ，ウシ，ウマ，ネコ，イヌ，サル，チンパンジー，トリなど）におけるカルモジュリンまたはその塩の量を測定することができるので、例えば、該タンパク質の発現低下または発現上昇などの遺伝子診断剤として有用である。

抗CaM抗体を用いる上記の遺伝子診断は、前記した抗CaM抗体を用いるカルモジュリン発現調節（促進もしくは阻害）物質のスクリーニング方法（(c)のスクリーニング方法）において、カルモジュリン類を産生する能力を有する細胞として、被験温血動物から採取した生体試料（例：関節液，生検など）を用いてイムノアッセイを実施することにより行うことができる。

イムノアッセイの結果、該試料中のカルモジュリンまたはその塩の増加が検出された場合は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等）〕などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

一方、イムノアッセイの結果、該試料中のカルモジュリンまたはその塩の減少が検出された場合は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）〕，骨軟

骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

後記実施例により示される通り、カルモジュリンをコードするCALM1遺伝子の転写開始点とTATA配列との間（転写開始点の上流16番目の塩基；配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基に相当する）にSNP（C>T）の存在が新たに見出され、このうちTアレルは、股関節OA患者群で頻度の高いOA感受性アレルである。CALM1遺伝子には14個のSNPがJSNPデータベースに既に登録されているが、これらのうちマイナーアレル頻度が10%以上の11個のSNPを用いてハプロタイプ構造を推定した結果、3つのコモンハプロタイプ（全ハプロタイプ頻度の約90%を網羅する）が同定され（図2b参照）、ハプロタイプBのみが股関節OAと相関を示した。ハプロタイプBは股関節OAと高い相関を示す3つのSNP（図2b；SNP ID：CALM1_1，CALM1_5，CALM1_9；配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号1576，2445および6641にそれぞれ相当する）を含むが、本発明者らが見出した新規SNP（-16C>Tと記述する場合がある）のTアレル（-16T）はこれらのSNPと完全連鎖の状態にあり、-16TもまたハプロタイプBに含まれることが明らかとなった。

従って、本発明はまた、

- (1) 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）を含む該塩基配列の部分配列であって約15塩基以上の連続した塩基配列を含む核酸、および
- (2) 配列番号：5で表される塩基配列において、塩基番号85，1576，2445および6641で示される塩基が、それぞれチミン，シトシン，グアニンおよびチミンであるハプロタイプの塩基配列を含む核酸を提供する。

これらの核酸は、後述する骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法において、該疾患感受性多型（ハプロタイプ）を検出するためのプローブ等として用いることができる。上記（1）の核酸は、好ましくは約500塩基以下、より好ましくは200塩基以下の連続した塩基配列を含むものであり、そのような核酸は、

配列番号：5で表される塩基配列情報に基づいて、DNA/RNA自動合成機を用いて合成することができる。また、上記（2）の核酸は、当該ハプロタイプ構造を有するCALM1遺伝子を保有する動物（好ましくはヒト）の細胞・組織から単離したゲノムDNAより、配列番号：5で表される塩基配列の全部または一部を含む核酸

5 をプローブ等として用いることにより単離することができる。

後記実施例において示される通り、本発明の新規SNP（-16C>T）はCALM1遺伝子の転写活性に影響を及ぼし、Tアレル（-16T）では転写活性が低下している。従って、上記したカルモジュリンの機能を考慮すると、Tアレルは変形性関節症だけでなく、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）〕などの疾患に対しても感受性を示すこ

10 とが示唆される。一方、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等）〕、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍などの疾患に対しては保護的であり得る。

したがって、本発明はまた、配列番号：5で表される塩基配列において、塩基

20 番号85、1576、2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上の塩基における多型を検出することを含む、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法を提供する。塩基番号1576、2445および6641で示される塩基は、塩基番号85で示される本発明の新規SNPと完全連鎖の状態にあるので、これらの塩基のいずれかにおける多型を検出することにより、骨・関節疾患感受性のハプロ

25 タイプ（上記ハプロタイプB）を保有しているか否かを高確度に判定することが可能である。

上記の各塩基における多型の検出方法としては、公知のSNP検出方法のいず

れも使用することができる。該検出方法としては、例えば、被験動物の細胞から抽出したゲノムDNAを試料とし、上記(1)の核酸をプローブとして用い、例えばWallaceら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 278-282(1983))の方法に従って、ストリンジェンシーを正確にコントロールしながらハイブリダイゼーションを行い、
5 い、プローブと完全相補的な配列のみを検出する方法や、上記(1)の核酸および上記(1)の核酸において塩基番号85で示される塩基がシトシンである核酸の一方を標識し、他方を未標識としたミックスプローブを用い、変性温度から徐々に反応温度を低下させながらハイブリダイゼーションを行い、一方のプローブと完全相補的な配列を先にハイブリダイズさせ、ミスマッチを含むプローブとの交
10 差反応を防ぐ方法などが挙げられる。

また、多型の検出は、例えば、特開2004-000115に記載された種々の方法、例えば、RFLP法、PCR-SSCP法、ASOハイブリダイゼーション、ダイレクトシーケンス法、ARMS法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、RNaseA切断法、化学切断法、DOL法、TaqMan PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、モレキュ
15 ー・ビーコン法、ダイナミック・アレルスペシフィック・ハイブリダイゼーション法、パドロック・プローブ法、UCAN法、DNAチップまたはDNAマイクロアレイを用いた核酸ハイブリダイゼーション法、およびECA法などにより実施することができる。

多型を調べた結果、配列番号: 5で表される塩基配列において、
20 塩基番号85で示される塩基がチミン、
塩基番号1576で示される塩基がシトシン、
塩基番号2445で示される塩基がグアニン、または
塩基番号6641で示される塩基がチミンである場合、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関
25 節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨端異形

成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等)] などの疾患に対して感受性であると判定する。2以上の多型を調べた結果、上記3つのコモンハプロタイプに属さないマイナーハプロタイプであると判定された場合には、塩基番号85で示される塩基の結果が優先される。

- 5 後記実施例において示される通り、本発明の新規SNPにおいて、Tアレル (-16T) により選択的に結合する核内因子が存在し、該因子が転写抑制因子として作用していることが示唆される。従って、配列番号: 5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基 (但し、該塩基はチミンである) およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸は、デコイ核酸として機能することにより、
- 10 CALM1遺伝子の転写調節領域への該核内因子の結合を阻害して、CALM1遺伝子の転写活性を増大させることができ、そのため、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節
- 15 症を合併する先天性骨系統疾患 (例: 軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等)] などの疾患の予防・治療剤として用いることができる。

- ここで「隣接する塩基」は、-16Tの5' 上流側および3' 下流側のいずれであってもよく、その両方であってもよい。-16Tおよびそれに隣接する塩基からなる塩基配列は、好ましくは約5～約30塩基、より詳細には-16Tとその5' 上流側0
- 20 ～20塩基および16Tの3' 下流側0～20塩基とからなる全長約5～約30塩基からなる塩基配列である。

- 上記デコイ核酸を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したカルモジュリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸の場合と同様にして製剤化することが
- 25 ことができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物 (例えば、ラット，マウス，ハムスター，ウサギ，ヒツジ，ヤギ，ブ

タ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

上記デコイ核酸の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

上記のように、本発明の新規SNPにおいて、Tアレル（-16T）により選択的に結合する核内因子が存在し、該因子が転写抑制因子として作用していることが示唆されるので、該因子の-16Tおよびその周辺領域への結合を調節（促進もしくは阻害）する物質は、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常が関連する疾患の予防・治療に有効である。

従って、本発明はまた、配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸と、該塩基配列に選択的に結合する転写調節因子とを用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法を提供する。例えば、

- 1) 被験物質の存在下における該核酸と該転写調節因子の結合調節を検出する方法、および
- 2) 該核酸を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む動物細胞における、被験物質の存在下および非存在下での該遺伝子の発現を比較する方法などが挙げられる。

該核酸と該転写調節因子との結合を指標とする場合、例えば、標識（例： ^{32}P 、

ジゴキシゲニン等) した該核酸と該転写調節因子 (例えば、ヒトまたは他の温血動物細胞由来の核抽出液の状態を提供され得る。あるいは、該核酸を用いて該抽出液からアフィニティー精製して用いることもできる) とを被験物質の存在下でインキュベートした後、該反応液を非変性ゲル電気泳動に付し、核酸-転写
5 調節因子複合体に相当するバンドのシグナル強度の増減を検出することにより行うことができる。

被験物質としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

10 該核酸を含むプロモーターの制御下にある遺伝子の発現を指標とする場合、プロモーターとしては、動物細胞内で機能し得るいかなるプロモーターも使用することができ、例えば、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、HSV-tkプロモーターなどが用いられる。本発明のDNAは、自体公知の遺伝子工学的手法を用いて該プロモーター内
15 の適当な位置に挿入することができる。あるいは、-16Tを含むCALM1遺伝子プロモーターを使用してもよい。

該核酸を含むプロモーターの制御下にある遺伝子は、その発現量を容易に測定し得るものであれば特に制限されないが、好ましくはルシフェラーゼ、GFP、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子が挙げられる。また、-16Tを含むCALM1遺伝子をそのまま使用することもできる。この場合、該CALM1遺伝子を生来有する動物 (好ましくはヒト) 由来の細胞もしくは組織を、「該核酸を含むプロモーターの制御下にある遺伝子を含む動物細胞」として使用することができる。該核酸を含むプロモーターの制御下にある遺伝子としてレポーター遺伝子を用いる場合は、該核酸を含む上記プロ
20 モーターの下流にレポーター遺伝子を自体公知の遺伝子工学的手法を用いて連結したものを、適当な導入ベクター、例えば、大腸菌由来のプラスミド (例: pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例: pUB110, pTP5,

pC194)、酵母由来プラスミド (例: pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリ
オファージ等のベクター中に挿入し、宿主動物細胞に導入することができる。該
導入ベクターは、所望により他のエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マー
カー、SV40複製オリジン (以下、SV40oriと略称する場合がある) などを含
5 有していてもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子
[メソトレキセート (MTX) 耐性]、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性
遺伝子 (G418耐性) 等が挙げられる。

動物細胞は、該転写調節因子を発現し得る細胞であれば特に制限はなく、例
えば、Huh-7細胞などを用いることもできるが、これに限定されない。該動物細胞
10 は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール、263-267 (1995年)
(秀潤社発行)、*Virology*, 52: 456 (1973) に記載の方法に従って形質転換する
ことができる。

被験物質としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合
成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げ
15 られる。

被験物質の存在下および非存在下に、適当な培地 (例: 最小必須培地, ダル
ベッコ改変イーグル培地, ハム培地, F12培地, RPMI1640培地, ウイリアムE培
地等) 中で一定時間細胞を培養した後、該核酸を含むプロモーターの制御下に
ある遺伝子の発現を両条件下で比較する。CALM1遺伝子の発現は、上記抗CaM抗
20 体を用いたELISAなどのイムノアッセイ法や、RT-PCR法により検出・定量するこ
とができる。

あるいは、上記の方法に用いられ得る動物細胞を用い、該転写調節因子の細胞
内局在性を、例えば、該動物細胞における該因子の細胞質から核への移行の度合
いを被験物質の存在下および非存在下で比較することによっても、骨・関節疾患
25 の予防・治療物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、例えば、
該転写調節因子に対する蛍光標識した抗体で該細胞を免疫染色することにより、
該因子の細胞質から核への移行をモニタリングすることができる。あるいは、該

転写調節因子をGFPなどの蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現し得る形質転換体を用いることにより、直接的に該因子の細胞質から核への移行をモニタリングすることもできる（例えば、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278: 659-664 (2000) を参照）。

- 5 上記のスクリーニング法において、該核酸と該転写調節因子の結合を阻害した被験物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下が関連する疾患〔例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患
- 10 （例：軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）〕など〕、好ましくは変形関節症（例：股関節OA、膝関節OA）の予防・治療剤として使用することができる。

- 一方、該核酸と該転写調節因子の結合を促進した被験物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能の異常亢進が関連する疾患〔例えば、先天性骨系統疾患
- 15 （例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等））、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍など〕の予防・治療剤として用いることができる。

上記の結合促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したカルモジュリン類の場合と同様にして製剤化することができる。

- 20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

- 上記の結合阻害物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60
- 25 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与

量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たり
5 に換算した量を投与することができる。

上記の結合促進物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は
10 投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

15 本発明で用いられる配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質（以下、「アスポリン」または「ASPN」と称する場合がある）は、ヒトもしくは他の温血動物（例えば、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ニワトリなど）の細胞
20 [例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨
25 細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など] またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織もしくは器官 [例えば、脳、脳の各部位（例：嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視

床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例:大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織(例:褐色脂肪組織、白色脂肪組織)、骨格筋など]

5 に由来するタンパク質であってもよく、また、後述のように、化学的もしくは無細胞タンパク質合成系を用いて生化学的に合成されたタンパク質であってもよい。あるいは、上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってもよい。

配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1~347で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1~347で示されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列を含むタンパク質が、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1~347で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するような配列をいう。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合(%)を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸(Phe, Trp, Tyr)、脂肪族アミノ酸(Ala, Leu, Ile, Val)、極性アミノ酸(Gln, Asn)、塩基性アミノ酸(Lys, Arg, His)、酸性アミノ酸(Glu, Asp)、水酸基を含むアミノ酸(Ser, Thr)、側鎖の小さいアミノ酸(Gly, Ala, Ser, Thr, Met)などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない(即ち、保存的アミノ酸

置換である) ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている (例えば、Bowie et al., *Science*, 247: 1306-1310 (1990) を参照)。

アミノ酸配列の相同性を決定するためのアルゴリズムとしては、例えば、

5 Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))], Needleman et al., *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている], Myers and Miller, *CABIOS*, 4: 11-17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (version 2.0) に組み込まれている], Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられるが、それらに限定されない。

10

実質的に同質の活性としては、例えば、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化抑制活性、具体的には、軟骨細胞の分化マーカー [例: II型コラーゲン遺伝子 (Col2a1), アグリカン遺伝子 (Agc1) 等] の発現阻害活性などが挙げられる。

また、軟骨細胞 (または軟骨前駆細胞) の増殖抑制活性等も好ましい。「実質的に同質」とは、それらの性質が定性的に (例: 生理学的に、または薬理学的に) 同質であることを意味する。したがって、上記の活性の程度といった量的要素については同等であることが好ましいが、異なってもよい (例えば、約0.01~約100倍、好ましくは約0.1~約10倍、より好ましくは約0.5~約2倍)。

20

アスポリン (ASPN) の活性の測定は自体公知の方法に準じて行うことができる。例えば、後記実施例において詳述するように、軟骨細胞分化モデルにおける TGF- β 刺激時の上記マーカー遺伝子の発現量を測定することにより行うことができる。また、後記実施例において詳述するように、ATDC細胞株に対する増殖

25

抑制活性をMTTアッセイ等により測定することによっても行うことができる。

また、本発明で用いられるアスポリンとしては、例えば、(1) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または (5) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含むタンパク質であって、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質も含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、当該タンパク質の活性を損なわない限り、特に限定されない。

本明細書においてアミノ酸配列により特定されるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるアスポリンは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、

- イソプロピル、*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラ
- 5 キル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- 10 さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例：メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH, -SH, アミノ基, イミダゾール基,
- 15 インドール基, グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基, アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

- 本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：4で表
- 20 されるアミノ酸配列を含むヒトアスポリン（GenBank登録番号：AAK35161）の成熟体（アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列を含む）などがあげられる。

- 本発明で用いられるアスポリンの部分ペプチドは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記した
- 25 本発明で用いられるアスポリンと実質的に同質の活性を有するものであれば、いずれのものでもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同義である。また、「実質的に同質の活性」の測定は、上記と同様にして行うことができる。

具体的には、該部分ペプチドとしては、本発明で用いられるアスポリンの構成アミノ酸配列のうち少なくとも100個以上、好ましくは200個以上、より好ましくは300個以上のアミノ酸配列を含むペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられるアスポリンの部分ペプチドは、(1) そのアミノ酸
5 配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失し、または、(2) そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加し、または、(3) そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～50個程度、より好ましくは1～
10 10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が挿入され、または、(4) そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよく、あるいは (5) それらが組み合わされていてもよい。

本発明で用いられるアスポリンの部分ペプチドは、C末端がカルボキシル基
15 (-COOH)、カルボキシレート (-COO⁻)、アミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、アスポリンについて上記したと同様のものが挙げられる。また、該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、該カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるアス
20 ポリンの部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、C末端のエステルと同様のものが例示される。さらに、該部分ペプチドには、アスポリンの場合と同様に、N末端のアミノ酸残基（例：メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基
25 で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられるアスポリンまたはその部分ペプチドの塩としては、生理学

的に許容される酸（例：無機酸，有機酸）や塩基（例：アルカリ金属塩）などの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸，リン酸，臭化水素酸，硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸，ギ酸，プロピオン酸，フマル酸，マ
5 レイン酸，コハク酸，酒石酸，クエン酸，リンゴ酸，蔞酸，安息香酸，メタン
スルホン酸，ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるアスポリンまたはその塩は、前述したヒトや他の温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって調製することができる。具体的には、該動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで
10 抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるアスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、「アスポリン類」と包括的に略記する場合がある）は、公知のペプチド合
15 成法に従って製造することもできる。

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を含む場合は保護基を脱離することにより目的とするタンパク質を製造することができる。ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の
20 方法、例えば、以下の（1）および（2）に記載された方法に従って行われる。

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder and Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)

本発明のアスポリン類の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いる
25 ことができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂，ヒドロキシメチル樹脂，ベンズヒドリルアミン樹脂，アミノメチル樹脂，4-ベンジル
オキシベンジルアルコール樹脂，4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂，PAM樹脂，

- 4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質等の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。
- 10 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC, N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド, N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸
- 15 を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂に添加することができる。
- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、
- 20 N,N-ジメチルホルムアミド, N,N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル, プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル, 酢酸エチル
- 25 ルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘

導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸

5 をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護並びに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

10 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z, Boc, t-ペンチルオキシカルボニル, イソボルニルオキシカルボニル, 4-メトキシベンジルオキシカルボニル, Cl-Z, Br-Z, アダマンチルオキシカルボニル, トリフルオロアセチル, フタロイル, ホルミル, 2-ニトロフェニルスルフェニル, ジフェニルホスフィノチオイル, Fmocなどが用いられる。

15 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル, エチル, プロピル, ブチル, t-ブチル, シクロペンチル, シクロヘキシル, シクロヘプチル, シクロオクチル, 2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル, 4-ニトロベンジルエステル, 4-メトキシベンジルエステル, 4-クロロベンジルエス

20 テル, ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低

25 級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基, エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基, テトラヒ

ドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては例えば、Bzl, Cl₂-Bzl, 2-ニトロベンジル, Br-Z, *t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos, 4-メトキシ-
5 2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル, DNP, ベンジルオキシメチル, Bum, Boc, Trt, Fmocなどが用いられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの
10 混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン, トリエチルアミン, ピペリジン, ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール, フェノール, チオアニソール, メタクレゾール, パラクレゾール, ジメチルスル
15 フィド, 1, 4-ブタンジチオール, 1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は、上記の1, 2-エタンジチオール, 1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外
20 に、希水酸化ナトリウム溶液, 希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (例えば、ペンタクロロフェノール, 2, 4, 5-トリクロロフェノール, 2, 4-ジニトロフェノール, シアノメチルアル
25 コール, パラニトロフェノール, HONB, N-ヒドロキシスクシミド, N-ヒドロキシフタルイミド, HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分
5 ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。こ
10 の粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステル
15 ルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられるアスポリンの部分ペプチドまたはその塩は、上述もしくは後述のいずれかの方法により得られるアスポリンまたはその塩を、適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

20 このようにして得られた本発明のアスポリン類は、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

上記方法で得られるタンパク質または部分ペプチドが遊離体である場合には、
25 該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にタンパク質または部分ペプチドが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換

することができる。

本発明のアスポリン類は、アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養してアスポリン類を生成せしめ、得られる培養物からアスポリン類を分離・精製することによって製造することもできる。

アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸としては、前述した本発明で用いられるアスポリンのアミノ酸配列もしくはその部分アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものでもよい。該核酸は、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

アスポリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、ゲノムDNA、ヒトもしくは他の温血動物（例えば、サル、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ニワトリなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など〕またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織もしくは器官〔例えば、脳、脳の各部位（例：嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例：大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織（例：褐色脂肪組織、白色脂肪組織）、骨格筋など〕由来の

- cDNA、合成DNAなどが挙げられる。アスポリンまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、PCR法およびRT-PCR法によって直接増幅することもできる。あるいは、アスポリンまたはその部分ペ
- 5 プチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはブランクハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。
- 10

- アスポリンをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表される塩基配列中塩基番号115～1155で示される塩基配列を含むDNA、あるいは配列番号：3で表される塩基配列中塩基番号115～1155で示される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：4
- 15 に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性（例えば、軟骨細胞分化阻害活性など）を有するタンパク質もしくはペプチドをコードするDNAなどが挙げられる。

- 配列番号：3で表される塩基配列中塩基番号115～1155で示される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、
- 20 配列番号：3で表される塩基配列中塩基番号115～1155で示される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

- 本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment
- 25 Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。塩基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ

酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、*Molecular Cloning* 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販
5 のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。

ハイストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム塩濃度が約19～約40 mM、好ましくは約19～約20 mMで、温度が約50～約70℃、好ましくは約60
10 ～約65℃の条件等が挙げられる。特に、ナトリウム塩濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

15 アスポリンをコードするDNAは、好ましくは配列番号：3で表される塩基配列を含むヒトアスポリン cDNA (GenBank登録番号：AF316824) もしくはそのアレ変異体または他の温血動物 (例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) におけるそのオルソログ (ortholog) 等である。

20 アスポリンの部分ペプチドをコードするDNAは、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、上記した細胞・組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。

25 具体的には、該部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
(1) 配列番号：3で表される塩基配列中塩基番号115～1155で示される塩基配列を含むDNAの部分塩基配列、または

(2) 配列番号: 3で表される塩基配列中塩基番号115~1155で示される塩基配列を含むDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、且つ該DNAにコードされるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性（例：軟骨細胞分化阻害活性など）を有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

配列番号: 3で表される塩基配列中塩基番号115~1155で示される塩基配列を含むDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる、部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、該塩基配列中の対応する部分塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

アスポリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、該タンパク質またはペプチドをコードする塩基配列の一部分を含む合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、アスポリンの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションさせることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、*Molecular Cloning* 第2版（前述）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造(株)）、MutanTM-K（宝酒造(株)）等を用いて、ODA-LAPCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドン

や翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

上記のアスポリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該タンパク質またはペプチドを製造することができる。

- 5 アスポリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、アスポリンをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- 10 発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例： pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例： pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例： pSH19, pSH15）、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス、 pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neoなどが用いられる。

- 15 プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、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、HSV-tkプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。

- 20 宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

- 25 宿主が酵母である場合、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターな

どが好ましい。

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン (SV40ori) などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、

5 ジヒドロ葉酸還元酵素 (*dhfr*) 遺伝子 [メソトレキセート (MTX) 耐性]、アンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^r*)、ネオマイシン耐性遺伝子 (*Neor^r*, G418耐性) 等が挙げられる。特に、*dhfr*遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、*dhfr*遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

- 10 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル (もしくはプレプロ) 配列をコードする塩基配列を、アスポリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加 [またはネイティブなシグナルコドン (例: 配列番号: 3で表される塩基配列中塩基番号19~60で示される塩基配列) もしくはプレプロコドン (例: 配列番号: 3で表される塩基配列中塩基番号19~114で示される塩基配列) と置換] してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列, OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合、 α -アミラーゼ・シグナル配列, サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合、MF α ・シグナル (プレプロ) 配列, SUC2・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル (プレプロ) 配列, α -インターフェロン・シグナル配列, 抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。
- 20

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌, バチルス属菌, 酵母, 昆虫細胞, 昆虫, 動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌としては、例えば、*Escherichia coli* K12・DH1 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 160 (1968)], JM103 [*Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981)], JA221 [*J. Mol. Biol.*, 120: 517 (1978)], HB101 [*J. Mol. Biol.*, 41: 459 (1969)], C600 [*Genetics*, 39: 440 (1954)] などが用いられ
- 25

る。

バチルス属菌としては、例えば、*Bacillus subtilis* MI114 [*Gene*, 24: 255 (1983)], 207-21 [*J. Biochem.*, 95: 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R⁻, NA87-11A,
5 DKD-5D, 20B-12、*Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036、*Pichia pastoris* KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞、*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. et al., *In Vivo*, 13: 213-217 (1977)) などが用いられる。

15 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [Maeda et al., *Nature*, 315: 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル由来のCOS-7, Vero細胞、チャイニーズハムスター由来のCHO, dhfr遺伝子欠損CHO (CHO (dhfr⁻)) 細胞、マウス由来のL, AtT-20, ミエローマ細胞、ラット由来のGH3細胞、ヒト由来のFL, HEK293,
20 HepG2, HeLa細胞などが用いられる。

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972) や *Gene*, 17: 107 (1982) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

25 バチルス属菌は、例えば、*Mol. Gen. Genet.*, 168: 111 (1979) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、*Meth. Enzymol.*, 194: 182-187 (1991), *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 75: 1929 (1978) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、*Biotechnology (N.Y.)*, 6: 47-55 (1988) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

- 5 動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行), *Virology*, 52: 456 (1973) に記載の方法に従って形質転換することができる。

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

- 10 例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、
15 コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5~8である。

- 20 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, J. Exp. Mol. Genet., 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

- 25 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15~43℃で、約3~24時間行われる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30~40℃で、約6~24

時間行われる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、Burkholder最小培地 [Bostian, K.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G.A. et al.,
5 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～8である。培養は、通常約20℃～35℃で、約24～72時間行われる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium [Grace, T.C.C., *Nature*, 195: 788 (1962)]
10 に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～6.4である。培養は、通常約27℃で、約3～5日間行われる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含むMEM培地 [*Science*, 122: 501 (1952)], DMEM培地
15 [*Virology*, 8: 396 (1959)], RPMI1640培地 [*J. Am. Med. Assoc.*, 199: 519 (1967)], 199培地 [*Proc. Soc. Biol. Med.*, 73: 1 (1950)] などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～8である。培養は、通常約30℃～40℃で、約15～60時間行われる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にアスポリン類を生成さ
20 せることができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から、アスポリン類を自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、アスポリン類を培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心
25 分離やろ過により可溶性タンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-

100TMなどの界面活性剤を含んでいてもよい。

このようにして得られた可溶性画分中に含まれるアスポリン類の単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

かくして得られるアスポリンまたはその部分ペプチドが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該タンパク質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生するアスポリン類を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして得られるアスポリン類の存在は、特異的な抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

さらに、アスポリンまたはその部分ペプチドは、それをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞タンパク質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写/翻訳系を用いて、アスポリンまたはその部分ペプチドをコー

ドするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞タンパク質（転写/）翻訳系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には、大腸菌抽出液は、Pratt J.M. et al., "Transcription and Translation", Hames B.D. and Higgins S.J. eds, IRL Press, Oxford 179-209 (1984) に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の細胞ライセートとしては、大腸菌由来のものはE.coli S30 extract system (Promega社製) やRTS 500 Rapid Translation System (Roche社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製) 等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO社製) 等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。コムギ胚芽ライセートの作製法としては、例えば Johnston F.B. et al., *Nature*, 179: 160-161 (1957) あるいは Erickson A.H. et al., *Meth. Enzymol.*, 96: 38-50 (1996) 等に記載の方法を用いることができる。

タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J.M. et al. (1984) 前述) や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin A.S. et al., *Science*, 242: 1162-1164 (1988))、透析法 (Kigawa et al., 第21回日本分子生物学会, WID6)、あるいは重層法 (PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis core kit取扱説明書: TOYOBO社製) 等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特開2000-333673) 等を用いることができる。

「配列番号: 4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部」、あるいは「該塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部」を含む核酸とは、前述の (成熟) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸だけではなく、プレプロ配列を含む前駆アスポリンポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードする核酸、さらにはコドンの読み枠の合わない部分塩基配列をも含む意味で用いられる。該

核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

- 5 目的核酸の標的領域と相補的な塩基配列を含む核酸、即ち、目的核酸とハイブリダイズすることができる核酸は、該目的核酸に対して「アンチセンス」であるということができる。一方、目的核酸の標的領域と相同性を有する塩基配列を含む核酸は、該目的核酸に対して「センス」であるということができる。ここで
- 10 「相同性を有する」または「相補的である」とは、塩基配列間で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性または相補性を有することをいう。

- アスポリンをコードする塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸（以下、「アンチセンスASPN」ともいう）は、クローン化した、あるいは決定されたアスポリンをコードする核酸の塩基配列情報に基づき設計し、合成しう
- 15 る。そうした核酸は、アスポリンをコードする遺伝子の複製または発現を阻害することができる。即ち、アンチセンスASPNは、アスポリンをコードする遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（タンパク質への翻訳）を阻害することができる。

- アンチセンスASPNの標的領域は、アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてアスポリンタンパク質への翻訳が阻害されるものであれば
- 20 その長さに特に制限はなく、該タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定されない。
- 25 具体的には、例えば、アスポリンをコードする核酸の5' 端へアピンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンδροーム領域、

および3' 端へアピンループが標的領域として選択しうるが、アスポリンをコードする遺伝子内の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。

さらに、アンチセンスASPINは、アスポリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるアスポリンをコードする遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を含むその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含むその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含む）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、ア

- ルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含むのみでなく、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。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた、糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 好ましくは、アンチセンス核酸は、修飾されていてもよいRNAまたはDNAである。修飾された核酸（RNA, DNA）の具体例としては、核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンスASPENは次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、標的とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そして、もし毒性があるなら、アンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば、J. Kawakami et al., *Pharm Tech Japan*, Vol. 8, 247 (1992), 同 Vol. 8, 395 (1992); S.T. Crooke et al. ed., *Antisense Research and Applications*, CRC Press (1993) などに開示されている。

アンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していてもよく、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、遺伝子治療において適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレ

ステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アスポリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内部(初期転写産物の場合はイントロン部分を含む)で特異的に切断し得るリボザイムもまた、アンチセンスASPINに包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では、当該酵素活性部位の塩基配列を含むオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本明細書では、配列特異的な核酸切断活性を有する限り、DNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ(合わせて約10塩基程度)をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。アスポリンmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577

(2001)]]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる[Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

- 5 アスポリンをコードするmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な塩基配列を含む二本鎖オリゴRNA（siRNA）もまた、アンチセンスASPNに包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAの一方の鎖に相補的なmRNAが分解される、
10 いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が哺乳動物細胞でも起こることが確認されて以来[Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として広く利用されている。

- 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムは、アスポリンをコードするcDNA配列もしくはゲノムDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転
15 写産物の標的領域を決定し、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。RNAi活性を有するsiRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～
20 約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

- アンチセンスASPNの遺伝子発現阻害活性は、アスポリンをコードする核酸を
25 含む形質転換体、生体内や生体外のアスポリンをコードする遺伝子発現系またはアスポリンの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

本発明はまた、アスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗

体（以下、「抗ASPIN抗体」と略記する場合がある）を提供する。抗ASPIN抗体は、アスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対して特異的親和性を有するものであれば、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。該抗体は、アスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（アスポリン類）を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

アスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩を、哺乳動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

例えば、抗原で免疫された哺乳動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化アスポリンと抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は、既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法 [Nature, 256: 495 (1975)] に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1などの哺乳動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞

胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は、1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- 5 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例：マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する
- 10 方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したアスポリンを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などにより、スクリーニングすることができる。

- モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行
- 15 うことができる。モノクローナル抗体の選別は、通常HAT（ヒポキサンチン，アミノプテリン，チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。モノクローナル抗体の選別および育種用培地は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。このような培地としては、例えば、1～20%、好ましくは10～20%の胎仔ウシ血清を含むRPMI1640培地、1～10%の胎仔ウ
- 20 シ血清を含むGIT培地（和光純薬工業(株)）あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101，日水製薬(株)）などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして
- 25 測定できる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例：塩析法，アルコール沈殿法，等電点沈殿法，

電気泳動法、イオン交換体（例：DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法] に従って分離精製することができる。

5 [ポリクローナル抗体の作製]

アスポリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対するポリクローナル抗体は、自体公知の方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（アスポリン類）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作製し、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様にして温血動物に免疫を行い、該免疫動物から抗ASPN抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプリングさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤、例えばグルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水、母乳など、鳥類の場合は血液、卵などから採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と

同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

5 アスポリンの部分ペプチドまたはその塩を抗原として用いる場合、そのアスポリン上の位置は特に限定されないが、例えば、各種温血動物間でよく保存された領域の部分アミノ酸配列を含むポリペプチドもしくはオリゴペプチドまたはその塩が挙げられる。

上記した(i) アスポリン類、(ii) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸（好ましくは、DNA）、(iii) 抗ASPN抗体、(iv) アンチセンスASPNは、
10 例えば以下の用途を有する。

後記実施例において示される通り、アスポリン遺伝子は変形性関節症（OA）軟骨で発現が上昇し、また、アスポリンは、デコリンなどの他のSLRPファミリーに属するプロテオグリカンと競合的に軟骨細胞分化のkey regulatorであるTGF- β に結合し、TGF- β による軟骨細胞分化（分化マーカー遺伝子の発現）の
15 誘導を阻害する。更に、アスポリンはTGF- β 特異的なシグナルを抑制し、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を阻害等する。これらの事実、アスポリンの発現または活性を調節（促進または阻害）し得る物質が、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常、あるいは軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖異常が関連する疾患の予防・治
20 療に有効であることを示すものである。ここで「関連する疾患」とは、それに起因するか、あるいは結果としてそのような状態を生じる疾患をいう。

(1) 軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖の異常亢進が関連する疾患の予防・治療剤

上記のように、アスポリンは軟骨基質遺伝子の発現を低下させ、軟骨前駆細胞
25 から軟骨細胞への分化を抑制する機能を有し、また軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を抑制する機能を有するので、生体内においてアスポリンまたはそれをコードする核酸（例：遺伝子、mRNA等）に異常があったり、これを欠損

している場合、あるいはその発現量が異常に減少している場合、さらには、他の何らかの要因で軟骨の過形成が起こり、また軟骨基質の産生能が異常亢進している場合、あるいは軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化が異常亢進している場合、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖が異常亢進している場合に、a) アスボリンもしくはその部分ペプチドまたはその塩（アスボリン類）を患者に投与してアスボリンの量を補充したり、b) (i) アスボリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを患者に投与して標的細胞内で発現させることによって、あるいは (ii) 単離した標的細胞にアスボリンまたはその部分ペプチドをコードするDNAを導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるアスボリンの量を増加させ、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化および/または軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖の異常亢進を抑制し、軟骨基質の過剰などを基盤とする疾患を予防・治療することができる。

したがって、a) アスボリン類、または b) アスボリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を、上記のような疾患、例えば先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）]，骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患の予防・治療剤として用いることができる。

アスボリン類を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、アスボリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を上記予防・治療剤として使用する場合は、該核酸を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイド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ができる。

例えば、a) アスボリン類、あるいは b) アスボリンまたはその部分ペプチド

- をコードする核酸は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) アスポリン類、あるいは b) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を、生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにする
- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。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（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、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）、非イオン性界面活性剤（例：ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。
- 10
15
20
25

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢

酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤 (例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤 (例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤 (例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物 (例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど) に対して投与することができる。

- アスポリン類の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) 10 においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 15 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

- アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、 20 例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程 25 度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(2) 軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖

能低下が関連する疾患の予防・治療剤

上記のように、アスポリンは軟骨基質遺伝子の発現を低下させ、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を抑制する機能を有し、また軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を抑制する機能を有するので、生体内においてアスポリンまたはそれをコードする核酸（例：遺伝子、mRNA等）に異常がある（高活性変異体の出現）場合、あるいはその発現量が異常に増加している場合、さらには、他の何らかの要因で軟骨基質の変性・消失が起こり、またその産生能が低下している場合、あるいは軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化が抑制されている場合、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖が抑制されている場合に、a) 抗ASPN抗体を患者に投与してアスポリンを不活性化（中和）したり、b) (i) アンチセンスASPNを患者に投与して標的細胞内に導入する（および発現させる）ことによって、あるいは (ii) 単離した標的細胞にアンチセンスASPNを導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるアスポリンの量を減少させ、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化および/または軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を促進し、軟骨基質の変性や消失を基盤とする疾患を予防・治療することができる。

したがって、a) 抗ASPN抗体、または b) アンチセンスASPNを、上記のような疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）〕など、好ましくは変形関節症（例：股関節OA、膝関節OA）の予防・治療剤として使用することができる。

抗ASPN抗体を上記予防・治療剤として使用する場合、前記したアスポリン類を含有する医薬と同様にして製剤化することができる。また、アンチセンスASPNを上記予防・治療剤として使用する場合、前記したアスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含有する医薬と同様にして製剤化することがで

きる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与
5 することができる。

抗ASPN抗体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投
10 与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

15 アンチセンスASPNの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注
20 射剤の形では通常例えば、変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

(3) アスポリンとbFGFとの併用剤

25 また、後述の実施例にて詳述するように、アスポリンはbFGFに結合することによりbFGFの作用を増強し、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化誘導条件下でのbFGFの軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖抑制効果や、分化非誘導条件下

でのbFGFの軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖促進効果を増強する。

したがって、a) アスポリン類、または b) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸と、c) bFGFもしくはその部分ペプチドまたはその塩（bFGF類）、または d) bFGFまたはその部分ペプチドをコードする核酸とを適量配合して、あるいは適量併用して使用することにより、骨・関節疾患の予防・治療剤とすることができる。

即ち、本発明は以下の（I）および（II）を組み合わせる、骨・関節疾患の予防・治療剤を提供する。

（I） a) アスポリン類、または b) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸、および

（II） c) bFGF類、または d) bFGFまたはその部分ペプチドをコードする核酸

ここで、「bFGF」は、ヒトその他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）のbFGFと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質を意味する。「実質的に同一のアミノ酸配列」、「部分ペプチド」の定義は、アスポリンにおける定義と同様である。

アスポリンはbFGFの作用を増強し、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化誘導条件下でのbFGFの軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖抑制効果を増強する。従って、一態様において、上述の（I）および（II）を組み合わせる、骨・関節疾患の予防・治療剤は、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化および/または軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖の異常亢進を抑制し、軟骨基質の過剰などを基盤とする疾患、例えば先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）]，骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患の予防・治療剤として用いることができる。

また、アスポリンはbFGFの作用を増強し、特に軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化の非誘導条件において、bFGFの軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）増殖促

進効果を増強する。従って、別の態様において、上述の (I) および (II) を組み合わせてなる、骨・関節疾患の予防・治療剤は、軟骨基質遺伝子の発現および/または軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化および/または軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を促進し、軟骨基質の変性や消失を基盤とする疾患、例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等）〕などの疾患の予防・治療剤として用いることができる。

上述の (I) と (II) との併用に際しては、(I) と (II) の投与時期は限定されず、(I) と (II) とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。(I) および (II) の投与量は、本発明の併用剤において用いられた際に上述の疾患の予防・治療を達成し得る範囲で特に限定されず、投与対象、投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。

上述の (I) と (II) の投与形態は、特に限定されず、投与時に、(I) と (II) とが組み合わされていればよい。このような投与形態としては、例えば、(1) 上述の (I) と (II) とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、(2) 上述の (I) と (II) とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、(3) 上述の (I) と (II) とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、(4) 上述の (I) と (II) とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5) 上述の (I) と (II) とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えば、(I)→(II) の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）等が挙げられる。以下、これらの投与形態をまとめて、本発明の併用剤と略記する。

本発明の併用剤は、上記 (1) の予防・治療剤と同様に、薬理学的に許容され

る担体と混合して、常套手段に従って製剤化することができる。

本発明の併用剤において、bFGFまたはその部分ペプチドをコードする核酸を使用する場合は、該核酸を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベ
5 クターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイド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ができる。

上述の (I) と (II) とを同時に製剤化して単一の製剤として使用する場合、本発明の併用剤における (I) の含有量は、製剤の形態や、(I) として含まれる
10 ものがアスポリン類か、アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸なのかによって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～99.9重量%、好ましくは約1～99重量%、さらに好ましくは約10～90重量%程度である。

また、本発明の併用剤における上述の (II) の含有量は、製剤の形態や、(II) として含まれるものがbFGF類か、bFGFまたはその部分ペプチドをコードす
15 る核酸なのかによって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.1～99.9重量%、好ましくは約1～99重量%、さらに好ましくは約10～90重量%程度である。

本発明の併用剤において、上述の (I) および (II) 以外の成分の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常、製剤全体に対して約0.2～99.8重量%、好ましくは約2～98重量%、好ましくは約20～90重量%程度である。

20 本発明の併用剤における上述の (I) と (II) との配合比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブ
25 タ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与することができる。

本発明の併用剤の投与量は、上述の (I) および (II) の種類、投与ルート、症状、患者の年齢等によっても異なり、適宜選択することが出来る。

本発明の併用剤における (I) の投与量は、上記 (1) の予防・治療剤と同様である。

本発明の併用剤におけるbFGFの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者
5 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約
10 0.1~10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明の併用剤におけるbFGFまたはその部分ペプチドをコードする核酸の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、より好ましくは約1.0~20 mg
15 である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者 (60 kgとして) においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好ましくは約0.1~10 mg程度を投与するのが好都合
20 である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

上述の (I) および (II) をそれぞれ別々に製剤化する場合も同様の含有量でよい。

上述の (I) と (II) をそれぞれ別々に製剤化して併用投与するに際しては、上述の (I) を含有する医薬組成物と上述の (II) を含有する医薬組成物とを同時
25 時期に投与してもよいが、(II) を含有する医薬組成物を先に投与した後、(I) を含有する医薬組成物を投与してもよいし、(I) を含有する医薬組成物を先に投与し、その後で (II) を含有する医薬組成物を投与してもよい。時間差をお

いて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法により異なるが、例えば、(II) を含有する医薬組成物を先に投与する場合、(II) を含有する医薬組成物を投与した後1分～3日以内、好ましくは10分～1日以内、より好ましくは15分～1時間以内に (I) を含有する医薬組成物を投与する方法が挙げられる。

- 5 (I) を含有する医薬組成物を先に投与する場合、(I) を含有する医薬組成物を投与した後、1分～1日以内、好ましくは10分～6時間以内、より好ましくは15分から1時間以内に (II) を含有する医薬組成物を投与する方法が挙げられる。

(4) 骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング

- 上記のように、アスポリンの活性を調節（促進または阻害）し得る物質は、
10 骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖異常が関連する疾患の予防・治療に有効である。従って、本発明は、アスポリン類を用いてその活性の変動を測定することによる、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

- 15 より具体的には、本発明は、

- (a) 軟骨細胞分化マーカーである軟骨基質（例：II型コラーゲン，アグリカン等）を産生する能力を有する細胞を、アスポリン類の存在下、またはアスポリン類および被験物質の存在下に培養し、両条件下におけるアスポリン類の活性を比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法
20 法を提供する。

- 上記スクリーニング方法において、アスポリン類は、前述のいずれかの方法により単離・精製されたものを添加してもよいし、あるいは、軟骨基質を産生する能力を有する細胞が、アスポリン類を産生する能力を同時に有していてもよい。アスポリンまたはその塩および軟骨基質を産生する能力を有する細胞としては、
25 生来それらを発現しているヒトもしくは他の温血動物細胞またはそれを含む生体試料（例：関節液，関節軟骨等）であれば特に制限はないが、物理的または化学的刺激に応じてアスポリンの発現および/または活性化が誘導されるものが好

ましい。非ヒト動物由来の細胞、組織等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。上記の遺伝子工学的手法により、軟骨基質遺伝子を産生する能力を有する細胞にアスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸

5 を導入して得られる各種の形質転換体を用いることもできる。

被験物質としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

アスポリン類の活性の測定は、軟骨細胞分化マーカーである軟骨基質遺伝子の

10 発現量を測定することにより行うことができる。例えば、一定期間（例えば、5～25日程度）培養した細胞から常法により総RNAを抽出して、定量的RT-PCRやノーザンハイブリダイゼーションにより軟骨基質遺伝子〔例：II型コラーゲン遺伝子（Col2a1）、アグリカン遺伝子（Agc1）等〕の発現量を定量する。あるいは、細胞から総タンパク質を抽出し、後述のアスポリン類の定量と同様の方法により、

15 抗II型コラーゲン抗体、抗アグリカン抗体等を用いてこれらの軟骨基質を定量することによっても行うことができる。

上記（a）のスクリーニング法において、Col2a1やAgc1等の軟骨基質遺伝子の発現を低下させた被験物質を「アスポリン活性促進物質」、それらの発現を増大させた被験物質を「アスポリン活性阻害物質」としてそれぞれ選択することができる。アスポリン活性促進物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患〔例えば、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等））、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍など〕の予防・治療剤として用いることができる。

20

一方、アスポリン活性阻害物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患〔例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツに

25

よる関節障害、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等））など]、好ましくは変形関節症（例：股関節OA，膝関節OA）の予防・治療剤として使用することができる。

アスポリン活性促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したアスポリン類と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット，マウス，ハムスター，ウサギ，ヒツジ，ヤギ，ブタ，ウシ，ウマ，ネコ，イヌ，サル，チンパンジー，トリなど）に対して投与することができる。

アスポリン活性促進物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

アスポリン活性阻害物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは

約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

上述のように、アスポリンの発現を調節（促進または阻害）する物質もまた、骨・関節疾患、特に軟骨基質の変性・産生異常や、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化異常、軟骨細胞増殖異常が関連する疾患の予防・治療に有効である。従って、本発明は、アスポリン類を産生する能力を有する細胞におけるアスポリン類の発現を、被験物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

アスポリンの発現量は、アスポリンをコードする核酸とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸（即ち、前記したアスポリンをコードする塩基配列またはその一部を含む核酸（以下、「センスASPN」ともいう））またはアスポリンをコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部（アンチセンスASPN）を用いてそのmRNAを検出することにより、転写レベルで測定することもできる。あるいは、該発現量は、前記した抗ASPN抗体を用いてタンパク質（ペプチド）を検出することにより、翻訳レベルで測定することもできる。

従って、より具体的には、本発明は、

(b) アスポリン類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるアスポリン類をコードするmRNAの量を、センスもしくはアンチセンスASPNを用いて測定、比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法、および

(c) アスポリン類を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下におけるアスポリン類のタンパク質（ペプチド）量を、抗ASPN抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

上記 (b) および (c) のスクリーニング方法において、アスポリン類を産生する能力を有する細胞としては、上記 (a) のスクリーニング方法において用いられるのと同様のものが好ましく用いられる。

例えば、アスポリン類のmRNA量またはタンパク質（ペプチド）量の測定は、具体的には以下のようにして行うことができる。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリなど）に対して、薬剤あるいは物理的刺激などを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的刺激と同時に被験物質を投与し、投与から一定時間が経過した後、関節液、関節軟骨などを採取する。得られた生体試料に含まれる細胞において発現したアスポリンのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、RT-PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、アスポリンタンパク質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種イムノアッセイ法を用いて定量することができる。
- (ii) アスポリンまたはその部分ペプチドをコードする核酸を導入した形質転換体を上記の方法に従って作製し、該形質転換体を常法に従って培養する際に被験物質を培地中に添加し、一定時間培養後、該形質転換体に含まれるアスポリン類のmRNA量またはタンパク質（ペプチド）量を定量、解析することにより行うことができる。
- 被験物質としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

上記（c）のスクリーニング方法におけるアスポリン類の量の測定は、具体的には、例えば、

- (i) 抗ASPN抗体と、試料液および標識化されたアスポリン類とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたアスポリン類を検出することにより試料液中のアスポリン類を定量する方法や、

(ii) 試料液と、担体上に不溶化した抗ASPN抗体および標識化された別の抗ASPN抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量（活性）を測定することにより、試料液中のアスポリン類を定量する方法等が挙げられる。

- 5 上記 (ii) の定量法においては、2種の抗体はアスポリン類の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体がアスポリン類のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体としてアスポリン類のC端部と反応するものを用いることができる。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、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、
10 例えば、 $[^{125}\text{I}]$, $[^{131}\text{I}]$, $[^3\text{H}]$, $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、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
15 オレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。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、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-(ストレプト)アビジン系を用いることもできる。

- 試料液としては、アスポリン類が細胞内に局在する場合は、細胞を適当な緩衝
20 液に懸濁した後、超音波処理または凍結融解などによって細胞を破壊して得られる細胞破碎液が、アスポリン類が細胞外に分泌される場合には、細胞培養上清がそれぞれ用いられる。必要に応じて、破碎液や培養上清からアスポリン類を分離・精製した後に定量を行ってもよい。また、標識剤の検出が可能である限り、無傷細胞を試料として用いてもよい。

- 25 抗ASPN抗体を用いるアスポリン類の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用

いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

- 5 抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化・固定化するのに用いられる化学結合を用いてもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコーン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。
- 10 サンドイッチ法においては不溶化した抗ASPN抗体に試料液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の抗ASPN抗体を反応させた（2次反応）後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中のアスポリン類を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序で行っても、また、同時に
- 15 行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相化抗体あるいは標識化抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 抗ASPN抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イム
- 20 ノメトリック法あるいはネフロメトリーなどにも用いることができる。

- 競合法では、試料液中のアスポリン類と標識したアスポリン類とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定することにより、試料液中のアスポリン類を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、
- 25 ポリエチレングリコールや前記抗体（1次抗体）に対する2次抗体などを用いてB/F分離を行う液相法、および1次抗体として固相化抗体を用いるか（直接法）、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相化抗体を用いる固

相化法（間接法）とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中のアスポリン類と固相化したアスポリン類とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは試料液中のアスポリン類と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化したアスポリン類を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し試料液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。試料液中のアスポリン類の量がわずかであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に、当業者の通常技術的配慮を加えて、アスポリン類の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、*Meth. Enzymol.*, Vol. 70: (Immunochemical Techniques (Part A)), 同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), 同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), 同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), 同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、Academic Press発行)などを参照することができる。

以上のようにして、抗ASPN抗体を用いることによって、細胞におけるアスポリン類の生産量を感度よく定量することができる。

上記 (b) および (c) のスクリーニング法において、アスポリン類の発現量

(mRNA量またはタンパク質（ペプチド）量）を増加させた物質をアスポリン発現促進物質、発現量を減少させた物質をアスポリン発現阻害物質としてそれぞれ選択することができる。アスポリン発現促進物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患〔例えば、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）），骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍など〕の予防・治療剤として用いることができる。

一方、アスポリン発現阻害物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患〔例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等））など〕、好ましくは変形関節症（例：股関節OA，膝関節OA）の予防・治療剤として使用することができる。

アスポリン発現促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したアスポリン類の場合と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の温血動物（例えば、ラット，マウス，ハムスター，ウサギ，ヒツジ，ヤギ，ブタ，ウシ，ウマ，ネコ，イヌ，サル，チンパンジー，トリなど）に対して投与することができる。

アスポリン発現促進物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば、骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日に

つき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

アスポリン発現阻害物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

また、本発明は、

(d) 軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）を、アスポリン類の存在下、またはアスポリン類および被験物質の存在下に培養し、両条件下における細胞増殖を比較することを特徴とする、骨・関節疾患の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、アスポリン類は、前述のいずれかの方法により単離・精製されたものを添加してもよいし、あるいは、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）が、アスポリン類を産生する能力を同時に有していてもよい。軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）としては、ヒトもしくは他の温血動物細胞またはそれを含む生体試料（例：関節液、関節軟骨等）であれば特に制限はないが、物理的または化学的刺激に応じてアスポリンの発現および/または活性化が誘導されるものが好ましい。非ヒト動物由来の細胞、組織等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。上記の遺伝子工学的手法により、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）にアスポリンまたはその部分ペプチドをコー

ドする核酸を導入して得られる各種の形質転換体を用いることもできる。

被験物質としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

- 5 軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖は常法に従い測定することができる。例えば、一定期間（例えば、1～25日程度）細胞を培養した後に、目視による細胞数計測、MTTアッセイ、BrdUの取り込み、³H-チミジンの取り込み等により、細胞増殖を測定する。

- 10 軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の培養を、インシュリン等の添加により軟骨細胞分化誘導条件下で行うことも、また好ましい。

- アスポリン類は、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖を抑制する活性を有するので、上記（d）のスクリーニング法において、軟骨細胞（または軟骨前駆細胞）の増殖低下をより増強させた被験物質を「アスポリン活性促進物質」、該細胞増殖低下を減弱させた被験物質、または細胞増殖を増大させた被験物質を
15 「アスポリン活性阻害物質」としてそれぞれ選択することができる。アスポリン活性促進物質は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患〔例えば、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫、片側肥大、オリエール病、マフッチ症候群等））、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍など〕の予防・治療剤として用いること
20 ができる。

- 一方、アスポリン活性阻害物質は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患〔例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患（例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨
25 端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）など〕、好ましくは変形関節症（例：股関節OA、膝関節OA）の予

防・治療剤として使用することができる。

アスポリン活性促進もしくは阻害物質を上記予防・治療剤として使用する場合は、前記したアスポリン類と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の
5 温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブ
タ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）に対して投与
することができる。

アスポリン活性促進物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な
どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば骨軟骨腫患者（60
10 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、
より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与
量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射
剤の形では、通常、例えば骨軟骨腫患者（60 kgとして）においては、一日につ
き約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～
15 10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換
算した量を投与することができる。

アスポリン活性阻害物質の投与量も、投与対象、対象臓器、症状、投与方法な
どにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば変形性関節症患者
（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50
20 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回
投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば
注射剤の形では、通常、例えば変形性関節症患者（60 kgとして）においては、
一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは
約0.1～10 mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当
25 ちに換算した量を投与することができる。

(5) 遺伝子診断剤

アスポリンをコードする塩基配列またはその一部を含む核酸（以下、「セン

スASPN」ともいう)、あるいは該塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸(アンチセンスASPN)は、プローブ等として使用することにより、ヒトまたは他の温血動物(例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど)におけるアスポリンをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAの損傷もしくは突然変異やmRNAのスプライシング異常あるいは発現低下、あるいは該DNAの増幅やmRNAの発現上昇などの遺伝子診断剤として有用である。アスポリンをコードする塩基配列の一部を含む核酸は、プローブとして必要な長さ(例えば、約15塩基以上)を有する限り特に制限されず、また、アスポリンの部分ペプチドをコードしている必要もない。

センスもしくはアンチセンスASPNを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、PCR-SSCP法、アレル特異的PCR、PCR-SSOP法、DGGE法、RNaseプロテクション法、PCR-RFLP法などにより実施することができる。

上記のように、アスポリンは軟骨基質遺伝子の発現を低下させ、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化を抑制し、軟骨細胞(または軟骨前駆細胞)の増殖を抑制する機能を有することから、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患の発症・進行に關与する。そのため、そのような疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患するリスクが高い状態にあれば、アスポリン遺伝子の発現が正常な状態に比して上昇していると考えられる。従って、例えば、被験温血動物の細胞から抽出したRNA画分についてのノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRの結果、アスポリン遺伝子の発現上昇が検出された場合は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患[例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患(例:軟骨無形成症、多発性骨端異形成

症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等)]などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

- 一方、ノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRによりアスポリン遺伝子の発現低下が検出された場合は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患[例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患(例:多発性外骨腫,片側肥大,オリエール病,マフッチ症候群等)],骨軟骨腫,骨腫瘍,軟骨腫瘍などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。
- 10 前記した抗ASPIN抗体は、ヒトまたは他の温血動物(例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど)におけるアスポリンまたはその塩の量を測定することができるので、例えば、該タンパク質の発現低下または発現上昇などの遺伝子診断剤として有用である。
- 15 抗ASPIN抗体を用いる上記の遺伝子診断は、前記した抗ASPIN抗体を用いるアスポリン発現調節(促進もしくは阻害)物質のスクリーニング方法((c)のスクリーニング方法)において、アスポリン類を産生する能力を有する細胞として、被験温血動物から採取した生体試料(例:関節液,生検など)を用いてイムノアッセイを実施することにより行うことができる。
- 20 イムノアッセイの結果、該試料中のアスポリンまたはその塩の増加が検出された場合は、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症,変形性関節症,慢性関節リウマチ,関節炎,滑膜炎,代謝性関節症,スポーツによる関節障害,先天性骨系統疾患[例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する
- 25 先天性骨系統疾患(例:軟骨無形成症,多発性骨端異形成症,脊椎骨端異形成症,骨幹端異形成症,Stickler症候群,偽性軟骨無形成症等)]などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

一方、イムノアッセイの結果、該試料中のアスポリンまたはその塩の減少が検出された場合は、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエール病，マフッチ症候群等）〕，骨軟骨腫，骨腫瘍，軟骨腫瘍などの疾患に罹患しているか、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

後記実施例において示される通り、アスポリンのN末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し（以下、「D-リピート」ともいう）における多型が、股関節OAおよび膝関節OAと相関する。即ち、14個のアスパラギン酸の繰り返しを有するアレル（D14アレル）の保有者頻度はOA患者群において有意に高く、13個のアスパラギン酸の繰り返しを有するアレル（D13アレル）はOA患者群において有意に低い（その他の繰り返し多型ではOA患者群と対照群とで有意な差はみられない）。従って、D14アレルはOA感受性アレルであり、D13アレルはOA保護性（難罹患性）アレルであるといえる。

実際、アスポリンのD-リピートにおける多型は、TGF- β による軟骨基質遺伝子発現誘導に対する影響に差異を生じる。即ち、D14アレルはD13アレルに比べてTGF- β の上記作用をより強く阻害する。

上記したアスポリンの機能を考慮すると、D14アレルは変形性関節症だけでなく、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症，変形性関節症，慢性関節リウマチ，関節炎，滑膜炎，代謝性関節症，スポーツによる関節障害，先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等）〕などの疾患に対しても感受性を示すことが示唆される。一方、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患（例：多発性外骨腫，片側肥大，オリエー

ル病, マフッチ症候群等)], 骨軟骨腫, 骨腫瘍, 軟骨腫瘍などの疾患に対しては、D14アレルはむしろ保護的であり得る。

これに対し、D13アレルは、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患 (例: 軟骨無形成症, 多発性骨端異形成症, 脊椎骨端異形成症, 骨幹端異形成症, Stickler症候群, 偽性軟骨無形成症等)] などの疾患に対しては保護的であり、他方、軟骨基質の産生能・軟骨細胞分化能・軟骨細胞増殖能の異常亢進が関連する疾患、例えば、先天性骨系統疾患 [例えば、軟骨形成の亢進している骨系統疾患 (例: 多発性外骨腫, 片側肥大, オリエール病, マフッチ症候群等)], 骨軟骨腫, 骨腫瘍, 軟骨腫瘍などの疾患に対しては、むしろ感受性であり得る。

したがって、本発明はまた、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列中N末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し残基数における多型を検出することを含む、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法を提供する。

上記多型の検出方法としては、公知の検出方法のいずれも使用することができる。例えば、被験動物の細胞から抽出したゲノムDNAを試料とし、アスポリン遺伝子のD-リピートをコードする領域の塩基配列を含む核酸をプローブ等として用いて、例えば、特開2004-000115に記載された種々の方法 [例: RFLP法、PCR-SSCP法、ASOハイブリダイゼーション、ダイレクトシーケンス法、ARMS法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、RNaseA切断法、化学切断法、DOL法、TaqMan PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、モレキュラー・ビーコン法、ダイナミック・アレルスペシフィック・ハイブリダイゼーション法、パドロック・プローブ法、UCAN法、DNAチップまたはDNAマイクロアレイを用いた核酸ハイブリダイゼーション法およびECA法など] を行うことにより実施することができる。

その結果、D14アレルを保有する場合、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、

軟骨細胞分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症、多発性骨端異形成症、脊椎骨端異形成症、骨幹端異形成症、Stickler症候群、偽性軟骨無形成症等）〕などの疾患に対して感受性であると判定することができ、D13
5 アレルを保有する場合、上記の疾患に対して保護的であると判定することができる。

後記実施例9に示される通り、上記CALM1遺伝子における骨・関節疾患感受性
10 アレルと、ASPN遺伝子におけるD14アレルの両方を保有する場合、それらの一方を保有する場合に比べて、骨・関節疾患の発症リスクが相乗的に増大する。このことは、CALM1とASPNが協奏的に骨・関節疾患の発症に関与することを示唆している。従って、本発明はまた、配列番号：5で表される塩基配列において、塩基
番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上
15 の塩基における多型と、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中N末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し残基数における多型とを検出することを含む、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法を提供する。

上記多型の検出方法としては、各遺伝子の多型の検出に関して例示したものが同様に使用され得る。

20 その結果、配列番号：5で表される塩基配列において、塩基番号85で示される塩基がチミン、塩基番号1576で示される塩基がシトシン、塩基番号2445で示される塩基がグアニン、または塩基番号6641で示される塩基がチミンであり、且つ配列番号：4で表されるアミノ酸配列中N末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し残基数が14である場合、軟骨基質の変性・消失・産生能低下、軟骨細胞
25 分化能低下、軟骨細胞増殖能低下が関連する疾患、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、先天性骨系統疾患〔例えば、軟骨形成の低下している骨系統疾

患・変形性関節症を合併する先天性骨系統疾患（例：軟骨無形成症，多発性骨端異形成症，脊椎骨端異形成症，骨幹端異形成症，Stickler症候群，偽性軟骨無形成症等）]などの疾患に対する感受性がより高いと判定することができる。

- 本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB
 5 Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
10	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
15	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
20	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
25	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン

	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
5	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
10	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン
15	Gln	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸
	Sec	: セレノシステイン (selenocysteine)

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

20	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
25	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
	Bzl	: ベンジル

- Cl₂-Bzl : 2, 6-ジクロロベンジル
- Bom : ベンジルオキシメチル
- Z : ベンジルオキシカルボニル
- Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
- 5 Br-Z : 2-ブromoベンジルオキシカルボニル
- Boc : t-ブトキシカルボニル
- DNP : ジニトロフェニル
- Trt : トリチル
- Bom : t-ブトキシメチル
- 10 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
- HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
- HOObt : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
- HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
- DCC : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

15 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号: 1]

ヒトCALM1 cDNAの塩基配列を示す。

[配列番号: 2]

20 CALM1遺伝子にコードされるヒトカルモジュリンタンパク質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号: 3]

ヒトアスポリンcDNA (D13) の塩基配列を示す。

[配列番号: 4]

ヒトアスポリンタンパク質 (D13) のアミノ酸配列を示す。

25 [配列番号: 5]

ヒトCALM1遺伝子の塩基配列を示す [マイナーアレル頻度が10%以上の12のSNP
部位 (塩基番号: 85, 1576, 2011, 2190, 2276, 2445, 2543, 3074, 5170, 6641,

9233, 10526) は、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(平成14年7月)の付属書2、表1に示される択一的記号により表記している]。

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは単なる例示
5 であって本発明を何ら限定するものではない。

実施例1 大規模相関解析

対象は全て日本人である。相関解析は、日本人のSNPデータベースであるJSNP
データベース (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) からランダムに選出した
10 81,398個のSNPについて行った。第一に、スクリーニングとして股関節OA患者群
94人および対照群658人から抽出したゲノムDNAに対して、Ohnishi et al. (*J.
Hum. Genet.*, 46: 471 (2001)) の方法に従い、インバーダー法によってジェノ
タイピングを行い、 χ^2 検定もしくはフィッシャーの正確な検定を行った。これ
らの検定でP値が0.01を下回った2,219個のSNPについて、前述の検体と重複しな
15 い股関節OA患者群335人および対照群375人についてジェノタイピングを行い、
同様の検定を行った。その結果、14番染色体上(14q24-q31)のCALM1 IVS3-
293C>T(図2b、左表中のSNP ID: CALM1_9、並びに配列番号: 1の塩基番号6641
に相当)が股関節OAとの高い相関を示した(表1)。

表1	変形性股関節症 と <i>CALN1</i>	IVS3-293C>T の相関					
		スクリーニング		独立検定			
		股関節OA	対照	股関節OA	対照	股関節OA	対照
		1	1	2	2		
遺伝子型 (個体数/%)							
	TT	18/19.4	56/8.5	47/14.0	24/6.4		
	CT	35/37.6	290/44.2	130/38.8	157/41.9		
	CC	40/43.0	310/47.3	158/47.2	194/51.7		
	総数	93	656	335	375		
TT 対 CT+CC							
P 値		0.00085		0.00082			
オッズ比		2.57		2.39			

続いて、この領域における股関節OA感受性遺伝子を同定するため、IVS3-293C>Tと連鎖不平衡にある領域の決定を行った。このSNPを中心とした400-kbの領域に存在するマイナーアレル頻度10%以上のJSNPを、股関節OA患者335人についてインベーター法もしくはTaqMan法によってジェノタイピングを行い、
 Yamada et al. (*Am. J. Hum. Genet.*, 68: 674 (2001)) の方法に従って、IVS3-293C>Tとの連鎖不平衡定数D' を計算した。その結果、IVS3-293C>Tと高い

連鎖 ($D' = 1$) を示すSNPは、CALM1およびHs. 407640内に限局していた (図1)。

実施例2 ハプロタイプ解析

CALM1には14個のJSNPが既に登録されている。CALM1における股関節OA感受性
5 アレルを同定するため、股関節OA患者16名のゲノムDNAを用いてCALM1遺伝子の
5' -フランキング領域、エクソン、およびエクソン-イントロン接合部に対して
ABI3700キャピラリーシーケエンサー (Applied BioSystems) によるダイレクト
シーケンスを行い、新規SNPの探索を行った。その結果、JSNPデータベースに
登録されているCALM1の14個のSNP (図2a, 縦棒) 以外に、CALM1の5' -フランキ
10 ング領域、エクソン1、イントロン1およびエクソン7に、それぞれ1つずつ新規
SNPを検出した (図2a, 矢印)。CALM1に存在するマイナーアレル頻度が10%以上
の11個のSNP (図2a, アスタリスク) のジェノタイプデータを用いて、アレルキ
ンソフトウェアによってハプロタイプ構造を推定した。その結果、この領域には
全ハプロタイプ頻度の約90%を網羅する3つのコモンハプロタイプが存在するこ
15 とが推定された (図2b, ハプロタイプA-C)。そのうちハプロタイプBは、 χ^2 検定
の結果、股関節OAと相関を示した (図2b, 右表)。ハプロタイプBには、股関節
OAと高い相関を示すSNPが3つ存在している (IVS1+1271C>A, IVS1-692G>Cおよび
マーカーSNPである IVS3-293C>T、それぞれ図2b, 左表中のSNP ID: CALM1_1, 5
および9に相当)。この3つのSNPは互いに完全連鎖の関係にあり、マーカーSNPと
20 全く同様に股関節OAと高い相関を示した。新規に検出した4つのSNPに対して、
股関節OA患者を用いてダイレクトシーケンスによるジェノタイピングを行っ
たところ、-16C>TはハプロタイプB上の3つのSNPと完全連鎖の関係にあった。こ
のことは、-16C>Tもこれら3つのSNPと全く同様に、股関節OAの感受性多型であ
ることを示す。

25

実施例3 軟骨細胞におけるCALM1発現解析

正常ヒト膝関節軟骨細胞 (NHAC-kn, Takara) は、アルジネートビーズ中に包

- 埋し、添付の分化培地 (CDM) で2週間培養したものを使用した。OA関節軟骨は、人工膝関節置換術を行う患者 (n= 4) から、インフォームド・コンセントを得て取得した。総RNAの抽出はISOGEN (ニッポンジーン) を用いて行い、cDNAは Multi Scribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) を用いて500 ng
- 5 の総RNAから合成した。得られたcDNAを鋳型とし、表4に記載のヒトCALM1遺伝子増幅用プライマーを用いてPCRを行った。PCR反応は、最終容量20 μ M [逆転写反応液 1 μ l, 10x Ex Taq buffer (Takara) 2 μ l, 2.5 mM dNTP混合液 1.6 μ l, Ex Taq (Takara) 0.1 μ l, 10 μ M フォワードプライマー 0.4 μ l, 10 μ M リバースプライマー 0.4 μ l, 核酸分解酵素 14.5 μ l] の系で行った。
- 10 PCR増幅産物は、2% アガロースゲルにて分離し、エチジウムブロマイドにて検出した。その結果、培養ヒト膝関節軟骨細胞およびOA膝関節軟骨でCALM1が発現していることを確認した (図3)。

実施例4 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

- 15 -16C>TのCALM1転写活性に与える影響を、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価した。CALM1の-16Cもしくは-16Tアレルを有するゲノムDNAを鋳型として、CALM1のプロモーター領域および5' -非翻訳領域 (nt -1231 to +202) を表2に示すプライマーセットを用いてPCRにて増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクターであるpGL3-basic (Promega) のNheI-XhoI部位に、5' -3' の方向
- 20 性を保持したまま組み込むことによって、CALM1遺伝子の発現調節領域をルシフェラーゼ遺伝子の前に結合したレポーターコンストラクトを、-16TアレルおよびCアレルについて作成した。

表2 CALM1 プロモーター領域および5'非翻訳領域の増幅プライマーの配列

増幅領域 (nt.)	フォワードプライマー	リバースプライマー	
-1231 to +202	AAAGCTAGCCCGGCCCTGTAAACAGA	AACTCGAGGTGCGAGCGGAAGGGAGGAA	(7)
-550 to +202	AAAGCTAGCTCTGCAGACCCCTCTCCTC	AACTCGAGGTGCGAGCGGAAGGGAGGAA	(8)
-53 to +202	AAAGCTAGCGGAGGGATACGGCGCAC	AACTCGAGGTGCGAGCGGAAGGGAGGAA	(9)
-53 to +8	AAAGCTAGCGGAGGGATACGGCGCAC	TTTCTCGAGCACCACTGCCGAGCGC	(10)

()内の数字は配列番号を示す。

これらのコンストラクトを、10% 胎仔ウシ血清 (FBS) および抗生物質 (100 U/ml ペニシリンGと100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含むDulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM, Sigma) で培養した軟骨様細胞OUMS-27細胞

にトランスフェクションした。トランスフェクションは、以下の手順で行った。
トランスフェクションの前日、OUMS-27細胞を 5×10^4 個/ウェルとなるように24マルチウェルプレートに播種した。翌日、Fugene-6 (Roche Diagnostics) を用いて、1ウェルあたり、レポーターコンストラクト200 ng、およびトランスフェク
5 ション効率を補正する内部標準としてのpRL-TK (Promega) 4 ngをトランスフェク
クションした。トランスフェクションから24時間後、細胞を可溶化し、ピッカ
ジーン・デュアル・シーパンジーシステム (東洋インキ) を用いてルシフェラー
ゼ活性を測定した。その結果、Tアレルにおけるルシフェラーゼ活性は、Cア
レルの約2分の1であった (図4a)。全く同様のアッセイをHuh-7細胞 (胎児肝癌
10 由来) について行ったところ、Tアレルにおけるルシフェラーゼ活性は、Cア
レルの約2分の1であった (図4b, 最上段)。

次に、2アレル間の転写活性の差を引き起こすのに十分な領域を絞り込むため、
同様の方法で、-16C>Tを含むが、長さの異なる3つのレポーターコンストラクト
を表3に示すプライマーを用いて作成した (図4b, 左模式図の2, 3および4段目)。
15 これらのコンストラクトをHuh-7細胞にトランスフェクションし、Tアレルおよ
びCアレルのルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、いずれのコンストラク
トにおいても、Tアレルにおけるルシフェラーゼ活性は、Cアレルの約2分の1で
あった (図4b)。この結果は、2アレル間における転写活性の差を引き起こすに
は、-16C>T周辺の領域 (61 bp, nt. -53 to +8) で十分であることを示唆する。

20

実施例5 ゲルシフトアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、TアレルとCアレル間の転写活性
の差を生じるには、そのアレル周辺の配列で十分であることが分かった。このこ
とから、この配列に結合し、転写活性の差を引き起こす核内タンパク質の存在が
25 示唆される。そこで、本発明者らは、この仮説を検証するため、-16C>Tを含む
CALM1遺伝子調節領域の部分配列からなるDNAと、Huh-7細胞の核抽出物とを用い
てゲルシフトアッセイを行った。Huh-7細胞の核抽出タンパク質は、Andrews et

al. (*Nucleic Acids Res.*, 19: 2499 (1991)) の方法に従って調製した。オリゴヌクレオチドのアニーリングとDIGラベリングは、DIGゲルシフトキット (Roche Diagnostics) を用いて行った。使用したオリゴヌクレオチドの配列を表3に記す。

表3 ゲルシフトアッセイに用いたオリゴヌクレオチドの配列	
アレル	オリゴヌクレオチド
T	CTAGCATATATATCGCGGGGTCGAGACTCGCGCTCC (11)
	TCGAGGAGCGCGAGTCTGCACCCCGGATATATATG (12)
C	CTAGCATATATATCGCGGGGTCGAGACTCGCGCTCC (13)
	TCGAGGAGCGCGAGTCTGCACCCCGGATATATATG (14)

()内の数字は配列番号を示す。

5

DIGラベルしたプローブを、Huh-7細胞核抽出物と混合して20分間室温でインキュベーションし、DNA-タンパク質複合体を形成させた。形成したDNA-タンパク質複合体は、0.5% Tris-ホウ酸-EDTAバッファー中で、6% ポリアクリルアミドゲルによって分離した。DIGラベルしたプローブと非標識プローブの競合実験に際しては、ラベルしたプローブと核抽出物の混合に先立って、ラベルしたプロ

10

ープの125倍量の非標識プローブを添加した。泳動後、DNA-タンパク質複合体をニトロセルロース膜に転写し、UVによって架橋した後、化学発光検出システム (Roche Diagnostics社) で標識プローブ由来のシグナルを検出した。

- その結果、-16Tまたは-16Cを含む配列からなるDNAとHuh-7細胞核抽出物とを
- 5 混合したレーンにおいて、複数のバンドが確認された (図5)。このことは、-16C>T周辺配列と直接結合する核内因子が存在することを示唆する。これらのバンドはCアレルよりもTアレルにおいてシグナル強度が高いことから、これらの核内因子は、Tアレルに比較的強固に結合することが示唆された (図5, 矢尻)。
- レポーターアッセイの結果では、Tアレルは転写活性の低下を引き起こすアレル
- 10 である。従って、Tアレルに強固に結合する核内因子は、CALM1の転写に対してサプレッサーとして働いている可能性を示唆する。

実施例6 軟骨細胞分化実験

- 胚性腫瘍由来クローン化細胞株ATDC5は、インスリンの存在下で、軟骨細胞の
- 15 初期分化から終末分化に至る全ての分化段階を再現可能な *in vitro* 軟骨細胞分化モデルである。本発明者らは、軟骨細胞分化におけるカルモジュリン (CaM) の役割を解析するため、ATDC5をCaM阻害剤であるW-7の存在下で培養し、軟骨細胞の分化マーカーであるII型コラーゲン遺伝子 (Col2a1)、アグリカン遺伝子 (Agc1) およびX型コラーゲン遺伝子 (Col10a1) の発現量を定量した。通常培養
- 20 には、5% FBSおよび抗生物質 (100 U/ml ペニシリンGと100 μ g/mlストレプトマイシン) を含むDMEM/F12 (Gibco) を用いた。分化実験は以下の手順で行った。細胞を 3×10^4 cells/ウェルとなるように12 マルチウェルプレートに播種した。細胞がコンフルエントに達した後、培養培地を分化培地 (5% FBS, 抗生物質, 10 μ g/ml ウシインスリン, 10 μ g/ml ヒトトランスフェリンおよび 3×10^{-8} M
- 25 亜セレン酸ナトリウムを含むDMEM/F12) に置換した。また、CaM阻害群の分化培地には、CaM阻害剤であるW-7 (20 μ M、和光) を添加した。培地交換は1日おきに行い、分化培地への交換日から数えて、最長で22日間培養した。ATDC5細胞か

らの総RNA抽出は、ISOGENを用いて行った。抽出した総RNA 500 ngに対して、Multi Scribe Reverse Transcriptaseを用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。定量的real-time PCRは、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて行った。PCR反応は、最終容量20 μ l [逆転写反応液 1 μ l, QuantiTectSYBR Green
5 PCR(QIAGEN) 10 μ l, 10 μ M フォワードプライマー 0.6 μ l, 10 μ M リバー
スプライマー 0.6 μ l, 核酸分解酵素除去水 6.8 μ l] の系で行った。反応プ
ログラムは [94°C 15分, (94°C 15秒, 60°C 15秒, 72°C 30秒) x40 サイクル]
とした。各サンプルにおける標的遺伝子のコピー数は、系列希釈したコピー数既
知の標的遺伝子DNAを用いて作成した検量線から算出した。各遺伝子の発現量は、
10 Gapdhの発現量を指標として算出した総RNA量で補正した。各標的遺伝子に対す
るプライマーの配列を表4に記す。

表4 RT-PCR に用いたプライマーの配列

標的遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー
ヒトCALM1遺伝子	GGACAAGTCAACTATGAAGAATTGG	CCACCAACCAATACATGCAG (16)
マウスGapdh遺伝子	GGATGCAGGGATGATGTTCT	TGCACCACCAAGTGTCTAG (18)
マウスCol2a1遺伝子	CCAAACCAGCCTGACAACTT	TCTAGCATGCTCCACCACCTG (20)
マウスCol10a1遺伝子	CATAAAGGGCCCACTTGCTA	TGGCTGATATTCTGTTGGT (22)
マウスAgc1遺伝子	GCCAAGACCTGAAACTCTGC	GCCATAGCTGAAGTGGAAAGC (24)

()内の数字は配列番号を示す。

インスリン存在下で培養したATDC5では、インスリン非存在下条件と比較して、軟骨細胞の主要な基質遺伝子であるCol2a1およびAgc1の発現量が、インスリン添加後6日目から上昇し、それぞれ、14日目、18日目に最大となった (図6a, b)。

これらの遺伝子の発現上昇は、W-7の存在下で約2分の1まで抑制された。一方、肥大軟骨細胞のマーカーであるCol10a1の発現量は、22日目まで上昇しつづけ、W-7の添加によってさらに上昇した（図6c）。これらの結果から、CaMは軟骨細胞分化過程において、Col2a1やAgc1の発現上昇に関わるシグナルを仲介していることが示唆された。また、CaMは軟骨細胞でのCol10a1の発現を抑制すること、即ち軟骨細胞の肥大化を抑制することが示唆された。

実施例7 軟骨前駆細胞株RCJ3.1C5.18を用いたイオノマイシン刺激実験

RCJ3.1C5.18細胞は、軟骨前駆細胞としての形質を有し、細胞内カルシウム濃度を上昇させる試薬であるイオノマイシン刺激によって、II型コラーゲン遺伝子およびアグリカン遺伝子の発現が上昇する細胞である。本発明者らは、この反応におけるCaMの関与を、CaM阻害剤であるW-7を用いて解析した。通常培養には10% FBSおよび抗生物質（100 U/ml ペニシリンGと100 μ g/ml ストレプトマイシン）を含むDMEM（Sigma）を用いた。刺激実験は以下の手順で行った。細胞を15 1×10^5 cells/ウェルとなるように12 マルチウェルプレートに播種した。細胞がコンフルエントに達した後、実験条件に応じた濃度のイオノマイシン（0または2 μ M）およびW-7（0～10 μ M）を含む培地に置換した。培地置換から24時間後にISOGENを用いてRNAを回収した。抽出した総RNA 500 ngに対して、MultiScribe Reverse Transcriptaseを用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。20 定量的real-time PCRは、ABI PRISM 7700（Applied Biosystems）を用いて行った。PCR反応は、最終容量20 μ l [逆転写反応液 1 μ l, QuantiTect SYBR Green PCR（QIAGEN）10 μ l, 10 μ M フォワードプライマー 0.6 μ l, 10 μ M リバースプライマー 0.6 μ l, 核酸分解酵素除去水 6.8 μ l] の系で行った。反応プログラムは [94°C 15分, (94°C 15秒, 60°C 15秒, 72°C 30秒) x 40 サイクル] 25 とした。各サンプルにおける標的遺伝子のコピー数は、系列希釈したコピー数既知の標的遺伝子DNAを用いて作成した検量線から算出した。各遺伝子の発現量は、GAPDHの発現量を指標として算出した総RNA量で補正した。標的遺

伝子に対するプライマーの配列は表5に記す。

表5 RT-PCRに用いたプライマーの配列			
標的遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー	
ラット <i>Col2a1</i>	CTGCCAGGACCTGAAACTCT (25)	CGTCGGCGTAGCTGAAGT (26)	
ラット <i>Agc1</i>	AGAACCATCGAAGGGGACTT (27)	GATCTTTCTTCTGCCCAAGG (28)	

()内の数字は配列番号を示す。

イオノマイシンの添加によって発現上昇したII型コラーゲン遺伝子およびア

グリカン遺伝子は、W-7の存在下で用量依存的に抑制された（図7aおよびb）。このことは、軟骨前駆細胞におけるカルシウムシグナルは、CaMを介して軟骨基質遺伝子の発現を誘導することを示唆する。

5 実施例8 RNAディファレンスプロット法を用いた、*in vivo*におけるアレルのCALM1発現量比較

- 16C>TのCALM1転写調節に対する作用を*in vivo*で評価するため、-16C>Tのヘテロ接合体から採取した軟骨細胞におけるCALM1の発現量を、RNAディファレンスプロット法 [*J. Hum. Genet.* 49: 635-641 (2004)] を用いて各アレルごとに
- 10 定量、比較した。方法を以下に示す。表6に示す蛍光標識したプライマーを用いて、-16C>Tのヘテロ接合体から採取した軟骨細胞由来のcDNAおよびゲノムDNAを鋳型として、PCRを行った。プライマーはCALM1のエクソン1内に存在する+114G>Aを含む領域を増幅するように設計した。使用したサンプルにおける-16-
- 15 +114のハプロタイプはC-GおよびT-Aであることを当該領域のクローニングにより確認した。PCR産物をフォルムアミドで変性した後、SF5200オートシーケンサー（日立）にて電気泳動を行った。各アレルのシグナル強度はAllele Links（日立）を用いて解析した。この実験は、PCRを独立に9回行った。各アレルの発現量は、cDNAを鋳型とした場合の値を、ゲノムDNAを鋳型とした場合の値で補正した。

表 6 RNAディファレンスプロットに用いたプライマーの配列

フォワードプライマー	リバースプライマー
CAGTGGTGCTGGGAGTGC (29)	GAAAGGAGGAAGAGCAGAGG (30)

()内の数字は配列番号を示す。

その結果、+114Aに対する+114G（それぞれ-16Tと-16Cに対応）の発現比は1.09（99%信頼区間：1.04-1.15）であった。このことは、-16T由来のCALM1発現量は-16C由来のCALM1発現量よりも低いことを意味する。

実施例9 CALM1とASPNの組み合わせ解析

アスロリン遺伝子 (ASPN) は、後記実施例に示される通り、変形性股関節症および変形性膝関節症と高い相関を示す。我々は、CALM1とASPNが共同して変形性股関節症の発症リスクを高めるかについて検討した。方法を以下に示す。変形性股関節症323人および対照374人を、CALM1 IVS3-293C>TとASPNのアスパラギン酸繰返し多型の組み合わせによって2 x 3表に分配した (表7)。その2 x 3表に基づき、非疾患感受性アレルのホモ接合体の組み合わせに対するオッズ比を計算した。CALM1およびASPNの疾患感受性アレルはそれぞれTおよびD14である。

表 7 CALM1 と ASPN の組み合わせ解析

		ASPNのジェノタイプ				オッズ比 (95% 信頼区間)	
		股関節OA		対照			
		D14*	その他	D14*	その他	D14*	その他
CALM10D ジェノタイプ	TT	10	37	1	23	13.16 (1.66-104.06)	2.12 (1.20-3.73)
	GT	23	99	15	142	2.02 (1.01-4.02)	0.92 (0.65-1.29)
	CC	21	133	18	175	1.54 (0.79-3.00)	1

*アスパラギン酸の繰り返し多型のホモおよびヘテロ接合体の和

オッズ比は、CALM1 の疾患感受性アレルのホモ接合体と ASPN の D14 アレルの組み合わせで最も高い値を示した。このことは CALM1 と ASPN が共同して変形性股関節症の発症リスクを高める可能性を示唆する。

実施例10 オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析による正常およびOA関節軟骨におけるアスボリンの発現量の比較

アスボリンの発現解析は約6万種類のターゲット配列に対するオリゴヌクレオチドプローブから構成されるマイクロアレイセット (GeneChip U95およびU133, Affymetrix) を用いて行った。ビオチン化cRNAの調製とアレイハイブリダイゼーションなどの一連の操作はAffymetrix GeneChip expression analysis manualに準じて行った。OA軟骨および正常関節軟骨のRNAは、武田薬品工業(株)の社内倫理委員会の承認の下にDirect Clinical Access社より購入した。まず Total RNA 5-10 μ g を鋳型とし、T7-poly T primer と Superscript II (Invitrogen) を用いてfirst strand cDNAを合成した。次に、*E. coli* DNA polymerase I (Invitrogen) と ligase (Invitrogen) を用いてsecond strand cDNAを合成した。得られた二本鎖cDNAを用いてビオチン化UTPとCTP (Enzo Diagnostics) の存在下で*in vitro* transcription (Ambion) を行った。Tris (pH 8.1), 100 mM 酢酸カリウム, 30mM 酢酸マグネシウムを含むバッファー中、94°Cで30分間インキュベートすることによりビオチン化cRNAを断片化し、アレイハイブリダイゼーションを行った。洗浄および染色は専用のFluidics Station (Affymetrix) を用いて行った。シグナルは専用のConfocal Scanner (MolecularDynamics) を用いて検出した。アレイハイブリダイゼーションシグナルはGeneChip analysis softwareによって“presence”と判定された全遺伝子のシグナル値の中央値を1として標準化した。上記の方法により、膝関節OA患者由来関節軟骨 (n=5)、股関節OA患者由来軟骨 (n=5)、正常膝関節軟骨 (n=3)、および正常股関節軟骨 (n=3) より抽出したtotal RNAから作製したビオチン化cRNAを用いてアスボリンのマイクロアレイ解析を行った結果、膝関節OAと股関節OAの両方において各々の関節由来正常軟骨と比べてアスボリンmRNA発現量が有意に増加していることがわかった (p<0.01, 図8)。すなわち、アスボリンがヒトOA関節軟骨で発現量が上昇する遺伝子であることが明らかとなった。

実施例11 アスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型のタイピング

日本人一般集団、および三重県宮川村コホート (cohort) 集団を用いて、変形性関節症の相関解析を行った。日本人一般集団は、膝関節OA患者393人、股関節OA患者593人、および非OA患者 (対照) 374人により構成された。三重県宮川村コホートは、膝関節OA患者137人、非OA患者 (対照) 234人により構成された。これらの患者より得た末梢血より調製したDNAサンプルを用いて、アスポリンN末にあるアスパラギン酸繰り返し多型 (塩基配列: GAT) の繰り返し数のタイピングを以下の方法により行った。繰り返し多型の領域をはさむ蛍光プライマーペア (Applied Biosystems)、すなわち6-FAMラベル化センス鎖プライマー (ATTCCTGGCTTTGTGCTCTG; 配列番号: 31) およびテイルドアンチセンス鎖プライマー (TGGCTTCTTGGCTCTCTGT; 配列番号: 32) を各々3 pmol, 10×ExTaqバッファ 1.5 μ l, 2.5 mM デオキシリボヌクレオチド溶液 1.2 μ l, ジメチルスルホキシド (DMSO) 1.5 μ l, ExTaq (宝酒造) 0.3 μ l, 2.5 ng/ μ l DNA溶液 1.5 μ lを含む混合液15 μ lを調製し、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、94°Cで8分置いた後、94°Cで30秒、60°Cで30秒、72°Cで30秒を1サイクルとして35サイクル各反応を繰り返し、さらに72°Cで7分間反応させるというプログラムでPCRを行った。反応終了後、105 μ lの蒸留水を加え、ボルテックスミキサーで1秒x3回混合した。1 mlのHi-Diホルムアミド (Applied Biosystems) あたり40 μ lのGENESCAN-500 [ROX] (Applied Biosystems) を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) に10 μ l/wellずつ分注した。その中に、蒸留水で希釈したPCR反応液を1.5 μ l/wellずつ加え、95°Cで5分間加熱した後、氷中5分以上静置した。このようにして調製した反応液をABI PRISM 3700 DNA Analyzerを用いてキャピラリー電気泳動を行った後、GeneScan Analysis 3.5 (Applied Biosystems) およびGenotyper 3.7 (Applied Biosystems) を用いて D (GAT) の繰り返し数のタイピングを行った。その結果、繰り返し数はD10からD19まで観察され、D14だけが、すべてのOA患者サンプルにおいて、一般集団およびコホ

ート非OA患者よりも頻度が高い傾向が認められた（表8）。一方、D13は、OA・非OAを問わず、最も高頻度に認められるアレルであるが、OAでは頻度が低い傾向が認められた。以上の結果から、D14が疾患アレル、D13が保護アレルであることがわかった。

表 8 日本人膝関節OAおよび股関節OA患者におけるアスポリンアスバギン酸繰り返し多型のアレル頻度		D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	Total
集団	アレル											
コホート膝関節OA (N=137)	数	0	0	36	163	30	14	15	15	1	0	274
	頻度 (%)	0	0	13.1	59.5	10.9	5.1	5.5	5.5	0.36	0	100
コホート非OA (N=234)	数	0	0	63	314	22	22	31	16	0	0	468
	頻度 (%)	0	0	13.5	67.1	4.7	4.7	6.6	3.4	0	0	100
一般集団膝関節OA (N=393)	数	1	0	121	459	61	34	84	26	0	0	786
	頻度 (%)	0.13	0	15.4	58.4	7.8	4.3	10.7	3.3	0	0	100
一般集団股関節OA (N=593)	数	0	1	185	731	94	37	104	34	0	0	1186
	頻度 (%)	0	0.08	15.6	61.6	7.9	3.1	8.8	2.9	0	0	100
一般集団非OA (N=374)	数	0	1	104	479	36	34	57	35	1	1	748
	頻度 (%)	0	0.13	13.9	64	4.8	4.5	7.6	4.7	0.13	0.13	100

実施例12 アスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型と日本人における
膝関節OAとの相関解析

- 実施例11で得られた結果に基づき、ケース-コントロール相関解析を以下のよ
5 うにして行った。すなわち、日本人一般集団膝関節OA患者（n=393）をケース、
非OA患者（n=374）をコントロールとし、両集団におけるD14アレルの頻度の差、
およびD14アレル保有者（ヘテロまたはホモ）頻度の差を χ^2 二乗法により検定し
た。その際、D14に対する比較の対象は、D14以外のすべてのアレルを用いた。
その結果、日本人一般集団膝関節OAでD14アレルの頻度およびD14アレル保有者
10 頻度が非OAと比べて有意に高いことがわかった（表9）。

表9 アスپرリンアスパラギン酸繰り返し多型と日本人膝関節OAおよび股関節OAとの相関解析 (D14アレル)

比較された集団	遺伝子型		アレル			
	D14/- ^a vs それ以外		D14/- ^a vs それ以外		D14 vs D13	
	P値	オッズ比	95%信頼区間	P値	オッズ比	95%信頼区間
コホート						
膝関節OA vs 非OA	0.002	2.61	1.4-4.8	0.0013	2.49	1.4-4.4
一般集団						
膝関節OA vs 非OA	0.016	1.73	1.1-2.7	0.018	1.66	1.1-2.5
コホート+一般集団						
膝関節OA vs 非OA	3E-04	1.95	1.4-2.8	0.0002	1.87	1.3-2.6
股関節OA vs 非OA	0.004	1.84	1.2-2.8	0.0078	1.7	1.1-2.5

^a D14アレルをヘテロまたはホモで持つ人

次に、上記の集団とは異なる集団を用いてケース-コントロール相関解析を以下のように行った。すなわち、三重県宮川村コホートにおける膝関節OA患

者 (n=137) をケース、非OA患者 (n=234) をコントロールとし、両集団におけるD14アレルの頻度の差、およびD14アレル保有者 (ヘテロまたはホモ) 頻度の差を χ^2 乗法により検定した。その際、D14に対する比較の対象は、D14以外のすべてのアレルを用いた。その結果、膝関節OAでD14アレルの頻度およびD14アレル保有者頻度が非OAと比べて有意に高いことがわかった (表6)。以上の結果から、独立した2つの集団でアスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型が日本人膝関節OAと有意に相関することが明らかとなった。

さらに、上記の一般集団とコホートとを併せたときのケース-コントロール相関解析を以下のようにして行った。すなわち、日本人膝関節OA患者 (n=530) をケース、非OA患者 (n=608) をコントロールとし、両集団におけるD14アレルの頻度の差、およびD14アレル保有者 (ヘテロまたはホモ) 頻度の差を χ^2 乗法により検定した。その際、D14に対する比較の対象は、D14以外のすべてのアレルを用いた。その結果、一般集団とコホートを併せることによりD14アレルの頻度およびD14アレル保有者頻度がより有意に高くなることがわかった (表9)。

また、疾患アレルであるD14との比較の対象を保護アレルであるD13として上記と同様に一般集団、コホート、一般集団+コホートの場合においてケース-コントロール相関解析を行ったところ、いずれの集団を用いた場合もD14以外のすべてのアレルを比較の対象とした場合よりも、ケース-コントロール間でのD14アレル頻度の差の有意差がより顕著になることがわかった (表9)。したがって、アスポリンD14とアスポリンD13との間に膝関節OAになりやすい (なりにくい) 体質を作り得るような何らかの機能的な差があることが示唆された。

実施例13 アスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型と日本人における股関節OAとの相関解析

実施例11で得られた結果に基づき、ケース-コントロール相関解析を以下のようにして行った。すなわち、日本人一般集団股関節OA患者 (n=593) をケース、非OA患者 (n=374) をコントロールとし、両集団におけるD14アレルの頻度の差、

およびD14アレル保有者（ヘテロまたはホモ）頻度の差を χ^2 乗法により検定した。その結果、日本人一般集団股関節OAでD14アレルの頻度およびD14アレル保有者頻度が非OAと比べて有意に高いことがわかった（表9）。以上の結果から、アスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型が日本人における股関節OAと

5 有意に相関することが明らかとなった。

次に、疾患アレルであるD14との比較の対象を保護アレルであるD13としたときの、両集団におけるD14アレルの頻度の差を χ^2 乗法により検定した。その結果、D14以外のすべてのアレルを比較の対象とした場合よりも、ケース-コントロール間でのD14アレル頻度の差の有意差がより顕著になることがわかった（表

10 9）。したがって、アスポリンD14とアスポリンD13との間に股関節OAになりやすい（なりにくい）体質を作り得るような何らかの機能的な差があることが示唆された。

実施例14 アスポリン遺伝子の連鎖不平衡解析

15 理研内部で保有している全8疾患（股関節OA、膝関節OA、心筋梗塞、糖尿病性腎症/網膜症、肥満、慢性関節リウマチ、喘息、慢性肝疾患）患者DNAサンプルより得られたSNPタイピングデータを用いて、以下の方法により連鎖不平衡マッピングを行った。すなわち、アスポリン遺伝子およびその周辺遺伝子を含む約500 kbの領域内より、マイナーアレル頻度が20%以上である15個のSNPを選択し、

20 連鎖不平衡定数 D' を用いて連鎖不平衡マップを作製した。その結果、アスポリン遺伝子は一つの連鎖不平衡ブロック内に完全に含まれていることがわかった（図9a, b）。以上の結果から、アスポリン遺伝子内でアスパラギン酸繰り返し多型を上回る有意な相関を示す多型がないことを示すためには、アスポリン遺伝子全体から多型を探す必要があることがわかった。

25

実施例15 アスポリン遺伝子内の一塩基多型（SNP）と三重県宮川村コホートサンプル中の膝関節OAとの相関解析

日本人一般集団膝関節OAおよび宮川村コホートの中でD14をホモまたはヘテロで保有する人から調製したDNAサンプルを用いて、アスポリン遺伝子の5' 上流5 kb, 全exon, 3' 下流領域, 並びにexon-intron junctionについてシーケンスを行い、多型探索を行った。その過程で見つかった中で比較的高頻度に認められた7つの多型 (6 SNPsと1欠失; 図9a, 下段) を選び、宮川村コホートサンプルを用いてgenotypingを行った。相関解析の結果, 有意な相関を示すものはなかった (表10)。

表 10 アスポリン遺伝子一塩基多型 (SNP) と三重県宮川村コホートサンプル
中の膝関節OAとの相関解析

SNPの 存在位置	アレル頻度		P値
	非OA	膝関節OA	
-11392	0.169	0.207	0.197
-10109	0.179	0.185	0.852
-8294	0.198	0.210	0.702
-443	0.068	0.074	0.759
8133	0.177	0.185	0.795
17932	0.240	0.261	0.528
18351	0.215	0.221	0.852

実施例16 アスポリン遺伝子のアスパラギン酸繰り返し多型におけるD14アレル
保有者頻度と日本人膝関節OAの重症度との相関

実施例11で得られた結果に基づき、膝関節OAの重症度とD14アレル保有者頻度との関係を日本人一般集団膝関節OAおよびコホートについて調べた。その結果、両集団とも疾患の重症度が高いほどD14保有者頻度が高い傾向が認められた（図10）。したがって、遺伝子型（genotype）と表現型（phenotype）とが相関する
5 ことがわかった。

実施例17. ヒトアスポリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株の取得

ヒトアスポリンをマウス軟骨幹細胞株であるATDC5細胞に安定発現させるためのプラスミドDNAを以下のようにして調製した。まず、以下に記す方法により、
10 ヒトアスポリンD13およびD14の全長cDNAを取得した。KOD-plus（東洋紡）を用い、添付プロトコールに記載された方法に従って反応液を調製した。プライマーは25 μ lの反応液当り、開始コドンと制限酵素Xho Iサイトを含むセンス鎖プライマーとアスポリンの終止コドンと制限酵素BamH Iサイトを含むアンチセンス鎖プライマーを各々7.5 pmolずつを使用し、鋳型として、アスポリンのアスパ
15 ラギン酸繰り返し多型のD13アレルとD14アレルをヘテロで保有するOA患者の膝関節軟骨から抽出したtotal RNAより調製したcDNA溶液を1 μ l（total RNAとして10 ng）使用した。反応は、Gene Amp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用いて、94℃で2分置いた後、94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で1.5分を1サイクルとして35サイクル各反応を繰り返し、さらに72℃で7分間反
20 応させるというプログラムでPCR反応を行った。増幅されたDNA断片をQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン）を用いて精製した後、制限酵素Xho IとBamH Iで処理を行った。この反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、アスポリンの全長サイズ（1.1 kb付近）に相当するバンドを切り出して、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて精製した。このDNA断片をあらかじめ
25 Xho IとBamH Iで消化してリニア化したpcDNA3.1(-)ベクター（インビトロゲン）とLigation high（東洋紡）を用いて連結させた。このプラスミドDNAを大腸菌コンピテントセルJM109（宝酒造）に形質転換し、アンピシリンを含むLB寒天培

地にまいた。出現したコロニーよりプラスミドDNAを抽出し、挿入DNA断片の塩基配列を確認した。正しい塩基配列を持つ挿入DNA断片を含むクローンをD13とD14についてそれぞれ選択し、該クローンよりアスボリンD13全長cDNAを含むプラスミドDNA (pcDNA3.1-ASP13) およびアスボリンD14全長cDNAを含むプラスミドDNA (pcDNA3.1-ASP14) を取得した。

pcDNA3.1-ASP13およびpcDNA3.1-ASP14をFuGENE-6 (Roche) を用いて添付プロトコール記載の方法にしたがって、ATDC5細胞株に導入した。培地1-1 (5% FBS, ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml), ITS (シグマ) および500 μ g/ml G418 (プロメガ) を含むDMEM/F12培地 (インビトロゲン)) 中で、生き残った細胞から限界希釈法によりヒトアスボリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株クローンを取得した。

実施例18 ヒトアスボリン安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β アイソフォーム (TGF- β s: TGF- β 1, β 2 および β 3) 刺激アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現抑制作用

ヒトアスボリン安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β s刺激によるアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現の定量は以下の方法で行った。実施例17で作製したヒトアスボリン安定発現ATDC5細胞株を培地1-1で培養し、コンフルエントに達した時点でFBSを0.2%にした培地1-1に交換し、12時間前培養した。次に、TGF- β s (いずれも10 ng/ml) を加え、さらに24時間培養した後、Isogen (ニッポンジーン) を用いてtotal RNAを抽出した。Total RNAの精製はSV Total RNA Isolation System (プロメガ) を用いて、キット添付のプロトコールに準じて行った。cDNAはTaqMan Reverse Transcription Reagents (ABI) を用いてrandom primerを鋳型にして合成した。Real-time PCRはQuantiTectSYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いて反応を行い、ABI PRISM 7700を用いて検出、定量した。このような方法で、ヒトアスボリンD13およびD14安定発現ATDC5細胞株におけるTGF- β s刺激によるアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現量を測定し

た結果、両方の株においてmockと比べてTGF- β 1刺激によるアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現量の上昇が抑制された（図11，図12）。これらの株ではヒトアスポリン遺伝子が確かに高発現していることを確認した（図13）。これらの結果より、アスポリンはATDC5細胞においてTGF- β 1刺激による軟骨マーカー

5 遺伝子発現上昇を抑制する作用を有することがわかった。

実施例19 ヒトアスポリン一過性発現ATDC5細胞株におけるTGF- β 1刺激アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現抑制作用

ATDC5細胞を 0.5×10^5 cells/wellで12-well プレートに蒔き、培地1-2（5% FBS, ITS（シグマ），ペニシリン（100 U/ml）およびストレプトマイシン（100 μ g/ml）を含むDMEM/F12培地）中で培養した。その24時間後にFuGENE-6（Roche）を用いてpcDNA3.1-ASP13およびpcDNA3.1-ASP14を導入させ、24時間培養した。次に、FBSを0.2%にした培地1-2に交換して12時間培養した後、TGF- β 1（10 ng/ml）を加え、さらに18時間培養した後、実施例18と同様にしてtotal

10 RNA抽出、精製、cDNA合成、およびReal-time PCRを行った。その結果、アスポリンD13およびD14を一過性に発現させたATDC5細胞においてmockと比べて、TGF- β 1刺激時におけるアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現量の上昇が抑制された（図14）。これより、アスポリンはATDC5細胞において安定発現株と一過性発現株の両方でTGF- β 1刺激による軟骨マーカー遺伝子発現上昇を抑制する作用を有することがわかった。

15

20

実施例20 ヒトアスポリン安定発現ATDC5細胞株の軟骨分化培養過程における軟骨初期分化マーカー遺伝子発現抑制作用

実施例17で作製したヒトアスポリン安定発現ATDC5細胞株を 0.3×10^5 cells/wellで12-wellプレートに蒔き、培地1-1で5，9，15および21日間培養した後、実施例18と同様にしてtotal RNA抽出、精製、cDNA合成、およびreal-time PCRを行った。その結果、mockでは培養9日目にアグリカンおよびII型コラ

25

ーゲン遺伝子発現上昇がピークに達したが、ヒトアスポリンD13およびD14発現株ではこれらの軟骨分化マーカーの発現上昇がみられなかった（図15）。これらの結果より、アスポリンはATDC5細胞における軟骨細胞の分化を抑制する作用を有することがわかった。

5

実施例21 ヒトアスポリンD13およびヒトアスポリンD14を一過性に発現させたATDC5細胞株におけるTGF- β 1刺激によるアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現の抑制活性の比較

実施例19の結果を基に、アスポリンD13とD14の、TGF- β 1刺激時の軟骨分化マーカー遺伝子発現抑制作用の強さを、以下の方法により評価した。まず、MockにおいてTGF- β 1刺激により上昇したアグリカン遺伝子発現量を（AM）、そのときのII型コラーゲン遺伝子発現量を（CM）とする。次に、アスポリンD13の強制発現により抑制されたTGF- β 1刺激時のアグリカン遺伝子発現量を（A13）、そのときのII型コラーゲン遺伝子発現量を（C13）とする。同様に、アスポリンD14の強制発現により抑制されたTGF- β 1刺激時のアグリカン遺伝子発現量を（A14）、そのときのII型コラーゲン遺伝子発現量を（C14）とする。このとき、アスポリンD13発現株におけるTGF- β 1刺激時のアグリカン遺伝子発現抑制率は（A13）/（AM）、II型コラーゲン遺伝子発現抑制率は（C13）/（CM）と表せる。同様に、アスポリンD14発現株におけるTGF- β 1刺激時のアグリカン遺伝子発現抑制率は（A14）/（AM）、II型コラーゲン遺伝子発現抑制率は（C14）/（CM）と表せる。さらに、これらをTGF- β 1刺激時のヒトアスポリンmRNA量で割って補正することにより、ヒトアスポリンmRNA量当りのアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現抑制率を算出した。アスポリンD13とD14におけるこれらの値の平均値の差をStudent's t-testにより有意差検定を行った。その結果、アスポリンD14はD13よりもTGF- β 1刺激時のアグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現抑制作用が有意に強いことがわかった（図16）。以上の結果から、アスポリンD13とD14とは機能的な差があることが明らかとなった。アスポリンD14はD13よりも軟骨

分化抑制作用が強いことから、D14を持つ人の方が持たない人よりも軟骨が生得的に脆弱であり、そのことがOAになりやすい体質をつくる原因となっているのかもしれない。

5 実施例22 プルダウンアッセイ法を用いたヒトアスポリンとTGF- β との結合試験

以下に記す方法により、ヒトアスポリン成熟体の全長cDNAを取得した。KOD-plus（東洋紡）を用いて、添付プロトコールに記載された方法に従って反応液を調製した。プライマーは25 μ lの反応液当り、ヒトアスポリン成熟体のN末端
10 とKpn Iサイトを含むセンス鎖プライマーとアスポリンの終止コドンと制限酵素Xho Iサイトを含むアンチセンス鎖プライマーを各々7.5 pmolずつを使用し、鋳型として実施例17で作製したpcDNA3.1-ASP13およびpcDNA3.1-ASP14を1 μ l使用した。反応は、Gene Amp PCR System 9700（Applied Biosystems）を用いて、94℃で2分置いた後、94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で1.5分を1サイクルとして
15 20サイクル各反応を繰り返し、さらに72℃で7分間反応させるというプログラムでPCR反応を行った。このDNA断片をQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン）を用いて精製した後、制限酵素Kpn I+Xho I処理を行った。この反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、ヒトアスポリン成熟体の全長サイズ（1 kb付近）に相当するバンドを切り出して、QIA quick Gel Extraction Kit（キ
20 アゲン）を用いて精製した。このDNA断片をあらかじめKpn IとXho Iで消化してリニア化したpET29b(+)ベクター（Novagen）とLigation high（東洋紡）を用いてインフレームになるように連結させた。このプラスミドDNAを大腸菌コンピテントセルJM109（宝酒造）に形質転換し、カナマイシンを含むLB寒天培地にまいた。出現したコロニーよりプラスミドDNAを抽出し、挿入DNA断片の塩基配列を
25 確認した。正しい塩基配列を持つ挿入DNA断片を含むクローンを選択し、該クローンよりヒトアスポリン成熟体の全長cDNAを含むプラスミドDNA（pET29b-ASP13およびpET29b-ASP14）を取得した。

このようにして作製したpET29b-ASP13およびpET29b-ASP14を鋳型として、S-タグ付きヒトアスポリンD13およびD14をTNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (プロメガ) を用いてTranscend™ Biotin-Lysyl-tRNAの存在下で反応を行うことにより調製した。S-タグ付きヒトアスポリンD13およびD14を含む反応液 (10 μ l) とTGF- β 1 (0.1 μ g) を、バッファA (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche)) 中、4°Cで1時間混合した後、S-プロテインアガロース (Novagen, 12.5 μ l) を加え、さらに室温で30分間インキュベートした。沈澱させたレジンをバッファAで5回洗浄した後、還元条件下でSDS-PAGEを行った。沈殿物中のS-タグ付きヒトアスポリンはストレプトアビジン-HRP (R&D Systems) を、TGF- β 1はビオチン化抗TGF- β 1抗体 (Genzyme) を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。以上の方法により、ヒトアスポリンとTGF- β との結合を調べた結果、S-タグ付きヒトアスポリンD13およびD14を含む沈殿物中にはTGF- β 1のバンドが検出された (図17)。

15 以上の結果より、S-タグ付きヒトアスポリンD13およびD14は、TGF- β 1と *in vitro*で結合することがわかった。

実施例23 大腸菌組換え型マウスアスポリンの部分精製

以下に記す方法により、マウスアスポリン成熟体の全長cDNAを取得した。

20 KOD-plus (東洋紡) を用いて、添付プロトコールに記載された方法に従って反応液を調製した。プライマーは25 μ lの反応液当たり、マウスアスポリン成熟体のN末端とBamH Iサイトを含むセンス鎖プライマーとアスポリンの終止コドンと制限酵素Hind IIIサイトを含有アンチセンス鎖プライマーを各々7.5 pmolずつを使用し、鋳型としてマウスATDC5細胞株から抽出したtotal RNAより調製した

25 cDNA溶液を1 μ l (total RNAとして10 ng) 使用した。反応は、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、94°Cで2分置いた後、94°Cで15秒、55°Cで30秒、68°Cで1.5分を1サイクルとして35サイクル各反応を繰り返し、

さらに72℃で7分間反応させるというプログラムでPCR反応を行った。増幅されたDNA断片をQIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製した後、制限酵素BamH I+Hind III処理を行った。この反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、マウスアスボリン成熟体の全長サイズ (1 kb付近) に相当する

5 バンドを切り出して、QIA quick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて精製した。このDNA断片をあらかじめBamH IとHind IIIで消化してリニア化したpET29b(+)ベクター (Novagen) とLigation high (東洋紡) を用いてインフレームになるように連結させた。このプラスミドDNAで大腸菌コンピテントセルJM109 (宝酒造) を形質転換し、カナマイシンを含むLB寒天培地にまいた。出現

10 したコロニーよりプラスミドDNAを抽出し、挿入DNA断片の塩基配列を確認した。正しい塩基配列を持つ挿入DNA断片を含むクローンを選択し、該クローンよりマウスアスボリン成熟体の全長cDNAを含むプラスミドDNA (pET29b-MASP) を取得した。このpET29b-MASPで、さらに、大腸菌*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS株を形質転換し、カナマイシンを含むLB寒天培地上で生育した大腸菌株 (*E. coli*

15 Rosetta (DE3) pLysS/pET29b-MASP) を取得した。

この大腸菌株 (*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS/pET29b-MASP) を用いて、カナマイシンを含むLB培地中、37℃でOD600値が0.5になるまで培養した後、終濃度1 mMになるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加して、さらに30℃で6時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して集菌し、

20 その菌体をBugBuster Reagent (Novagen) に懸濁し、Benzonase (Novagen) 処理を室温で20分間行った。この反応液を10,000 rpmで20分間、4℃で遠心分離した後の上清を可溶性画分とした。タンパク量はProtein Assay Reagent (BioRad) を用いて測定した。この可溶性画分のバッファー交換を行うため、バッファーS (4 M グアニジン塩酸, 50 mM マレイン酸ナトリウムバッファー (pH

25 6.0), 0.05% CHAPS, 10 mM EDTA) に置換した。次に、このタンパク溶液をAmicon Ultra-4 10,000MWCO を用いて濃縮した後、AKTAExplorer 100 (Amersham) に取り付けしたSuperose 12カラム (Amersham) を用いたゲル濾過を

バッファーS中で行うことにより分画した。S-プロテイン-HRPを用いたウエスタンブロッティングによりSタグ付きマウスアスボリンの溶出位置を確認し、Sタグ付きマウスアスボリンを含むフラクションを再度AmiconUltra-4 10,000MWC0を用いて濃縮した後、再度ゲル濾過を行った。この操作をもう一度繰り返して得られたフラクションを透析により Complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche) を含むPBSに交換した。このようにして得られたタンパク溶液をFr. 18-21とした。このフラクションについてSDS-PAGEを行い、クマシー染色でタンパクのバンドを検出したところ、Sタグ付きマウスアスボリンの分子量に相当するバンド以外にまだ数本のバンドが検出された (図18a)。また、このフラクション中にSタグ付きマウスアスボリンが含まれることはS-プロテイン-HRPを用いたウエスタンブロッティングにより確認した (図18b)。このようにして得られたFr. 18-21をSタグ付きマウスアスボリンの部分精製品として、以下の結合実験に使用した。

15 実施例24 マイクロプレートアッセイ法を用いたマウスアスボリンとTGF- β との結合試験

マイクロプレートアッセイ法を用いたマウスアスボリンとTGF- β との結合試験をビオチン化デコリンとTGF- β との結合阻害度を指標として以下のようにして行った。Nunc社Maxisorp 96-well マイクロプレートに0.05 M 炭酸ナトリウムバッファー (pH 9.6) で調製した1 μ g/ml TGF- β 1溶液を100 μ l/wellずつ分注し、4°Cで一晩コーティングした。TGF- β -coated wellを200 μ l/wellの結合バッファー (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2% BSA, 0.05% Tween20) 中、37°Cで3時間ブロッキングした。wellを400 μ l/wellの結合バッファーで1回洗浄した後、well当り全量が100 μ lになるように結合バッファーで調製した25 ビオチン化デコリンと非ラベル化タンパクを添加し、37°Cで6時間インキュベートした。wellを400 μ l/wellの結合バッファーで3回洗浄した後、結合バッファーで200倍希釈したストレプトアビジン-HRP (R&D System) を100 μ l/wellずつ

加え、室温で20分間インキュベートした。wellを400 μ l/wellの結合バッファーで3回洗浄した後、TMB Peroxidase Substrate Kit (BIO-RAD) 添付の発色試薬を100 μ l/wellずつ加え、37°Cで15分間インキュベートした。1 M リン酸を直接100 μ l/wellずつ添加して反応を停止させ、Ultramark Microplate Imaging System (BIO-RAD) を用いて415 nm (対照: 750 nm) の吸光度を測定した。S-タグ付きマウスアスボリンのTGF- β 1固相との結合評価は、標識体としてS-プロテイン-HRPを用い、ウェルの洗浄と標識体の希釈をTBST (20 mM Tris (pH 8), 0.15 M NaCl, 0.05% Triton X-100) で行った以外は上記と同様にして行った。

10 トロンビン消化は4 μ gのFr. 18-21を含む100 μ lの反応系にビオチン化トロンビン 0.5 Uを添加し、室温で一晩反応させることにより行った後、ストレプトアビジンアガロース (50% スラリー) を20 μ l加え、室温で30分間攪拌した後遠心することにより、ビオチン化トロンビンを除去した。このときの上清を結合実験に用いた。

その結果、Fr. 18-21にはタンパク量依存的にビオチン化デコリンのTGF- β 1との結合を阻害する活性が認められた (図19a)。すなわちFr. 18-21にはTGF- β 1中のデコリン結合部位と同じ場所に特異的に結合するタンパクが含まれることがわかった。次に、この活性がS-タグ付きマウスアスボリンによるものであるかどうかを調べるために、結合アッセイの際の検出を、ストレプトアビジン-HRPを用いて行った。その結果、S-タグ付きマウスアスボリンの結合が認められた (図19b)。さらに、この結合は、トロンビン消化により消失したことから、Fr. 18-21中に認められたデコリン-TGF- β 1結合阻害活性がS-タグ付きマウスアスボリン中のアスボリン部分とTGF- β 1との結合を介するものであることがわかった (図19b)。

25 実施例25 ヒトアスボリンを一過性に発現させたCOS7細胞株における培養上清中および細胞抽出画分におけるアスボリンタンパクの検出

細胞におけるヒトアスボリンタンパクの発現を確認する目的で、アスボリン成

熟体のN末にHAタグを付与したHAタグ付きアスポリンを発現させるためのプラスミドDNAを以下のようにして調製した。まず、実施例22で作製したpET29b-ASP13およびpET29b-ASP14を制限酵素Kpn IとXho Iで消化し、この反応液をアガロースゲル電気泳動し、予想サイズに相当するバンドを切り出して、QIA quick Gel
5 Extraction Kit (キアゲン) を用いて精製した。これらのDNA断片とHAタグカートリッジ (Hind IIIを5'末端に、Kpn Iを3'末端に含むように作製したもの) をあらかじめHind IIIとXho Iで消化してリニア化したpSecTag2Aベクター (インビトロゲン) とLigation high (東洋紡) を用いて連結させた。このプラスミドDNAで大腸菌コンピテントセルJM109 (宝酒造) を形質転換し、アンピシリンを含むLB寒天培地にまいた。出現したコロニーよりプラスミドDNAを抽出し、挿入DNA断片の塩基配列を確認した。正しい塩基配列を持つ挿入DNA断片を含むクローンをD13とD14についてそれぞれ選択し、該クローンよりHAタグ付きアスポリン成熟体D13を含むプラスミドDNA (pSecTag2A-HA-ASP13) およびHAタグ付きア
10 スポリン成熟体D14を含むプラスミドDNA (pSecTag2A-HA-ASP14) を取得した。
15 このようにして取得したプラスミドを以下の実験に使用した。

COS7細胞を 0.5×10^5 cells/wellで12-well プレートに蒔き、10% FBS, ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含むDMEM培地中で培養した。24時間後にFuGENE-6 (Roche) を用いてpSecTag2A-HA-ASP13およびpSecTag2A-HA-ASP14を導入させ、24時間培養した。培地を無血清のDMEMに交換
20 し、さらに24時間培養を継続した。上清を回収し、AmiconUltra-4 10,000MWCOを用いて100倍に濃縮した。細胞抽出液は、細胞にM-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE) を50 μ l/well加え、ピペッティングすることにより調製した。このようにして得られたサンプルを用いてHA-HRPを用いたウェスタンブロッティングを行った結果、ヒトアスポリン成熟体の分子量に相当する
25 位置にバンドが検出された (図20)。以上の結果から、ヒトアスポリンはCOS7細胞においてタンパクとして培養上清および細胞抽出液中に発現することがわかった。

実施例26 アスポリンとコラーゲンとの結合試験

アスポリンとコラーゲンとの結合試験を以下に示す方法により行った。コラーゲンは、酸可溶性II型コラーゲン溶液 (KOKEN, 3 mg/ml) および酸可溶性I型コラーゲン溶液 (I-C: 新田ゼラチン, 3 mg/ml) を用いた。酸可溶性コラーゲン溶液 (3 mg/ml) 5 μ l、実施例13に示す方法により調製したS-タグ付きヒトアスポリン反応液を5 μ l、および90 μ lのPBSを含む反応液を調製し、37°Cで5時間インキュベートした。この反応液を遠心分離 (10,000 rpm, 5分間, 4°C) した後、沈澱をPBSで3回洗浄した。洗浄した沈澱を20 μ lのサンプルバッファー (2-メルカプトエタノールを1 μ l含む) に溶解した後、SDS-PAGEを行い、ストレプトアビジン-HRPを用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、S-タグ付きヒトアスポリンD13およびD14はII型コラーゲンとI型コラーゲンの両方と結合した (図21a)。ポジティブコントロールとして用いたデコリンはII型コラーゲンとI型コラーゲンの両方と結合し、ネガティブコントロールであるバイグリカンはいずれのコラーゲンとも結合しなかった (図21b)。以上の結果から、ヒトアスポリンはII型コラーゲンとI型コラーゲンの両方と結合することがわかった。

実施例27 各種軟骨系細胞株におけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導

各種軟骨系細胞株についてTGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導能を以下の方法により調べた。OUMS-27は10% FBSを含むDMEMで、CS-OKBは10% FBSを含むRPMI1640で、正常ヒト膝関節軟骨細胞 (NHAC-kn, P7, monolayer, Clonetics) はChondrocyte Growth Medium (CGM, Clonetics) を用いて培養した。ATDC5は実施例13に記載した培地1-2を用いて培養した。軟骨系細胞株における誘導実験は、上記の培地中で細胞がコンフルエントに達するまで培養した後、0.2% FBSを含む培地に交換して12時間培養し、TGF- β 1 (10 ng/ml) を加えてさ

らに24時間培養した。RNAの抽出、cDNA合成、リアルタイムPCRは実施例12に記載した方法で行った。その結果、NHAC-knおよびOUMS-27でTGF- β 1刺激による有意なアスポリン遺伝子発現の上昇がみられた (図22)。一方、軟骨幹細胞であるATDC5では、アスポリンの発現はTGF- β 1刺激によりやや抑制傾向が認められた (図22)。これらの結果から、NHAC-knおよびOUMS-27でTGF- β 1刺激によりアスポリン遺伝子の発現が誘導されることがわかった。

実施例28 ヒト膝関節OA軟骨組織およびヒト軟骨系細胞株におけるTGF- β 1、 β 2および β 3遺伝子発現量の比較

10 ヒト膝関節OA軟骨組織 (2例) およびヒト軟骨系細胞株 (正常ヒト膝関節軟骨細胞: NHAC-kn, OUMS-27およびCSOKB) におけるTGF- β 1、 β 2および β 3遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで調べた。また、膝関節OA (1例)、股関節OA (5例)、正常膝関節 (1例) および正常股関節 (1例) について、実施例1に記載の方法でオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析によるTGF- β 1、 β 2および β 3遺伝子の
15 発現量を調べた。その結果、調べたすべての関節軟骨組織ではTGF- β 1>TGF- β 3>TGF- β 2の順に発現量が多く、調べたすべての軟骨系細胞においてTGF- β 1>TGF- β 2>TGF- β 3の順に発現量が多かった (図23)。すなわち、正常軟骨、OA軟骨および軟骨系細胞のいずれにおいても、TGF- β 1が最も多く発現していることがわかった。

20

実施例29 ヒトアスポリン安定発現CHO-K1細胞株の取得

ヒトアスポリン安定発現CHO-K1細胞株は、上記実施例11で調製したプラスミドDNAを用いて以下の方法により取得した。すなわち、pcDNA3.1-ASP13およびpcDNA3.1-ASP14を、FuGENE-6 (Roche) を用い、添付のプロトコールに記載の方法に従って、CHO-K1細胞株に導入した。培地2-1 (10% FBS, ペニシリン (100
25 U/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) および500 μ g/ml G418 (プロメガ) を含むHam's-F12培地 (インビトロゲン)) 中で、生き残った細胞から限界希釈法

によりヒトアスポリンD13およびD14安定発現CHO-K1細胞株クローンを取得した。

実施例30 ヒトアスポリン安定発現ATDC5細胞株における細胞外プロテオグリカン蓄積低下作用

- 5 実施例17で作製したヒトアスポリン安定発現ATDC5細胞株を実施例20に記載した方法で培養を行い、培養開始後21日目の細胞を用いてアルシアンブルー染色を以下のようにして行った。まず、培地を吸引して除き、冷PBSで細胞表面を3回洗浄した後、メタノール固定を4℃で2分間行った。メタノールを吸引で除去し、蒸留水で細胞を1回リンスした後、0.1% アルシアンブルー8GX (Sigma)/3% 酢酸溶液を用いて4℃で2日間細胞を染色した。染色液を除去し、蒸留水で3回洗
- 10 浄した後、顕微鏡下で観察し、写真撮影を行った。その後、細胞を6 M グアニジン塩酸水溶液で処理することにより染色されたプロテオグリカンを抽出した後、630 nmの吸光度を測定した。その結果、アルシアンブルーによる染色度はmock>D13>D14の順に有意に強かった (図24a, b)。以上の結果から、アスポリン
- 15 はATDC5細胞におけるプロテオグリカン蓄積量を低下させる作用を持つことが明らかとなった。

実施例31 大腸菌組換え型マウスアスポリンの精製

- 実施例23に記載した方法で取得した大腸菌株 (*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS/pET29b-MASP) を用いてカナマイシンを含むLB培地中、37℃でOD600値が
- 20 0.5になるまで培養した後、終濃度1 mMになるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに37℃で2時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して集菌し、その菌体をBugBuster Reagent (Novagen) に懸濁し、Benzonase (Novagen) 処理を室温で20分間行った。この反応液を10,000
- 25 rpmで20分間、4℃で遠心分離した後の沈殿物を、蒸留水で10倍希釈したBugBuster Reagentを用いてさらに3回洗浄したものを不溶性画分とした。この不溶性画分をProtein Refolding Kit (Novagen) を用いてキット添付のプロト

コールに準じて可溶化および透析を行った。さらに、この透析後のタンパク溶液をAKTAEplorer 100 (Amersham) に取り付けたSuperose 12カラム (Amersham) を用いたゲル濾過により分離した。以上の操作で調製したタンパク溶液を用いて SDS-PAGEを行い、クマシブリリアントブルー染色を行った結果、組換え型マウスアスボリンの分子量に相当する単一のバンドが得られた (図25)。よって、上記の方法により大腸菌で発現させた組換え型マウスアスボリンを精製できることがわかった。

実施例32 精製組換え型マウスアスボリンのTGF- β 1結合活性

10 実施例31に記載した方法で精製した組換え型マウスアスボリンを用いて実施例22に記載した方法 (プルダウンアッセイ法) によりTGF- β 1との結合能を調べた結果、精製マウスアスボリンの沈殿物中にTGF- β 1が検出されることを確認した (図26)。以上の結果より、精製マウスアスボリンがTGF- β 1と *in vitro* で結合することがわかった。

15

実施例33 精製組換え型マウスアスボリンのATDC5細胞におけるTGF- β 1刺激アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現抑制活性

ATDC5細胞を 1×10^5 cells/wellで12-well プレートに蒔き、培地1-2 (5% FBS, ITS (シグマ), ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含むDMEM/F12培地) 中で2日間培養した。細胞にFBSを0.2%にした培地1-2で希釈した精製マウスアスボリンを添加し、さらに12時間培養した後、TGF- β 1 (10 ng/ml)を加え、さらに18時間培養した後、実施例18と同様にしてtotal RNA抽出、精製、cDNA合成、およびreal-time PCRを行った。このとき、アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現量はグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子発現量で補正した。その結果、精製マウスアスボリンの添加量に依存してTGF- β 1刺激アグリカンおよびII型コラーゲン遺伝子発現を抑制する活性が認められた (図27)。これより、精製マウスアスボリンがATDC5

25

細胞においてTGF- β 1刺激による軟骨マーカー遺伝子の発現上昇を抑制する活性を有することがわかった。

実施例34 マイクロプレートアッセイ法を用いた精製組換え型マウスアスポリ 5 ンとTGF- β との結合試験

実施例24に記載した方法を一部改変して以下のようにして行った。Nunc社
Maxisorp 96-well マイクロプレートに0.05M 炭酸ナトリウムバッファー (pH
9.6) で調製した1 μ g/ml TGF- β 1溶液を100 μ l/wellずつ分注し、4℃、一晩
コーティングした。TGF- β でコーティングしたwellを、200 μ l/wellのブロッ
10 クケース中で37℃、3時間ブロッキングした。次にwell当りtotal volumeが100
 μ lになるようにブロッケースで希釈したマウスアスポリンとビオチン化マウ
スアスポリンを添加し、4℃で一晩インキュベートした。wellを400 μ l/wellの
TBSTで3回洗浄した後、TBSTで1000倍希釈したストレプトアビジン-アルカリフ
ォスファターゼ (Novagen) を100 μ l/wellずつ加え、室温で1時間インキュベ
15 ートした。wellを400 μ l/wellのTBSTで5回洗浄した後、アルカリフォスファ
ターゼ基質キット (BIO-RAD) を用いて発色させ、Ultramark Microplate Imaging
System (BIO-RAD) を用いて405 nmの吸光度を測定した。以上の方法でアッセイ
を行うことにより、精製マウスアスポリンがTGF- β 1と濃度依存的にかつ特異的
に結合することがわかった (図28)。

20

実施例35 精製組換え型マウスアスポリンの正常ヒト膝関節軟骨細胞 (NHAC) におけるTGF- β 刺激II型コラーゲンおよびアグリカン遺伝子発現抑制作用

Cambrex社より購入したNHACをキット添付の増殖培地 (Chondrocyte growth
medium, CGM) で10 cmシャーレで培養した後、0.05% Trypsin/EDTAで細胞をは
25 がし、12-well plateに 10^5 cells/wellになるようにまいた翌日に、培地を
DMEM/F12+0.2% FBSに交換し、その5時間後にアスポリンを添加した。さらに12
時間培養した後、TGF- β 1 (40 ng/ml) を添加し、48時間培養した後の細胞から

実施例12に記載した方法に従って、total RNAの調製、cDNA合成、real-time PCRを行った。その結果、マウスアスポリンはNHACにおけるTGF- β 1刺激によるII型コラーゲンおよびアグリカン遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した（図29）。したがって、アスポリンは正常ヒト膝関節軟骨細胞において軟骨特異的マトリックスの発現を低下させる作用を持つことがわかった。

実施例36 精製組換え型マウスアスポリンのATDC5細胞におけるTGF- β 特異的シグナル抑制作用

ATDC5を12-well plateに蒔き、実施例19に記載した培地1-2を用いてコンフルエントになるまで培養した後、FBSを0.2%にした同じ培地に交換し、4時間後にアスポリンを添加した。さらに12時間後にTGF- β 1 (10 ng/ml) を添加し、その5分後にM-PER試薬 (PIERCE) で細胞を溶解した。この細胞抽出液を用いてSDS-PAGEを行い、Cell Signaling社抗体製品に添付されたプロトコールに従ってウェスタンブロッティングを行った。リン酸化Smad2およびSmad2タンパク質の検出のための一次抗体はPhospho-Smad2 antibody (Cell Signaling) およびRabbit anti-Smad2 (Zymed Laboratories) をそれぞれ用いた。二次抗体は抗ウサギIgG-HRP (Cell Signaling) を用いた。その結果、マウスアスポリンはTGF- β 1 (10 ng/ml) 刺激によるSmad2リン酸化を濃度依存的に抑制した（図30）。これより、アスポリンはTGF- β 特異的シグナルを抑制する作用を示すことがわかった。

実施例37 リアルタイムPCR法による正常およびOA関節軟骨におけるアスポリンmRNA発現量の比較

OA関節軟骨は膝関節OA患者 (n=8) の膝より採取した。非OA関節軟骨は大腿骨頸部骨折 (femoralneck fractures, FNF) 患者 (n=9) の大腿骨頭より採取した。これらのFNF患者には関節疾患の発症歴およびレントゲン所見上でのOAの徴候は認められなかった。採取した軟骨組織はただちに液体窒素で凍結させた後、-

80℃で保管した。次いで、凍結組織をCRYO-PRESS（マイクロテック・ニチオン）を用いて粉碎し、ただちにIsogen（ニッポンジーン）を加えて混合し、4℃で2日間shakingすることにより、RNAを抽出した。抽出後は実施例15に記載した方法に従って、total RNAの調製、cDNA合成、リアルタイムPCRを行った。その結果、OA関節軟骨では非OA関節軟骨と比べて約20倍アスポリンmRNA量が高かった（図31）。したがって、アスポリンがOA関節軟骨で著しく発現上昇する疾患感受性遺伝子であることがわかった。

実施例38 ATDC5細胞株におけるTGF- β 1刺激II型コラーゲン遺伝子発現に及ぼすヒトアスポリンD16およびD17の一過性発現の効果

実施例21に記載した方法に基づき、D-リピート数が16（D16）および17（D17）であるアスポリンの一過性発現によるTGF- β 1刺激COL2A1発現抑制作用をD14と比較した。その結果、D16とD17の活性は有意にD14よりも弱かった（図32）。これより、アスポリンの活性はD14にユニークであり、D-リピートの長さに依存しないことが分かった。

実施例39 各種細胞株培養上清における組換え型ヒトアスポリンの発現

実施例25に記載した方法に基づき、HAタグ付きアスポリンD13およびD14成熟体発現ベクターを各種細胞株に導入したときの培養上清における発現をウエスタンブロッティングで調べた。その結果、ヒト肝臓癌細胞株HuH-7、マウス軟骨前駆細胞株ATDC5、および正常ヒト膝関節軟骨細胞（NHAC, Cambrex社）においてHAタグ付きアスポリンのバンドを確認した（図33）。以上の結果から、この方法によりヒトアスポリンを非軟骨系、軟骨系を問わず、種々の細胞の培養上清中に発現させることができることがわかった。

25

実施例40 組換え型マウスアスポリンのATDC5細胞増殖抑制作用

ATDC5を 0.4×10^5 cells/wellずつ12-well plateに蒔き、実施例19に記載した

培地1-2を用いて24時間培養した後、アスボリンとbFGFを添加し、経時的にMTTアッセイを以下のようにして行った。すなわち、培地を吸引により除去し、1 mg/mlになるようにDMEM/F12に溶かしたMTT試薬 (DOJINDO) を1 ml/wellずつ添加し、CO₂インキュベーター中で1時間インキュベートした。上清を吸引により除去し、溶解試薬 (86% イソプロパノール, 40 mM HCl, 1% SDS) を0.2 ml/well

5 ずつ入れ、室温で5分間抽出した。この抽出液を96-well plateに移し、プレートリーダーを用いてOD550を測定した。その結果、アスボリンは濃度依存的にATDC5細胞の増殖を抑制することがわかった (図34a)。

また、この条件でbFGFは濃度依存的にATDC5細胞の増殖を抑制するが、さらに

10 アスボリン (10 μ g/ml) を添加することにより増殖抑制効果が増強された (図34b)。以上の結果から、アスボリンはATDC5細胞の増殖を抑制する作用を持つことが明らかとなった。

実施例41 組換え型マウスアスボリンのATDC5細胞におけるbFGF刺激プロモデオキシウリジン (BrdU) 取り込み促進作用

15

実施例40と同様にして蒔いたATDC5細胞がサブコンフルエントに達した時点で無血清DMEM/F12で細胞を2回洗浄し、1 ml/wellずつ無血清DMEM/F12を入れ、24-48時間培養した。そこにアスボリンとbFGFを添加してさらに20時間培養後にBrdU取り込みアッセイをCell Proliferation ELISA, BrdU (Roche) を用いて、

20 12-well plateアッセイ用にプロトコールを以下のように改変して行った。すなわち、細胞に終濃度1 μ MになるようにBrdUを添加し、37°C、4時間培養した後、培養液を吸引除去し、固定液 (FixDenat) を1 ml/wellずつ添加してから室温30分間静置した。固定液を吸引除去し、BrdU抗体-HRP (x1000) を0.5 ml/wellずつ添加して室温1時間静置した後、TBSTで4回洗浄し、基質液を0.3 ml/wellずつ

25 入れ、室温で30分間、十分発色するまで反応させた。1 M リン酸 0.3ml/wellずつ入れて反応を停止させ、96-well plateに移し、プレートリーダーを用いてOD415を測定した。その結果、アスボリンはbFGF非存在下ではBrdU取り込みに変

化は与えず、bFGF存在下でのみBrdU取り込み上昇をさらに増強させる活性を示した（図35）。したがって、アスポリンはATDC5細胞におけるbFGF作用の positive regulatorであることがわかった。

5 実施例42 マイクロプレートアッセイ法を用いたマウスアスポリンとbFGFとの結合試験

マイクロプレートに1 μ g/ml TGF- β 1の代りにbFGF溶液をコーティングする点以外は、実施例34と同様にして行った。その結果、精製マウスアスポリンはbFGFと濃度依存的かつ特異的に結合することがわかった（図36）。

10

実施例43 アスポリン抗血清の調製

免疫源として用いたペプチドの合成および免疫はペプチド研究所（株）に外注した。すなわち、ヒトアスポリン成熟体のN末から21番目から33番目のアミノ酸で構成されるペプチド（Peptide-2210: NSLFPTREPRSHF）（配列番号：33）、
15 およびN末から264番目から279番目のアミノ酸で構成されるペプチド（Peptide-2211: ENNKLKKIPSGLPK）（配列番号：34）のそれぞれのC末にCysを付与してさらにそのC端をアミド化したものを合成し、化学的にKeyhole Limpet Hemocyanin（KLH）との複合体を形成させた。これらの複合体をウサギ2羽ずつに免疫し、初回免疫から49日後に全採血した。精製マウスアスポリンの免疫は
20 タンパクをそのまま投与し、初回免疫から49日後に同様に全採血した。これらのウサギ抗血清はいずれも抗原として用いたペプチドおよびタンパクと良好な反応性を示すことを確認した。

実施例44 アスポリン抗体のアフィニティ精製

25 実施例43で得た5種類の抗血清、すなわちPeptide-2210に対する抗血清2種類（2210-B01, 2210-B02）、Peptide-2211に対する抗血清2種類（2211-B01, 2211-B02）、およびマウスアスポリンに対する抗血清（2229-B01）のそれぞれをアフ

イニティ精製するため、それぞれの抗原ペプチドおよびタンパクを添付プロトコールに従って、HiTrapNHS-activated HP (Amersham Pharmacia) に固定化した。50 mM Tris-HCl (pH 8) で平衡化した固定化カラムに抗血清を通し、吸着画分
5 の入ったチューブに回収した。コントロールIgGは免疫前ウサギ抗血清をHiTrap rProtein A FF (Amersham Pharmacia) に通してアフィニティ精製したものを使用した。

実施例45 アスポリン抗体のウエスタンブロッティングによるヒトおよびマウスアスポリンとの反応性

作製した抗体のヒトおよびマウスアスポリンとの反応性をウエスタンブロッティングにより比較した。ブロッキングにはブロックエースを用い、抗体の希釈および洗浄にはTBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.05% Tween20) を用いた。一次抗体反応は室温1時間で行い、検出は抗ウサギIgG-HRP (Cell
15 Signaling) を用いて行った。その結果、HAタグ付きヒトアスポリンD13およびD14との反応性は2229-B01抗体と2211-B02抗体とは強く、2210-B02とは弱かった(図37)。マウスアスポリンとの反応性は2229-B01抗体が最も強く、2210-B02と2211-B02は同程度であった。以上の結果から、いずれの抗体もヒトおよびマウスアスポリンをウエスタンブロッティングで検出できることがわかった。

20

実施例46 ヒトアスポリンD13およびD14を安定発現させたATDC5細胞株の培養上清中におけるアスポリンタンパクの検出

アスポリンを安定的に発現させたATDC5細胞 (10 cmシャーレ3枚分) の無血清培養上清 (45 ml) をAmicon Ultra 10000MWC0を用いて400 μ lまで濃縮し、以下
25 の方法により免疫沈降を行った。すなわち、500 μ lのブロックエース (大日本製薬)、20 μ lの抗マウスアスポリン抗体 (2229-B02)、および50 μ lのProtein-A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia) と混合し、一晚4℃で

shakingした。ビーズに結合したタンパク複合体をBuffer SNP (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を用いて5回洗浄した後、結合タンパク質を0.1 M グリシン塩酸 (pH 3.0) を用いて溶出させた。溶出させたタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜にトランスファーした後、膜をブロックエー

5 ス中にて30分間ブロッキングした。一次抗体反応はビオチン化2210-B02を用いて室温30分間shakingすることにより行った。検出にはStreptavidin-HRPを用いた。その結果、D13発現株およびD14発現株とも、アスポリンタンパクの発現を培養上清中に認めた (図38)。さらに、Mockでもわずかなバンドが検出されたことから、ATDC5細胞自身が内在性にマウスアスポリンを発現していることもわ

10 った (図38)。

実施例47 正常ヒト関節軟骨細胞 (NHAC) におけるアスポリンの関節軟骨細胞としての分化度抑制 (脱分化促進) 作用

NHACをCambrex社製軟骨細胞分化培地 (CDM) を用いて添付プロトコールにしたがい、アルジネートビーズ培養を2週間行って再分化させた。この再分化後の細胞をLab-Tek IIチャンバースライド (Nunc) に蒔き、5% FBS、ITS (Sigma) およびTGF- β 1 (40 ng/ml) を含むDMEM/F12を添加してその分化度を維持させた時の、細胞形態と細胞外プロテオグリカンの蓄積に及ぼすアスポリン (20 μ g/ml) の添加効果を調べた。チャンバースライドに蒔いてからTGF- β 1無添加で

15 7日間培養すると、細胞の形態は線維芽細胞様を示し、細胞外プロテオグリカンを反映するサフラニン-Oの染色性は陰性であった (脱分化, 図39a)。TGF- β 1添加時では、細胞の形態は卵型を示し、サフラニン-O染色性は陽性で、軟骨細胞としての分化度が維持されていた (図39b)。ところが、TGF- β 1とアスポリンを

20 両方添加すると、細胞の形態は線維芽細胞様を示し、サフラニン-O染色性は低下し、軟骨細胞としての分化度を喪失した (図39c)。これらの結果から、アスポリンは、NHACにおけるTGF- β 1による軟骨細胞様細胞形態の維持作用、および細胞外プロテオグリカン産生作用を抑制し、細胞を脱分化させることがわかった。

実施例48 NHACにおけるTGF- β 1によるSmad2リン酸化のアスポリンによる抑制作用

NHACを12-well plateにまき、10% FBSとpenicillin/streptomycinを含む
5 DMEM/F12中で培養し、ほぼコンフルエントに達した時点で血清0.2%の同培地に
交換した。その12時間後にアスポリン (20 μ g/ml) を添加し、その更に12時間
後にTGF- β 1 (40 ng/ml) を添加し、その10分後にM-PER試薬 (PIERCE) で細胞
を溶解した。この細胞抽出液を用いてSDS-PAGEを行い、Cell Signaling社抗体
10 製品に添付されたプロトコールに従ってウエスタンブロッティングを行った。リ
ン酸化Smad2およびSmad2タンパク質の検出のための一次抗体は、Phospho-Smad2
antibody (Cell Signaling) およびRabbit anti-Smad2 (Zymed Laboratories)
をそれぞれ用いた。二次抗体は抗ウサギIgG-HRP (Cell Signaling) を用いた。
その結果、アスポリンはTGF- β 1刺激によるSmad2リン酸化を抑制した (図40)。
これより、アスポリンはNHACにおけるTGF- β 1によるSmad 2 シグナルを抑制する
15 作用を示すことがわかった。

実施例49 アスポリンのNHACにおけるTGF- β 1によるSmad3特異的遺伝子転写抑制作用

NHACを24-well plateに 2.5×10^4 cells/wellになるように蒔き、10% FBSと
20 penicillin/streptomycinを含むDMEM/F12中で24時間培養し、SBE4-Luc (Smad
binding element x4 -ルシフェラーゼ) プラスミドと内在性コントロールとし
て用いたpRL-TKベクターをトランスフェクションした。その48時間後にアスポ
リン (40 μ g/well) を添加し、さらにその12時間後にTGF- β 1 (10 ng/well)
を添加して24時間インキュベートした。細胞中のルシフェラーゼ活性はPG-
25 DUAL-SPレポーターアッセイシステム (東洋インク) を用いて測定した。その結
果、アスポリンはSBE4-Lucを導入した細胞でのTGF- β 1によるルシフェラーゼ活
性の上昇を有意に抑制した (図41)。よって、アスポリンはTGF- β 1によるSmad3

特異的遺伝子の転写を抑制する作用を示すことが分かった。

実施例50 免疫沈降法によるNHAC培養上清中におけるアスポリンの発現の検出

NHACの培養上清中における発現を以下のようにして免疫沈降法により調べた。

- 5 NHACを175 cm²シャーレに蒔き、2日間培養することにより調製した無血清培養上清液をAmicon Ultra 10000MWCOを用いて400 μ lまで濃縮し、500 μ lのブロックエース（大日本製薬）、20 μ lの抗マウスアスポリン抗体（2229-B02, 500 μ g/ml）、および50 μ lのProtein-A Sepharose CL-4B（Amersham Pharmacia）と混合し、一晩、4℃でshakingした。ビーズに結合したタンパク質複合体を
- 10 Buffer SNP（1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl（pH 8.0））を用いて5回洗浄した後、結合タンパクを0.1 M グリシン塩酸（pH 3.0）を用いて溶出させた。この溶出させたタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜にトランスファーした後、膜をブロックエース中にて30分間ブロッキングした。一次抗体反応はビオチン化2210-B02を用いて室温30分間shakingすることにより行った。
- 15 検出にはStreptavidin-HRPを用いた。その結果、NHACの培養上清中にアスポリンタンパクの発現を認めた（図42）。すなわち、内在性のアスポリンがNHACの培養上清中に分泌されていることがわかった。

実施例51 細胞免疫染色法によるNHACにおけるアスポリンの細胞外局在の確認

- 20 NHACにおいてアスポリンが細胞外に局在するかどうかを以下に記載する細胞免疫染色法により調べた。細胞の培地を除去し、PBSで2回洗浄した後、細胞を4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液中で室温15分処理することにより固定した。PBSで5分x3回洗浄した後、ブロックエース（大日本製薬）中で室温1時間ブロッキングした（なお、抗体を細胞内に浸透化させやすくするため、ブロッ
- 25 キングの前に0.2% Triton X-100で室温15分処理し、PBSで5分x3回の洗浄を行った）。抗マウスアスポリン抗体（2229-B01）または抗Smad2抗体（Zymed laboratories）と1時間、室温で反応させた後、PBSで5分x3回洗浄し、Alexa

fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) と1時間、室温で反応させた。PBSで5分x3回洗浄した後、VECTASHIELD (VECTOR) を滴下して標本を作製した。その結果、浸透化処理 (-) の方が、浸透化処理 (+) よりもアスボリンの染色度はより強かった (図43a, b)。細胞内マーカーとして用いたSmad2は、
5 予想通り浸透化 (+) の方だがより強く染色された (図43c, d)。したがって、NHACにおいて内在性のアスボリンが細胞外に局在していることがわかった。

実施例52 蛍光免疫二重染色によるNHACにおけるアスボリンとTGF- β 1の局在一致の確認

10 NHACの細胞外でアスボリンとTGF- β 1の局在が一致するかどうかを以下に記載する蛍光免疫二重染色により調べた。細胞の培地を除去し、PBSで2回洗浄した後、細胞にビオチン化TGF- β 1 (R&D Systems社製Human TGF- β 1 Biotinylated Fluorokine Kit) を添加して、4°C、1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄
15 した後、4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液中で室温15分処理することにより細胞を固定した。PBSで5分x3回洗浄した後、ブロックエース (大日本製薬) 中で室温1時間ブロッキングした。抗マウスアスボリン抗体 (2229-B01) を1時間室温で反応させた後、PBSで5分x3回洗浄し、Alexa fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)、およびアビジン-FITCと1時間、室温で反応させた。PBSで5分x3回洗浄した後、VECTASHIELD (VECTOR) を滴下して標本を作製
20 した。その結果、内在性アスボリンとビオチン化TGF- β 1の局在が一致することを示す染色像が得られた (図44d)。この結果から、内在性のアスボリンとTGF- β 1が細胞外で非常に近接して存在することがわかった。

実施例53 ヒトOA患者膝関節軟骨組織におけるアスボリンとTGF- β 1の局在

25 ヒトOA患者膝関節軟骨組織を採取後すみやかにホルマリン固定し、厚さ6 μ mの組織学的検索用切片を作製した。この切片について脱パラフィン処理を行った後、蒸留水で洗浄し、3% 過酸化水素水で室温10分間の処理を行った。1.5% ヤ

ギ正常血清を用いて30分間室温でブロッキングした後、ウサギ抗マウスアスポリンポリクローナル抗体 (2229-B01) またはウサギ抗TGF- β 1ポリクローナル抗体 (sc-146, サンタクルズ) を用いて、4℃で一晩反応させた。検出は、Vectastain ABC EliteKit (VECTOR) とDAB (フナコシ) 染色を用いて行った。

- 5 また、サフラニン-O-ファストグリーン試薬で染色されなかった部位を病変部と、染色された部位を非病変部と定義した。その結果、アスポリンとTGF- β 1はいずれもOA軟骨の非病変部と比べて病変部の細胞でより強く染まっており (図45)、基質中での染色も弱いながら認められた。また、TGF- β 1と染色が一致する部分も観察された (図45矢頭)。これらの結果から、アスポリンとTGF- β 1は*in vivo*
- 10 でOAの病態と深く関わっていることが示唆された。

実施例54 NHACにおけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子の一過性発現誘導

- NHACにおけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子の発現のタイムコースを以下のようにして調べた。細胞を12-well plateに 1×10^5 cells/mlになるように蒔き、
- 15 10% FBSを含むDMEM/F12中でコンフルエントになるまで培養した。培地を0.2% FBSを含むDMEM/F12に交換して24時間培養した後、TGF- β 1 (10 ng/ml) を添加し、経時的にtotal RNAを抽出し、アスポリン、GAPDH遺伝子の発現量を調べた。その結果、TGF- β 1 (10 ng/ml) 存在下で12時間培養したときにアスポリン遺伝子の発現量は最大となり、その後、経時的に発現量は低下した (図46)。TGF- β
- 20 1存在下で3日間培養した時点では、非誘導時 (対照) よりもアスポリンの発現量は下回った。以上の結果から、NHACにおけるアスポリン遺伝子の発現はTGF- β 1により初期には誘導され、時間の経過につれて、著しく抑制されることがわかった。

- 25 実施例55 NHACにおけるTGF- β 1によるアスポリン、II型コラーゲン、アグリカンおよびTGF- β 1遺伝子発現の誘導に及ぼすSB431542の効果

実施例54に記載した方法で示したTGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導

実験の系において、TGF- β タイプ1受容体リン酸化の阻害剤であるSB431542（シグマ）（10 μ M）をTGF- β 1（10 ng/ml）添加の30分前に添加したときの、アスポリン、II型コラーゲン、アグリカンおよびTGF- β 1遺伝子発現の誘導（12時間）に及ぼす効果を調べた。その結果、SB431542は、TGF- β 1によるこれらの遺伝子発現の誘導を阻害した（図47）。よって、これらの遺伝子発現の誘導はTGF- β タイプ1受容体を介していることがわかった。

実施例56 NHACにおけるTGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導に及ぼすシクロヘキシミド（CHX）の効果

10 実施例54に記載した方法で示したTGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導実験の系において、タンパク合成阻害剤であるCHX（シグマ）（10 μ M）をTGF- β 1（10 ng/ml）添加の30分前、同時、2時間後、または6時間後に添加したときの、アスポリン遺伝子発現の誘導（12時間）に及ぼす効果を調べた。その結果、CHXをTGF- β 1添加の30分前および同時添加した時には、TGF- β 1によるアスポリンの誘導が阻害された（図48）。ところが、TGF- β 1添加の2時間後以降でのCHXの添加では、TGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現の誘導が観察された。この結果より、TGF- β 1によるアスポリン遺伝子発現は何らかのタンパク質合成を介する間接的な誘導作用によることが示唆された。

20 実施例57 アスポリンのNHACにおけるTGF- β 1刺激アスポリンおよびTGF- β 1遺伝子発現抑制作用

実施例35に記載した方法で調製したcDNAを用いて、リアルタイムPCRによりアスポリンおよびTGF- β 1遺伝子の発現を調べた。その結果、TGF- β 1刺激によりアスポリンおよびTGF- β 1遺伝子の発現は上昇し、その上昇はいずれもアスポリンの添加により抑制された（図49）。これより、アスポリンが、TGF- β 1存在下でアスポリンとTGF- β 1遺伝子の両方の発現を負に制御していることが明らかとなった。

実施例58 NHACにおけるアスポリン特異的siRNAのII型コラーゲン、アグリカンおよびTGF- β 1遺伝子発現上昇作用

アスポリン特異的siRNA (Si9: UCCCUUCAGGAUUACCAGATT; 配列番号: 35) は宝
5 酒造ホームページ内 siRNA design support system (<http://www.takara-bio.co.jp/rnai/intro.htm>) を用いて設計した。コントロールsiRNA (Si1N: CCUACGUCCAGAUAAUUCGTT; 配列番号: 36) はアスポリンやそれ以外の遺伝子のいずれともマッチしない配列を設計して使用した。細胞を12-well plateに 5×10^5 cells/wellになるように蒔き、10% FBS, ITS, 10 ng/ml TGF- β 1および
10 penisillin/streptomycinを含むDMEM/F12中で24時間培養し、siRNAをTransIT-TKO (宝酒造) を用いてトランスフェクションした。24時間培養後の細胞から total RNAを抽出し、II型コラーゲン、アグリカン、TGF- β 1遺伝子の発現を調べた。その結果、アスポリン特異的siRNAはNHACにおけるII型コラーゲン、アグリカンおよびTGF- β 1遺伝子の発現を有意に上昇させた (図50)。したがって、
15 内在性のアスポリンはNHACにおける軟骨基質の発現およびTGF- β 1の発現を負に制御していると考えられた。これは、アスポリンの発現や作用を抑制する化合物が関節軟骨における軟骨基質の量を増加させることで、変形性関節症治療薬となる可能性があることを示唆する。

20 実施例59 NHACにおけるアスポリンのTGF- β 1による細胞増殖抑制作用

NHACを12-well plateに 1×10^5 cells/mlになるように蒔き、10% FBSを含むDMEM/F12にTGF- β 1 (40 ng/ml) およびアスポリン (5または20 μ g/ml) を添加し、5日間培養した後、以下に述べるMTTアッセイ法により細胞増殖の程度を調べた。すなわち、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラ
25 ゾリウムブロミド (MTT, 同仁化学研究所) を1 mg/mlになるようにDMEM/F12に溶解し、あらかじめ培地を吸引除去した細胞に加え、37°Cで1時間培養した。その後、MTTを含む培地を捨て、細胞を溶解試薬 (86% イソプロパノール, 40 mM

塩酸, 1% SDS) を用いて抽出した。この細胞溶解液を96-well plateに移し、マイクロプレートリーダーを用いて550 nmの吸光度を測定した。その結果、NHACの増殖度は、TGF- β 1の添加により増加したが、TGF- β 1とともにアスポリンを添加すると、濃度依存的に細胞増殖を抑制した (図51)。以上の結果から、アス

5 ポリンはTGF- β 1に依存したNHACの細胞増殖を抑制する作用を示すことが明らかとなった。

実施例60 モルモット自然発症病態OAモデルにおける関節軟骨でのアスポリンの発現

10 Hartley系雄性モルモットは、加齢とともに関節軟骨に変性が認められることから、自然発症病態OAモデルとして用いられる。そこで、該動物における関節軟骨でのアスポリンの発現について検討した。実験には、モルモット (Hartley系, 雄性, 日本エスエルシー, 静岡より購入) を、2および16月齢時点で、炭酸ガス存在下で屠殺した後、両膝の脛骨関節軟骨の内側部分をサージカルナイフ

15 (FEATHER) で剥ぎ取った。その後、可及的速やかにRNA抽出試薬のISOGEN (ニッポンジーン) に浮遊させて、ホモジナイザー機 (NITI-ON) を用いて組織を細分し、RNAを回収した。得られた総RNAサンプルを鋳型として、Super script reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。このDNAを鋳型として、RT-PCR (GeneAmp PCR System 9600) を行った。

20 反応液は、cDNAサンプル 40 ng, ExTaq 0.25 μ l, 10x buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l (Takara Bio)、各プライマー 500 nmol/l, 全量50 μ lで混合した。反応は、94°Cで2分反応した後、94°C 1分, 55°C 2分, 72°C 1分の条件で40サイクル行った。その後、サンプルを1.2% アガロースゲル (FMC) にローディングして、40分間電気泳動を行った。データは、Imaging Densitometer (Bio-Rad) によるバ

25 ンドの数値化で示した。なお、標的遺伝子に対するプライマーとしては下記の配列を使用した。

フォワードプライマー: TGGCTTTGTGCTCTGCCAA (配列番号: 37)

リバースプライマー：AGCTGAACACTCATTCTG（配列番号：38）

2月齢モルモットと比較し、16月齢モルモットはアスポリンmRNAの発現が有意に亢進していることがわかった（図52）。

本実験結果から、病変部分でアスポリンの発現が亢進していたので、OA病態
5 におけるアスポリンの解明に、本動物モデルは、有用であることが示唆された。

実施例61 モルモット自然発症病態OAモデルにおける血清アスポリン濃度の測定

Hartley系雄性モルモットにおける血清アスポリン濃度を、抗アスポリン抗体
10 を用いて検討した。実験には、モルモット（Hartley系，雄性，日本エスエルシー，静岡）を購入して使用した。1，3，6および18月齢のモルモットから、採血して血清を分離し、アスポリンの含量をELISA法により測定した。すなわち、96-well プレート（Corning）に抗マウスアスポリン抗体（2.5 μ g/ml，200 μ l in PBS）を播種し、室温で一晩反応させた。Wash buffer（Biosource
15 International Inc.）で洗浄後、25% ブロックエース溶液（大日本製薬）で2時間ブロッキング、洗浄した後にサンプルを100 μ l添加した。2時間室温で放置して洗浄後、ビオチン化2229-B01（10,000倍希釈；100 μ l）を加えて2時間反応させた。洗浄後、アビジン-HRP（2,500倍希釈；100 μ l）を添加し、30分放置した。洗浄後、3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine（TMB）基質（100 μ l）
20 を加え、20分後に0.25 mol/l 硫酸（100 μ l）を加えて反応を停止し、吸光光度計にてOD450 nmを測定した。

その結果、血清中のアスポリン濃度は、加齢とともに増大し、1月齢時点に比して6月齢から有意な亢進が確認された（図53）。

本実験結果から、アスポリンは、OA病態動物モデルでの軟骨破壊と関係する
25 生化学的パラメーターとして有用なマーカーであることが示唆された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性を容易に判定することができる。また、カルモジュリン、アスポリン、それらに対する抗体、それらをコードする核酸、それらのアンチセンス核酸、その他それらの発現もしくは活性を調節し得る物質は、骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

5

本出願は日本で出願された特願2004-228745（出願日：2004年8月4日）、特願2004-324372（出願日：2004年11月8日）および特願2005-070103（出願日：2005年3月11日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請 求 の 範 囲

1. 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。
- 5 (a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩
(b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸
- 10 (c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩
2. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる
- 15 群より選択される請求項1記載の剤。
3. 哺乳動物における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を増強することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法。
- 20 4. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項3記載の方法。
5. 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用。
- 25 (a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩
(b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ

酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくはは

5 活性を促進する化合物またはその塩

6. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項5記載の使用。

7. 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療
10 剤。

(a) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

(b) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ
15 酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

(c) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくはは活性を抑制する化合物またはその塩

20 8. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項7記載の剤。

9. 哺乳動物における、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくはは活性を低減することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患
25 患の予防・治療方法。

10. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項9記載の方法。

11. 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用。
- (a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸
- (b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体
- (c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩
12. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項11記載の使用。
13. 下記 (a) または (b) の物質を含有してなる骨・関節疾患の診断剤。
- (a) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体
- (b) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸
14. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項13記載の剤。
15. 被験動物における、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現変動を調べることを含む、骨・関節疾患の診断方法。
16. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項15記載の方法。

17. 骨・関節疾患の診断剤の製造のための下記 (a) または (b) の物質の使用。
- (a) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体
- (b) 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸
- 5 18. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項17記載の使用。
19. 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。
- 10 20. 配列番号: 2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸、あるいは該タンパク質もしくは該部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。
- 15 21. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項19または20記載の方法。
- 20 22. 配列番号: 5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）を含む該塩基配列の部分配列であって、約15塩基以上の連続した塩基配列を含む核酸。
23. 配列番号: 5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基がそれぞれチミン、シトシン、グアニンおよびチミンである
- 25 24. 配列番号: 5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上の塩基における多型を検出

することを含み、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法。

25. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項24記載の方法。

- 5 26. 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

27. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項26記載の剤。

- 10 28. 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸を哺乳動物に投与することを含み、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法。

- 15 29. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項28記載の方法。

30. 骨・関節疾患の予防・治療剤の製造のための、配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸の使用。

- 20 31. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項30記載の使用。

- 32 配列番号：5で表される塩基配列中塩基番号85で示される塩基（但し、該塩基はチミンである）およびそれに隣接する塩基からなる塩基配列を含む核酸と、該塩基配列に選択的に結合する転写調節因子とを用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

25

33. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項32記載の方法。

5 34. 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩

10 (b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩
15

35. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項34記載の剤。

36. 哺乳動物における、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を増強
20 することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法。

37. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項36記載の方法。

38. 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の使用。
25

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくは

その部分ペプチドまたはその塩

(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含む核酸

- 5 (c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を促進する化合物またはその塩

39. 骨・関節疾患が、先天性骨系統疾患、骨軟骨腫、骨腫瘍および軟骨腫瘍からなる群より選択される請求項38記載の使用。

40. 下記 (a)～(c) のいずれかの物質を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

- (a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

- (c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

41. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項40記載の剤。

42. 哺乳動物における、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含

むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を低減することを含む、該哺乳動物における骨・関節疾患の予防・治療方法。

43. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな

5 る群より選択される請求項42記載の方法。

44. 骨・関節疾患予防・治療剤の製造のための下記 (a)～(c) のいずれかの物質の物質の使用。

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくは

10 その部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体

(b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸

(c) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくは
15 はその部分ペプチドまたはその塩の発現もしくは活性を抑制する化合物またはその塩

45. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害および先天性骨系統疾患からな

20 る群より選択される請求項44記載の使用。

46. 下記 (a) または (b) の物質を含有してなる骨・関節疾患の診断剤。

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

25 (b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

47. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、

滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項46記載の剤。

48. 被験動物における、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現変動を調べることを含む、骨・関節疾患の診断方法。

49. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項48記載の方法。

- 10 50. 骨・関節疾患の診断剤の製造のための下記 (a) または (b) の物質の使用。

(a) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体

- 15 (b) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸

51. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項50記載の使用。

- 20 52. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

- 25 53. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含む核酸、あるいは該タンパク質もしくは該部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

54. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、

滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項52または53記載の方法。

55. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中N末端側に存在するアスパラギン酸の繰り返し残基数における多型を検出することを含む、骨・関節疾患に対する遺伝的感受性の診断方法。

56. 配列番号：5で表される塩基配列において、塩基番号85, 1576, 2445および6641で示される塩基からなる群より選択される1以上の塩基における多型を検出することをさらに含む、請求項55記載の方法。

- 10 57. 骨・関節疾患が、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症、スポーツによる関節障害、骨軟骨腫、骨腫瘍、軟骨腫瘍および先天性骨系統疾患からなる群より選択される請求項55または56記載の方法。

図 1

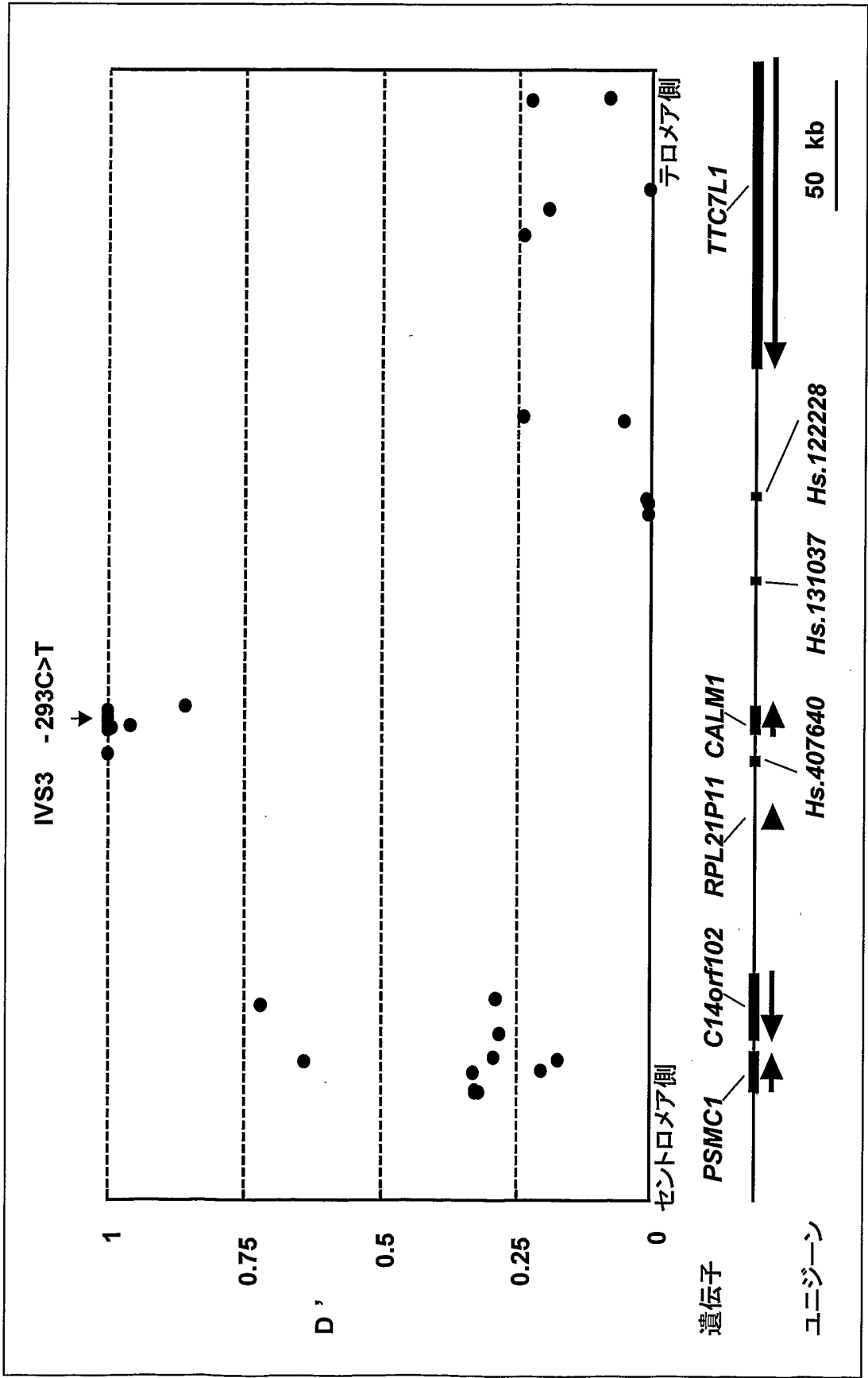
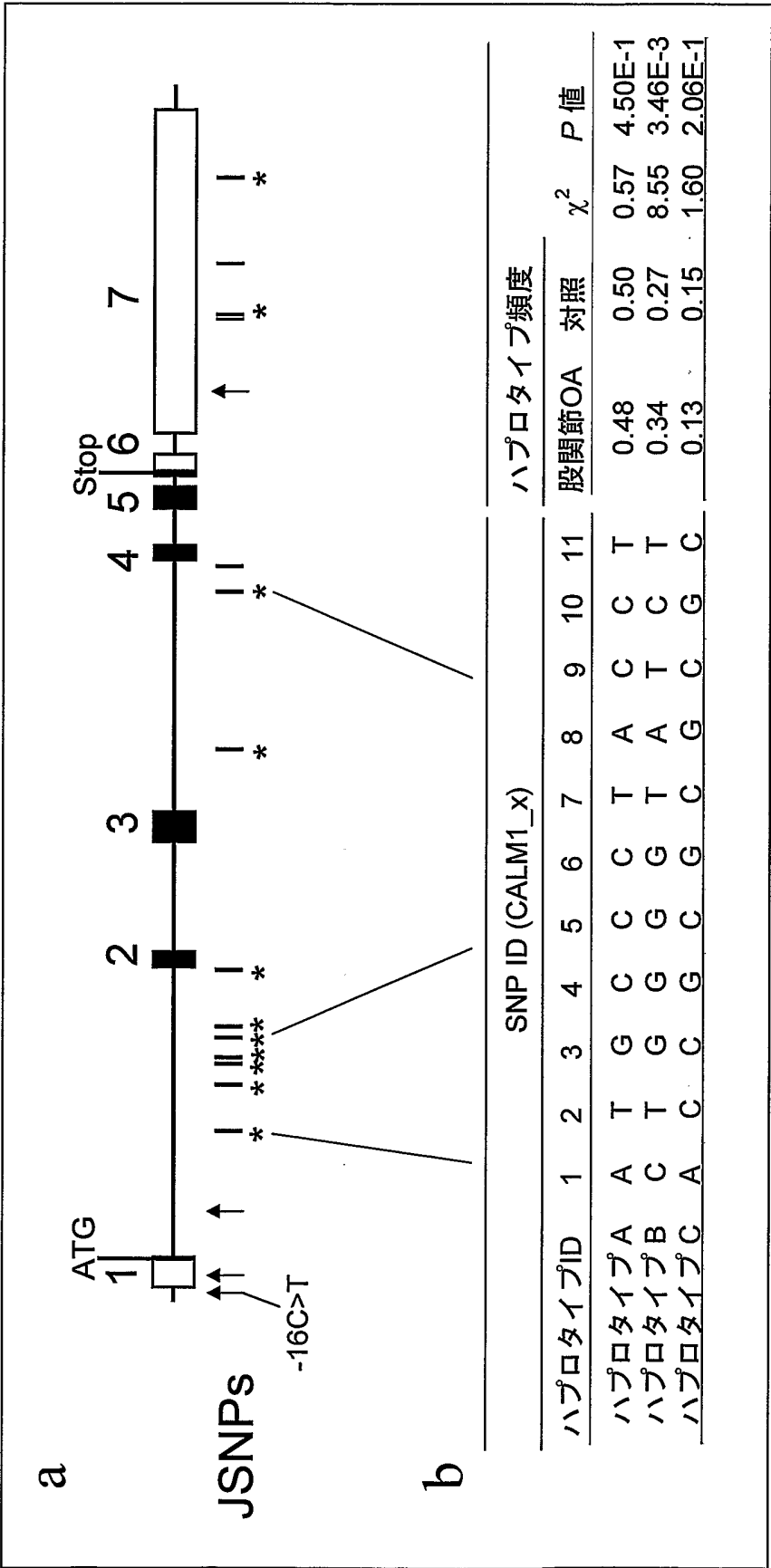


図 2



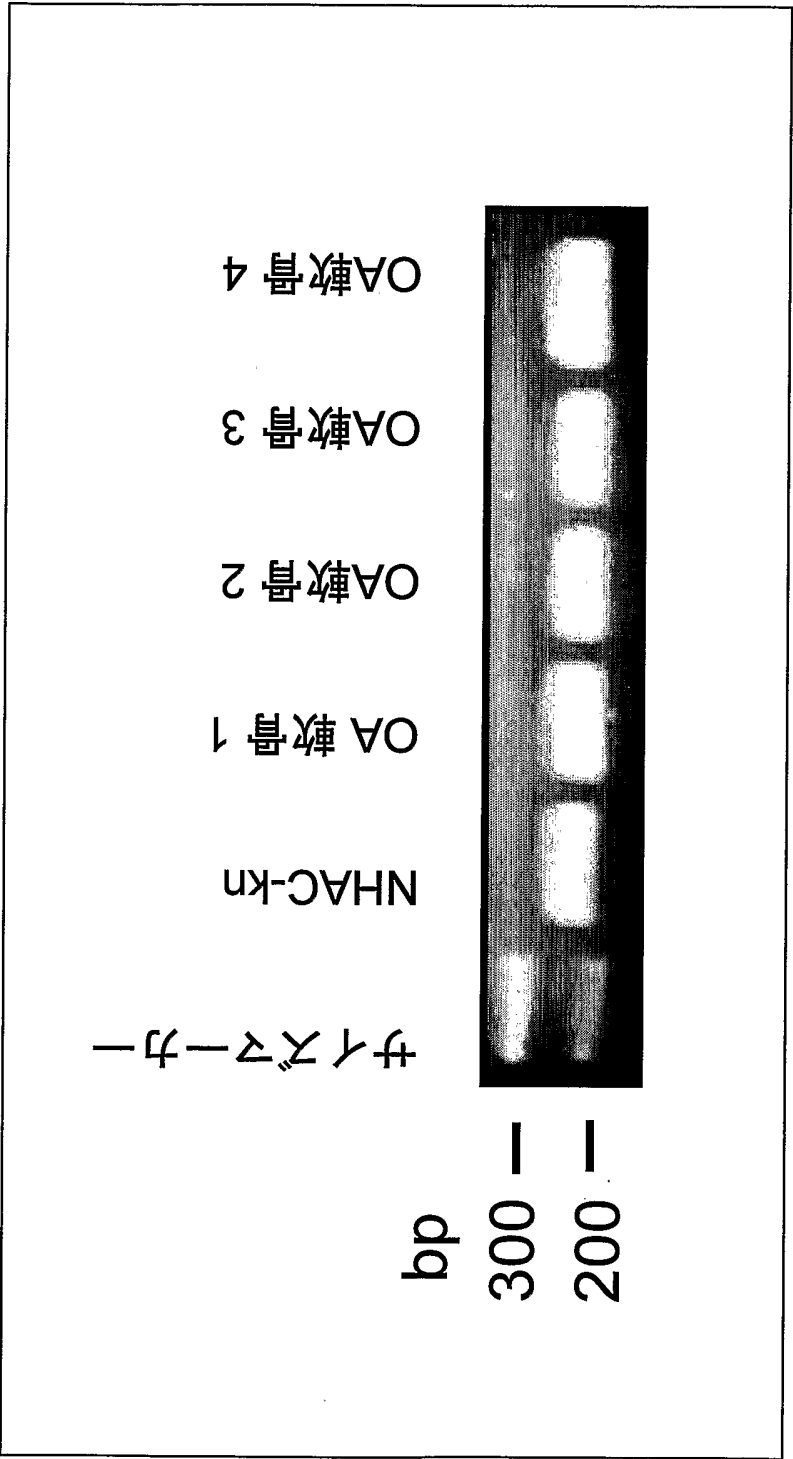


図 3

図 4 a

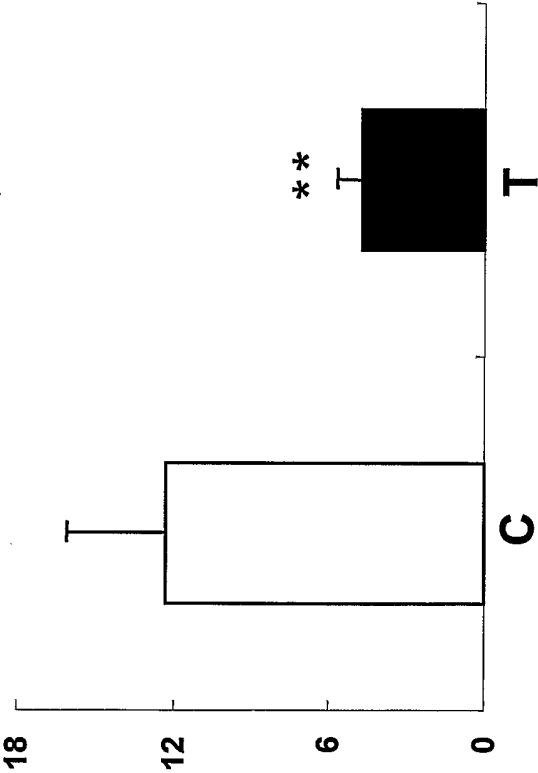


図 4 b

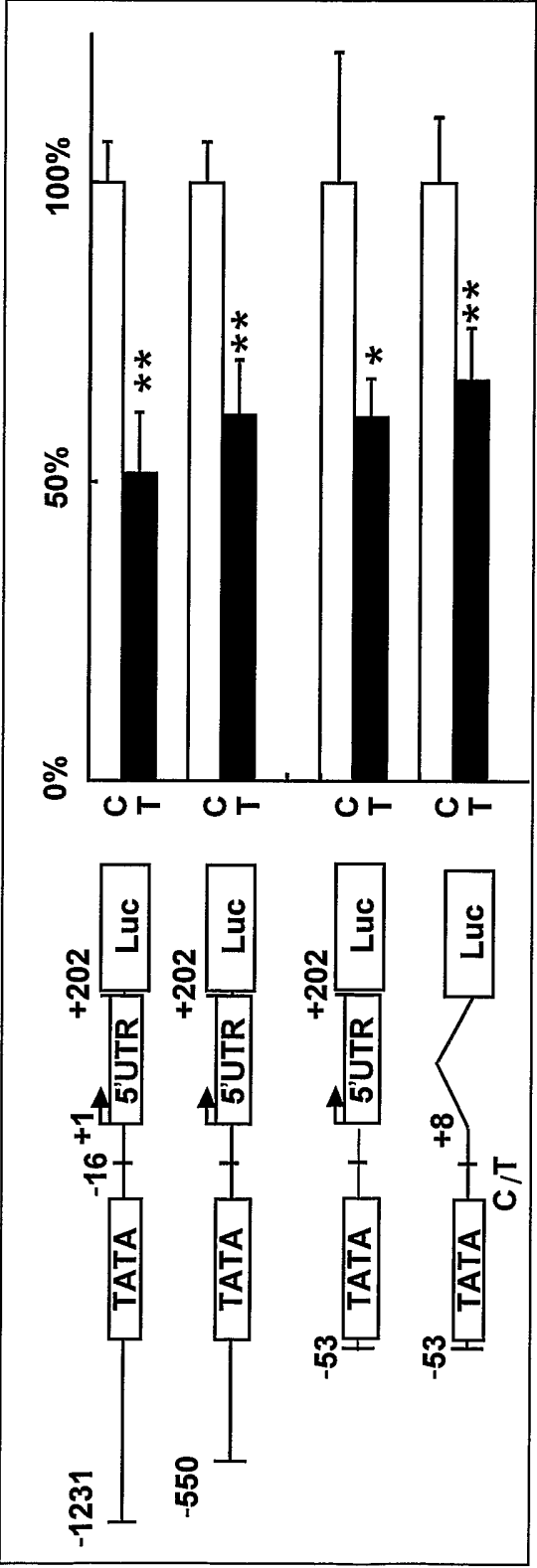


図 5

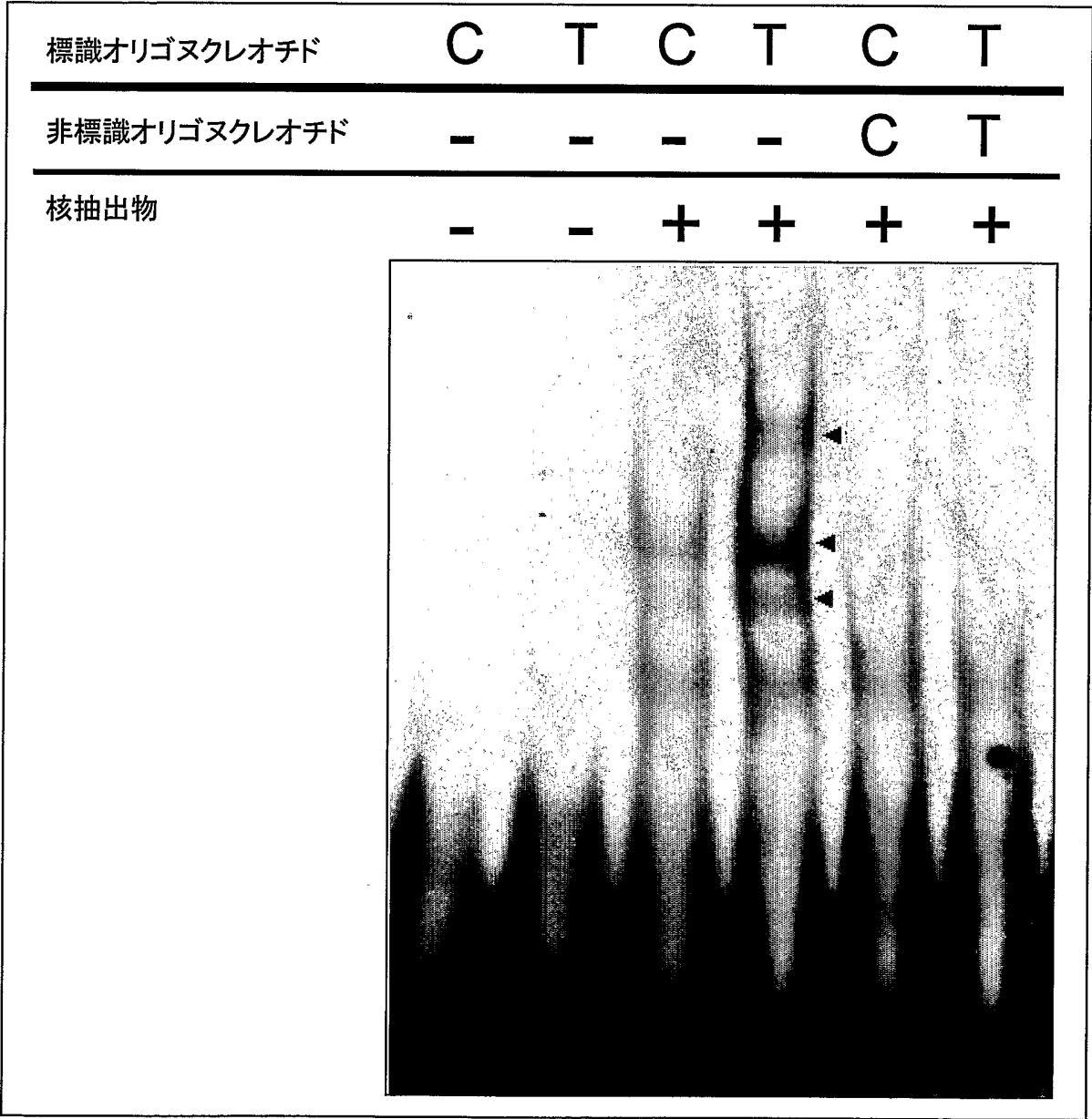


図 6

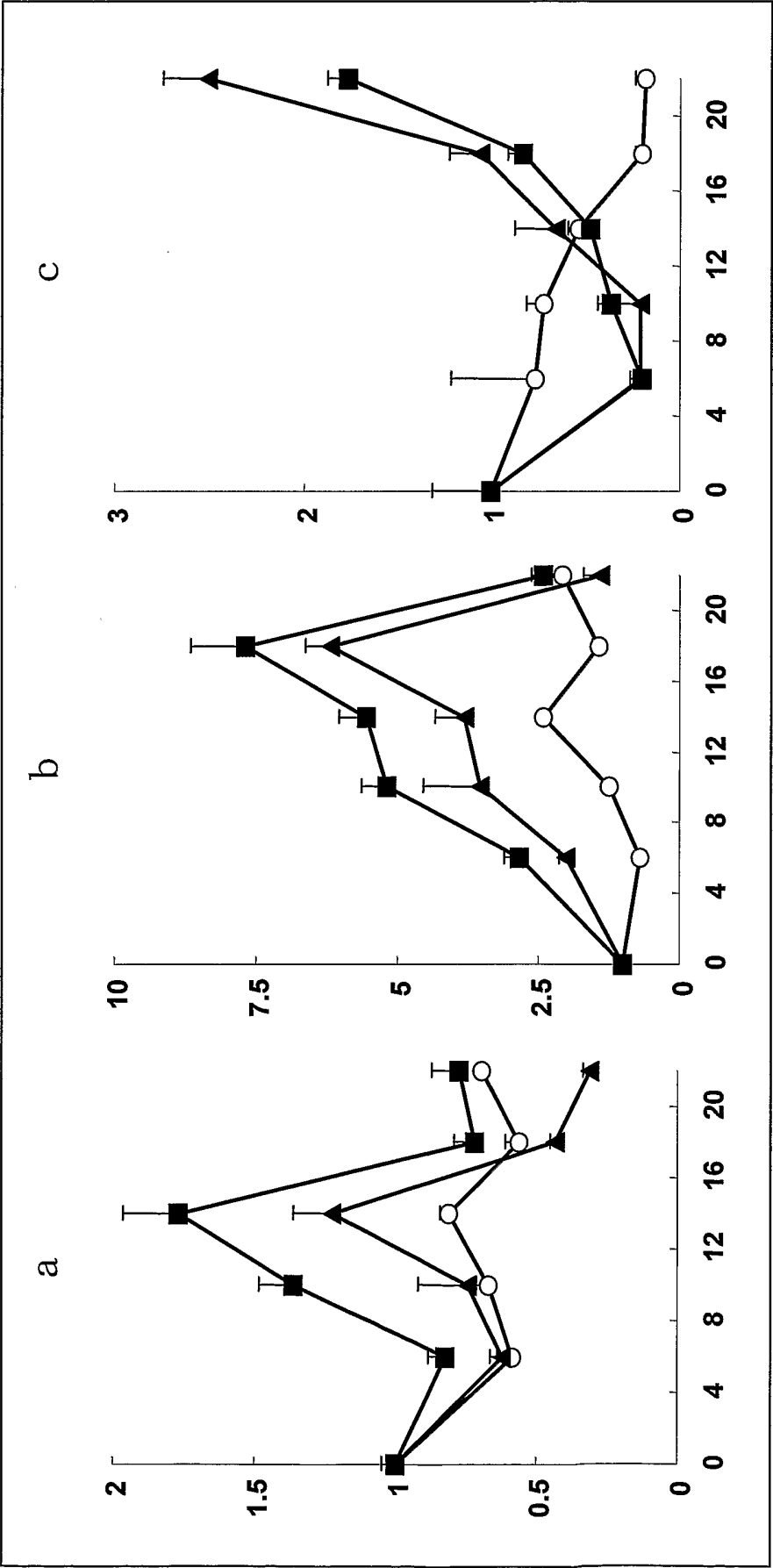


図 7

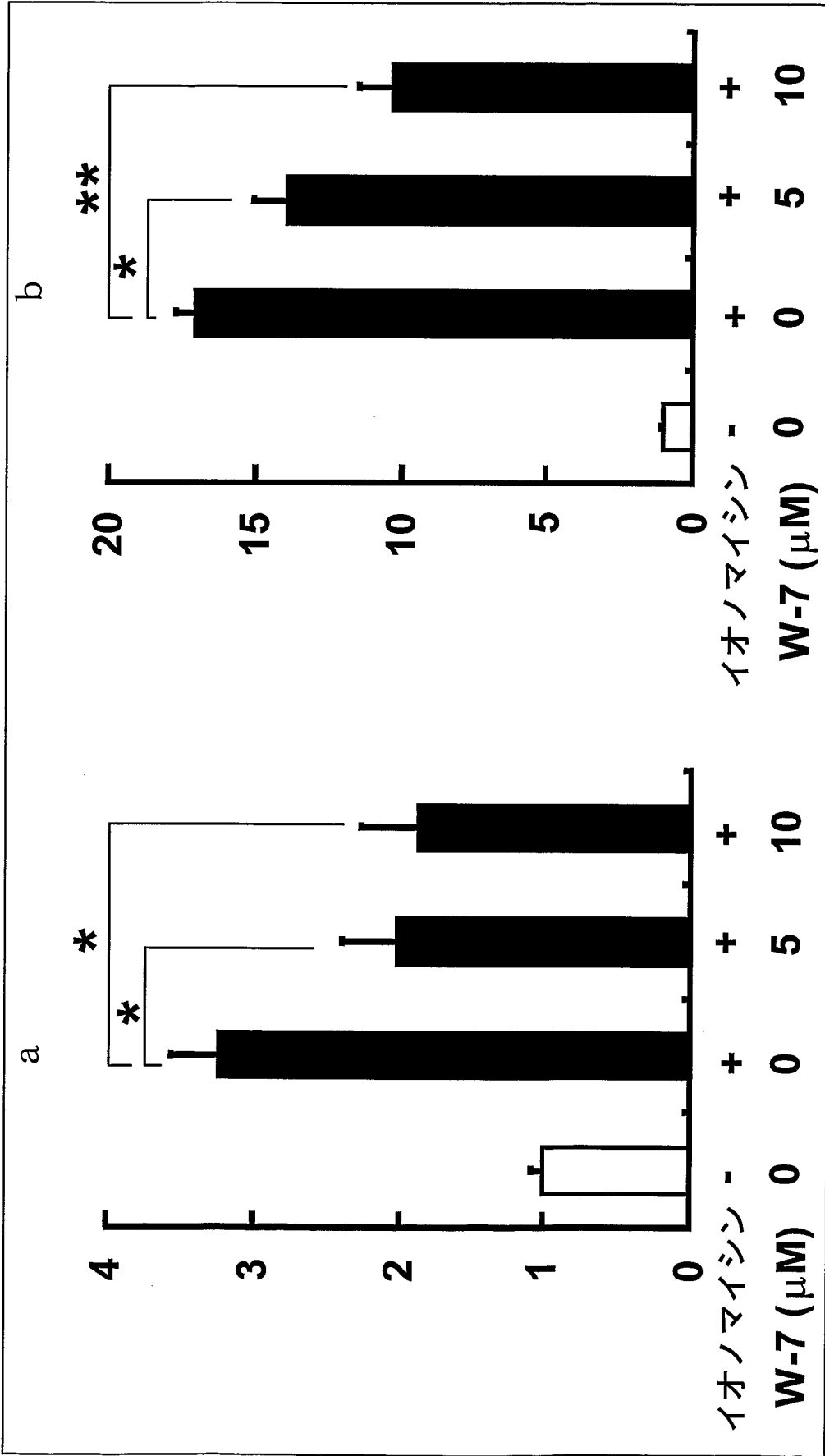


図 8

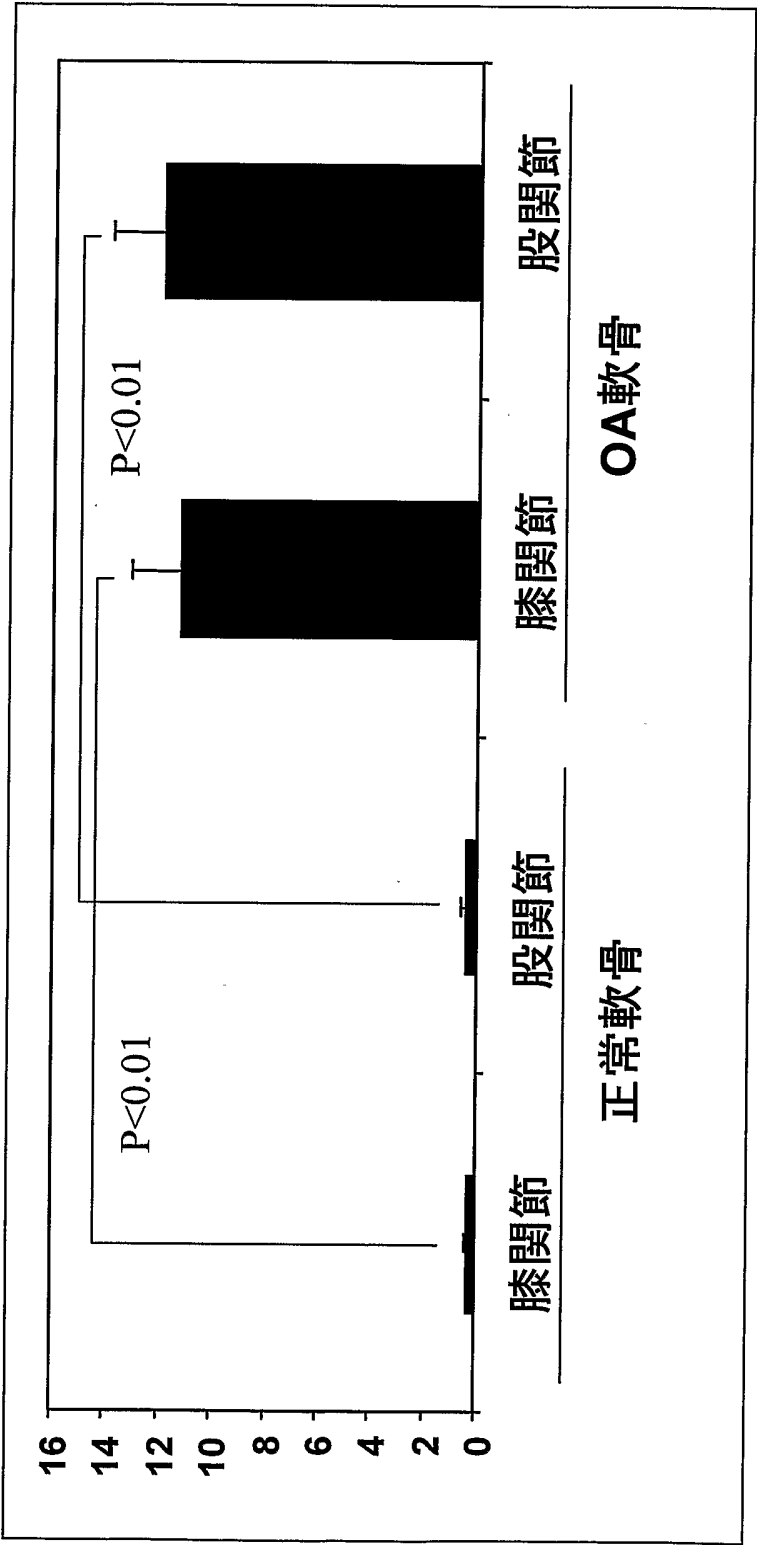


図 9 a

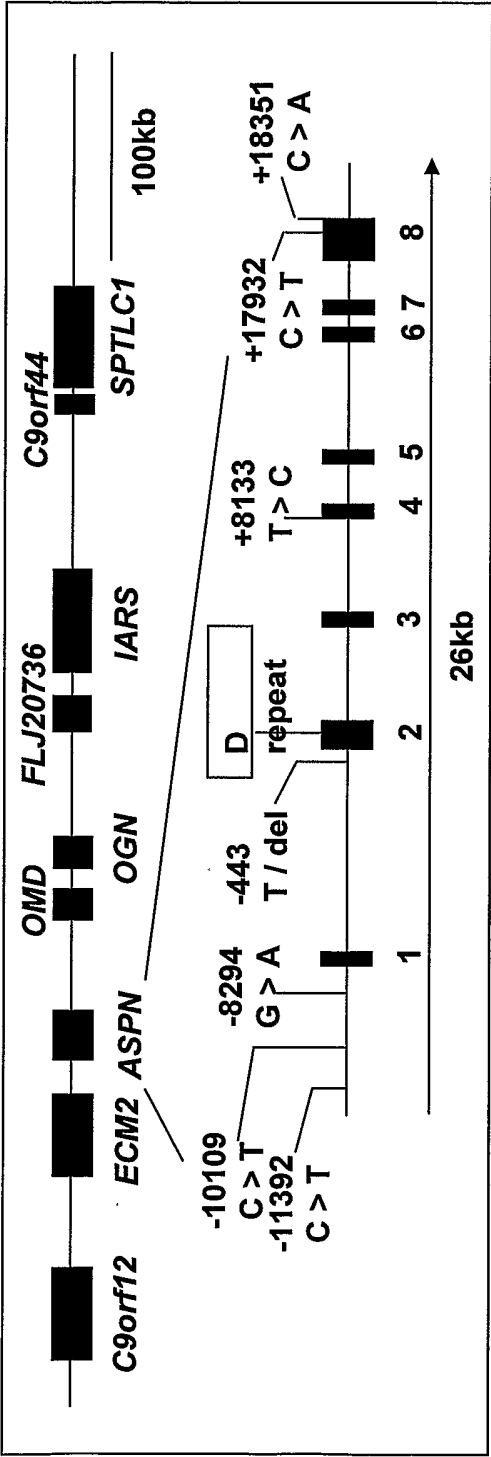


図 9 b

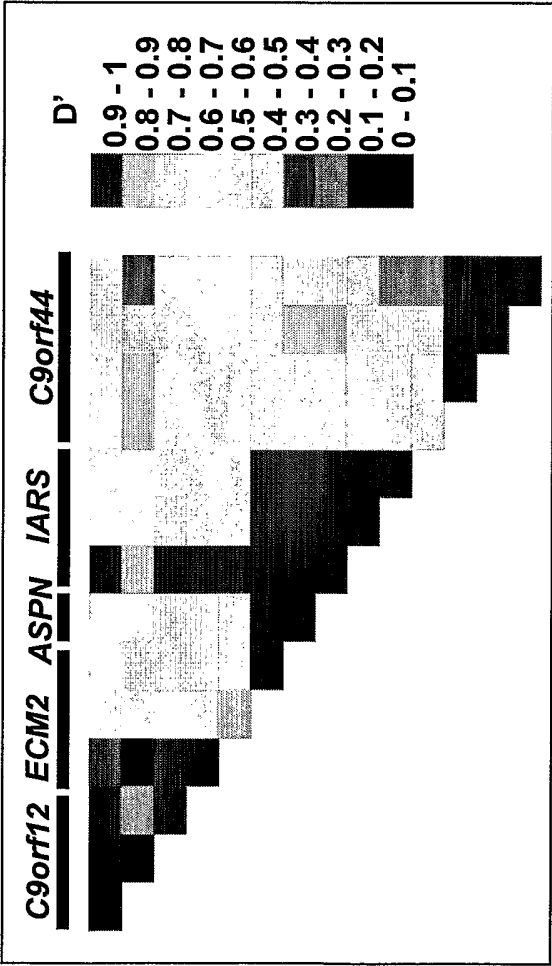


図 10 b

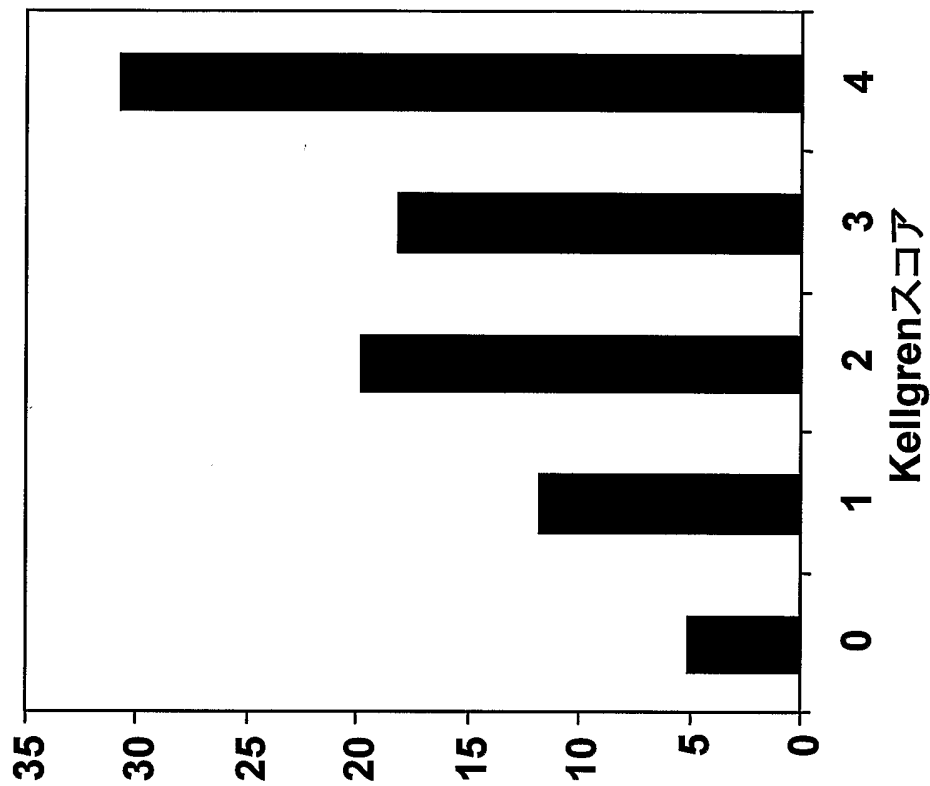
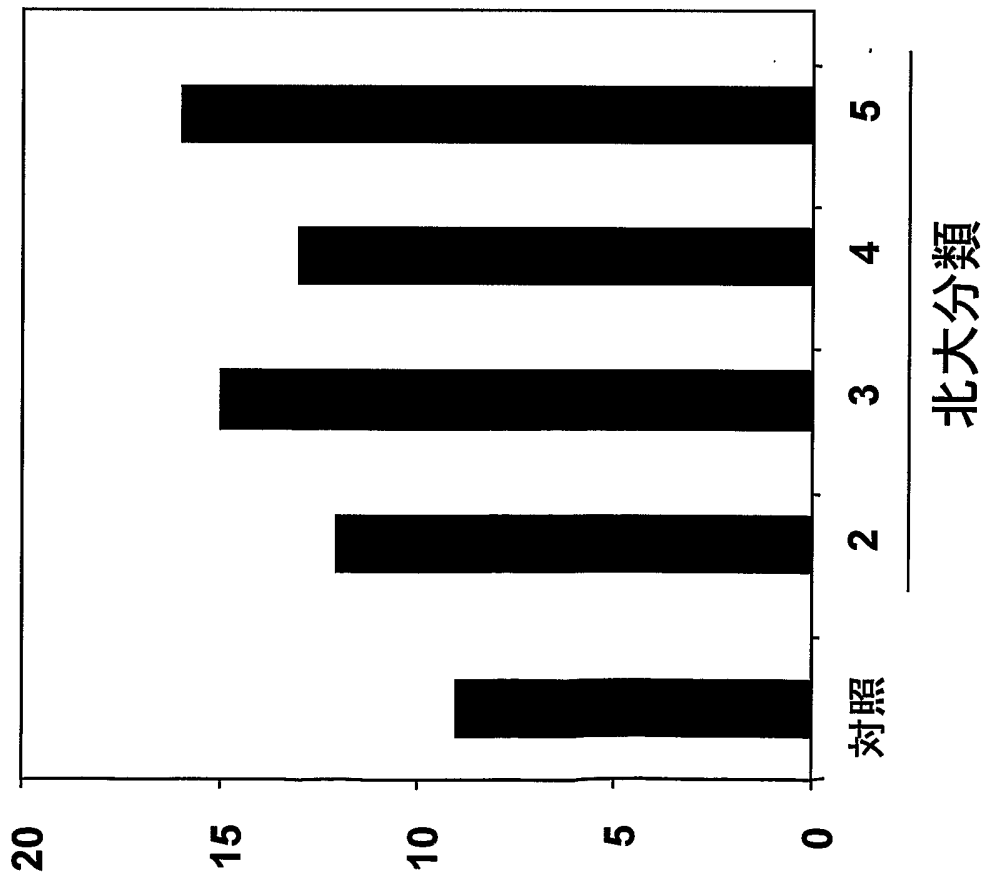


図 10 a



11 / 39

図 11 a

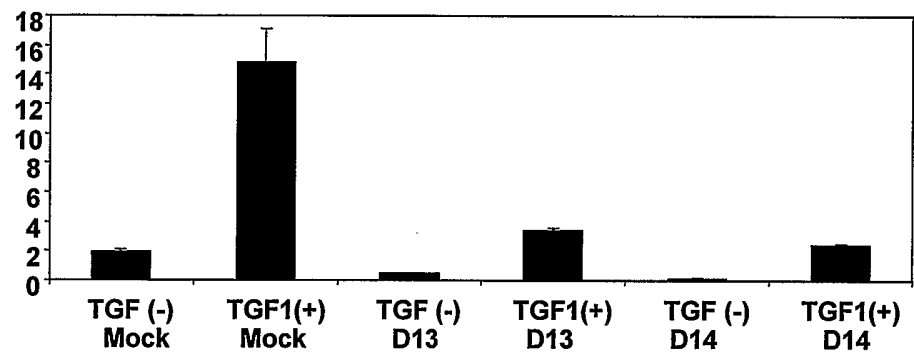


図 11 b

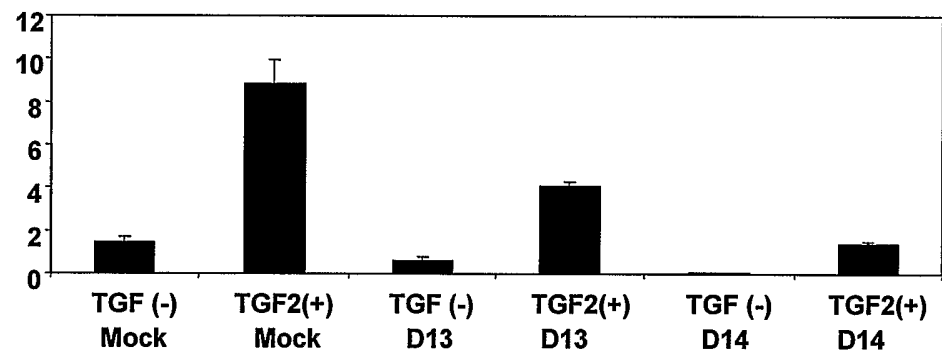
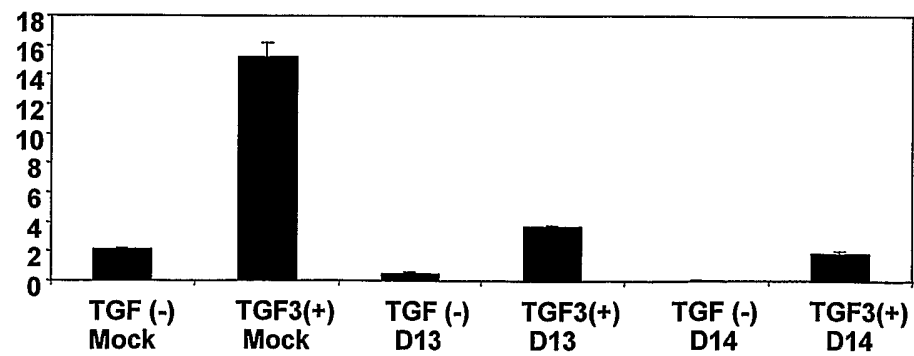


図 11 c



1 2 / 3 9

図 1 2 a

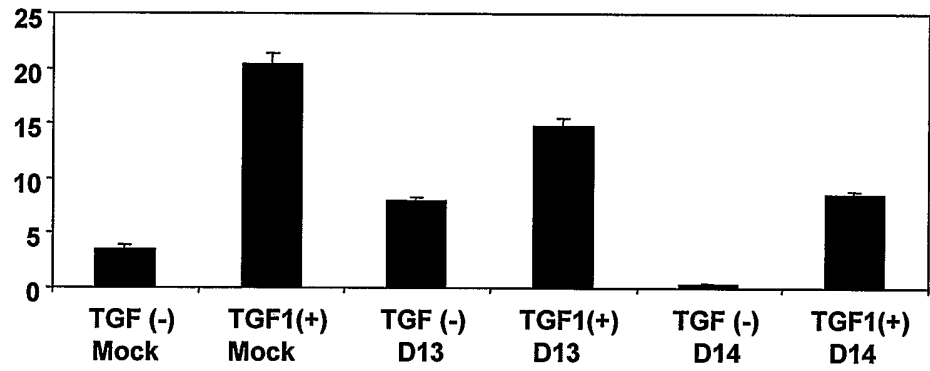


図 1 2 b

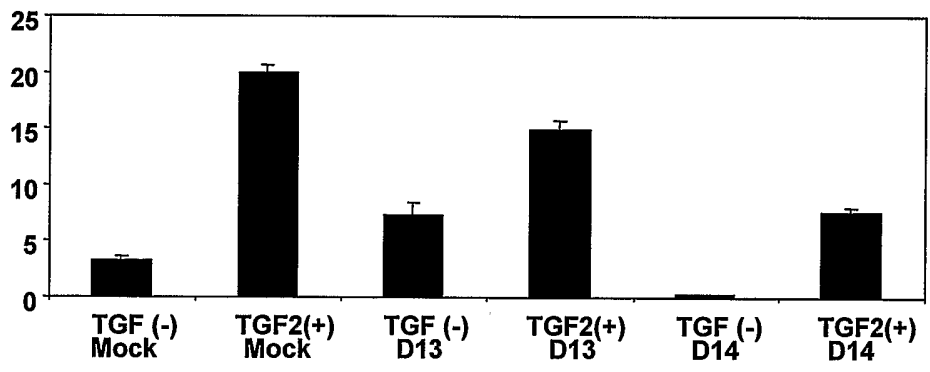
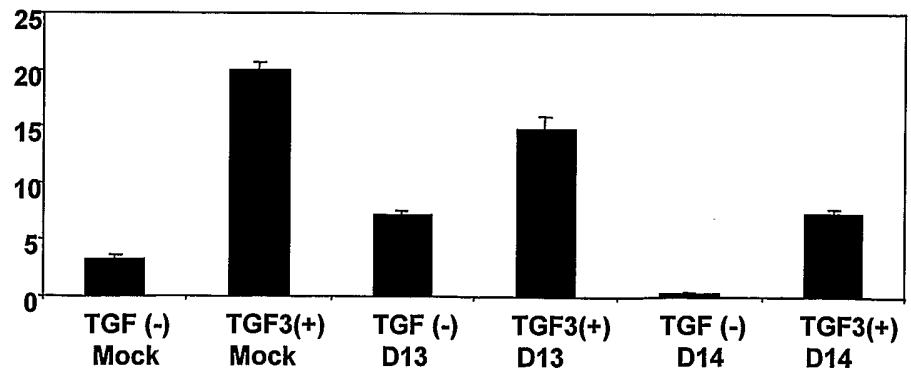


図 1 2 c



13 / 39

図 13 a

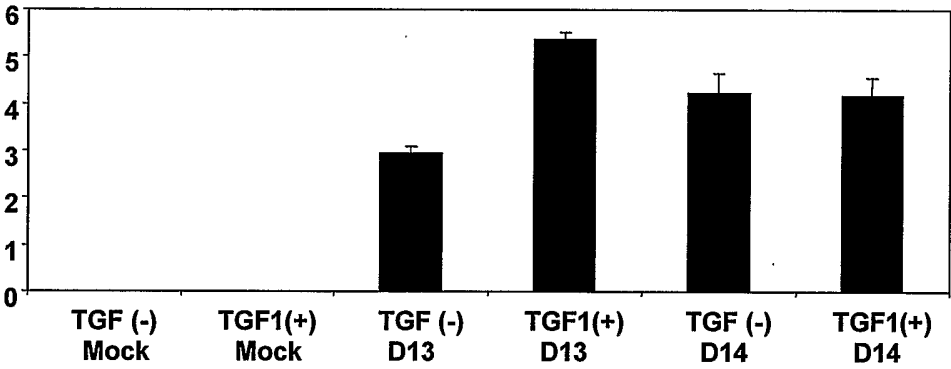


図 13 b

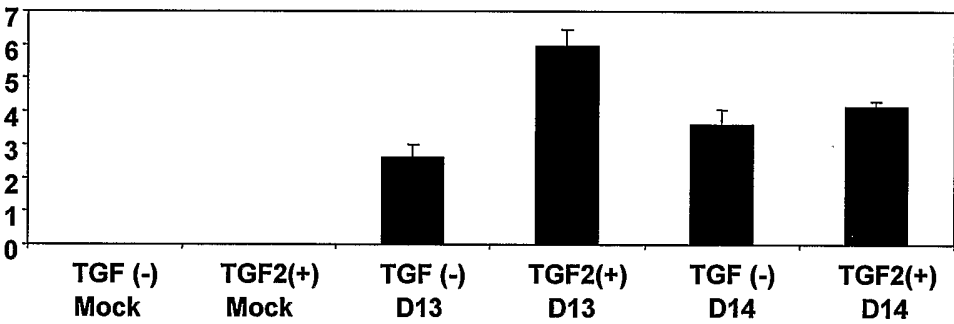


図 13 c

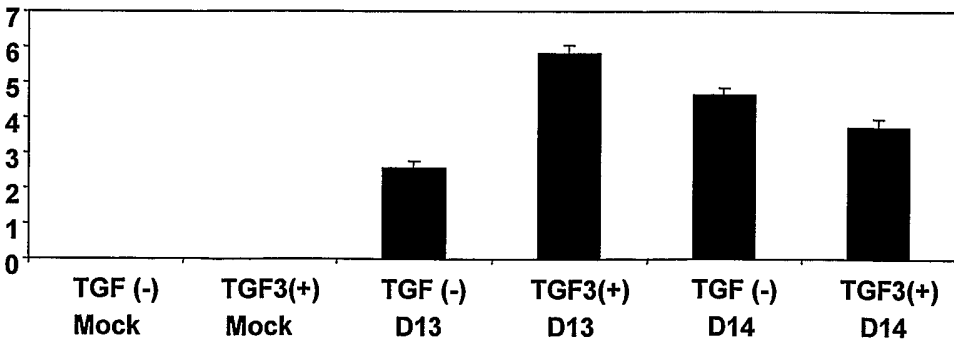
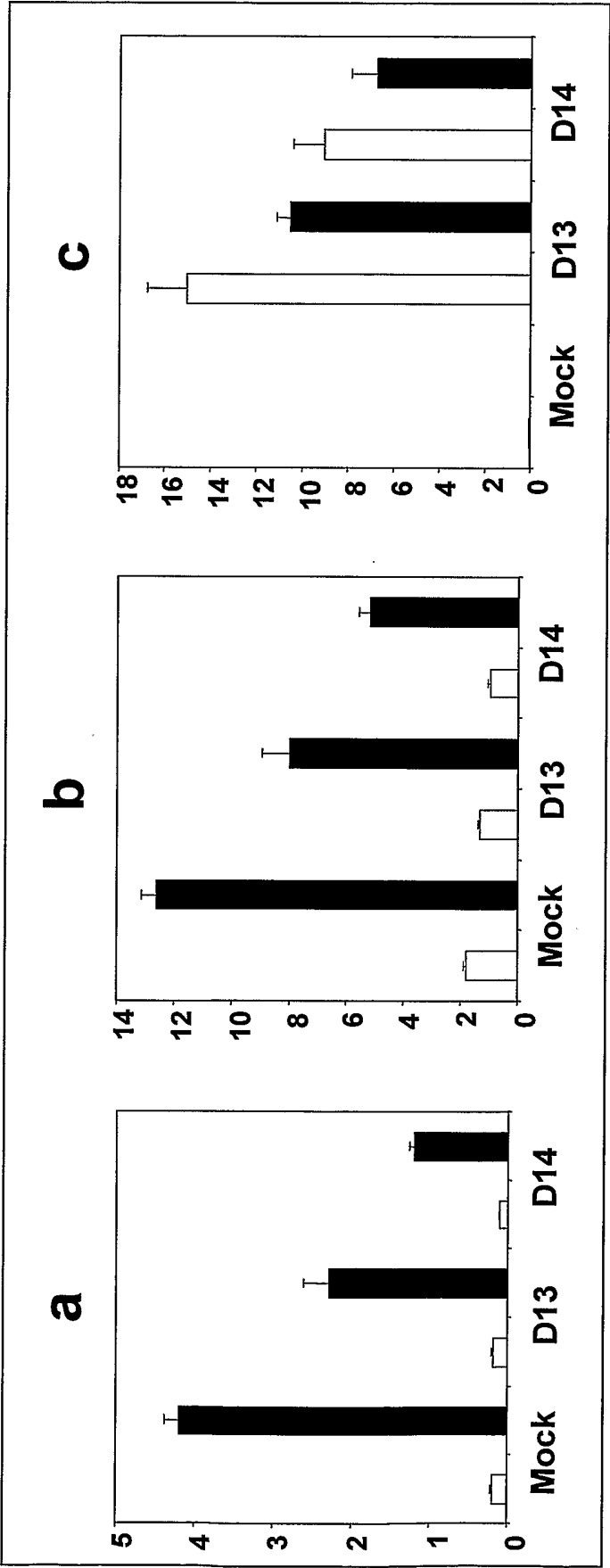


図 1 4



15/39

図 15 a

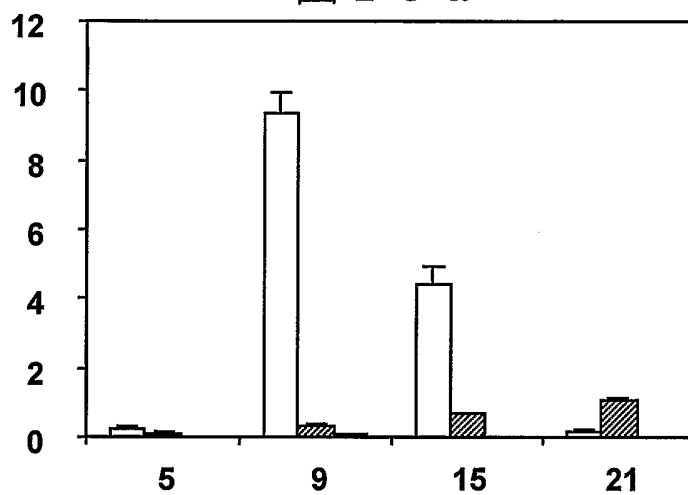


図 15 b

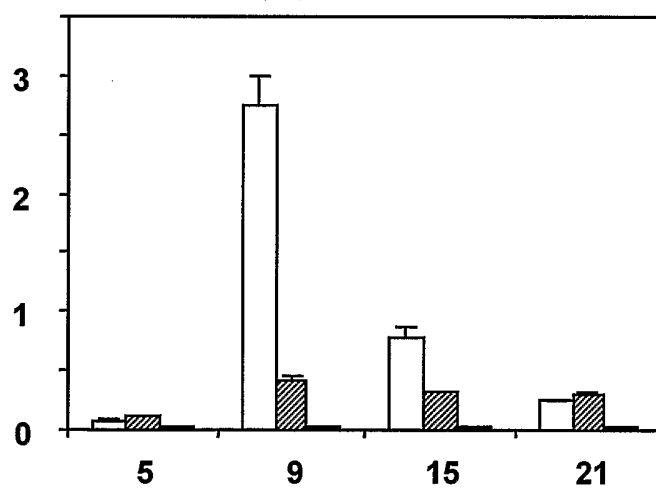
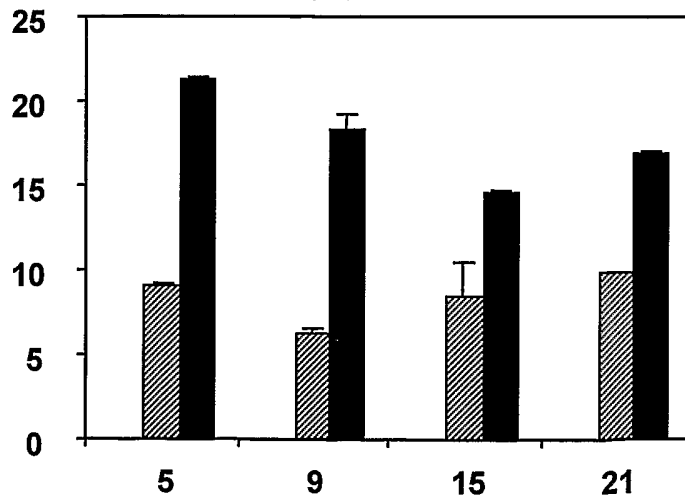


図 15 c



16 / 39

図 16 a

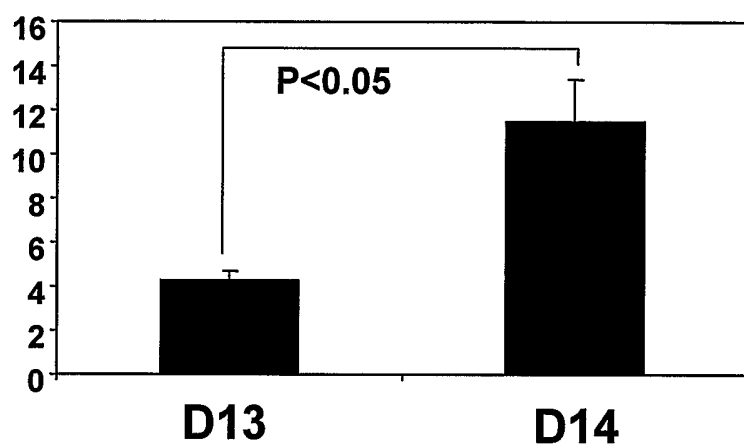


図 16 b

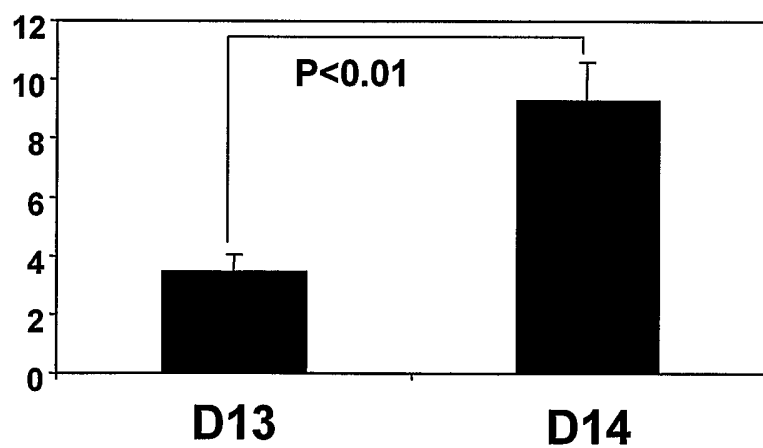


図 17

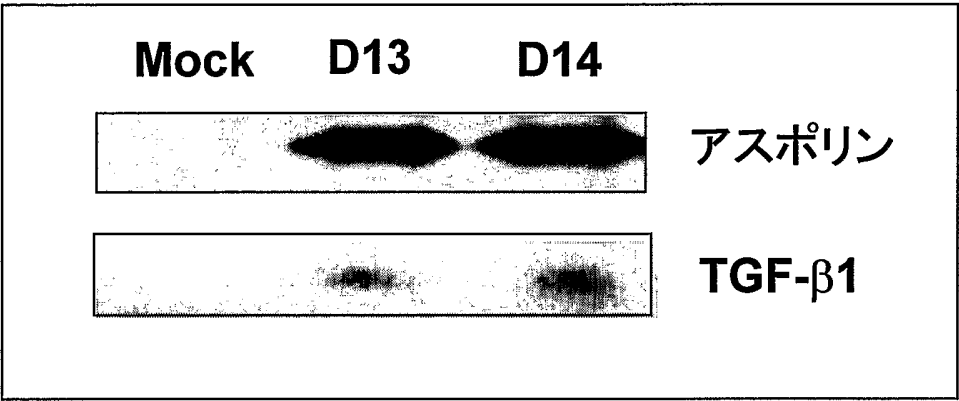
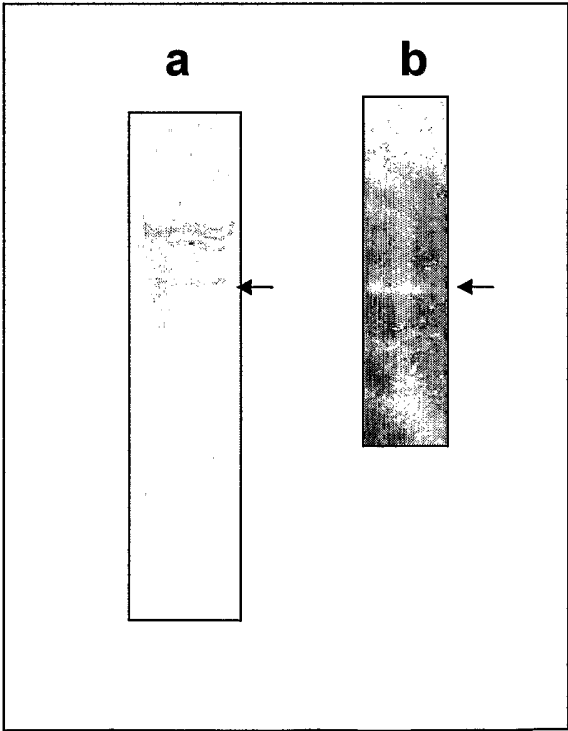


図 18



18/39

図 19 a

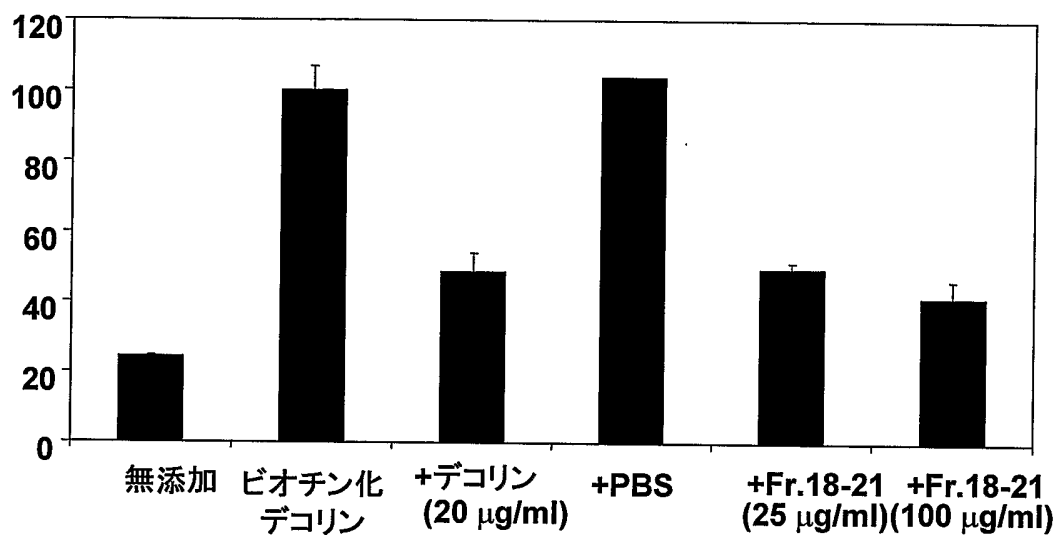


図 19 b

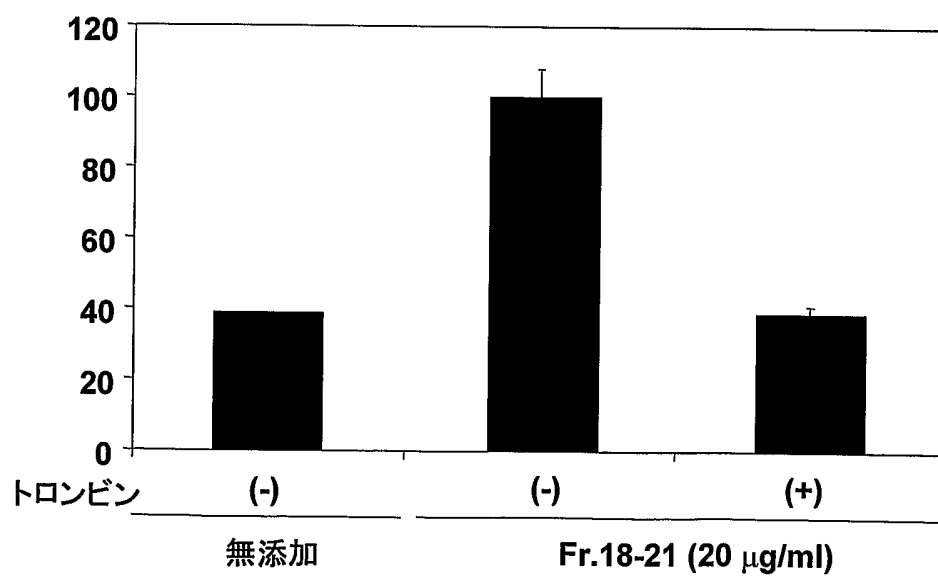


図 2 0

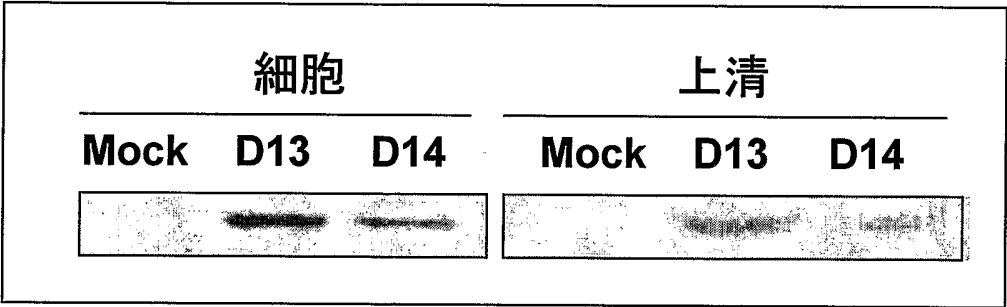


図 2 1

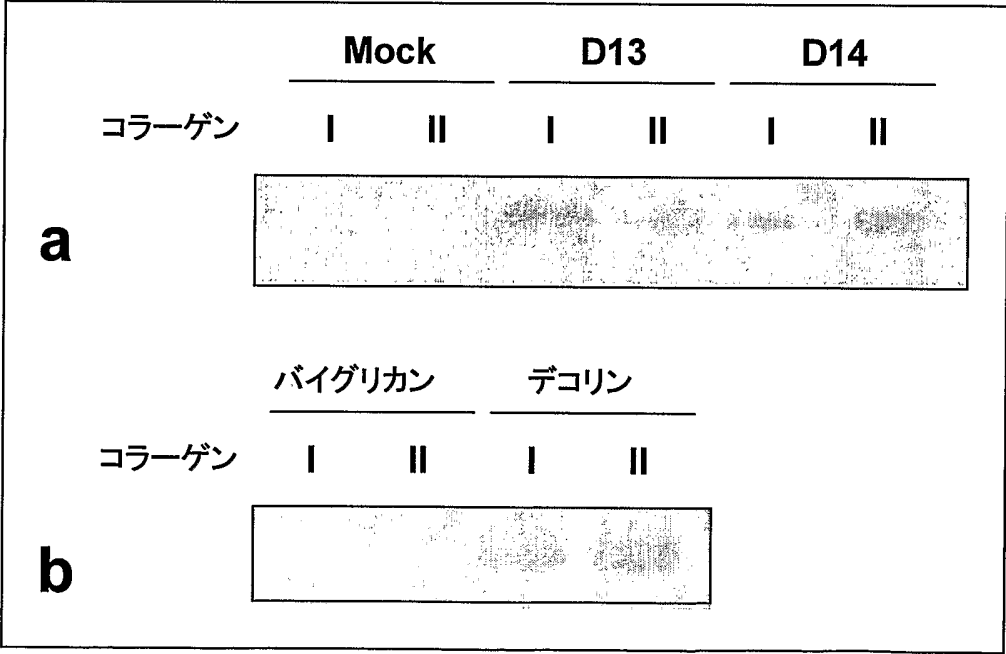


図 2 2

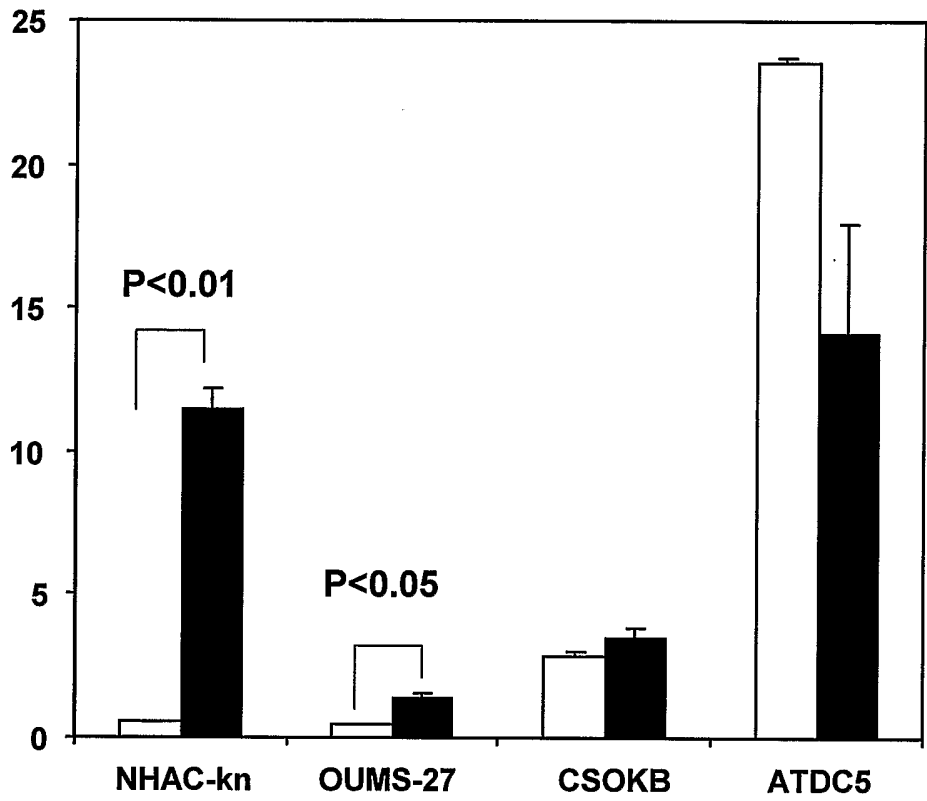


図 2 5

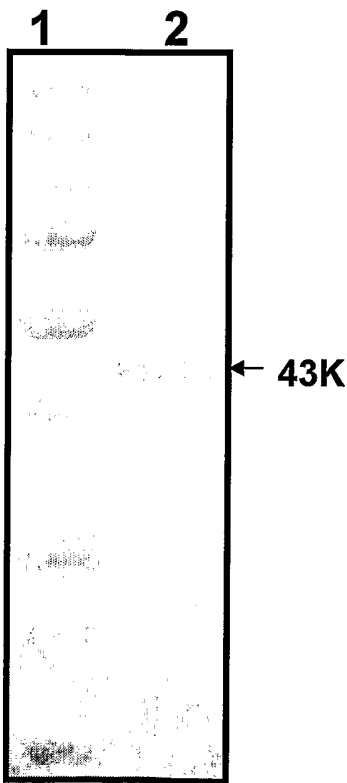


図 2 3 a

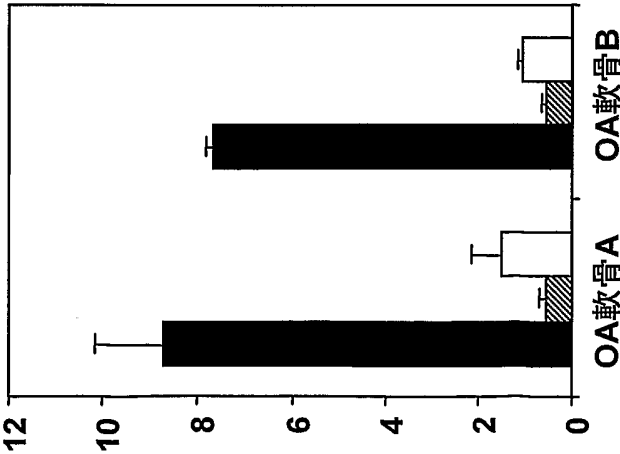


図 2 3 b

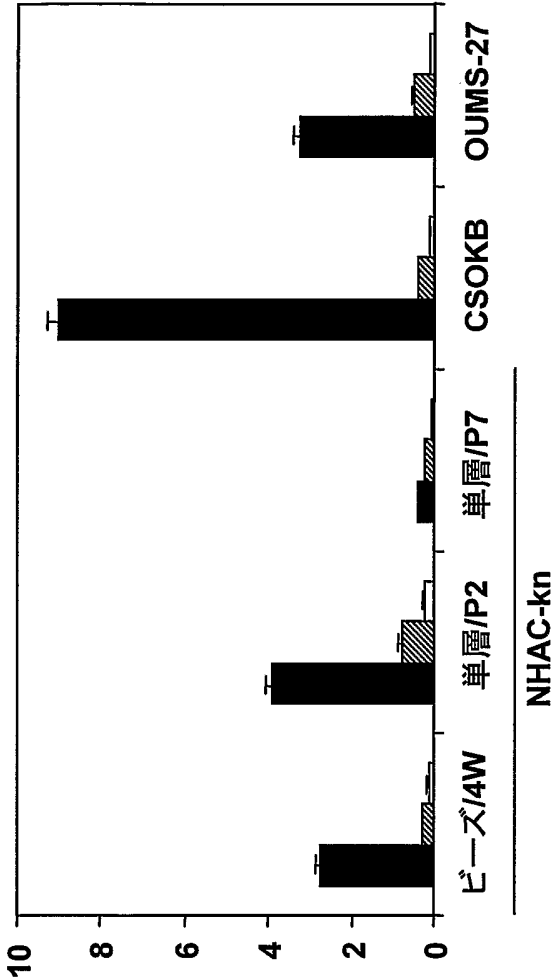


図 2 3 c

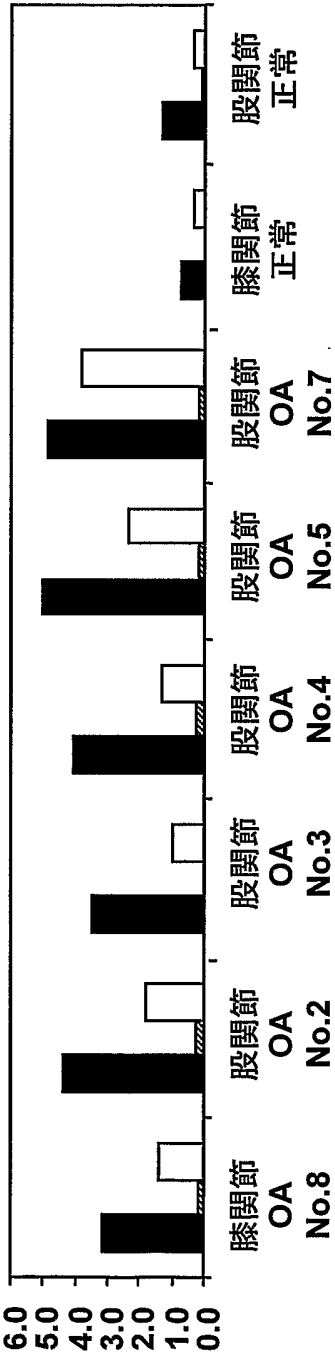


図 24 a

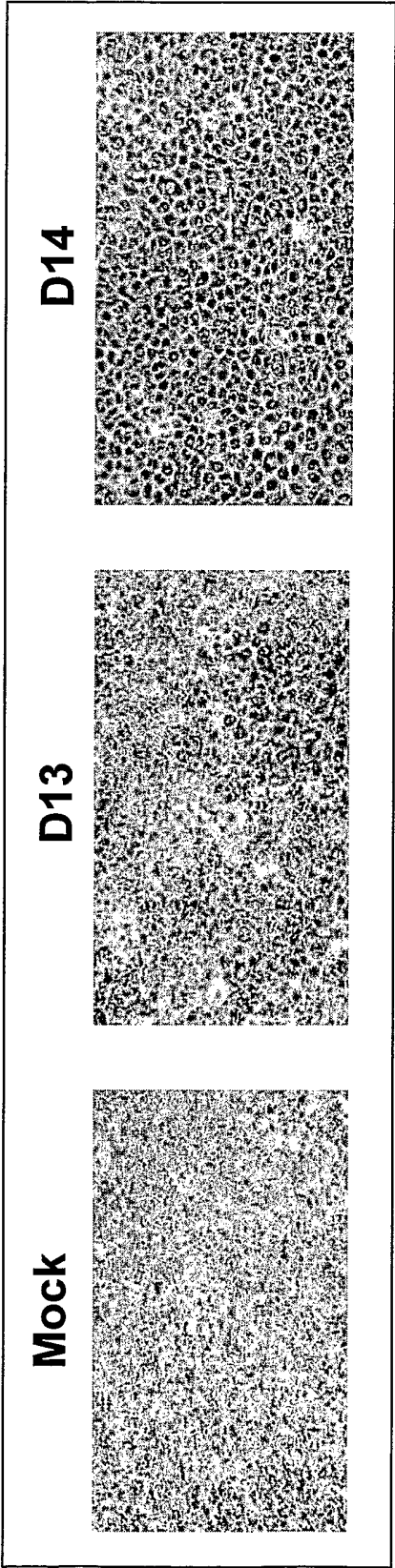
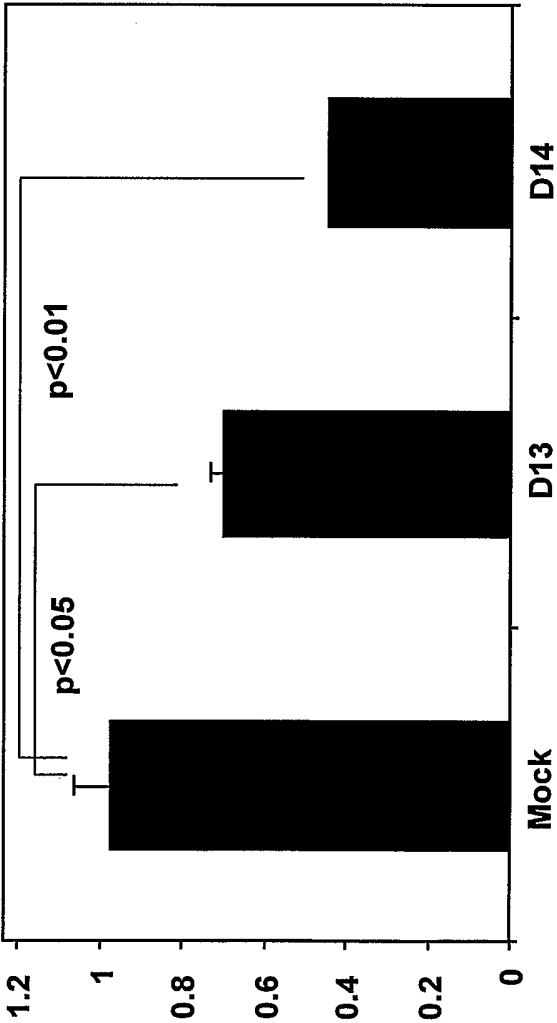


図 24 b



23 / 39

図 2 6

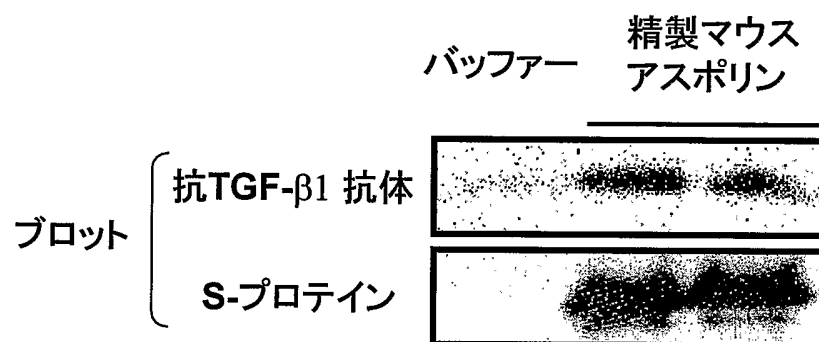


図 2 7 a

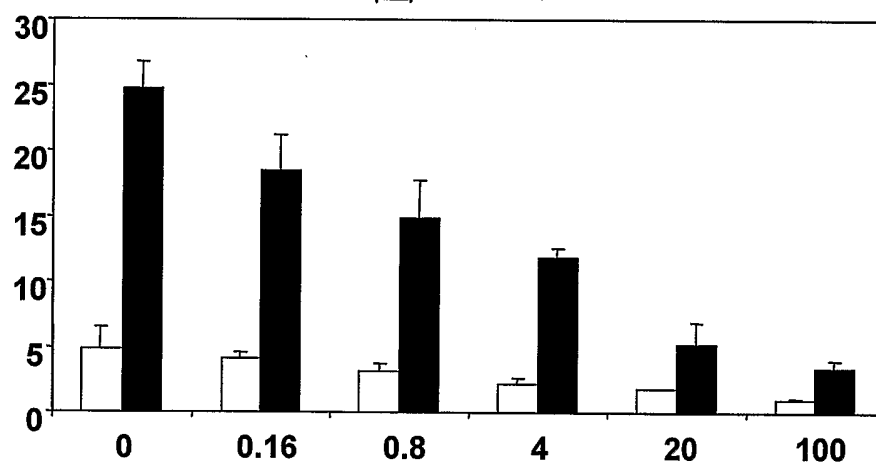
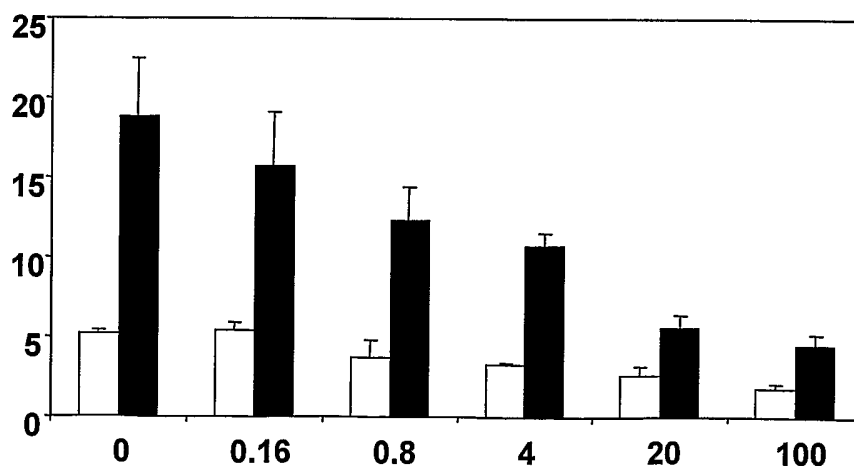


図 2 7 b



24 / 39

図 28

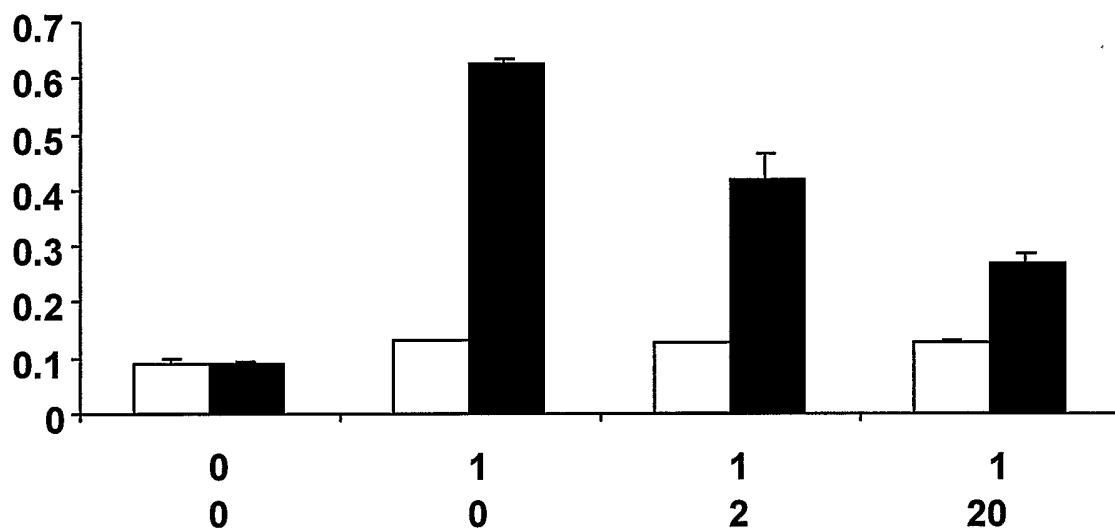


図 29

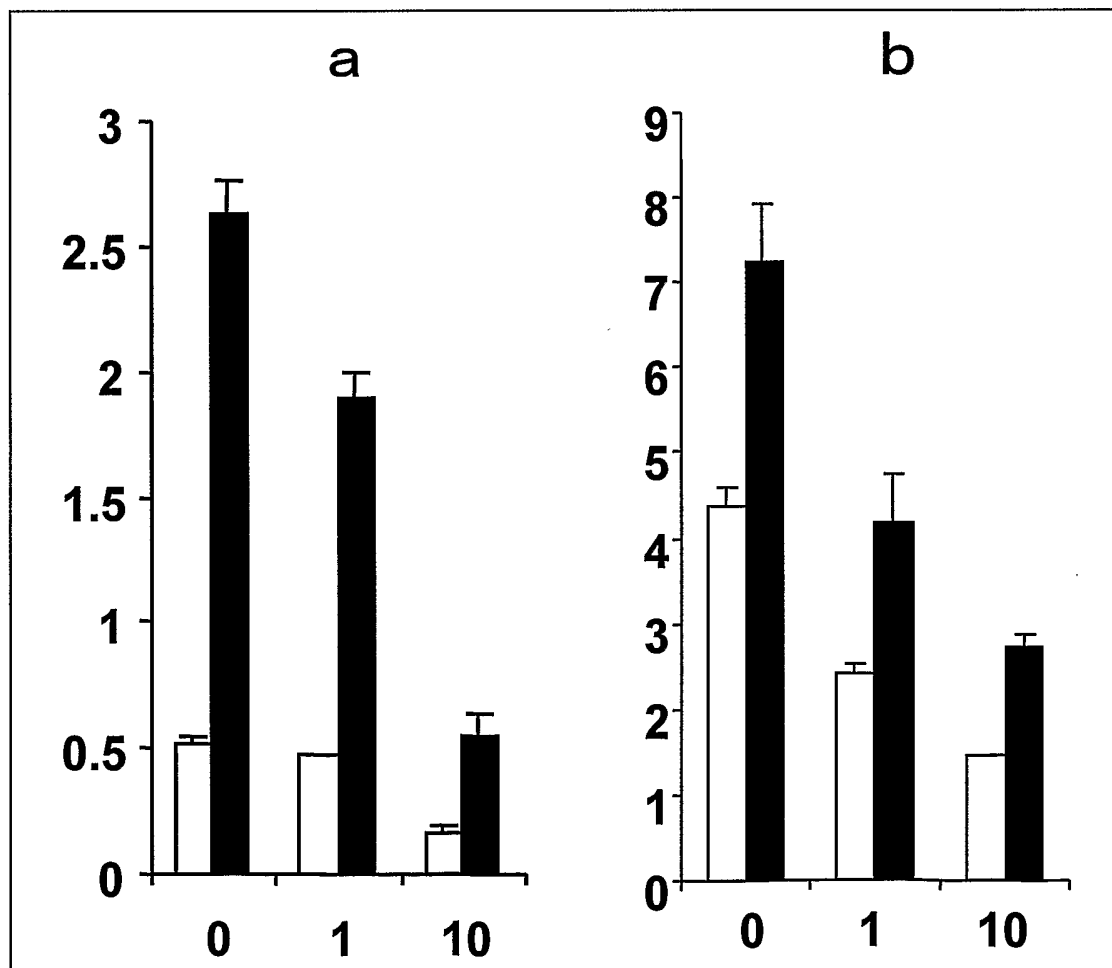
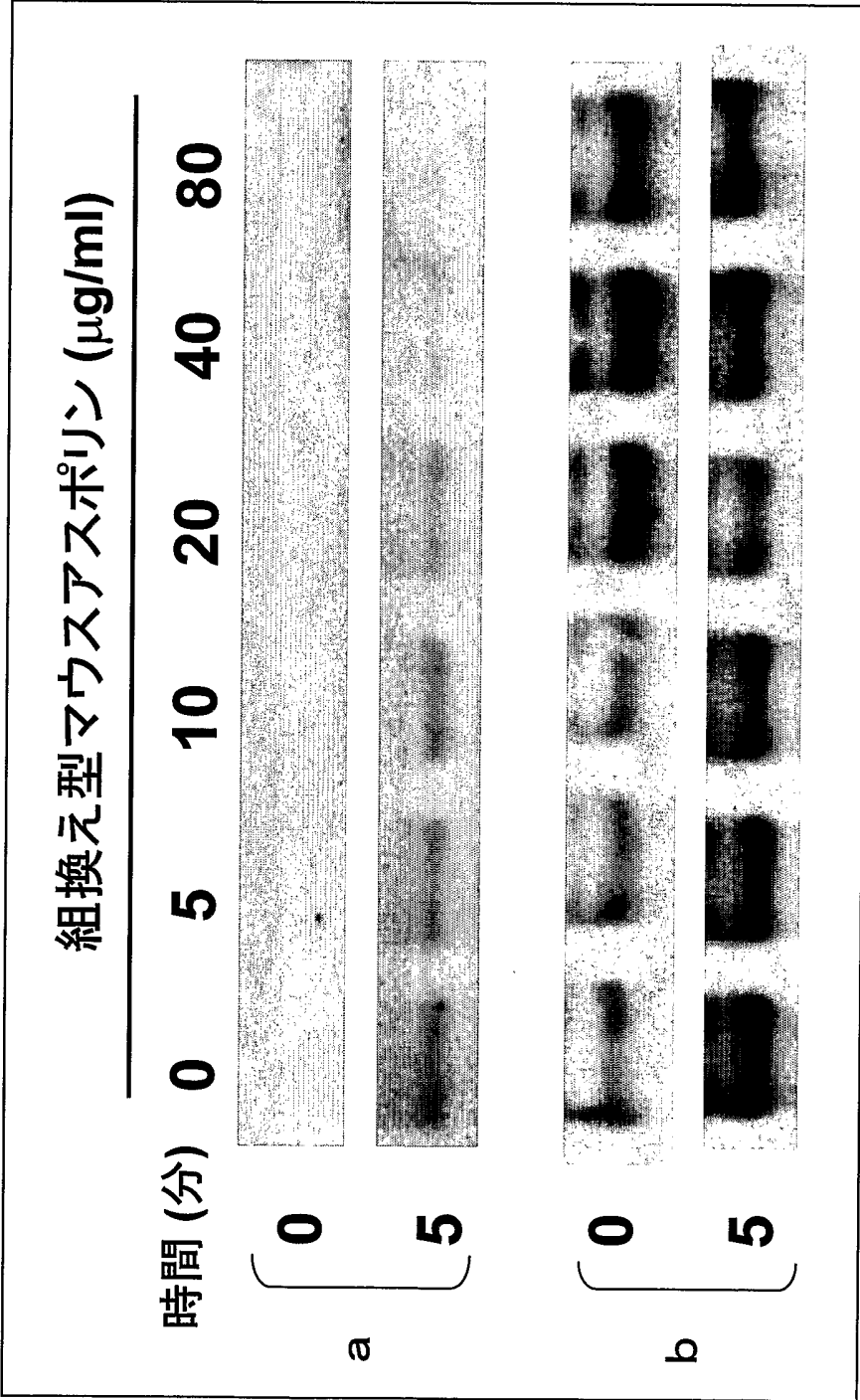


図 30



26 / 39

図 3 1

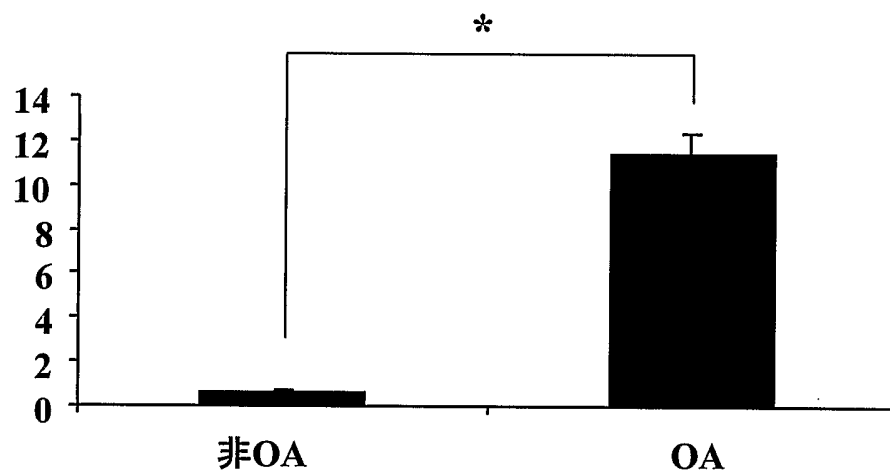


図 3 2

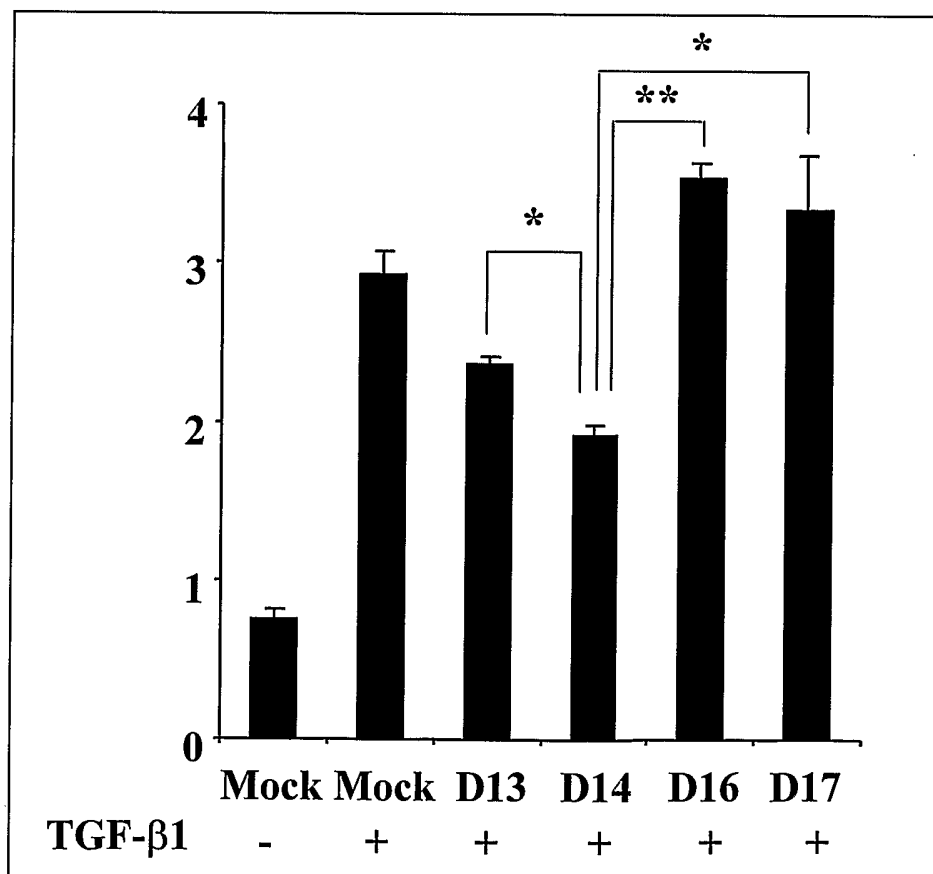


図 3 3

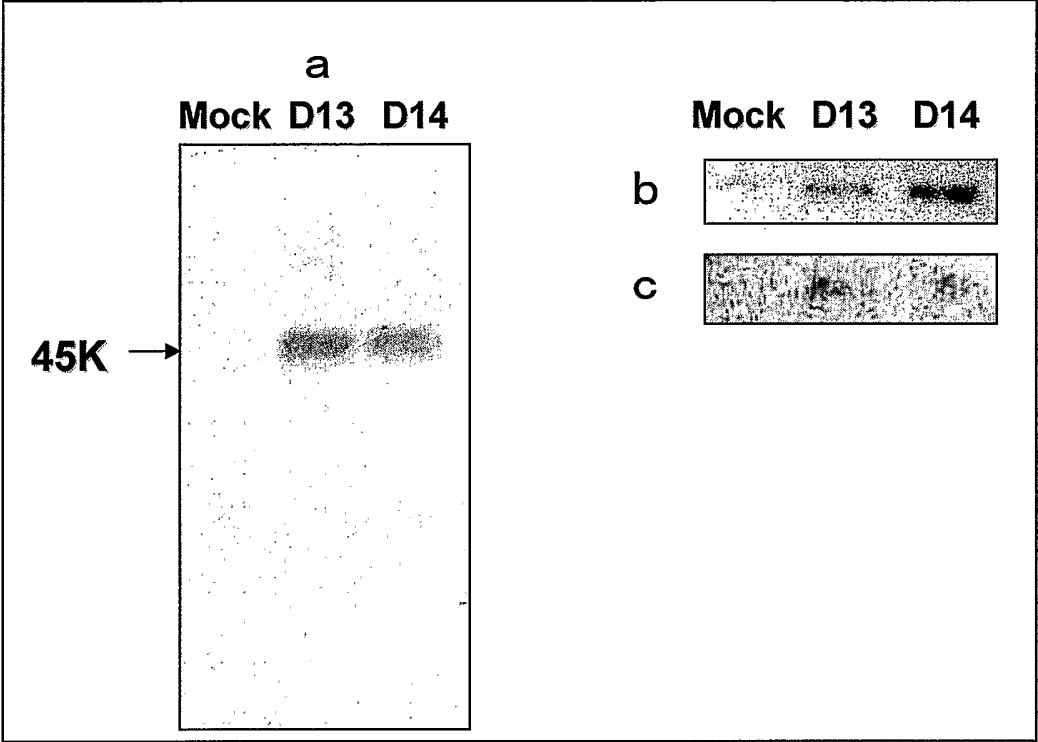
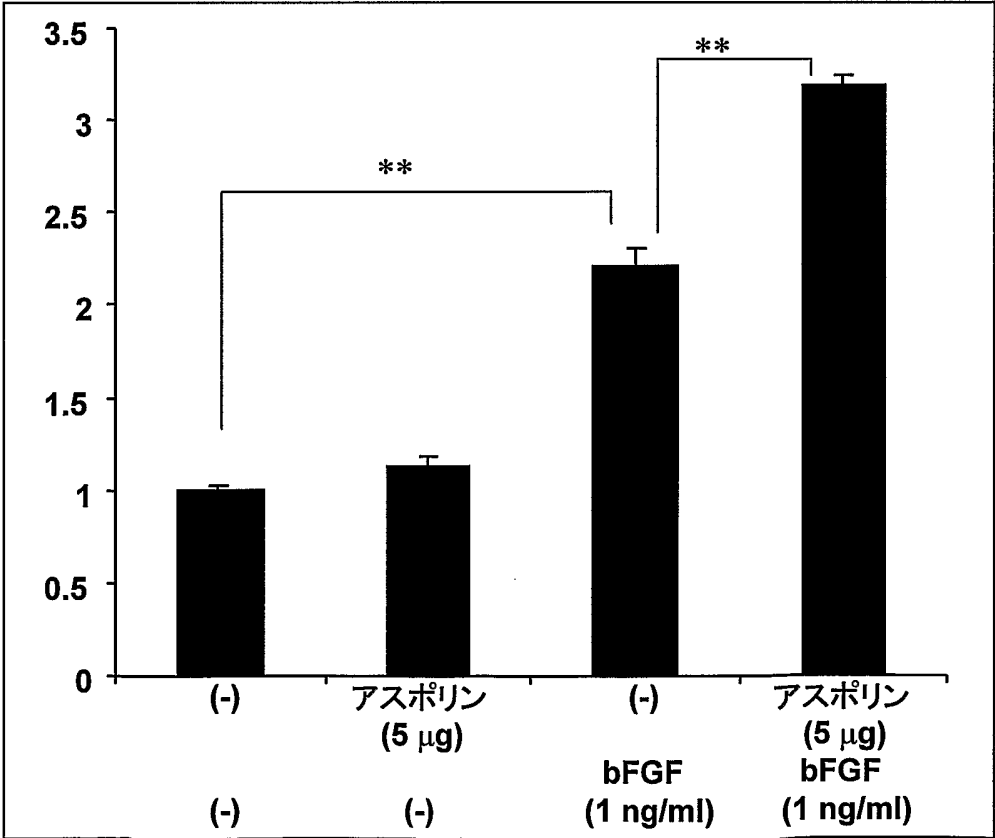


図 3 5



28 / 39

図 3 4 a

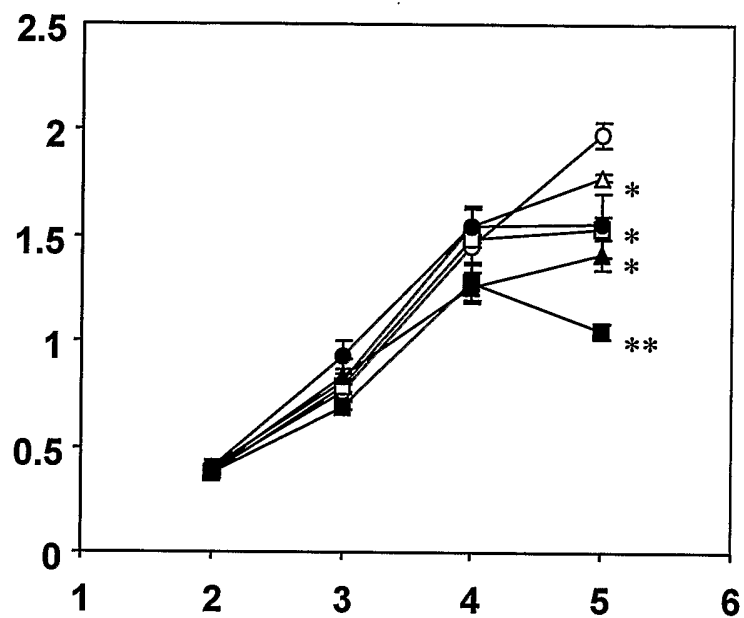


図 3 4 b

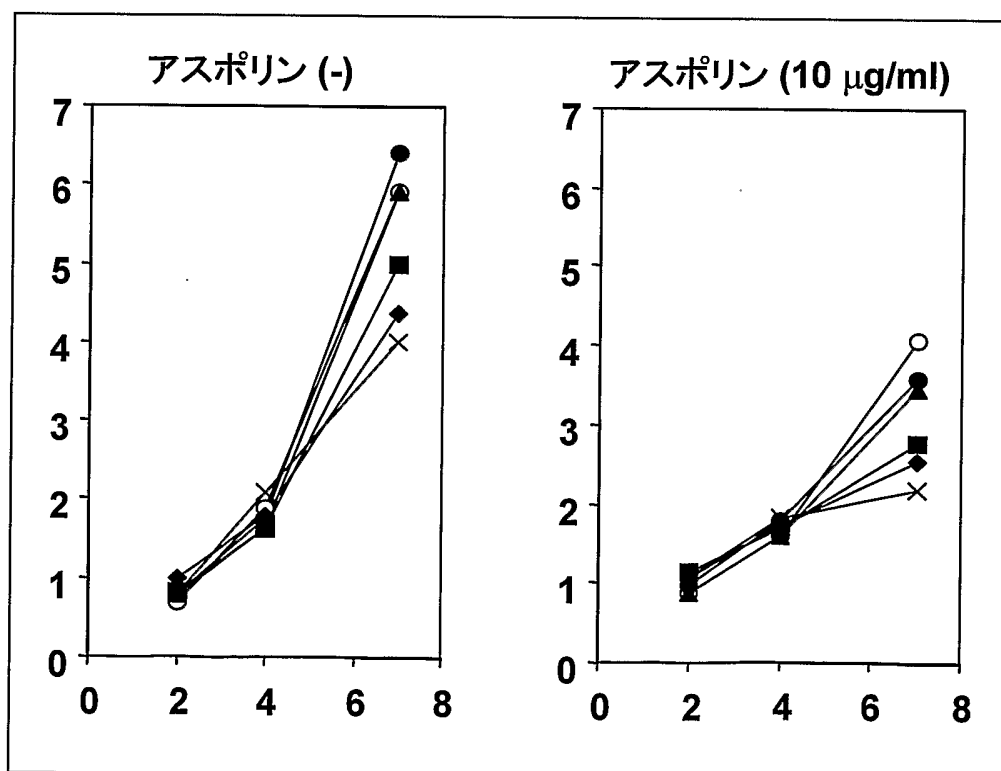


図 3 6

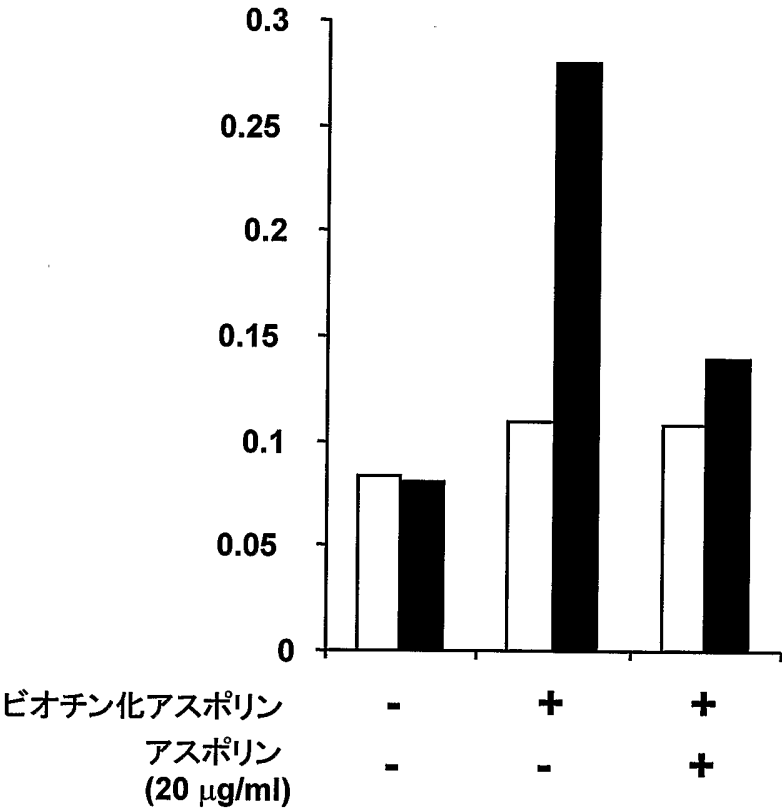
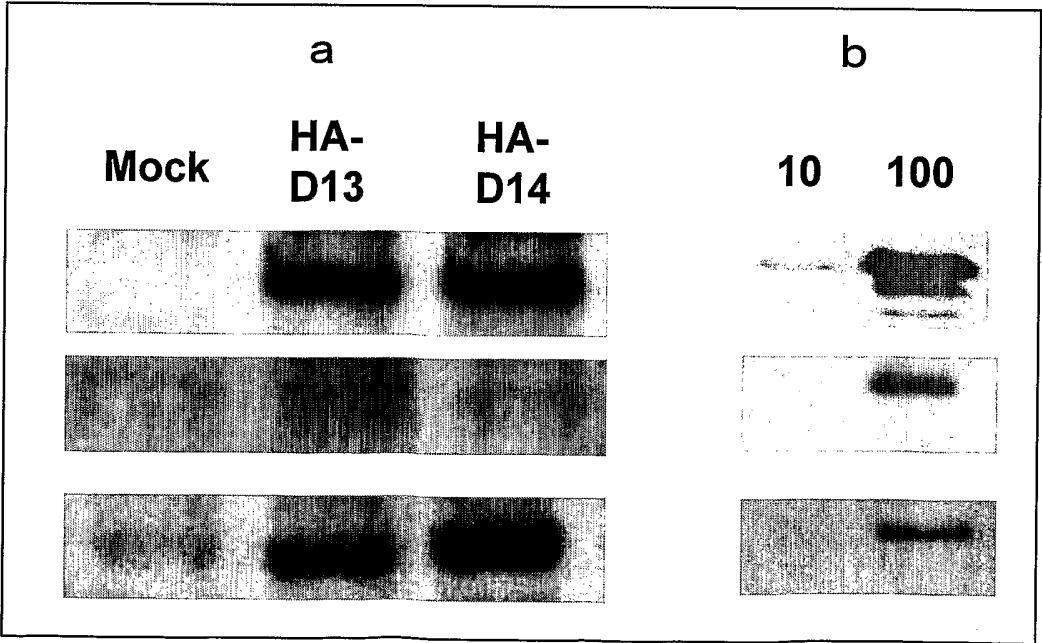


図 3 7



30 / 39

図 3 8

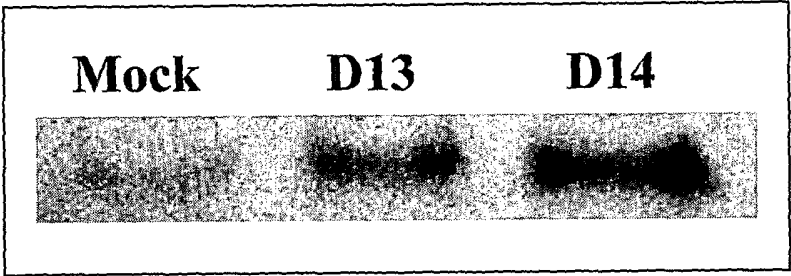


図 4 0

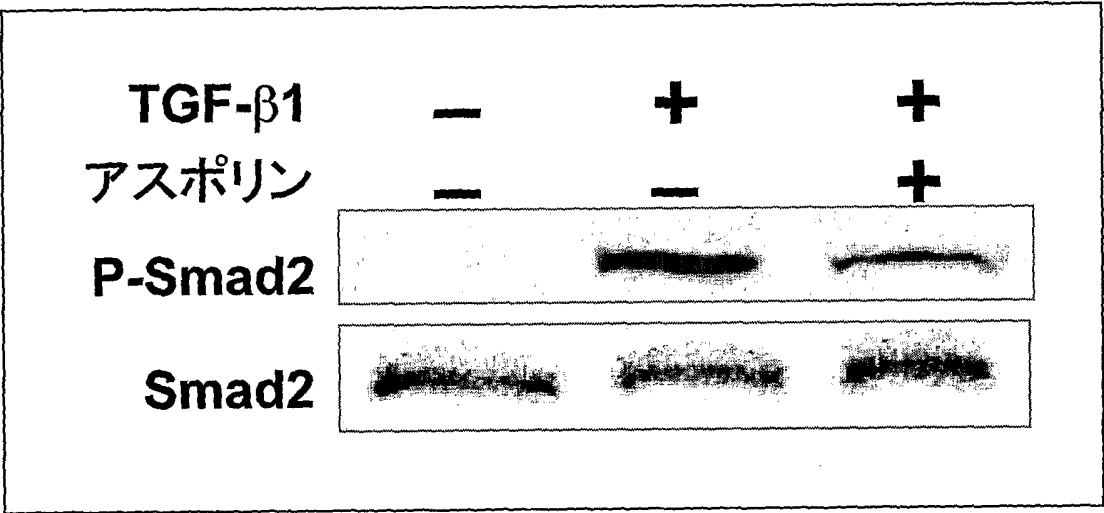


図 4 1

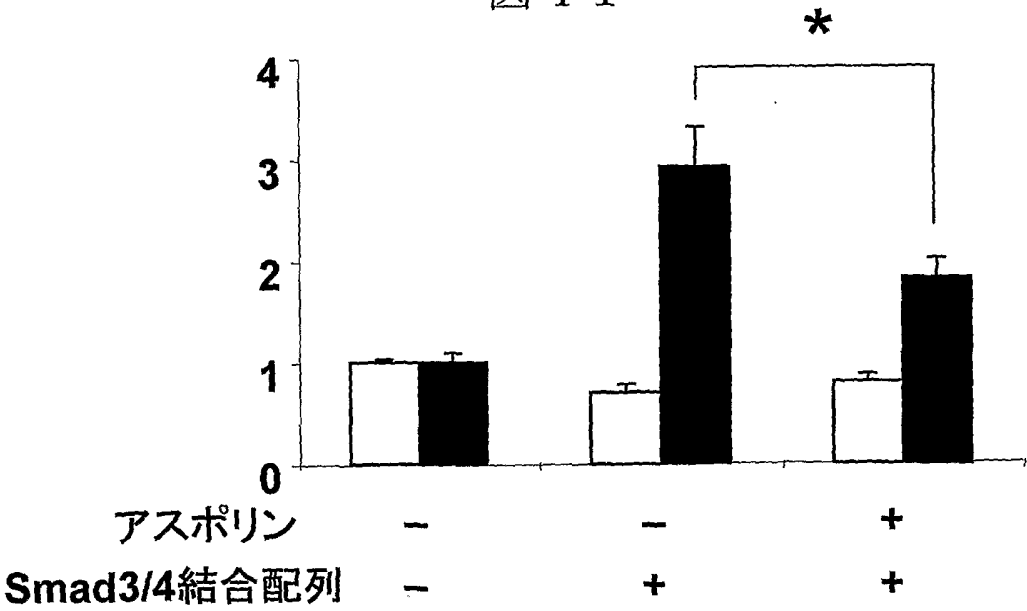
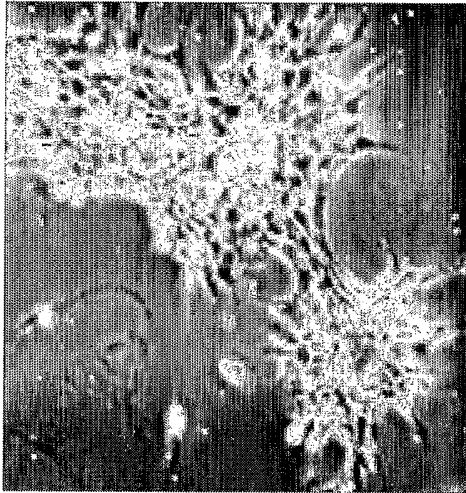
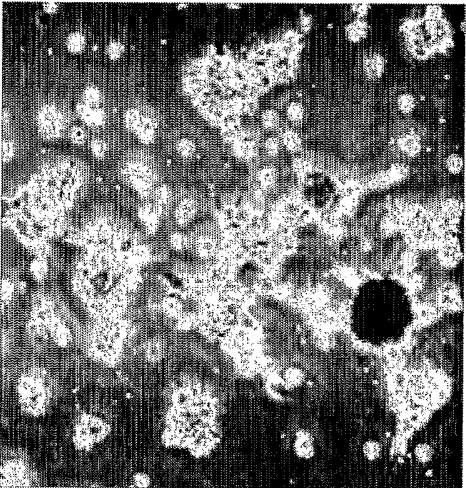


図 39

c



b



a

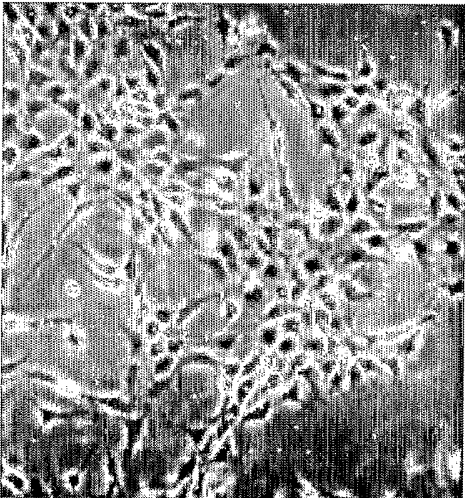
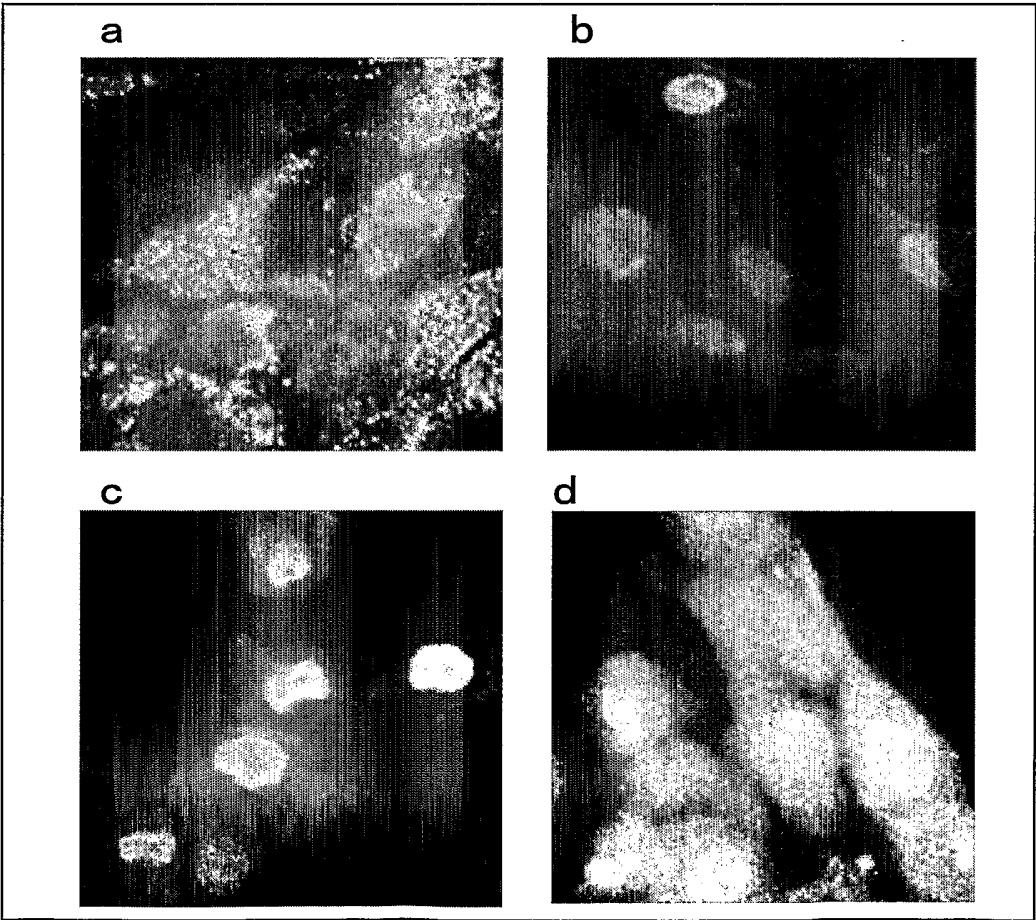


図 4 2

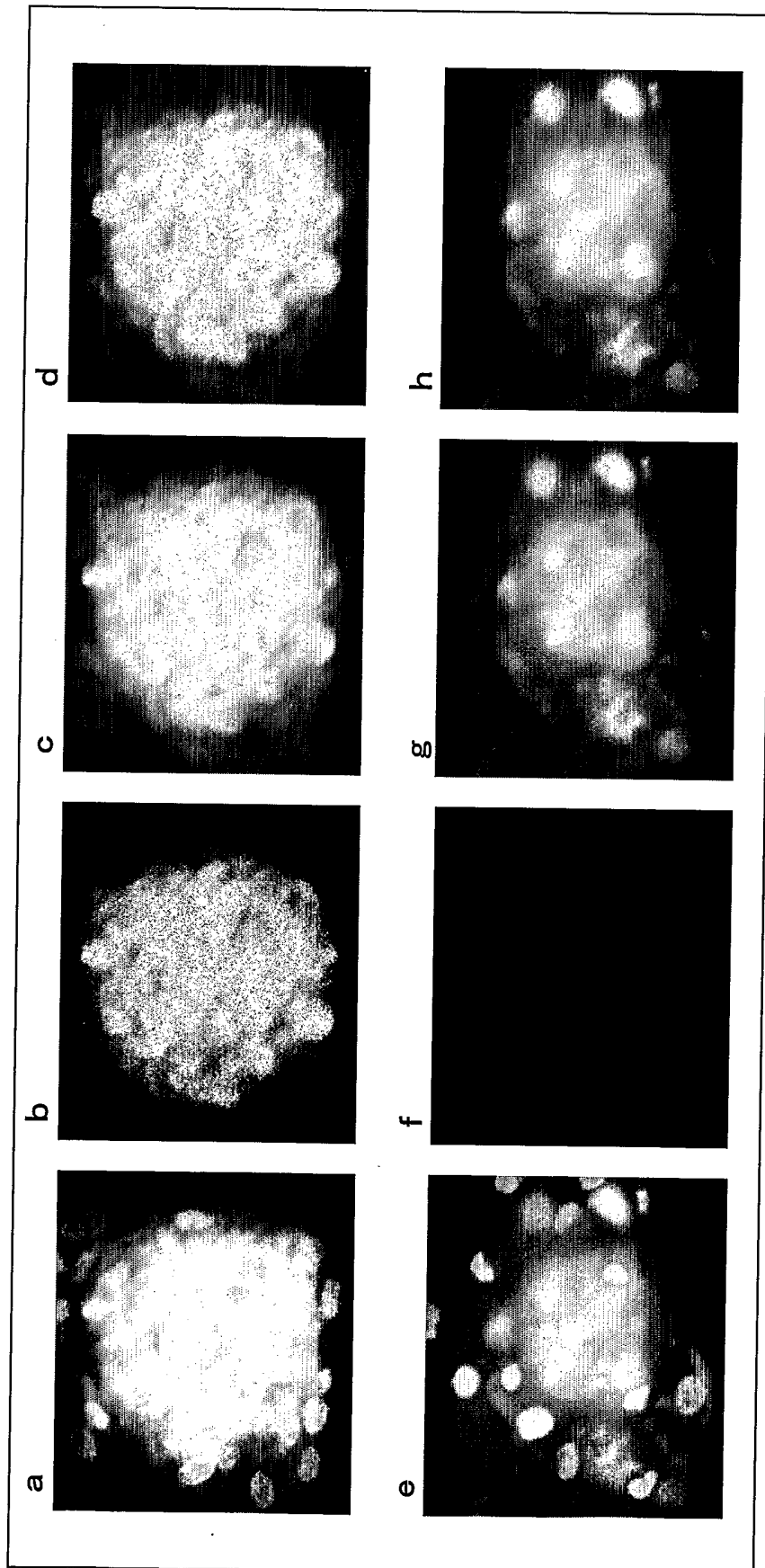


図 4 3



33 / 39

図 44



34 / 39

図 45

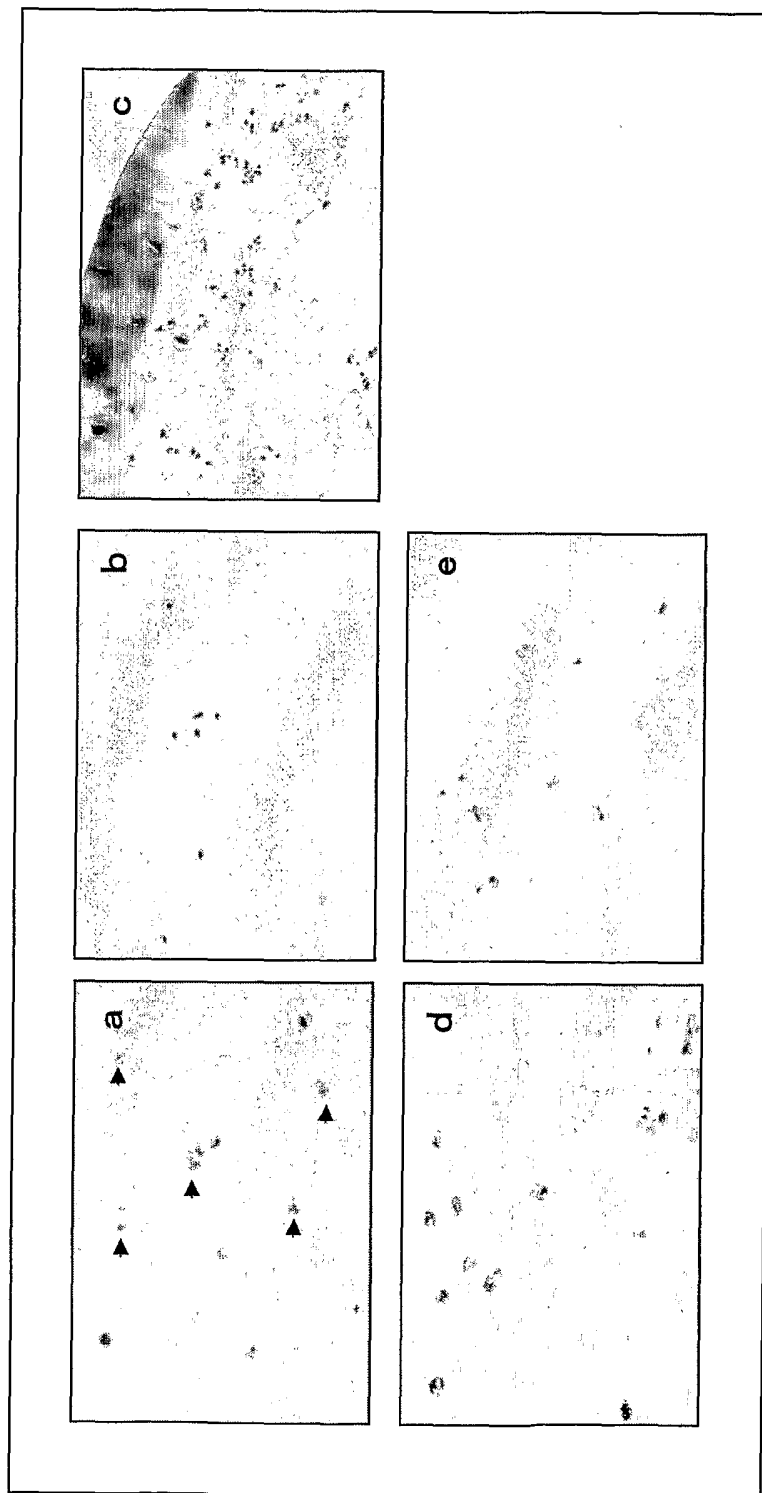


図 4 6

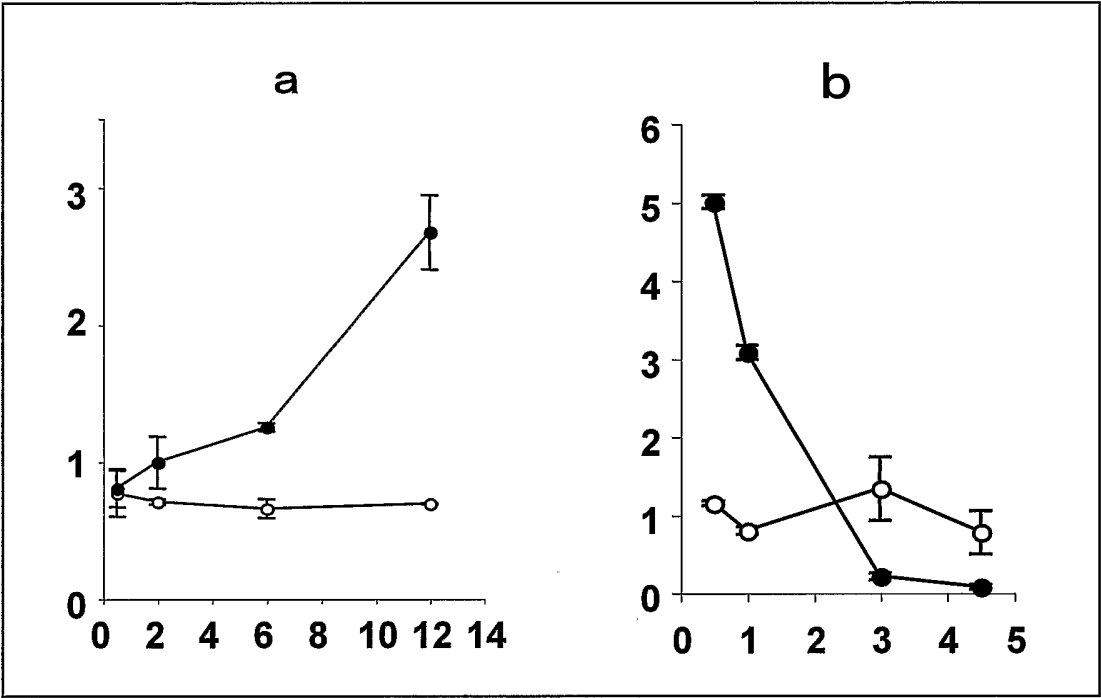


図 4 8

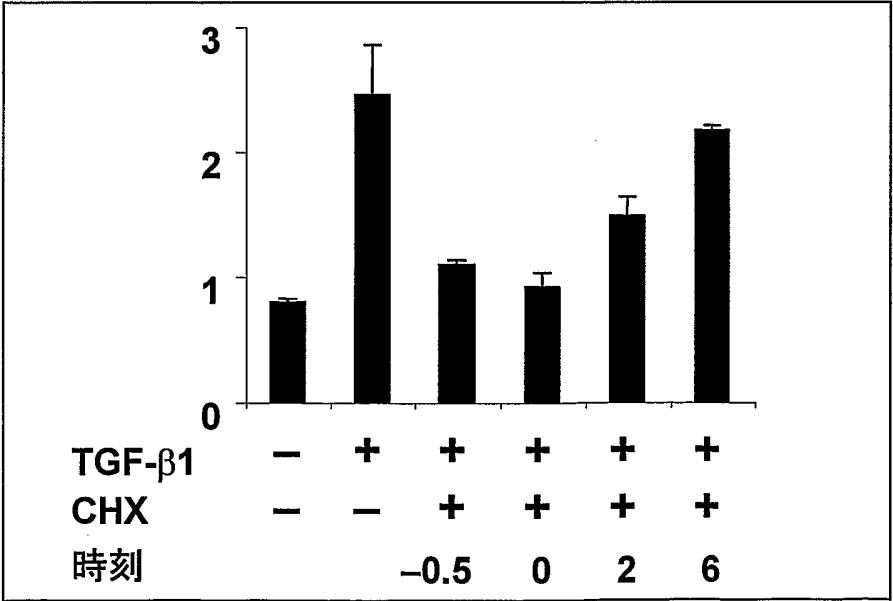


図 47 a

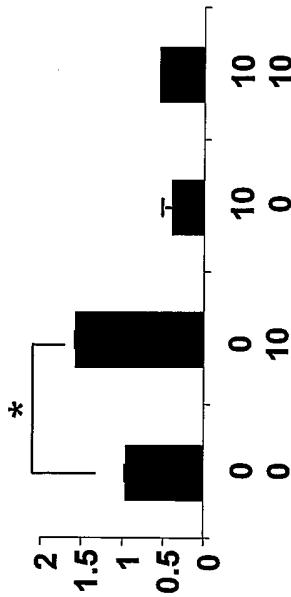


図 47 b

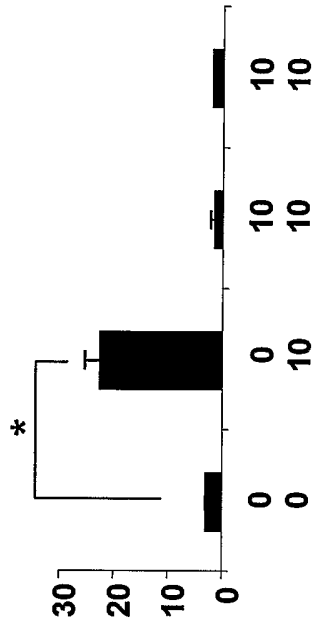


図 47 c

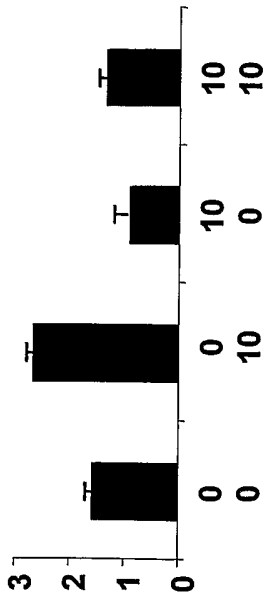
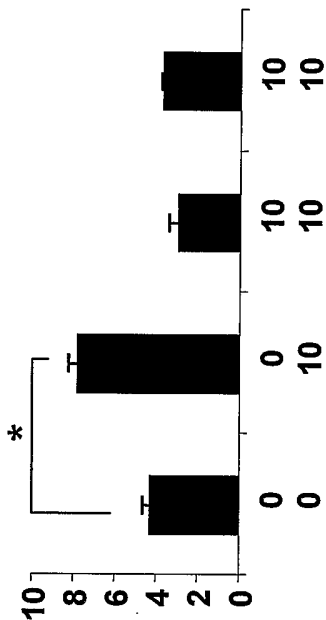


図 47 d



37 / 39

図 4 9

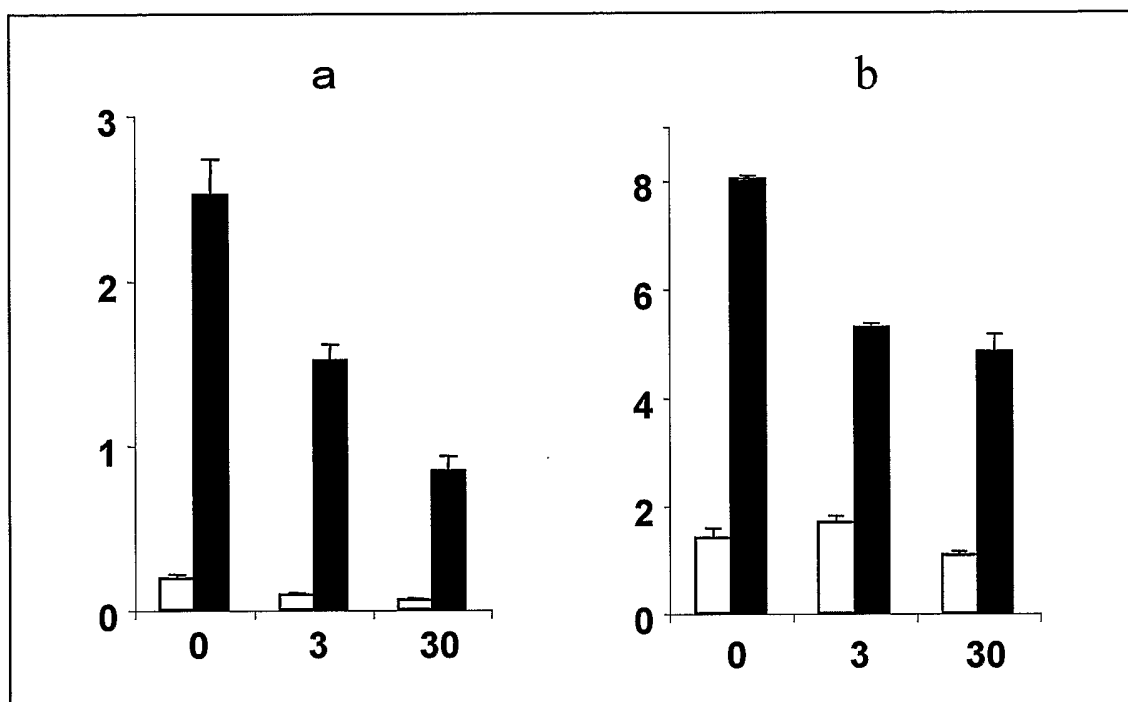


図 5 1

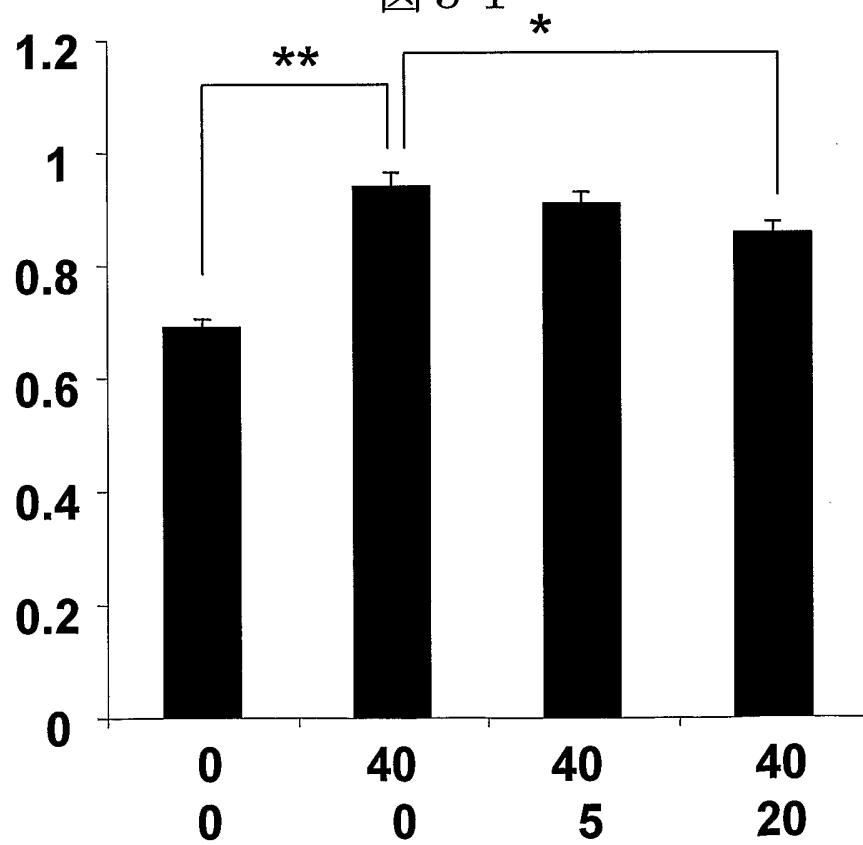
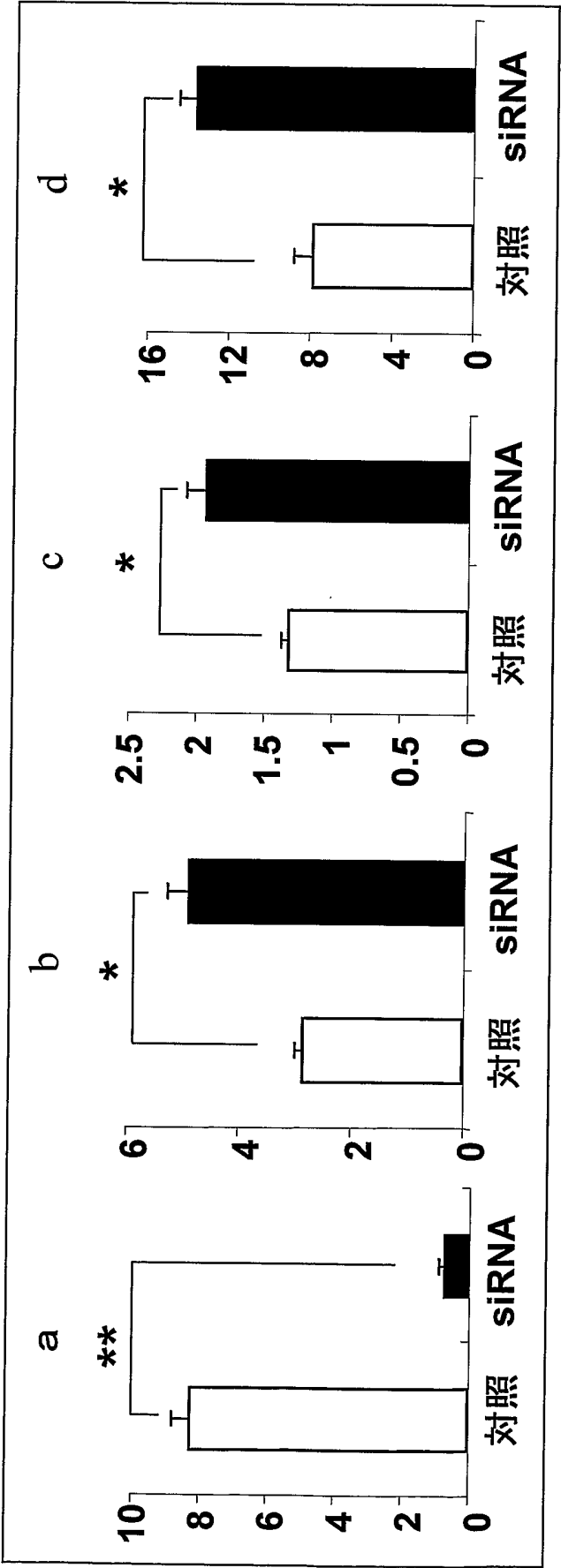


図 50



39 / 39

図 5 2

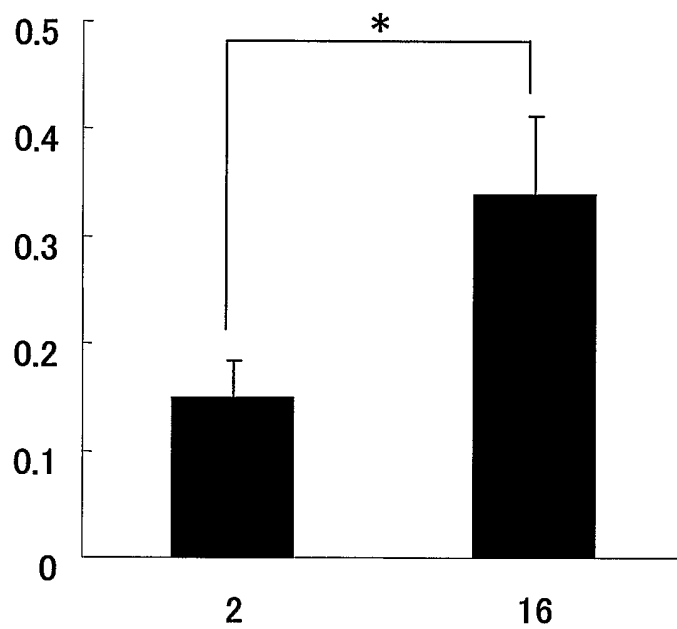
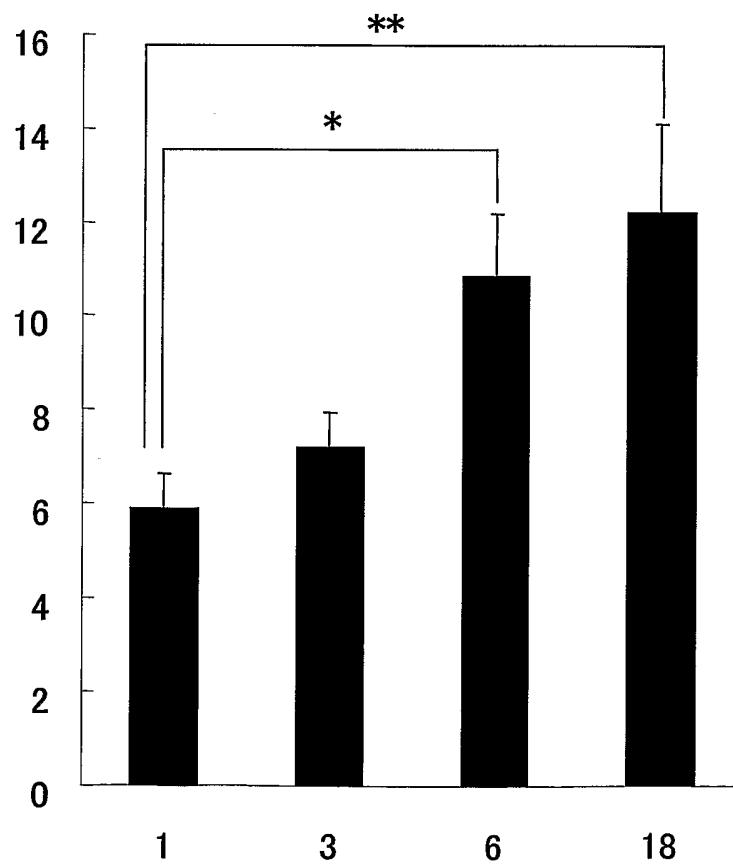


図 5 3



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN
IKEGAWA, Shiro
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

<120> Bone and Joint Disease-Susceptibility Genes and Use Thereof

<130> 09793

<150> JP 2004-228745

<151> 2004-08-04

<150> JP 2004-324372

<151> 2004-11-08

<150> JP 2005-070103

<151> 2005-03-11

<160> 38

<170> PatentIn version 3.2

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 447

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$ CDS

$\langle 222 \rangle$ (1).. (447)

<400> 1

atg gct gat cag ctg acc gaa gaa cag att gct gaa ttc aag gaa gcc 48
Met Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
1 5 10 15

ttc tcc cta ttt gat aaa gat ggc gat ggc acc atc aca aca aag gaa 96
Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
20 25 30

ctt gga act gtc atg agg tca ctg ggt cag aac cca aca gaa gct gaa 144
Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
35 40 45

ttg cag gat atg atc aat gaa gtg gat gct gat ggt aat ggc acc att 192
Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
50 55 60

gac ttc ccc gaa ttt ttg act atg atg gct aga aaa atg aaa gat aca 240
Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
65 70 75 80

gat agt gaa gaa gaa atc cgt gag gca ttc cga gtc ttt gac aag gat 288
Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
85 90 95

ggc aat ggt tat atc agt gca gca gaa cta cgt cac gtc atg aca aac 336
Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
100 105 110

tta gga gaa aaa cta aca gat gaa gaa gta gat gaa atg atc aga gaa 384
Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
115 120 125

gca gat att gat gga gac gga caa gtc aac tat gaa gaa ttc gta cag 432
Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
130 135 140

atg atg act gca aaa 447
Met Met Thr Ala Lys
145

$\langle 210 \rangle$	2
$\langle 211 \rangle$	149
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 2

Met Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
1 5 10 15

3/29

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
20 25 30

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
35 40 45

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
50 55 60

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
65 70 75 80

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
85 90 95

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
100 105 110

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
115 120 125

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
130 135 140

Met Met Thr Ala Lys
145

<210> 3

<211> 1184

<212> DNA

<213> Homo sapiens

4/29

<220>

<221> CDS

<222> (19).. (1155)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (19).. (60)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (115).. (1155)

<400> 3

cttctacact aagacacc atg aag gag tat gtg ctc cta tta ttc ctg gct	51
Met Lys Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Ala	
-30 -25	

ttg tgc tct gcc aaa ccc ttc ttt agc cct tca cac atc gca ctg aag	99
Leu Cys Ser Ala Lys Pro Phe Phe Ser Pro Ser His Ile Ala Leu Lys	
-20 -15 -10	

aat atg atg ctg aag gat atg gaa gac aca gat gat gat gat gat gat	147
Asn Met Met Leu Lys Asp Met Glu Asp Thr Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
-5 -1 1 5 10	

gat gat gat gat gat gat gat gag gac aac tct ctt ttt cca aca aga	195
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asn Ser Leu Phe Pro Thr Arg	
15 20 25	

gag cca aga agc cat ttt ttt cca ttt gat ctg ttt cca atg tgt cca	243
Glu Pro Arg Ser His Phe Phe Pro Phe Asp Leu Phe Pro Met Cys Pro	
30 35 40	

ttt gga tgt cag tgc tat tca cga gtt gta cat tgc tca gat tta ggt	291
Phe Gly Cys Gln Cys Tyr Ser Arg Val Val His Cys Ser Asp Leu Gly	
45 50 55	

ttg acc tca gtc cca acc aac att cca ttt gat act cga atg ctt gat	339
Leu Thr Ser Val Pro Thr Asn Ile Pro Phe Asp Thr Arg Met Leu Asp	
60 65 70 75	

5/29

ctt caa aac aat aaa att aag gaa atc aaa gaa aat gat ttt aaa gga	387
Leu Gln Asn Asn Lys Ile Lys Glu Ile Lys Glu Asn Asp Phe Lys Gly	
80 85 90	
ctc act tca ctt tat ggt ctg atc ctg aac aac aac aag cta acg aag	435
Leu Thr Ser Leu Tyr Gly Leu Ile Leu Asn Asn Asn Lys Leu Thr Lys	
95 100 105	
att cac cca aaa gcc ttt cta acc aca aag aag ttg cga agg ctg tat	483
Ile His Pro Lys Ala Phe Leu Thr Thr Lys Lys Leu Arg Arg Leu Tyr	
110 115 120	
ctg tcc cac aat caa cta agt gaa ata cca ctt aat ctt ccc aaa tca	531
Leu Ser His Asn Gln Leu Ser Glu Ile Pro Leu Asn Leu Pro Lys Ser	
125 130 135	
tta gca gaa ctc aga att cat gaa aat aaa gtt aag aaa ata caa aag	579
Leu Ala Glu Leu Arg Ile His Glu Asn Lys Val Lys Lys Ile Gln Lys	
140 145 150 155	
gac aca ttc aaa gga atg aat gct tta cac gtt ttg gaa atg agt gca	627
Asp Thr Phe Lys Gly Met Asn Ala Leu His Val Leu Glu Met Ser Ala	
160 165 170	
aac cct ctt gat aat aat ggg ata gag cca ggg gca ttt gaa ggg gtg	675
Asn Pro Leu Asp Asn Asn Gly Ile Glu Pro Gly Ala Phe Glu Gly Val	
175 180 185	
acg gtg ttc cat atc aga att gca gaa gca aaa ctg acc tca gtt cct	723
Thr Val Phe His Ile Arg Ile Ala Glu Ala Lys Leu Thr Ser Val Pro	
190 195 200	
aaa ggc tta cca cca act tta ttg gag ctt cac tta gat tat aat aaa	771
Lys Gly Leu Pro Pro Thr Leu Leu Glu Leu His Leu Asp Tyr Asn Lys	
205 210 215	
att tca aca gtg gaa ctt gag gat ttt aaa cga tac aaa gaa cta caa	819
Ile Ser Thr Val Glu Leu Glu Asp Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Gln	
220 225 230 235	
agg ctg ggc cta gga aac aac aaa atc aca gat atc gaa aat ggg agt	867

6/29

Arg Leu Gly Leu Gly Asn Asn Lys Ile Thr Asp Ile Glu Asn Gly Ser	
240 245 250	
ctt gct aac ata cca cgt gtg aga gaa ata cat ttg gaa aac aat aaa	915
Leu Ala Asn Ile Pro Arg Val Arg Glu Ile His Leu Glu Asn Asn Lys	
255 260 265	
cta aaa aaa atc cct tca gga tta cca gag ttg aaa tac ctc cag ata	963
Leu Lys Lys Ile Pro Ser Gly Leu Pro Glu Leu Lys Tyr Leu Gln Ile	
270 275 280	
atc ttc ctt cat tct aat tca att gca aga gtg gga gta aat gac ttc	1011
Ile Phe Leu His Ser Asn Ser Ile Ala Arg Val Gly Val Asn Asp Phe	
285 290 295	
tgt cca aca gtg cca aag atg aag aaa tct tta tac agt gca ata agt	1059
Cys Pro Thr Val Pro Lys Met Lys Lys Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Ser	
300 305 310 315	
tta ttc aac aac ccg gtg aaa tac tgg gaa atg caa cct gca aca ttt	1107
Leu Phe Asn Asn Pro Val Lys Tyr Trp Glu Met Gln Pro Ala Thr Phe	
320 325 330	
cgt tgt gtt ttg agc aga atg agt gtt cag ctt ggg aac ttt gga atg	1155
Arg Cys Val Leu Ser Arg Met Ser Val Gln Leu Gly Asn Phe Gly Met	
335 340 345	
taataattag taattggtaa tgtccattt	1184

<210> 4

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Ala Leu Cys Ser Ala Lys
-30 -25 -20

Pro Phe Phe Ser Pro Ser His Ile Ala Leu Lys Asn Met Met Leu Lys

7/29

-15		-10		-5		-1
Asp Met Glu Asp Thr Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp						
1		5		10		15
Asp Asp Glu Asp Asn Ser Leu Phe Pro Thr Arg Glu Pro Arg Ser His						
	20		25		30	
Phe Phe Pro Phe Asp Leu Phe Pro Met Cys Pro Phe Gly Cys Gln Cys						
	35		40		45	
Tyr Ser Arg Val Val His Cys Ser Asp Leu Gly Leu Thr Ser Val Pro						
	50		55		60	
Thr Asn Ile Pro Phe Asp Thr Arg Met Leu Asp Leu Gln Asn Asn Lys						
65		70		75		80
Ile Lys Glu Ile Lys Glu Asn Asp Phe Lys Gly Leu Thr Ser Leu Tyr						
	85		90		95	
Gly Leu Ile Leu Asn Asn Asn Lys Leu Thr Lys Ile His Pro Lys Ala						
	100		105		110	
Phe Leu Thr Thr Lys Lys Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Ser His Asn Gln						
	115		120		125	
Leu Ser Glu Ile Pro Leu Asn Leu Pro Lys Ser Leu Ala Glu Leu Arg						
	130		135		140	
Ile His Glu Asn Lys Val Lys Lys Ile Gln Lys Asp Thr Phe Lys Gly						
145		150		155		160

8/29

Met Asn Ala Leu His Val Leu Glu Met Ser Ala Asn Pro Leu Asp Asn
165 170 175

Asn Gly Ile Glu Pro Gly Ala Phe Glu Gly Val Thr Val Phe His Ile
180 185 190

Arg Ile Ala Glu Ala Lys Leu Thr Ser Val Pro Lys Gly Leu Pro Pro
195 200 205

Thr Leu Leu Glu Leu His Leu Asp Tyr Asn Lys Ile Ser Thr Val Glu
210 215 220

Leu Glu Asp Phe Lys Arg Tyr Lys Glu Leu Gln Arg Leu Gly Leu Gly
225 230 235 240

Asn Asn Lys Ile Thr Asp Ile Glu Asn Gly Ser Leu Ala Asn Ile Pro
245 250 255

Arg Val Arg Glu Ile His Leu Glu Asn Asn Lys Leu Lys Lys Ile Pro
260 265 270

Ser Gly Leu Pro Glu Leu Lys Tyr Leu Gln Ile Ile Phe Leu His Ser
275 280 285

Asn Ser Ile Ala Arg Val Gly Val Asn Asp Phe Cys Pro Thr Val Pro
290 295 300

Lys Met Lys Lys Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Ser Leu Phe Asn Asn Pro
305 310 315 320

Val Lys Tyr Trp Glu Met Gln Pro Ala Thr Phe Arg Cys Val Leu Ser

9/29

325

330

335

Arg Met Ser Val Gln Leu Gly Asn Phe Gly Met
340 345

<210> 5
<211> 11126
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> 5' UTR
<222> (101).. (302)

<220>
<221> CDS
<222> (303).. (305)

<220>
<221> Intron
<222> (306).. (3136)

<220>
<221> CDS
<222> (3137).. (3167)

<220>
<221> Intron
<222> (3168).. (4330)

<220>
<221> CDS
<222> (4331).. (4474)

<220>
<221> Intron
<222> (4475).. (6933)

<220>

10/29

<221> CDS
<222> (6934).. (7040)

<220>
<221> Intron
<222> (7041).. (7450)

<220>
<221> CDS
<222> (7451).. (7586)

<220>
<221> Intron
<222> (7587).. (7760)

<220>
<221> CDS
<222> (7761).. (7786)

<220>
<221> 3' UTR
<222> (7787).. (7860)

<220>
<221> Intron
<222> (7861).. (8144)

<220>
<221> 3' UTR
<222> (8145).. (11126)

<400> 5
aggccccggct gccgcagcgc cgctctgcgc gaggcggctc cgccgcggcg gagggatacg 60
gcgcaccata tatatatcgc ggggygcaga ctgcgcctcc ggcagtgggtg ctgggagtgt 120
cgtggacgcc gtgccgttac tcgtagtcag gcggcggcgc aggcggcggc gccggcatag 180
cgcacagcgc gccttagcag cagcagcagc agcagcggca tcggaggtac ccccgccgtc 240
gcagcccccg cgctggtgca gccaccctcg ctccctctgc tcttcctccc ttcgctcgca 300

11/29

cc atg gtaggtcggg agtggcaa at gccggcgtag cagctgcccc agattttcttc 355
Met
1

ccagatttct agttgttttg tttgtttttt gtttgttttt ggttcttgga ggttttttctt 415

ttctgagtgt tacgcagcag ctgcgcttaa aggaggttgc attttggatt tgcattctcg 475

cgacctctgc cagggagctt catttattgg ttcccccttg agctggactt ggtcgttaggc 535

cgtccacggg caggggctcc ggccgcaact gcagcggggg tttctgcatc caatccccct 595

gcccccgcc cagccccga cccactgcat ccactagcgc cgcacccggg ctgcctgcag 655

cgcagcgttt cggcctggga gccgggcggg gccgggcact agaccccccc ccccgcccg 715

cccctcccca ccccgcttct ccgccggcgc gaaggtggca ggtcgggcgg gcagtggaga 775

atgaatgggc tggagctggc cgggtggcga cattgttccg gccgggtgtt gaggggcgca 835

gtcagcgcgc gccacctccc cactttggcc ggccctgctg ggccccctcc ctcggctcgt 895

ctccccctct tcttccccgg gggcgcgcg cgggcgtggg ctgggaagga aggagccggg 955

gaagggtggg gttgggggca ggaaggcgag gggttggggg cggagagggc ggaagcggcg 1015

gccgggccc cctgcgccc ggcggggccc tgcgggtgtg ccgtggcttg ttctgcccgc 1075

tttcgcaccc tgcggccccc caccagtg cagcagtcgg gcgggcgtga gcctcgggtgc 1135

accaggaggc acttcccgc ggaggcgctg ggctcgcgt aattggggcg gggggggggg 1195

gcggcggggg aggagggaac tggcgcgcgg ctttggttcc attagagacg caaagtttct 1255

gctccgggag gaggcggcgc gccgcgggc tcgtcgcctg ggggagcaga agcgggtggg 1315

aggtgcgggt ggccttggcc tcagccctgg tgcgcggggg ccgggggttg tgaccctcct 1375

ggccgaggag gggcggcgtc cagacgccc ctcggggggc gccttcccc ccacgcctgc 1435

ccccgggcac gcgccctgcc cggtcctcg ccccgccca cttccagtcc gcagagagat 1495

12/29

gccctccacg tttctgcttt ctctgcagcc tctagattgc cagatgcgac tgtgcgcctc 1555
gctgggtgtg ttttccacag mccccttcctc ctcggcgtgc agggctgaca tcaccgactg 1615
cgtttctggt ttggcgggtg gggagatggt tccccgcagg gttctggtac acctttgccc 1675
ccagggctag cgccatttgg gggaggaggt tttcgttgc gagaaagttg gatgctcctg 1735
gtaaccctc taacaagaga gttctgtagc gaggtgggac tgttctcccc ataaggtgac 1795
agtttctctt gcgaggtgtg gcagcgcttc ctgttgtaga agacagatgt tgccttggcg 1855
ttacgtaaatt catcgtgtct ccgtcattta aagaaagcca attttttagtg attgaggtag 1915
aaagaaagat ccgtttataa tttgtaaaaa caaatcttca cccagaatca atatattgga 1975
acaccattcc tactgttaaa gttttcactt aagagyataa acttcatcag ctttctatta 2035
ggacttattt tgtaattggc ttcttaggca tccttcttta aaagagaaat ccacgttagc 2095
tctccttgag gtctcgagtt ccctcggctg gaggcacagg ttcagtggag accaaataat 2155
gcaggtgaat taccttcgtg gccattactg cctcsaacga agtgtgttta ttaagaacag 2215
ttcttatgtc attcttaagg taggtagggt taatactctc cagcaaattt agtagatact 2275
stttgccaga aaagagagga gtatatatag tttgataatt attgtgtagt tttctgtgta 2335
cttaattttt gcagttttgt aacacttcat ttgtaagatg gtaccatttt ttcttggett 2395
ctgaatcata ggatagtttg acccagggca ttagccattg taatggtags cttttaacaa 2455
ataactgcct aatttaaagg attggaaagc atttgttaca tggaaatgaa gttggtggcg 2515
taccagttg ctgtatcttt attttttsta cttaattatt tctcataaaa tggatataaa 2575
agcctgttaa tccaacccaa tgccattatg taacgccagt ttggagattt cgagggcctg 2635
gagcagtgcg caaggtgcgc tgaaagcctg cccctggatg agatccttat cctggctgtg 2695
atggcagtggt cagtgggctg ggtcccttgt tgagtggaaa gggggactgc ggtgtccatg 2755

gtgcagtagg	tggcgctctt	ctgtcttaga	gcctgcgcgc	actgcagctg	gtgccaaaggg	2815
gccttctgcc	actagaggtg	ccatttttca	catgatgaac	ttagcctagt	tagatcgcag	2875
agcaagctgt	aagccatggg	cccagaaaag	aaaacttgaa	gtgagcagat	gttgtcactt	2935
ccttgtaatc	ctttgttaaa	atagcataag	gagttttctt	tattctattt	actttcatta	2995
aatgaccgtg	ctacaggttt	caaaggattt	taagattgat	ttttgaaaga	tcacaatatt	3055
aaaagtataa	ctggaaaayc	tatgttgaaa	tcaaccaaac	atgtcgtgga	ctgaatgata	3115
accttttctt	tcttcatata	g gct gat	cag ctg acc	gaa gaa cag	att gct g	3167
		Ala Asp Gln	Leu Thr Glu	Glu Gln Ile	Ala	
		5		10		
gtaagttgac	aactccaagg	agtccccaga	aggccagaac	taggcactga	ctcagttttg	3227
gtgactcttc	tgttctctcc	cgctacagtc	tgggcagttt	tctaagaatt	tatttaaata	3287
agaacagtaa	gcagaaacac	tgaggtcaga	tgttattctt	gccagtactt	tatagatgag	3347
gtgaaaggaa	gtaaaactaa	ggatgcccac	atgttaaact	ctggagaatt	tgaccatggt	3407
tcacaatgtg	caaagtttgc	gatatgattaa	ttgtactgag	cctgctactc	agcggtttag	3467
tttacaattc	ttatgccatg	ggtctttcag	taatctgcc	cgaaagcttg	tgctcgctat	3527
cctaaaataa	atggaaatgg	gtgaatatga	gtgttaggac	cactgtagta	attgggaaga	3587
aagttacatt	agttaaactc	tgttgcccag	gctggtctct	aactcctggg	ctcaagcaat	3647
cctcctgcct	cagcctcctg	agtagctggg	actacaggca	tgtgccacca	cgctctggcag	3707
attttagctt	tttaatattc	ctggaggact	tgttttgaga	ctgtttctcg	ttaggaaacc	3767
aggaatgctt	ctgaaatatt	ctaaaagtca	tgtggagaga	gtttacctgg	gaatgtacat	3827
ttctagtaac	cattttattt	gttatgaaac	aagggtattct	tatggcttta	gaaatgtaac	3887
aggaagggat	ttgaaggggg	cacatggacc	aatcttgtca	gattggattt	agtcccttga	3947

acctgggagg caggggttgt agtgagctga gattgcacca ctgcactcca atctcggtga	4007
cagagcgaga ctccattgtt taaaaaaaaa aaaaaagatt ggatttagga ctaatttaag	4067
catgttccag cttagccgcc ttgaaacctt tgggaatatt gtggtgtgtg gcaactgttta	4127
ttgggagcag tgtttgcttt atgggctgct gtatgaaggc cagtccaaca ggactattgt	4187
ggtcattatt tcagtagata aagaccagac ttctgatacg ttgcacaact tgaatggctg	4247
gctttggcaa gccccggca agtgtgtatt gtgactgggt tggataaaga cattgattct	4307
aacgggtcaa cttttgtttt cag aa ttc aag gaa gcc ttc tcc cta ttt gat	4359
Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp	
15 20	
aaa gat ggc gat ggc acc atc aca aca aag gaa ctt gga act gtc atg	4407
Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met	
25 30 35	
agg tca ctg ggt cag aac cca aca gaa gct gaa ttg cag gat atg atc	4455
Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile	
40 45 50	
aat gaa gtg gat gct gat g gtaagagctt taaaacctg aatgagggcc	4504
Asn Glu Val Asp Ala Asp	
55	
attgttgtgt aattcaagtt cagacatggt acaggattgt ctttcaggtc ccagagcaa	4564
agcaaatgtg caaagatcct ttctgtggtt gcccagggc cattgacaat taaaatagaa	4624
gatgatgggc cttgcgtcca tctgcttag tgtctagaat gttttctgca tgggatcact	4684
attgttttct tctgcttgg tgcgacctag agctcaaate tttttttttt ttttttttg	4744
gagacggagt ctgcacctgt cgcccaggct ggagtggcac tggcgcgac tcggtcact	4804
gcaacctctg cctcttgggt tccagcgatt ctctgcgtc agccttctga gtagctggaa	4864
ttacaggcgt gtgtcgccac gccagtttag tgttttgtat ctttagtaga gatggggttt	4924

15/29

caccatgttg gccaggctgg tctcaaactc ctgacctcgt gatccgccct ccccgccctc 4984
ccaaagtgct gggattacag gcgtgaacca ctgctcctgg ccgagctcaa agctttttatc 5044
aactggccca tgagtctgca ctgagtcttg agggggggagg tgaaattaaa tagccataga 5104
aagtgcTTTT taacaaactt actgtgttta aagaggagga ggaacccccca gatgaagtag 5164
gtgacragca ctcttagaag ttaccataaa agtgagtaca gtgtgagctg tagatgtgtt 5224
tgctgcagag gagcatgtga ggTTTTggagg cggatgtgtg gtgactccag gggatagatt 5284
tgcagaacct aacggaaagg gaagctgtaa ggtgcagggc cagagggaac cagcagtaac 5344
cctgatagcg gtctgtcatc tgttcctctc gactctacag cagcggacaa cagaactttg 5404
attgctgatt tccatcagta agcaggcttt gaagcacact tccccacccc taaaaaaaaa 5464
ccacgtatTT tggtaaatcc tatatatatt ctaatgtact gtatgacagt atagaacatg 5524
atTTTTtaaaa gatgagttgg gaggagaaaa ggataaaaga aaaaataaaa gaagcattaa 5584
gaataaaciaa ttcggatcta gattttactt tctagatgat tgactcgagg gtggtgtagt 5644
aaaatcgctt gtctggtcac aaacatttgg cagcagagct tttgattagg ttctttgaca 5704
aagccttcag cacgttagag tggTTTTcac taatagtgtt ttggaaagaa aaggttgtcc 5764
atagttctct agtttgctaa gatgatcagc taccaggaa cgtggagtaa ctctctcttg 5824
tttgtgggag ccccggaat ctgtgcctgg ggaggggaga agtctgttag gctcttggat 5884
tgtgtggaag aaggagaagt tgtgccaggc tacagaatcc tgtgtttgca ctgagaaaac 5944
aggatggtac ctgaccttct ctgcatggct gtgagatagc ttaaaataat ttcttttggt 6004
tttgatgaat atgaacaata tcttaaaatt tttgaggcta aaaaagtctt gaagggatcc 6064
ctgaggtatt ttctttgaaa ggtactgggtg aaaatgagta acttaaccta agggTTTTtc 6124
tttctaattt tatttccatt tagttcaatg acactgttag tctggagtgc ttgtctttgg 6184

16/29

gggatattcat ctcttagttt taaagaggag ttgtttggag tactggccgt agaacagatt 6244
 gttctgacag ttccctaagt gttactagtc tgagctgtga gaatgctcct gagcttttcc 6304
 cttaatggga aataaagata ctgagttgga agaaaacagg tggctaacca tcatagcgtg 6364
 gccaaagaaat gatcctggag aagacttggg aagacttcat ggcccatgca tggcataaca 6424
 gaatcaatgt tcctctctca taatcttttc tcctctgaaa cactttatac acttaacctg 6484
 cagctcagtt ctaggccttt tttgtgttac tgctgtcact aaccaaggca gagttagacc 6544
 tgagtgattt ccctaactca gggatggcag tcggggggcg tttcttccct cggagtggaa 6604
 agattcagcc tgcggagtgg tgtatgctat ttttctyttg aactgtacag cccttcatga 6664
 cccttccatg ggcttgaatc cagatgtgca gtttcctttg tataattaaa tactatcctg 6724
 ggcaactgatg atgagtttga aattatgtga aattgccctg tgaagtgttt gaacgtttta 6784
 gacctgcaga tgattgaacc tagtaagata gtctgccctt ttgtcctagt acatgtttac 6844
 cgttccgtac agtggttctg aaatgattac tgcagagcag cgttaatgga gtgcttactt 6904
 tacatgagct ttttgttttt taattcgag gt aat ggc acc att gac ttc ccc 6956
 Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro
 65
 gaa ttt ttg act atg atg gct aga aaa atg aaa gat aca gat agt gaa 7004
 Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu
 70 75 80
 gaa gaa atc cgt gag gca ttc cga gtc ttt gac aag gtaatccagc 7050
 Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys
 85 90 95
 atctacatag cagatgggtac ttaagtatgg cttcttccgc tttcacttct aaaagctata 7110
 ataatgttat agacagaaga cttaaattcta actgcctgag cctctgatct cactttcaaa 7170
 aatcctcctt atggtaaccg tatcagggga gggtaggcat aataaatagg aattttggac 7230

17/29

catgtttctt gactgttact ttgaattgtt gtgagctttt gcaaatacctg ttttctgcat	7290
tagctgtttg catgtattta gtaggttaga ggtgggaact agagatcaga gaattgttta	7350
tggcagcaga gttagcagta acttgagagg gcatagctaa gtcaaagacc tacttcccca	7410
cactacatca ttagcaataa caattgctga atgttcacag gat ggc aat ggt tat	7465
Asp Gly Asn Gly Tyr	
100	
atc agt gca gca gaa cta cgt cac gtc atg aca aac tta gga gaa aaa	7513
Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys	
105 110 115	
cta aca gat gaa gaa gta gat gaa atg atc aga gaa gca gat att gat	7561
Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp	
120 125 130	
gga gac gga caa gtc aac tat gaa g gtaaaactaa attctctgag	7606
Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu	
135 140	
ctcagtggtt catagtctta cctttagatc tgtaagcaag ccaactgctt cactagacag	7666
cctttgactt tattttatgt acagtaaaga tgttgtgttc attaaagctg ttttcaaaga	7726
taaccaaaaag ttactattat atttgtcttt tcag aa ttc gta cag atg atg act	7780
Glu Phe Val Gln Met Met Thr	
145	
gca aaa tgaagaccta ctttcaactc ctttttcccc cctctagaag aatcaaattg	7836
Ala Lys	
aatctttttac ttacctcttg caaaaaaaag aaaaaagaaa aaagttcatt tattcattct	7896
gtttctatat agcaaaactg aatgtcaaaa gtaccttctg tccacacaca caaaatctgc	7956
atgtattggg tgggtgtcct gtcccctaaa gatcaagcta cacatcagtt ttacaatata	8016
aatacttgta ctaccttaat gataaggact ccttaaagtt ccatttgcta atgattaata	8076

18/29

cactgttttg gctggccagt ttttcatgca tgcagcttga cgattgagca cagtcaggcc	8136
tttgtattaa aaatgaaaaa tgaaaaaaca aattcaaaac ctattcaaat gggttctagt	8196
tcaatttggt tagtataaat tgtcatagct ggtttactga aaacaaacac atttaaaatt	8256
ggtttacctc aggatgacgt gcagaaaaat gggatgaagga taaaccgttg agacgtggcc	8316
ccactggtag gatggtcctc ttgtacttcg tgtgctccga cccatggtag cgatgacaca	8376
ccctggtagc atgcccgtgt atgttggttt agcgttgtct gcattgttct agagtgaac	8436
aggtgtcagg ctgtcactgt tcacacaaat ttttaataag aaacatttac caaggagca	8496
tctttggact ctctgttttt aaaaccttct gaacctgac ttggagccgg cagagtaggc	8556
tgtggctgtg gacttcagca caacctcaa cattgctgtt caaagaaatt acagtttacg	8616
tccattccaa gttgtaaag ctagtctttt tttttttttt tccaataaaa agaccattaa	8676
cttaaagtgg tgtaaagtc tttgtaaagc tgagatctaa atggggacaa ggcaggtgga	8736
ggggaggcca gtgtacatgt aaatgccac agcccagcat tgggtttccc tcccaggcc	8796
ccagcaccaa cctctgagcc caagacctg cctgaaaaca agcagatacc gattgcttca	8856
tcctatttat ggacatgtag gtctagttgc attttactg gggggagggg ggaaggtgaa	8916
ttatggtaac ttttaatgat ctattcaggc agtagagctc ttaaggaaaa aaaaaaacc	8976
actttctctc aagcatgtat ttaggggttg ttctcaattg tgctgtgat tacctgtctt	9036
atgtaactac ttgagaccat ctgcaagaga catgatttag tgtgtctgta attcaatctt	9096
cgctgtgtgt gtagaagca gtagtcactt ttgtaagcca gtctcttcat gcctaaaaga	9156
cactaccagt cacctttgat tcgcgacttt taatttatga ttatacttag cctcctcctc	9216
cttttttttt ttttccsaag ttgacttgac ttgtcttttt tcccccaag tagaactaat	9276
gctagcttcc agcttgaaag taaaactcca gtgtggagtg aattttgtgt ctaattataa	9336

19/29

acctgtaacc aaaactcaga catctggtac tggctcttgc attgagattg gtccctgtaa 9396
aaccaccttt aaaagcatat tgcatttagt acagagctct tttttgaaat gaaggctgga 9456
gatgtgcatt tttcacggtg ttaactggtt gtatcttatt agcaaggaga ttggggtttt 9516
gagtgtttgc gtgggtggtt tcaatttgcc agggaaacagt ggcaggctgc tagcaaggca 9576
gtgagaagct cttggcagcc aaatgggtgc attcagggtt gatttataga gacccttggc 9636
ttctcttct cctactccct gtctttctgg catctttagt cttgttagat tttctgccag 9696
aggggtgggt cagagcagtg gaggggagac atcgcccatg tgcttctgct actggctcctt 9756
gggctgggtg gttggtagag gagatgttga cactatgagc taagggttgg cttttgtaat 9816
tacctgaatc tgaaaggaat gcctaagggtt accttggggt ttctcttctg gtgagatagg 9876
gttcctgggt tgagtaagtt aatgtcctgg atatttcttg tggcaggggg tgggtcaaaga 9936
gcctgattgc tgaccagtc tcaggcctgt ggtcgatgac ctctcggtag tttcaaaggg 9996
ggctggaggg ggatatttga cttgtttttt cgaaatgtag ctttctaacc ctcaagtctt 10056
tagaagctgg gtggactctt agtggctctg cagcgtatcc taaaagacta cttttgaaac 10116
aggattcttg tatggccagg atcctgtctg ggaaccagaa accctacacc ctccccctcc 10176
agggaaatgt gagttccagt tttgagcaga ggtgaggcag aatccactgt agccttcgc 10236
cctgggtattt ggggggatga ccagcccagg cgttgggtgt tagtctgcat gagtttgtga 10296
gaggaaatag ctgggtgtcc tggcagtgcc cttgaagttg gttaggacct tcctgtaaac 10356
tcttgccct acttctaact actctataaa tatatacata ttttatata taaagtgatt 10416
agttgaactg gcatcctgct ttagcctgag acttgccata agaaactgct gactacttg 10476
caaacccttt catagttttg ttctccatct gtttgggta ggtgttgagy gaggcaaag 10536
gatctcgata tttcagatgg gcttttgatg cactgttgcc aaggaggct tttctgatt 10596

20/29

ttttgacaaa tgaatTTTTg cacactttca ttggtgtctt tggcaactt acacacattg 10656
aaaatgagct attgtacata tttttatatt ctctttataa atgcatgtct gattgtactt 10716
gtaacaatat tgtaatgaac ggctgtgcag taggcccagc gctgctgtgt ctgctcagag 10776
gaatagctta ccacgaaccc ctgagcatac tgggaatctc ttcttgaaca acgaatgtaa 10836
atttggTcaa gtctactctt ccgttcattc aattatttta agcatttgaa ttattttattg 10896
tatatcctaa atatatttct cctttggcag tgactagatt tccactaatg tgtcttaatc 10956
tatccctcca gctggcagtt actgtttttt taatcccctg aagttgtcct gtaggagaca 11016
gaaattcttt gctgtctgta tcccttgag taagaaggta gtggcatggg tggagtgtgt 11076
gttctttctc caaatctatt atgatgttta ttaaacactt ctgtagcaaa 11126

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
aaagctagcc cgggccctgt aaaacaga 28

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
aaactcgagg tgcgagcgaa gggaggaa 28

21/29

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 8
aaagctagct ctgcagaccc ctctcctc

28

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 9
aaagctagcg gagggatacg gcgcac

26

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 10
tttctcgagc accactgccg gagcgc

26

<210> 11
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

22/29

<220>

<223> Probe

<400> 11

ctagcatata tatatcgcg ggtgcagact cgcgctcc

38

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 12

tcgaggagcg cgagtctgca cccgcgata tatatatg

38

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe

<400> 13

ctagcatata tatatcgcg ggcgcagact cgcgctcc

38

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 14

tcgaggagcg cgagtctgcg cccgcgata tatatatg

38

23/29

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 15
ggacaagtca actatgaaga attcg

25

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 16
ccaccaacca atacatgcag

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 17
ggatgcaggg atgatgttct

20

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

24/29

<220>

<223> Primer

<400> 18

tgcaccacca actgcttag

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 19

ccaaaccagc ctgacaactt

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 20

tctagcatgc tccaccactg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 21

cataaagggc ccacttgcta

20

25/29

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 22
tggctgatat tcctggtggt

20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 23
gcccaagacct gaaactctgc

20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 24
gccatagctg aagtggaagc

20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

26/29

<220>

<223> Primer

<400> 25

ctgccaggac ctgaaactct

20

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 26

cgtcgccgta gctgaagt

18

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 27

agaaccatcg aaggggactt

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 28

gatctttctt ctgccaagg

20

27/29

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 29
cagtggctgct gggagtgtc

19

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 30
gaagggagga agagcagagg

20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 31
attcctggct ttgtgctctg

20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

28/29

<220>

<223> Primer

<400> 32

tggcttcttg gctctcttgt

20

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide antigen

<400> 33

Asn	Ser	Leu	Phe	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Arg	Ser	His	Phe
1				5				10				

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide antigen

<400> 34

Glu	Asn	Asn	Lys	Leu	Lys	Lys	Ile	Pro	Ser	Gly	Leu	Pro	Glu	Leu	Lys
1				5				10					15		

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (DNA/RNA chimeric molecule)

<400> 35

29/29

ucccuucagg auuaccagat t

21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (DNA/RNA chimeric molecule)

<400> 36

ccuacgucca gauaauucgt t

21

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 37

tggctttgtg ctctgccaa

19

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 38

agctgaacac tcattctg

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/12, A61K38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/02, 19/08, 35/00, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50//C07K14/47 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 C12N15/12, A61K38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/02, 19/08, 35/00, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50//C07K14/47 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 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5698518 A (Oklahoma Medical Research Foundation), 16 December, 1997 (16.12.97), Particularly, column 5, lines 7 to 11 (Family: none)	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-35, 38-41,44-47, 50-54
A	Lorenzo P. et al., Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglyca. J.Biol.Chem., 2001, 276 (15), p.12201-11	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-35, 38-41,44-47, 50-54
A	IKEGAWA S. et al., Genetic analysis of osteoarthritis: toward identification of its susceptibility genes., J.Orthop.Sci., 2003, 8 (5), p.737-9	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-35, 38-41,44-47, 50-54
☒ 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 14 September, 2005 (14.09.05)		Date of mailing of the international search report 04 October, 2005 (04.10.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shiro IKEGAWA, "SNP no Men'eki Shikkan heno Rinsho Oyo", Clinical Immunology, 2002, 38(1), p.64-8	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-35, 38-41,44-47, 50-54
A	Shiro IKEGAWA, "Hone Keito Shikkan", Igaku no Ayumi, 2002, 202(10), p.843-9	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-35, 38-41,44-47, 50-54
P,X	Shiro IKEGAWA, "Henkeisei Kansetsusho no Gen'in Idenshi", Igaku no Ayumi, 2005, March, 212(11), p.1035-6	34-35,38-41, 44-47,50-54
P,X	Hideyuki MOTOTANI, et al., "OA no Bunshi Mechanism 2, Calmodulin Idenshi (CALM1) no Promoter Ryoiki ni Sonzai Suru Kino SNP ha Nihonjin no Hekeisei Kokansetsusho to Sokan suru", Dai 18 Kai The Japanese Society of Cartilage Metabolism Program Shorokushu, 23 May, 2005 (23.05.05), Japan Science and Technology Agency, Ukeire page 8	1-2,5-8, 11-14,17-23, 26-27,30-33
P,X	Hideki KISAWA et al., "OA no Bunshi Mechanism 3, Asporin ha Nankotsu Bunka o Seigyo suru TGF- β Sayo no Yokusei Inshi de ari, Sono Yokusei Kassei no Tsuyosa no Chigai ga Henkeisei Kansetsusho ni Taisuru Kanjusei o Kimeru", Dai 18 Kai The Japanese Society of Cartilage Metabolism Program Shorokushu, 23 May, 2005 (23.05.05), Japan Science and Technology Agency Ukeire, page 9	34-35,38-41, 44-47,50-54
P,X	Hideki KISAWA et al., "OA no Bunshi Mechanism 4, Asporin Idenshi no Aspartic-san Repeat Takei ha Henkeisei Kansetsusho to Sokan suru", Dai 18 Kai The Japanese Society of Cartilage Metabolism Program Shorokushu, 23 May, 2005 (23.05.05), Japan Science and Technology Agency Ukeire, page 10	34-35,38-41, 44-47,50-54
P,X	KIZAWA H. et al., An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis., Nat.Genet., 2005, February, 37(2), p.138-44	34-35,38-41, 44-47,50-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014612

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.: 3-4, 9-10, 15-16, 24-25, 28-29, 36-37, 42-43, 48-49, 55-57
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 3 to 4, 9 to 10, 15 to 16, 24 to 25, 28 to 29, 36 to 37, 42 to 43, 48 to 49, and 55 to 57 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relate 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:
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 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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014612

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

is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1 (iv) , to search.

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

<Unity of invention>

Claims are divided into the following invention groups.

(1) Inventions relating to a preventive/remedy or a diagnostic for bone/joint diseases which contains a protein containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 and matters relating thereto.

(Claims 1 to 2, 5 to 8, 11 to 14, 17 to 23, 26 to 27 and 30 to 33)

(2) Inventions relating to a preventive/remedy or a diagnostic for bone/joint diseases which contains a protein containing the amino acid sequence of the amino acid nos.1 to 347 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 and matters relating thereto.

(Claims 34 to 35, 38 to 41, 44 to 47 and 50 to 54)

It appears that the matter common to the above invention groups resides in a preventive/remedy or a diagnostic for bone/joint diseases. However, a preventive/remedy or a diagnostic for bone/joint diseases had been widely known before the priority date of the present case without a need for citing examples and, therefore, the above common matter is not novel.

That is, the above common matter falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims. Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found out among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, the above invention groups do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/12, A61K38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/02, 19/08, 35/00, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50 // C07K14/47

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.⁷ C12N15/12, A61K38/00, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/02, 19/08, 35/00, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50 // C07K14/47

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JOIS)

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
A	US 5698518 A (Oklahoma Medical Research Foundation) 1997. 12. 16 特に、第5カラム第7-11行 (ファミリーなし)	1-2, 5-8, 11-14, 17-23, 26-27, 30-35, 38-41, 44-47, 50-54

☒ 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

14. 09. 2005

国際調査報告の発送日

04.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

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)

4B

3131

渡邊 潤也

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
A	Lorenzo P. et al., Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. J. Biol. Chem., 2001, 276(15), p. 12201-11	1-2, 5-8, 11- 14, 17-23, 26- 27, 30-35, 38- 41, 44-47, 50- 54
A	Ikegawa S. et al., Genetic analysis of osteoarthritis: toward, identification of its susceptibility genes. J. Orthop. Sci., 2003, 8(5), p. 737-9	1-2, 5-8, 11- 14, 17-23, 26- 27, 30-35, 38- 41, 44-47, 50- 54
A	池川志郎, SNP の免疫疾患への臨床応用, 臨床免疫, 2002, 38(1), p. 64-8	1-2, 5-8, 11- 14, 17-23, 26- 27, 30-35, 38- 41, 44-47, 50- 54
A	池川志郎, 骨系統疾患, 医学のあゆみ, 2002, 202(10), p. 843-9	1-2, 5-8, 11- 14, 17-23, 26- 27, 30-35, 38- 41, 44-47, 50- 54
PX	池川志郎, 変形性関節症の原因遺伝子, 医学のあゆみ, 2005 Mar., 212(11), p. 1035-6	34-35, 38-41, 44-47, 50-54
PX	本谷英之, 他 14 名, OA の分子メカニズム 2, カルモジュリン遺伝子 (CALM1) のプロモーター領域に存在する機能 SNP は、日本人の変形性股関節症と相関する, 第 18 回日本軟骨代謝学会プログラム・抄録集, 2005 May 23, 独立行政法人科学技術振興機構受け入れ, p. 8	1-2, 5-8, 11- 14, 17-23, 26- 27, 30-33
PX	木澤秀樹, 他 14 名, OA の分子メカニズム 3, アスポリンは軟骨分化を制御する TGF- β 作用の抑制因子であり、その抑制活性の強さの違いが変形性関節症に対する感受性を決める, 第 18 回日本軟骨代謝学会プログラム・抄録集, 2005 May 23, 独立行政法人科学技術振興機構受け入れ, p. 9	34-35, 38-41, 44-47, 50-54

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
PX	木澤秀樹, 他 14 名, OA の分子メカニズム 4, アスポリン遺伝子のアスパラギン酸リピート多型は変形性関節症と関連する, 第 18 回日本軟骨代謝学会プログラム・抄録集, 2005 May 23, 独立行政法人科学技術振興機構受け入れ, p. 10	34-35, 38-41, 44-47, 50-54
PX	Kizawa H. et al., An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. Nat. Genet., 2005 Feb, 37 (2), p. 138-44	34-35, 38-41, 44-47, 50-54

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 3-4, 9-10, 15-16, 24- 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、25, 28-29, 36-37, 42-43, 48-49, 55-57
請求の範囲3-4, 9-10, 15-16, 24-25, 28-29, 36-37, 42-43, 48-49, 55-57は治療による人体の
処置方法及び診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査
を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ろこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求
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ため、この国際調査報告は、手数料の納
付のあった次の請求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ため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載
されている発明に係る次の請求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なかった。

＜発明の単一性について＞

請求項は次の発明群に分けられる。

①配列番号:2 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質およびそれに係るものを含んでなる骨・関節疾患の予防・治療剤または診断剤に係るもの

(請求の範囲 1-2, 5-8, 11-14, 17-23, 26-27, 30-33)

②配列番号:4 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～347で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質およびそれに係るものを含んでなる骨・関節疾患の予防・治療剤、または診断剤に係るもの

(請求の範囲 34-35, 38-41, 44-47, 50-54)

上記発明群に共通の事項は、骨・関節疾患の予防・治療剤または診断剤であると認められるが、骨・関節疾患の予防・治療剤または診断剤は例を挙げるまでもなく、本優先権主張日前において広く知られたものであるから、上記共通事項は新規でない。

即ち、上記共通事項は先行技術の域を出ないので、PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味における特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。PCT 規則 13.2 の第 2 文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間に PCT 規則 13 の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、上記発明群は単一性の要件を満たしていない。