

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007 年 6 月 28 日 (28.06.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/073005 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 33/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/326306
- (22) 国際出願日: 2006 年 12 月 22 日 (22.12.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
60/753,388 2005 年 12 月 22 日 (22.12.2005) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 末松 誠 (SUE-MATSU, Makoto) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 山本 雄広 (YAMAMOTO, Takehiro) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 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: REGULATOR OF METHYL TRANSFER REACTION

(54) 発明の名称: メチル基転移反応調節物質

(57) Abstract: Disclosed are: a regulator of the methylation of a biological polymer, wherein the regulator comprises carbon monooxide; a method for regulating the methylation of a biological polymer; an inducer of the differentiation of a cell; and a method for inducing the differentiation of a cell.

(57) 要約: 本発明は、一酸化炭素を含有することを特徴とする、生体高分子のメチル化調節剤及び生体高分子のメチル化調節方法を提供する。また、本発明は、細胞の分化誘導剤及び細胞の分化誘導方法を提供する。



WO 2007/073005 A1

明 細 書

メチル基転移反応調節物質

5 技術分野

本発明は、生体高分子のメチル化に影響を与える物質に関する。詳しくは、生体高分子におけるメチル基転移反応を調節する物質に関する。

背景技術

- 10 生体高分子のメチル化は、細胞や臓器の保護にかかわる重要な生体制御機構の調節系として重要な役割を果たしている。このような生体高分子の修飾は、蛋白質、酵素及び DNA などに対して起こる。特に DNA の場合には、アセチル化が遺伝子発現のスイッチを入れる機構であるのに対して、メチル化は発現スイッチを切る機構であり、極めて重要である。
- 15 ところで、一酸化炭素 (CO) は、低酸素、活性酸素、過剰な一酸化窒素 (NO)、重金属、熱ショック、ホルモン産生などにより各種の細胞に誘導される heme oxygenase から生成されるガスメディエーターである。このガス分子は未知の細胞保護効果や炎症反応の抑制、移植免疫寛容、細胞の分化誘導などに関与していることが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない (文献
- 20 1～4)。

(文献)

1. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M (1999) Induction of
25 heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. Circ Res 85: 663-671.
2. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M (1998) Distribution of heme oxygenase

isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. J Clin Invest 101: 604-612.

3. Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M (2001) Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. Gastroenterology 120:1227-1240.
4. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, Kyokane T, Goda N, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Suematsu M, Ishimura Y (1999) Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. Am J Physiol 277(5 Pt 1):G1088-1096.

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、生体高分子におけるメチル基転移反応を調節し得る物質及びメチル基転移反応の調節方法を提供することにある。

また、本発明の別の課題は、細胞の分化を誘導する物質及び細胞の分化誘導方法を提供することにある。

本発明者は、上記課題を解決するべく鋭意検討を行った。その結果、生体内で一酸化炭素 (CO) が、蛋白質や DNA 等の生体高分子におけるメチル化に関与し、メチル基転移反応を調節し得る物質であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) 一酸化炭素を含有することを特徴とする、生体高分子のメチル化調節剤。
- (2) 生体高分子が、タンパク質又は DNA である、(1) に記載の調節剤。
- (3) 生体高分子が、transketorase 又は alpha-enolase である、(1) に記載の調節剤。
- (4) 生体高分子に一酸化炭素を接触させることを特徴とする、生体高分子のメチル化調節方法。
- (5) 一酸化炭素を含有することを特徴とする、細胞の分化誘導剤。
- (6) 細胞に一酸化炭素を接触させ、細胞中のタンパク質の脱メチル化を亢進することを特徴とする、細胞の分化誘導方法。

また、本発明は以下に関する。

- (7) 一酸化炭素を含有する生体高分子のアセチル化調節剤。
- (8) 生体高分子に一酸化炭素を接触させることを特徴とする、生体高分子のアセチル化調節方法。
- (9) 一酸化炭素を含有する heme oxygenase-1 の発現誘導方法。
- 5 (10) 生体高分子に一酸化炭素を接触させ、heme oxygenase-1 の発現を誘導することを特徴とする、生体高分子における一酸化炭素の産生方法。

図面の詳細な説明

図1は、Chromatin immunoprecipitation による CO の遺伝子修飾作用の検証方法の概要を示すフロー図である。

図2は、U937 の分化マーカーである CD11a の CO 投与によるクロマチン動態の変化を示す図である。

図3は、ADMA 抗体を用いた Western blotting による global protein methylation の解析と CO 添加による効果を示す図である (Ru: Ru(DMSO)₄Cl₂, CO donor: CORM-2)。

図4は、一酸化炭素 (CO) 処理により、メチル化修飾を受けるタンパク質の同定のストラテジーを示す図である。

図5は、ADMA 抗体を用いた Western blotting によるメチル化タンパク質の検出を示す図である。スポット 3,5,6,34,35,36 は CO 処理でメチル化の増強したスポットを示す。

図6は、2次元電気泳動ゲルから切り出したスポットの MALDI-TOF/MS 解析結果を示す図である。

図7は、ADMA 抗体を用いた Western blotting によるメチル化タンパク質の検出を示す図である。

25 図8は、MALDI-TOF/MS 解析結果をまとめた図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

- 5 なお、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。また、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願第 60/753,388 号の開示内容を包含する。

- 10 ガスメディエータは、細胞膜を容易に通過することが可能であり、蛋白質や DNA などの生体高分子と結合して特異的な機能を付与する分子群である。一酸化炭素は、このガスメディエータの一つであり、ヘムがヘムオキシゲナーゼにより、ビリベルジン、ビリルビンなどの胆汁色素と一酸化炭素と還元鉄 (Fe^{2+}) とに分解されることにより生じることが知られている。しかし、一酸化炭素の特異的な機能については十分に明らかにされていなかった。
- 15 本発明において、一酸化炭素は、生体高分子のメチル化又は脱メチル化を亢進する作用を有することが明らかになった。すなわち、本発明において、一酸化炭素は、生体高分子のメチル化調節に使用できることが示された。したがって、本発明は、一酸化炭素を含有する生体高分子のメチル化調節剤及び一酸化炭素による生体高分子のメチル化調節方法に関する。
- 20 また、本発明において、一酸化炭素は、生体高分子のアセチル化を制御する作用、特に生体高分子のアセチル化を亢進する作用を有することが明らかになった。すなわち、本発明において、一酸化炭素は生体高分子のアセチル化調節に使用できることが示された。したがって、本発明は、一酸化炭素を含有する生体高分子のアセチル化調節剤及び一酸化炭素による生体高分子のアセチル化調節方法に関する。
- 25 生体高分子のアセチル化は、遺伝子発現の制御に関係することが知られているため、一酸化炭素は生体高分子のアセチル化調節を介して遺伝子発現を制御することが可能といえる。

また、生体高分子のメチル化若しくは脱メチル化またはアセチル化は、遺伝子

発現の制御に関係することが知られているため、一酸化炭素は、生体高分子のメチル化またはアセチル化の調節を介して、遺伝子発現、さらに細胞の分化誘導を制御することが可能といえる。実際、実施例において、白血病細胞株 U937 を一酸化炭素で処理することにより、細胞の分化誘導が引き起こされることが示された。したがって、本発明は、一酸化炭素を含有する細胞の分化誘導剤又は一酸化炭素による細胞の分化誘導方法に関する。

さらにまた、本発明において、一酸化炭素は、**heme oxygenase-1 (HO-1)** の発現を誘導することが示された。HO-1 はヘムを分解する酵素であり、ヘムの分解により一酸化炭素が生成される。すなわち、本発明において、一酸化炭素は HO-1 の発現誘導を介する一酸化炭素の産生に使用できることが示された。したがって、本発明は、一酸化炭素による生体高分子における一酸化炭素の産生方法にも関する。

本発明において、「メチル化の調節」又は「メチル基転移反応の調節」は、生体高分子におけるメチル基修飾状態の制御、メチル基の転移もしくは離脱の亢進、又は生体高分子のメチル化若しくは脱メチル化の亢進を意味する。また、「アセチル化の調節」は、生体高分子におけるアセチル基の転移もしくは離脱の亢進、又は生体高分子のアセチル化もしくは脱アセチル化の亢進を意味する。亢進の程度は、特に限定されないが、一酸化炭素で処理しない対照生体高分子のメチル化またはアセチル化の程度の 5 % 以上、好ましくは 10 % 以上、より好ましくは 30 % 以上、さらに好ましくは 40 % 以上である。

本発明において、生体高分子は、メチル化またはアセチル化可能な側鎖を有する生体由来の分子であれば特に限定されないが、例えば、タンパク質、核酸 (DNA、RNA など)、脂質、糖質などが挙げられる。本発明において、生体高分子は、好ましくはタンパク質又は DNA、より好ましくはタンパク質である。一酸化炭素によりメチル化される生体高分子としては、例えば、解糖系の酵素である **transketolase** 又は **alpha-enolase** が挙げられる。

本発明において、一酸化炭素によりメチル化またはアセチル化される側鎖には、

アミノ酸の側鎖、より好ましくはアルギニンの側鎖を挙げることができるが、特に限定されるものではない。また、一分子あたりのメチル化またはアセチル化の数は特に限定されない。

- 本発明において、一酸化炭素は、そのまま使用してもよいし、あるいは、一酸化炭素を含有するリポソーム、一酸化炭素を含有するヘムおよびヘム蛋白質、一酸化炭素を含有する赤血球又は水溶液中で一酸化炭素を放出できる一酸化炭素含有錯体等の修飾型一酸化炭素、さらには体内で代謝されて CO を放出する化合物（アリルヒドロカーボンなど）を使用してもよい。気体の一酸化炭素を使用することが好ましい。また、操作の安全性の点から、修飾型一酸化炭素を使用することが好ましい。後述する一酸化炭素を含有する医薬組成物を使用しても良い。

- 一酸化炭素含有錯体には、CORM-1、CORM-2 ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$) (Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M (2002) *Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. J Clin Invest* 109: 457-467.))、CORM-3、CORM-A1、CORM-F3 などの CO releasing molecule を挙げることができる。それぞれ中心金属は、マンガン (CORM-1)、ルテニウム (CORM-2、-3)、ホウ素 (CORM-A1) 及び鉄 (CORM-F3) である。本発明において、一酸化炭素含有錯体は、生体高分子に対する中心金属の作用が比較的小さい点で、CORM-2 が好ましい。

- 本発明において、一酸化炭素による生体高分子のメチル化またはアセチル化の調節は、生体高分子に一酸化炭素を接触させることにより行うことができる。より具体的には、メチル化調節またはアセチル化調節の対象となる生体高分子を含む細胞、組織、体液などに一酸化炭素を接触させることにより行うことができる。

- 本発明において、「接触」は、生体高分子又は生体高分子を含む細胞、組織、体液を一酸化炭素の存在する環境にさらすことを意味する。接触には、例えば、一酸化炭素の存在下で細胞若しくは組織を培養する態様、一酸化炭素を含む培地で細胞若しくは組織を培養する態様、又は細胞、組織若しくは体液に一酸化炭素ガスを吹きつける態様などがある。

細胞又は組織の培養液に添加する場合の一酸化炭素の濃度は、 $0.1 \sim 10000 \mu\text{mol/L}$ 、好ましくは $1 \sim 1000 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 、さらに好ましくは $25 \mu\text{mol/L}$ である。また、細胞、組織又は体液に一酸化炭素を暴露する場合の濃度は、 $5 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 、より好ましくは $10 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ である。

- 5 接触は、 $10^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $30^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、最も好ましくは 37°C で、 $10 \text{分} \sim 72 \text{時間}$ 、好ましくは $20 \text{分} \sim 60 \text{時間}$ 、さらに好ましくは $30 \text{分} \sim 48 \text{時間}$ 行うことができる。

- 10 このように生体高分子のメチル化またはアセチル化を調節することができるが、メチル化またはアセチル化の程度は、抗メチル化抗体または抗アセチル化抗体を用いるウエスタンブロット解析、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法、免疫沈降法などの免疫化学的方法により検出することができる。また、免疫化学的方法に、公知の生体高分子の抽出、分離、精製方法を適宜組み合わせ、目的の生体高分子のメチル化またはアセチル化を検出することもできる。

- 15 メチル化の検出に使用する抗メチル化抗体は、メチル化された生体高分子を認識する抗体又はメチル基を認識する抗体であればよく、例えば、抗メチル化シトシン抗体 (Filgen 社、ASB 社)、抗メチル化リジン抗体、抗ジメチルアルギニン抗体 (ADMA)、抗メチル化ヒストン H3 (K9) 抗体 (Upstate 社、Abcam 社、SIGMA 社)、抗ジメチルヒストン H3 (K9) 抗体 (upstate #07-441)、抗メチル化 DNA 抗体、抗メチルグリオキサール抗体 (日本油脂、日本老化制御研究所) を挙
- 20 げることができる。

- アセチル化の検出に使用する抗アセチル化抗体は、アセチル化された生体高分子を認識する抗体又はアセチル基を認識する抗体であればよく、限定されるわけではないが、例えば、抗アセチルヒストン H3 (Lys9) 抗体 (Upstate #07-352)
- 25 を挙げることができる。

例えば、ヒストンのメチル化状態 (修飾状態) は、クロマチン免疫沈降法により検出することができる。

- クロマチン免疫沈降法は、まず、一酸化炭素に接触させた細胞を formaldehyde などで固定し、酵素的に切断して 250~500 bp 平均になるように DNA を断片化する。このサンプルから、anti-dimethyl histone H3 (Lys 9) antibody (upstate # 07-441)を用いて免疫沈降する。次に、reverse-crosslinking 及び溶出を行い、溶出液を用いて PCR により目的遺伝子の増幅を行う。増幅産物を電気泳動し、ヒストン H3 のメチル化状態を判断することができる。

このクロマチン免疫沈降法は、後述する一酸化炭素による細胞の分化誘導を検出するために使用することもできる。

- 10 一酸化炭素処理により、メチル基またはアセチル基による修飾状態が変動したタンパク質は、公知のタンパク質同定手法により同定することができる。

- 例えば、2次元電気泳動とウエスタンブロット解析において、対照に比べて修飾状態が変動したスポット中のタンパク質は、質量分析計を用いて同定することができる。場合により、スポット中のタンパク質をトリプシンなどにより消化してから質量分析計で解析してもよい。質量分析計は、例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型マススペクトロメトリー (MALDI-TOF/MS)、エレクトロスプレーマススペクトロメトリー (ESI/MS)、液体クロマトグラフィーマススペクトロメトリー (LC/MS)、ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー (GC/MS) 等を使用することができる。MALDI-TOF/MS
- 15
- 20 で質量分析した場合は、解析結果からペプチドマスフィンガープリント法 (PMF 法) によりタンパク質を同定することができる。

- また、本発明者は、ヒト白血病細胞株 U937 において、一酸化炭素処理により U937 の分化が誘導されることを、上記のクロマチン免疫沈降法を用いて示した。
- 25
- つまり、分化誘導剤である PMA で U937 を処理すると、U937 の分化マーカーである CD11a の転写調節領域中のヒストン H3 の脱メチル化およびアセチル化が亢進するが、このヒストン H3 の脱メチル化およびアセチル化の亢進は、一酸化炭素処理によっても同様に確認された。このことは、一酸化炭素は白血病細胞など

の未分化な細胞の分化を誘導できること示している。したがって、本発明は、一酸化炭素を含有する細胞の分化誘導剤（以下、「本発明の分化誘導剤」とも称する）を提供する。また、本発明は、細胞に一酸化炭素を接触させ、細胞中のタンパク質の脱メチル化又はアセチル化を亢進することを特徴とする、細胞の分化誘導方法も提供する。本発明の分化誘導剤は、細胞の分化誘導方法及び細胞の分化誘導療法に使用することができる。

また、本発明において、一酸化炭素は、リンパ系細胞の分化誘導に関係するため、炎症反応や移植における拒絶反応の人為的制御、及びこの制御に用いる医薬組成物（以下、「本発明の免疫調節剤」とも称する）に使用することができる。

- 10 また、本発明において、生体高分子に一酸化炭素を接触させると HO-1 の発現が誘導されるため、一酸化炭素は HO-1 の誘導に使用することができる。さらに、一酸化炭素により、発現量の増加した HO-1 を介して、生体内で一酸化炭素の産生が亢進するため、一酸化炭素は生体高分子における内因性一酸化炭素の産生に使用することができる。すなわち、CO の外因性投与は内因性の CO を増加させ、
- 15 細胞機能制御を相加的に制御する可能性がある。

さらに、一酸化炭素は生体高分子が担う多様な生物機能に関与していると考えられるため、本発明により、メチル化制御またはアセチル化制御を受ける全てのタンパク質又は遺伝子を人為的に制御することが可能となった。本発明は、メチル化制御またはアセチル化制御を受けることが将来的に解明されるタンパク質又は

20 は遺伝子についても、適用することができる。

本発明の分化誘導剤又は本発明の免疫調節剤の有効成分である一酸化炭素には、前述の通り、一酸化炭素又は一酸化炭素含有錯体等を使用することができるが、これに限定されるものではない。

25

なお、CO は hemoglobin に結合して末梢組織に運ばれるものである。そのため、CO を生体に投与する方法に関しては、(1) 低濃度（100ppm 程度）の吸入とすること、(2) 赤血球、修飾ヘモグロビン及び liposome-encapsulated

- hemoglobin 等に結合させて血管内投与すること、並びに(3) protoheme IX 及び protoporphyrin IX 等を体内に投与すること（経口投与、又は腹腔内若しくは筋肉内注射：40～100 $\mu\text{mol/L}$ ）が好適であると考えられ、さらには、(4) dopamine 及び dobutamine 等の、細胞の cyclic AMP を増加させて HO-1 を誘導する能力のあるすべての薬剤等により代替投与が可能であると考えられる。

本発明の分化誘導剤又は本発明の免疫調節剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤形によって異なる。

- 例えば、気体の一酸化炭素を使用する場合は、成人（60 kg）、1日当たり 0.1～300ppm、好ましくは 10～200ppm、より好ましくは 100ppm の濃度で1分～24時間、好ましくは5分～12時間、より好ましくは10分～6時間、吸入投与する。吸入は、一酸化炭素元（例えば、一酸化炭素ボンベ又は濃縮装置）に接続したマスク、鼻カテーテル、鼻カニューレを用いて行うことができる。また CO の飽和溶液（生理食塩水）を血管から投与することも可能である。

- また、一酸化炭素含有錯体、又は赤血球、修飾ヘモグロビン、代謝により CO を放出する化合物及び liposome-encapsulated hemoglobin 等に結合した一酸化炭素（修飾型一酸化炭素）を使用する場合は、成人（60 kg）、1日当たり、0.1nmol～1000 μmol 、好ましくは 1nmol～100 μmol 、より好ましくは 10nmol～10 μmol で投与する。protoheme IX 又は protoporphyrin IX の成人（60 kg）1日当たりの投与量は、0.1～10000 $\mu\text{mol/kg}$ 、好ましくは 1～1000 $\mu\text{mol/kg}$ 、より好ましくは 10～100 micromol/kg である。

- 修飾型一酸化炭素を使用する場合は、そのまま使用しても良いし、薬理学的に許容された担体と組み合わせて製剤化したものを使用しても良い。また、protoheme IX 若しくは protoporphyrin IX、又は dopamine 若しくは dobutamine を使用する場合も、そのまま使用しても良いし、製剤化したものを使用しても良い。

薬理学的に許容される担体としては、例えば通常医薬に使用される、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、潤滑剤、乳化剤、着色剤、矯味矯臭剤、界面活性剤、

溶解補助剤、懸濁化剤、等張剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤などを挙げることができる。

製剤としては、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤などの経口剤、坐剤、軟膏剤、点眼剤、パップ剤などの外用剤、又は注射剤を挙げることができる。

上記注射剤は、点滴、筋注、皮下注、静注などの方法で使用するすることができる。注射剤は、上記の薬理学的に許容される担体を適宜組み合わせて、リポソーム製剤として製剤化してもよい。

- 10 また、本発明は、一酸化炭素を含むキット（以下、「本発明のキット」とも称する）を提供する。本発明のキットは、生体高分子のメチル化の調節もしくはアセチル化の調節又は細胞の分化誘導に用いるものである。本発明のキットに含まれる一酸化炭素は、特に限定されず、例えば、気体の一酸化炭素、修飾型一酸化炭素、又は製剤化した一酸化炭素である。本発明のキットは、一酸化炭素の他に、
- 15 生体高分子のメチル化もしくはアセチル化の調節又は細胞の分化誘導の実施及び検出に使用する他の試薬、例えば、メチル化検出試薬（例えば抗メチル化抗体）、アセチル化検出試薬（例えば抗アセチル化抗体）生体高分子又は細胞、酵素基質（発色性基質など）、酵素反応停止剤を含めることができる。さらに、本発明のキットには、各種緩衝液、滅菌水、培養容器、反応容器、実験操作説明書などを
- 20 含めることもできる。

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、本発明はこれらに限定されるものではない。

- 25 実施例 1 : Chromatin immunoprecipitation method による DNA 修飾の検出
＜方法＞（図 1）

CO による細胞内の methionine pool の上昇が遺伝子発現に影響するかを検討するために、ヒト細胞株 U937 の分化マーカーである CD11a の基本転写調節領

域中のヒストン H3 の修飾状態をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により調べた。CD11a は血球細胞の分化誘導マーカーであり、白血病細胞である U937 が単球マクロファージ系に分化する際に細胞膜上に発現する。U937 細胞 1×10^7 cells を 10 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) 又は CO 除放剤 (CO releasing molecule-2: CORM-2 / $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M (2002) Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. J Clin Invest 109: 457-467.)) $25 \mu\text{mol/L}$ で 48 時間処理した。細胞を 1% formaldehyde で固定した後、enzymatic shearing により 250~500 bp 平均になるように DNA を断片化し、anti-dimethyl histone H3 (Lys 9) antibody (upstate #07-441) 及び anti-acetyl histone H3 (Lys9) antibody (Upstate #07-352) を用いて免疫沈降を行った。その後、reverse-crosslinking 及び elution を施して、続いて PCR により遺伝子増幅を行った。PCR では、図 2 に示すように、CD11a 遺伝子上流の約 -200~+100 を増幅した。CO 処理のコントロールとしては $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ を用いた。

<結果>

図 2 に示すように、CORM-2 を添加すると、コントロールである $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ 処理群に比べて chromatin のヒストン H3 の Lysine 残基のメチル化 (MeH3) が低下し (青色枠で囲んだパネル(左から 2 列目のパネルの上 2 つ)参照)、一方ではヒストン H3 の Lysine 残基 (Lys9) のアセチル化が顕著に増加する (オレンジ色枠で囲んだパネル(最右列のパネルの上 2 つ)参照) ことが明らかになった。この変化は、分化誘導物質である PMA の処理によっても同様の変化が認められたことから、CO は白血病細胞の分化誘導を惹起したことが明らかになった (図 2)。

実施例 2 : Anti-dimethyl-arginine antibody (ADMA) を用いた蛋白質メチル化の検出

<方法>

細胞内の蛋白質のメチル化を検出するために anti-dimethyl-arginine antibody (ADMA)を用いた Western blot analysis を行った。細胞としてヒト胎児肝芽細胞腫細胞株である HepG2, 副腎由来細胞 PC12 を用い、それぞれから

5 蛋白質を抽出し、15 μ g を Western 解析に用いて blotting を行った。CORM-2 (50 μ mol/L 又は 100 μ mol/L) あるいはそのコントロール化合物である Ru(DMSO)₄Cl₂ (50 μ mol/L) を細胞培養液に加えて、6-24 時間培養したときのメチル化蛋白質の増加を検出した。CO を加えた際の内因性の CO 生成系である heme oxygenase-1 (HO-1) の消長を確認するため、同じサンプルについて

10 anti-HO-1 antibody GTS-1 を用いた Western blotting を行った。

<結果>

図 3 に示すように、HepG2 及び PC12 を CORM-2 で処理すると、複数の蛋白質 (異なる分子量の位置) においてメチル化が亢進していることが明らかであったため、CO が細胞内蛋白質のメチル化を活性化することが明確に示された。

15

さらに、図 3 の最下段に示すように、外因性の CO を添加すると内因性の HO-1 の誘導がかかることが合わせて明らかになった。すなわち、CO の外因性投与は内因性の CO を増加させ、細胞機能制御を相加的に制御する可能性も示された。

20

実施例 3 : CO 処理によりメチル化修飾を受けるタンパク質の同定

<方法>

CO 処理によりメチル化修飾を受けるタンパク質の同定は、以下のように行った (図 4)。

25 まず、細胞を、コントロールである Ru(DMSO)₄Cl₂ (100 μ M)、又は CO ドナーである CORM-2 (100 μ M) の存在下で 30 分培養し、細胞を回収した。次に、回収した細胞から調製した全細胞溶解液 (160 μ g/ゲル) を 2 次元電気泳動し (pH6-11)、分離されたタンパク質を実施例 2 で使用した抗ジメチルアル

ギニン (ADMA) 抗体を用いて Western blot analysis した。

Ru(DMSO)₄Cl₂ で処理したサンプルのスポットと、CORM-2 で処理したサンプルのスポットを比較し、メチル化の程度に差のあるスポットを切り出した。切り出したスポットのタンパク質をトリプシンによりゲル内消化し、次に

5 MALDI-TOF/MS により質量分析を行った。質量分析の結果から、PMF 法によりタンパク質を同定した。

<結果>

Western blot analysis の結果、CO 処理により、スポット 3, 5, 6, 34, 35 及び

10 36 のメチル化がコントロール処理に比べて亢進していることが確認された (図 5)。これらのスポットを切り出し、MALDI-TOF/MS 解析し、PMF 法でタンパク質を同定した結果を図 6 に示す。

同定の結果、図 5 で CO 処理により発現の増強が確認されたスポットの中、ス

15 ポット 3, 5 及び 6 は transketorase であり、スポット 34, 35 及び 36 は alpha-enolase であった。

また、同様にヒト単球由来 U937 細胞を 30 分間 CORM-2 又はコントロールである Ru(DMSO)₄Cl₂ 処理したときの細胞から、細胞質画分を分離し、2 次元電気泳動を行い、ADMA 抗体を用いて Western blot analysis を行った。その結

20 果、CO 処理により、コントロール処理に比べてメチル化が亢進しているスポット (矢印) と脱メチル化が生じているスポットが (白抜き矢印) 確認された (図 7)。

本実施例で検討したスポットとその同定結果を図 8 にまとめた。スポット 3, 5 及び 6 の transketorase、並びにスポット 34, 35 及び 36 の alpha-enolase を線

25 で囲んだ。

この結果から、CO は、タンパク質のメチル化の調節作用を有することが示された。また、CO によりメチル化が亢進するタンパク質として、transketolase

及び α -enolase が同定された。

本発明では、以上の結果から鑑み、次のような応用例を実施することもできると考えられる。

5 (1) 白血病細胞や未分化な細胞の形質転換による分化誘導療法

例えば、一酸化炭素により、癌細胞などの未分化な細胞を正常細胞に分化させるような分化誘導療法に対して一酸化炭素を使用することが可能である。

(2) 炎症反応や移植における拒絶反応の人為的制御

(3) これまでの解析でまだ明らかになっていないメチル化制御を受ける蛋白質及

10 び遺伝子の特定が行われることを前提とした、これら生体高分子が担う生物機能すべての人為的制御

産業上の利用可能性

15 本発明により、生体高分子のメチル化調節剤及び生体高分子のメチル化調節方法が提供される。また、本発明より、細胞の分化誘導剤及び細胞の分化誘導方法が提供される。

本発明により、一酸化炭素が担う生物機能を制御することが可能となるため、本発明は、例えば、炎症反応や移植における拒絶反応の制御に適用することができる。

請求の範囲

1. 一酸化炭素を含有することを特徴とする、生体高分子のメチル化調節剤。
2. 生体高分子が、タンパク質又は DNA である、請求項 1 に記載の調節剤。
- 5 3. 生体高分子が、transketorase 又は alpha-enolase である、請求項 1 に記載の調節剤。
4. 生体高分子に一酸化炭素を接触させることを特徴とする、生体高分子のメチル化調節方法。
5. 一酸化炭素を含有することを特徴とする、細胞の分化誘導剤。
- 10 6. 細胞に一酸化炭素を接触させ、細胞中のタンパク質の脱メチル化を亢進することを特徴とする、細胞の分化誘導方法。

図1

<方法概略>

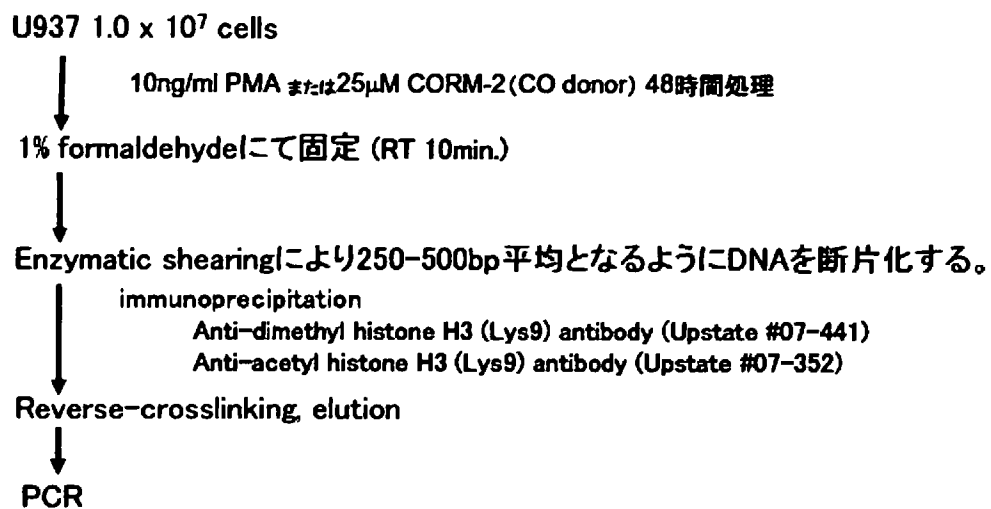


図2

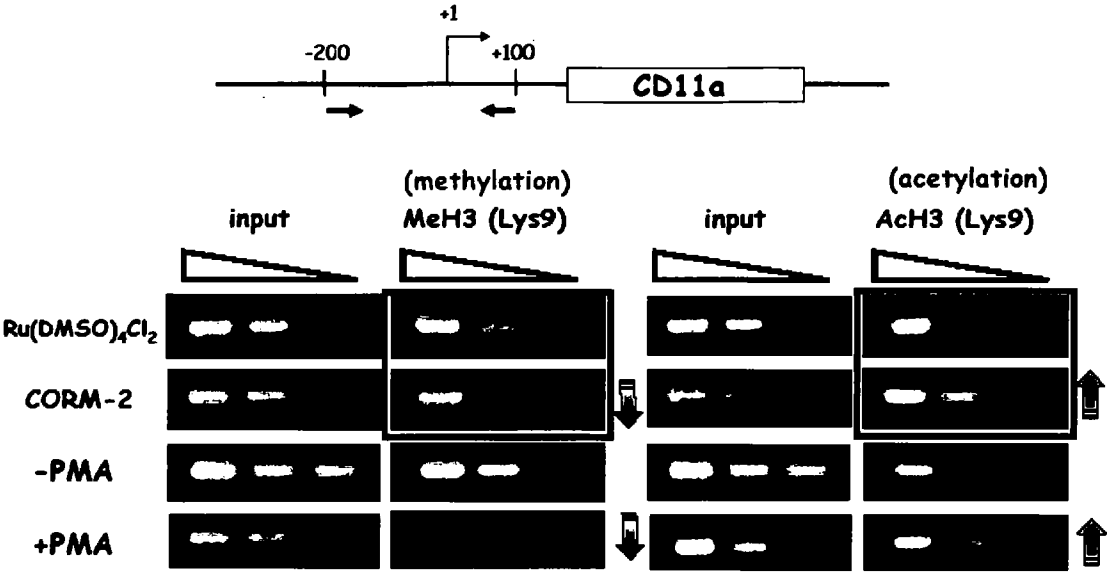


図3

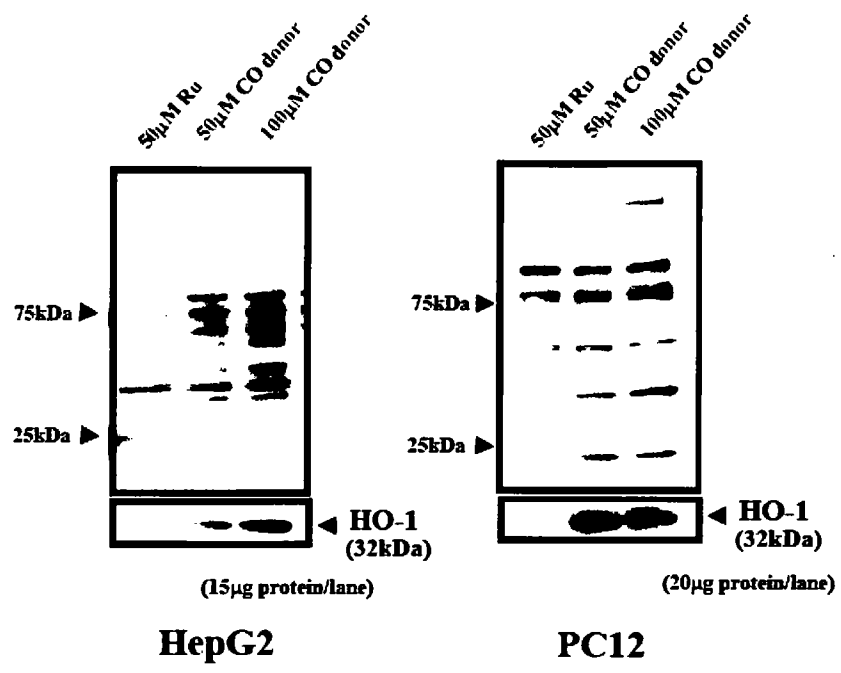
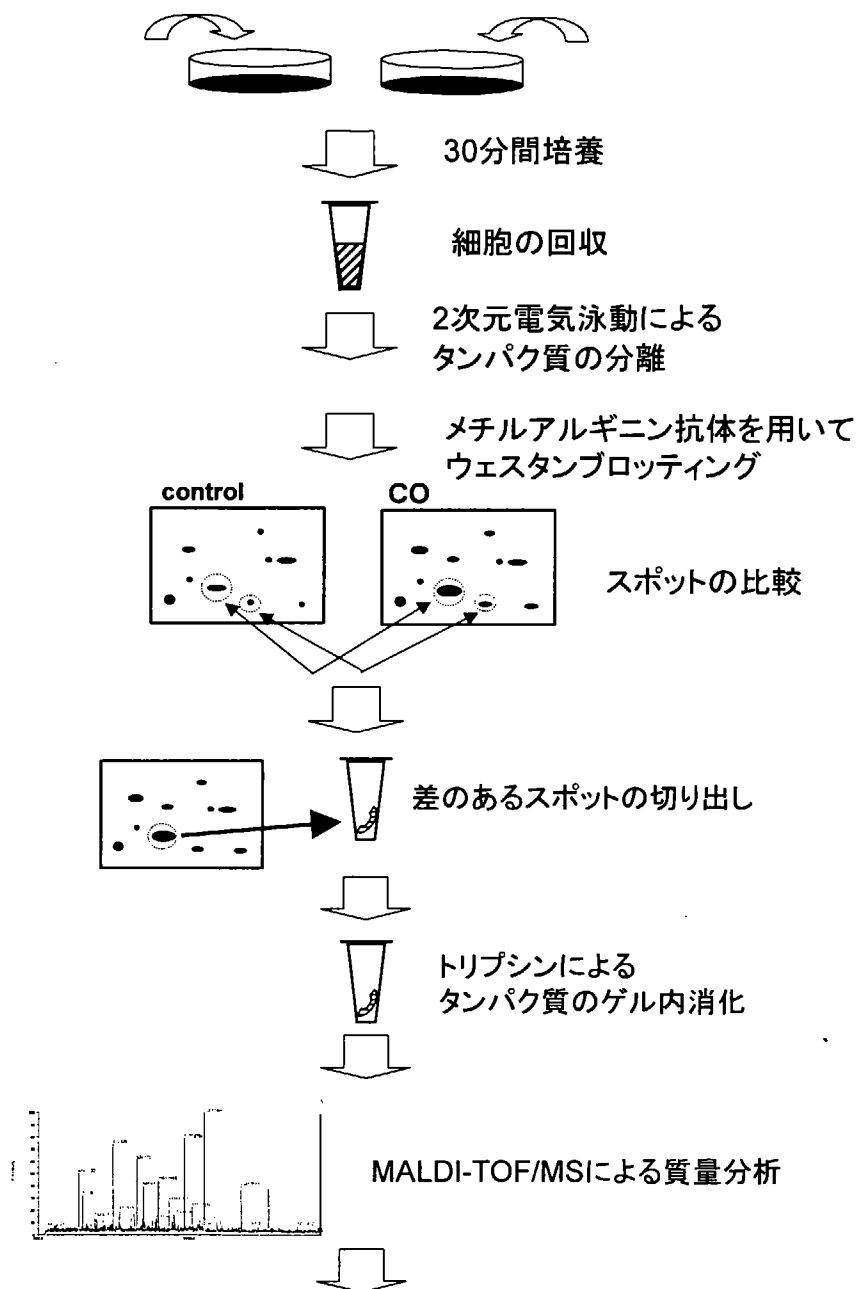
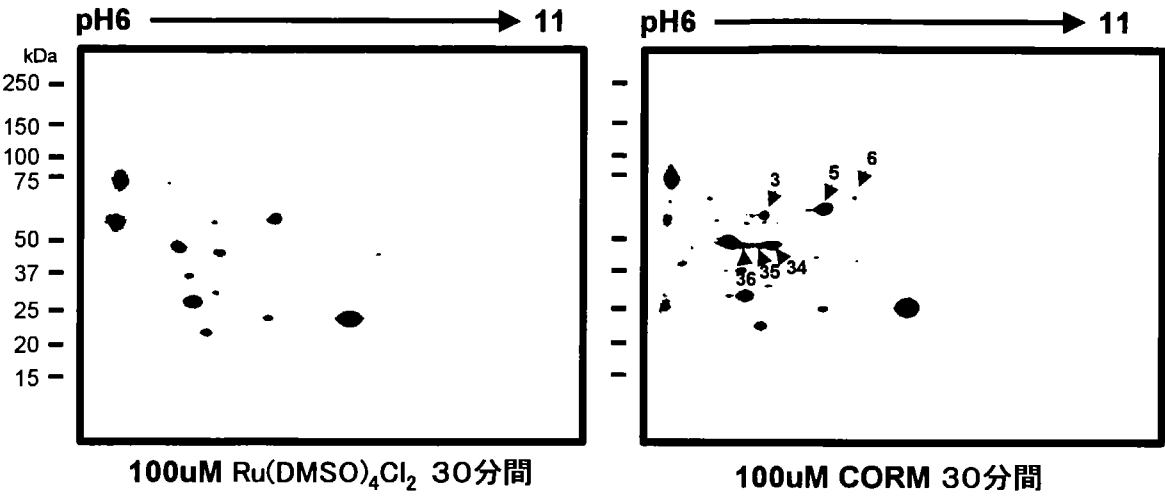


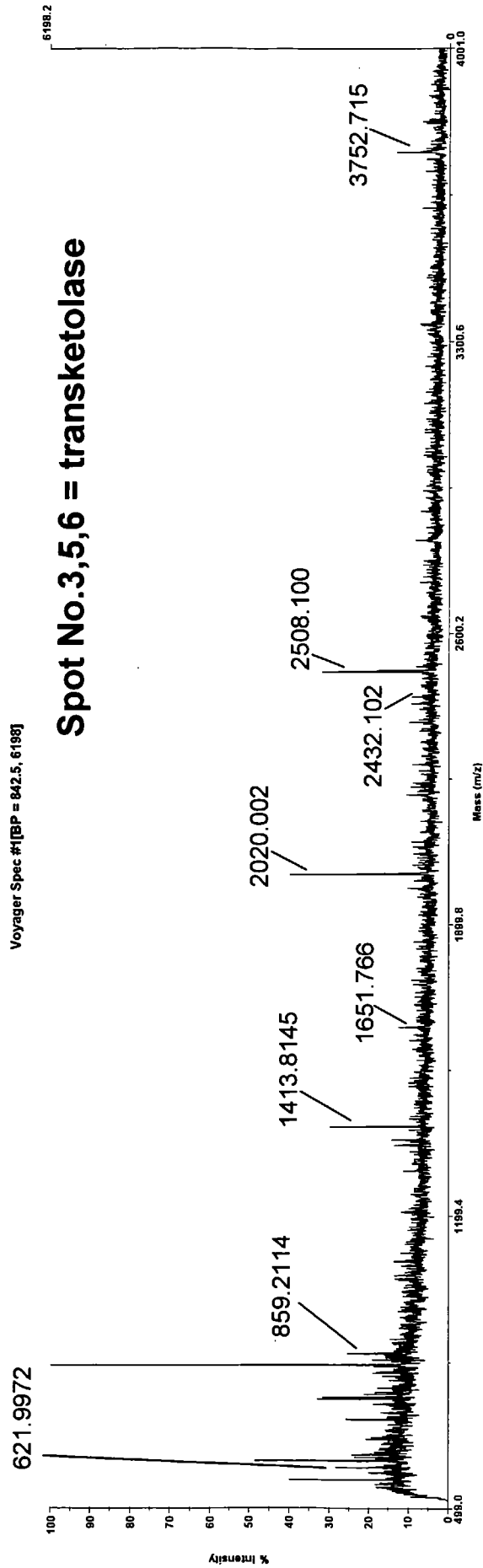
図4

コントロール: $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$ の投与COドナー: $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ (CORM-2)の投与

Peptide Mass Fingerprinting (PMF)法によるタンパク質の同定

図5





6

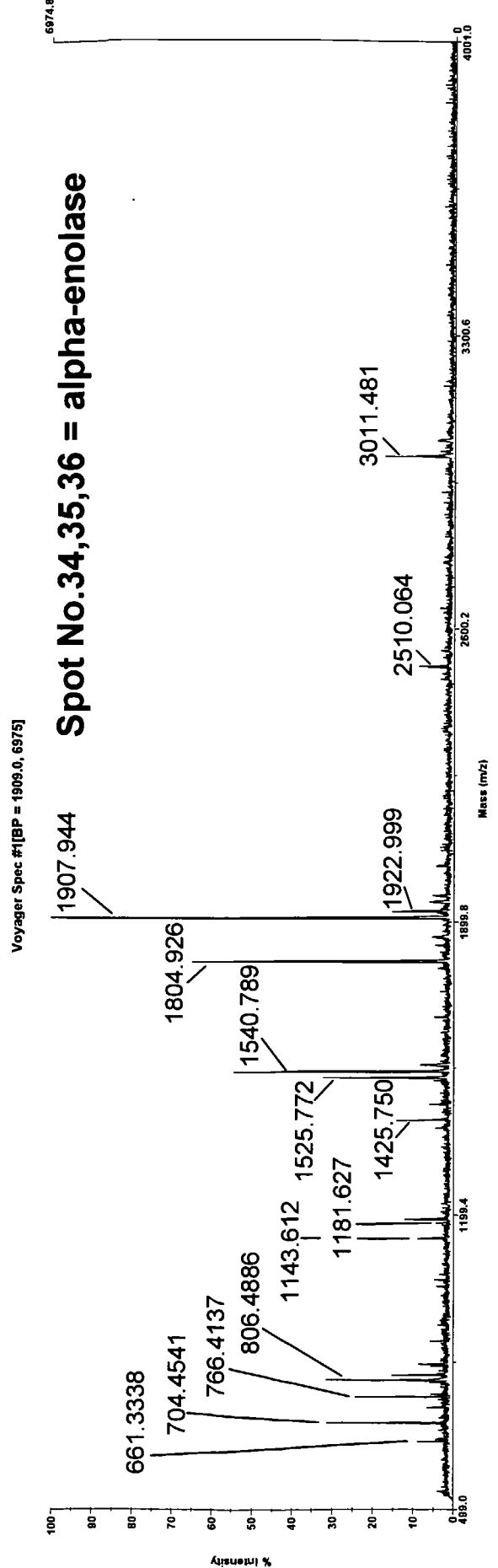
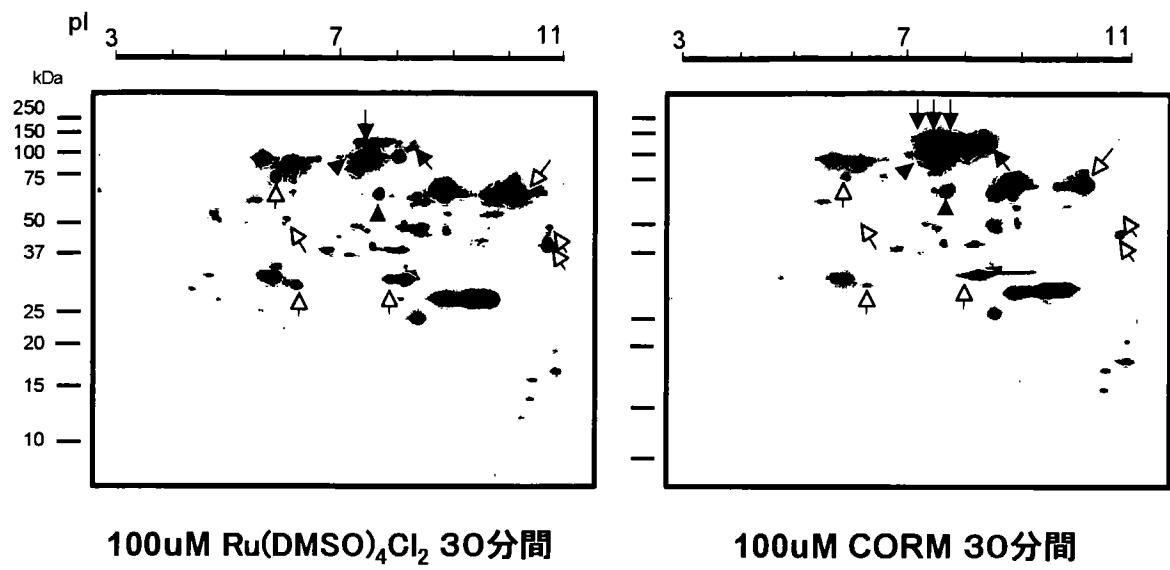


図7



88

Spot No.	SDMA/ADMA	Increase/Decrease		Protein name	Gene ID	pI		MW (observed/calculated)	Seq Cov (%)	MOWSE score	Matched /Inputed
		30 min	6 hr			O/N					
1	ADMA	+	-	Zinc finger protein 495 (zinc finger and SCAN domain containing and/or Elongation factor 1- α 1)	79149	9.0/8.7	49000/55866	22	1171	9/26	
2	ADMA			Transketolase (EC 2.2.1.1)	1915	9.0/9.1	49000/50141	17	291	7/26	
3	ADMA	+	+	Transketolase	7086	8.0/7.6	62000/67878	12	99.9	4/20	
4	ADMA	-	-	Esterase D (EC 3.1.1.1)	7086	7.5/7.6	62000/67878	13	488	7/12	
5	ADMA	+		Transketolase	2098	7.2/6.6	31000/31463	30	696	6/10	
6	ADMA	-	-	Transketolase	7086	8.0/7.6	62000/67878	30	8325	12/35	
6'	ADMA	-	-	Transketolase	7086	8.2/7.6	69000/67878	23	39795	11/16	
7		++	-	phosphatase and actin regulator 2 or mitochondrial serine hydroxymethyltransferase	7086	8.2/7.6	69000/67878	25	51923	11/18	
					9749	8.3/8.1	65000/69690	20	124	10/23	
8		+	-		6472	8.3/8.3	65000/53455	18	105	6/23	
9		+									
10		+	-	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA) (EC 4.1.2.13) and/or GAPDH?	226	9.1/8.5	39000/39448	32	21449	7/32	
11	ADMA		-	Calycyclin-binding protein (Slah-interacting protein)	2597	9.1/8.6	39000/36054	32	7548	9/32	
12		+	-	hnRNP A2	27101	8.6/8.3	28000/26210	50	1096	7/15	
13		+	+	Sorbitol dehydrogenase (EC 1.1.1.14)	3181	7.3/9.0	31000/37430	20	549	6/18	
14		-	-	Adenylyl cyclase-associated protein 1	6652	7.6/8.3	31000/38166	25	1728	6/37	
15		+	-		10487	7.3/8.1	65000/51542	24	223	6/19	
16	ADMA	+	-								
17	ADMA	-	-	TKT?	7086	8.0/7.6	69000/67878	12	44	5/37	
18		-									
19	ADMA										
20	ADMA	-	-								
21	ADMA	-	-								
22		-	-								
23											
24		-									
25			+								
26		+									
34	ADMA			alpha-enolase(EC 4.2.1.11)	2023	/7.0	/47038	39	216032	14/21	
35	ADMA			alpha-enolase(EC 4.2.1.11)	2023	/7.0	/47038				
36	ADMA			alpha-enolase(EC 4.2.1.11)	2023	/7.0	/47038				

88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/326306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K33/00(2006.01) i, A61P29/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P37/06(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K33/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/92075 A1 (Northwick Park Institute for Medical Research), 21 November, 2002 (21.11.02), Full text & JP 2004-532244 A & EP 1399147 A2	1-3, 5
X	WO 03/88748 A1 (Beth Israel Deaconess Medical Center), 30 October, 2003 (30.10.03), Full text & JP 2005-522521 A & EP 1499186 A1	1-3, 5
X	WO 03/94932 A1 (Yale University), 20 November, 2003 (20.11.03), Full text & JP 2005-532314 A & EP 1501523 A1	1-3, 5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 February, 2007 (20.02.07)

Date of mailing of the international search report
27 February, 2007 (27.02.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/326306

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/96977 A1 (Yale University), 27 November, 2003 (27.11.03), Full text & JP 2005-533021 A & EP 1505990 A2	1-3,5
X	WO 04/00368 A1 (University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education), 31 December, 2003 (31.12.03), Full text & JP 2005-533812 A & EP 1515753 A1	1-3,5
X	WO 03/103585 A1 (Yale University), 18 December, 2003 (18.12.03), Full text & JP 2005-532351 A & EP 1509237 A2	1-3,5
X	WO 04/43341 A2 (University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education), 27 May, 2004 (27.05.04), Full text & JP 2006-514621 A & EP 1558084 A2	1-3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/326306

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.: 4, 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4 and 6 involve methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K33/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K33/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

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

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/92075 A1 (Northwick Park Institute for Medical Research) 2002. 11. 21 全文 & J P 2004-532244 A & E P 1399147 A2	1-3, 5

☒ 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

20. 02. 2007

国際調査報告の発送日

27. 02. 2007

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 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)

岩下 直人

4 C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 03/88748 A1 (Beth Israel Deaconess Medical Center) 2003. 10. 30 全文 & JP 2005-522521 A & EP 1499186 A1	1-3, 5
X	WO 03/94932 A1 (Yale University) 2003. 11. 20 全文 & JP 2005-532314 A & EP 1501523 A1	1-3, 5
X	WO 03/96977 A1 (Yale University) 2003. 11. 27 全文 & JP 2005-533021 A & EP 1505990 A2	1-3, 5
X	WO 04/00368 A1 (University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education) 2003. 12. 31 全文 & JP 2005-533812 A & EP 1515753 A1	1-3, 5
X	WO 03/103585 A1 (Yale University) 2003. 12. 18 全文 & JP 2005-532351 A & EP 1509237 A2	1-3, 5
X	WO 04/43341 A2 (University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education) 2004. 05. 27 全文 & JP 2006-514621 A & EP 1558084 A2	1-3, 5

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（P C T 17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4,6 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲4, 6は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、
この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってP C T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の国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。