

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/147263 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/059744
- (22) 国際出願日: 2013 年 3 月 29 日(29.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-080211 2012 年 3 月 30 日(30.03.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 杉山 大介(SUGIYAMA, Daisuke); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: NOVEL USE OF ACETYLTRANSFERASE COMPETITIVE INHIBITORY FACTOR Gm16515

(54) 発明の名称: アセチル化酵素競合阻害因子 Gm16515 の新規用途

(57) Abstract: The present invention provides a novel use of Gm16515, a homologue of Gm16515 or a gene product of Gm16515 or the homologue, which relies on a novel function that is unknown previously. Specifically, Gm16515, a homologue of Gm16515 or a gene product of Gm16515 or the homologue is used as an active ingredient for a globin synthesis regulator, particularly a pharmaceutical composition for treating blood diseases associated with abnormal globin synthesis (e.g., myelodysplastic syndromes, hemoglobinopathy). Alternatively, Gm16515, a homologue of Gm16515 or a gene product of Gm16515 or the homologue is used as a melanin synthesis inhibitory factor, particularly a skin-whitening composition.

(57) 要約: 本発明は、Gm16515 若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物について、従来知られていない機能に基づいて新たな用途を提供する。具体的には、Gm16515 若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を、グロビン合成制御剤、特にグロビン合成異常を伴う血液疾患（骨髄異形成症候群や異常ヘモグロビン症など）の治療用医薬組成物の有効成分として用いる。また、Gm16515 若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を、メラニン合成抑制剤、特に美白用組成物として用いる。



WO 2013/147263 A1

明 細 書

発明の名称：アセチル化酵素競合阻害因子Gm16515の新規用途

技術分野

[0001] 本発明は、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の新規用途に関する。具体的には、グロビン合成制御剤およびメラニン合成抑制剤としての用途に関する。また本発明は、グロビン合成またはメラニン合成を制御（亢進または抑制）する作用を有する物質をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

[0002] ヘモグロビンは α 様グロビン鎖と非 α 様グロビン鎖の各2分子からなる4量体で構成されており、赤血球の酸素運搬を司る。ヘモグロビンの量的・質的異常は異常ヘモグロビン症と呼ばれ、貧血状態を惹起する。中でもサラセミアは東アジアに多発する常染色体優性遺伝性の異常ヘモグロビン症である。サラセミアでは α 様あるいは非 α 様グロビン鎖のどちらか一方の合成が抑制されてグロビン合成の不均衡が生じ、貧血状態を惹起する。この貧血の病態は、(1)正常なヘモグロビン合成低下による小球性低色素性貧血、(2)合成障害を受けていないグロビン鎖の産生過剰が引き起こす溶血性貧血、この両者が混合したものであり、骨髓において効率良く赤血球が産生されない無効赤血球造血を生じる。

[0003] しかしながら、その発症機序の解明は発展途上であり、サラセミア治療の現状は対症療法である輸血に依存している。

[0004] サラセミアは地中海沿岸及び東南アジアに多く、非 α 様グロビン鎖に異常を呈する β サラセミアだけで6～8千万人が保因者と考えられている。同様に遺伝性異常ヘモグロビン症である鎌状赤血球貧血は、ナイジェリアだけで15万人が罹患している。この鎌状赤血球貧血も、サラセミアと同様に発症機構の解明は発展途上であり、根治療法は骨髓移植だけである。

[0005] また近年国際交流が盛んになり、本邦においても β サラセミアの保因者は7

00-1000人に1人の割合で存在することが報告されている。“輸入遺伝病”としてのサラセミア、鎌状赤血球貧血は今後更に増加することが予測出来るため、骨髄移植に依存しない新しい治療薬の開発が急務とされる。

[0006] さらに、厚生労働省が指定する特定疾患である不応性貧血の一部は、 α 様グロビン鎖に異常を呈する α サラセミアに起因することが明らかになっている（非特許文献1）。本邦において不応性貧血患者数は7000人と言われているが、高齢者に多い疾患であり、今後増加することが予測出来る。また、高齢者であるがゆえに骨髄移植の対象から外れることが多く、本疾患においても骨髄移植に依存しない新しい治療薬の開発が必要である。

[0007] また、シミやソバカスなどの色素沈着を抑えることは、若さと美しさを保つうえで重要な要素であり、特に女性にとっては重大な関心事である一方、環境汚染等によるオゾン層の破壊により表皮に届く紫外線量は年々増加する傾向にあり、紫外線による肌のシミ、ソバカス、色黒などの肌の悩みは依然として多い。

[0008] シミやソバカスなどの色素沈着は、例えばホルモン分泌異常や紫外線照射等を受けて、活性化した色素細胞（メラノサイト）中でチロシナーゼなどの作用によりチロシンからメラニンが生成し、これが皮膚組織に沈着するために生じる。メラニンの生成は、チロシンがチロシナーゼの作用を受けることが引き金となり、酵素的または非酵素的酸化作用を受けて段階的な反応を経てメラニンに変化することによって生じる。このため、美白のアプローチとして、従来からチロシナーゼの活性を直接的に阻害することによってメラニンの合成を抑制する方法が用いられている。またその他の方法として、メラノサイト刺激物質（情報伝達物質）を阻害し、メラノサイトの活性化を遮断することにより、結果的にメラニン生成を抑制する方法や、メラニンの排泄を促進する方法（ターンオーバー促進）等もある。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Higgs et al., Ann NY Acad Sci, 2005

非特許文献2 : Kasem Kulkeaw et al., Biochemical and Biophysical Research Communications (2010) 394, 4, 859-864

非特許文献3 : Kasem Kulkeaw et al., Genes to Cells (2011) 16, 358-367

非特許文献4 : Rawls, J.F. & Johnson, S.L., Development (2000) 127, 3715-3724

非特許文献5 : Rawls, J.F. & Johnson, S.L., Development (2001) 128, 1943-1949

非特許文献6 : White, R.M. & Zon, L.I., Cell Stem (2008) 3, 242-252

非特許文献7 : Lister, J.A., et al., Development (1999) 126, 3757-3767

非特許文献8 : Parichy, D.M., et al., Development (2000) 127, 3715-3724

非特許文献9 : Kejsh, R.N. & Eisen, J.S., Development (2000) 127, 515-525

非特許文献10 : Drissen R, et al., Mol Cell Biol. 2005 Jun;25(12):5205-14

非特許文献11 : Whitelaw E, et al., Mol Cell Biol. 1990 Dec;10(12):6596-606

非特許文献12 : Tsiftoglou AS, et al., IUBMB Life. 2009 Aug;61(8):800-30.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物について、従来知られていない機能に基づいて新たな用途を提供することを目的とする。具体的には、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物について、グロビン合成制御剤としての用途、及びメラニン合成抑制剤としての用途を提供する。

[0011] さらに本発明は、今回新たに見出されたGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の機能を利用して、グロビン合成またはメラニン合成を制御（亢進または抑制）する作用を有する物質をスクリーニングし取得

する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者は、既にゼブラフィッシュを17℃の低温で飼育することにより、貧血状態を呈したゼブラフィッシュが得られることを確認しているが（非特許文献2）、この貧血ゼブラフィッシュについて遺伝子解析をしていたところ、造血組織である腎臓において有意に発現が低下している遺伝子を見出し、当該遺伝子が、既にマウスで同定されているGm16515のホモログ（以下、「ゼブラフィッシュGm16515」ともいう。）であることを確認した（実験例1、図2）。
- [0013] そこで、本発明者は、マウスGm16515について、マウス造血幹細胞の分化成熟過程におけるGm16515発現レベルを調べたところ、グロビン合成が盛んな時期に一致してGm16515の発現レベルが亢進することを確認し（実験例2、図3）、Gm16515の発現とグロビン合成との間に何らかの関係があると考えた。この考えのもと、更なる実験により、マウスのフレンド白血病細胞株にGm16515を過剰発現させると、ヒストンH4蛋白質のアセチル化が阻害されると共に、グロビン遺伝子である β major globin遺伝子mRNAの発現が抑制されること（実験例3、図4）：ゼブラフィッシュの胚を利用して、逆にGm16515のホモログ（ゼブラフィッシュGm16515）のスプライシングを阻害すると、グロビン遺伝子（hbb1遺伝子）mRNAの発現が亢進することを確認し（実験例4、図5）、ゼブラフィッシュGm16515またはその遺伝子産物がグロビン合成を負に制御していることを見出した。当該Gm16515またはその遺伝子産物の作用は、Gm16515タンパクが、アセチル化酵素と競合して、アセチルCoAを捕捉することで、グロビン蛋白質のアセチル化を阻害することによるものであり（実験例5～6、図8～10）、その意味からGm16515タンパクは、従来アセチル化の阻害を担うと考えられてきた“脱アセチル化酵素”とは異なる作用を保持する、新たなアセチル化酵素競合因子と位置づけることができる。
- [0014] さらに、本発明者は、既にゼブラフィッシュを17℃の低温で飼育することで、ゼブラフィッシュの皮膚への色素沈着が変わることを確認しているが（

非特許文献3)、ゼブラフィッシュGm16515は上記するヘモグロビン合成を抑制するだけではなく、黒色色素であるメラニンの合成をも抑制する作用を有することを確認した(実験例4、図6～7)。

[0015] 本発明は、これらの知見に基づいて完成したものであり、下記の実施形態を有するものである。

[0016] (I) グロビン合成制御剤、及びそれを含む医薬組成物

(I-1) Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするグロビン合成制御剤。

[0017] (I-2) グロビン合成を負または正に制御するものである、(I-1)記載のグロビン合成制御剤。

[0018] (I-3) Gm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物の造血細胞における機能発現を抑制または亢進する物質を有効成分とするグロビン合成制御剤。

[0019] (I-4) 上記機能発現が、造血細胞におけるGm16515若しくはそのホモログが有するアセチルCoA捕捉機能である、(I-3)記載のグロビン合成制御剤。

[0020] (I-5) 上記機能発現が、造血細胞におけるGm16515もしくはそのホモログの遺伝子発現の亢進または抑制に基づくものである、(I-3)記載のグロビン合成制御剤。

[0021] (I-6) グロビン合成を正または負に制御するものである、(I-3)乃至(I-5)のいずれかに記載するグロビン合成制御剤。

[0022] (I-7) (I-1)乃至(I-6)のいずれかに記載するグロビン合成制御剤、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する、グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療用医薬組成物。

[0023] (I-8) グロビン合成異常を伴う血液疾患が、骨髓異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症である(I-7)記載の医薬組成物。

[0024] なお、本発明には、下記の態様も含まれる：

(I-a) (I-1)乃至(I-6)のいずれかに記載するグロビン合成制御剤、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する医薬組成物をグロビン合成

異常を伴う血液疾患に罹患した患者に投与する工程を有する、グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療方法。

[0025] (I-b) グロビン合成異常を伴う血液疾患が、骨髄異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症である (I-a) に記載する治療方法。

[0026] (I-c) グロビン合成異常を伴う血液疾患を治療するために用いられる、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[0027] (I-d) グロビン合成異常を伴う血液疾患が、骨髄異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症である、(I-c) に記載するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[0028] (I-e) グロビン合成を制御する作用を有するものである、(I-c) または (I-d) に記載するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[0029] (I-f) グロビン合成制御剤を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。

[0030] (I-g) グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療用医薬組成物を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。
(I-h) グロビン合成異常を伴う血液疾患が、骨髄異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症である、(I-g) に記載する使用。

[0031] (II) メラニン合成抑制剤

(II-1) Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするメラニン合成抑制剤。

[0032] (II-2) (II-1) 記載のメラニン合成抑制剤を含有する、美白用組成物。

[0033] なお、本発明には、下記の態様も含まれる：

(II-a) (II-1) に記載するメラニン合成抑制剤、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する組成物をメラニン合成が亢進した患者または生

体部位（皮膚）に投与する工程を有する、メラニン合成の抑制方法。

[0034] (II-b) (II-1) に記載するメラニン合成抑制剤、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する組成物をメラニン合成が亢進した患者または生体部位（皮膚）に投与する工程を有する、美白方法。

[0035] (II-c) メラニン合成を抑制して美白するために用いられる、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[0036] (II-d) メラニン合成を抑制する作用を有するものである、(I-c) に記載するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[0037] (II-e) メラニン合成抑制剤を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。

[0038] (II-f) 美白用組成物を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。

[0039] (III) グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質のスクリーニング方法

(III-1) 下記の工程を有する、グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質をスクリーニングする方法：

(1) Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

(2) 上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

(3) 上記被験測定値が対照測定値よりも高いかまたは低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質として選択する工程。

[0040] (III-2) グロビン合成を制御する物質（グロビン合成制御物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、末梢血、骨髓細胞、EEB, F-36P、K562、KU-812-F、胚性幹細胞に由来するヒト赤血球細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、末梢血、骨髓

細胞、F5-5, fl、フレンド赤白血病細胞株、TSA8、32D、C-8052 & C-8049、赤白血病細胞、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、末梢血、腎髓細胞（以上、ゼブラフィッシュ由来細胞）を用いることを特徴とする（III-1）記載の方法。

[0041] （III-3）メラニン合成を制御する物質（メラニン合成制御物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、胚または成体の皮膚から採取したメラノブラスト及びメラノサイト、B16メラノーマ、B16メラノーマ4A5、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、HWV-I & HWV-II、G-361、HOMM、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、胚または成体のゼブラフィッシュに由来するメラノブラスト及びメラノサイト、GEM-81、GEM-199 & GEM-218（以上、金魚由来細胞）を用いることを特徴とする（III-1）記載の方法。

[0042] （IV）グロビン合成またはメラニン合成を負に制御する物質のスクリーニング方法

（IV-1）下記の工程を有する、グロビン合成またはメラニン合成を負に制御する物質をスクリーニングする方法：

（1）Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

（2）上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

（3）上記被験測定値が対照測定値よりも高い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を負に制御する物質として選択する工程。

[0043] （IV-2）グロビン合成を負に制御する物質（グロビン合成抑制物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、末梢血、骨髓細胞、EEB, F-36P、K562、KU-812-F、胚性幹細胞に由来するヒト赤血球細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、末梢血、

骨髓細胞、F5-5, f1、フレンド赤白血病細胞株、TSA8、32D、C-8052 & C-8049、赤白血病細胞、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、末梢血、腎髓細胞（以上、ゼブラフィッシュ由来細胞）を用いることを特徴とする（IV-1）記載の方法。

[0044] （IV-3）メラニン合成を負に制御する物質（メラニン合成抑制物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、胚または成体の皮膚から採取したメラノブラスト及びメラノサイト、B16メラノーマ、B16メラノーマ4A5、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、HWV-I & HWV-II、G-361、HOMM、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、胚または成体のゼブラフィッシュに由来するメラノブラスト及びメラノサイト、GEM-81、GEM-199 & GEM-218（以上、金魚由来細胞）を用いることを特徴とする（IV-1）記載の方法。

[0045] （V）グロビン合成またはメラニン合成を正に制御する物質のスクリーニング方法

（V-1）下記の工程を有する、グロビン合成またはメラニン合成を正に制御する物質をスクリーニングする方法：

（1）Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

（2）上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

（3）上記被験測定値が対照測定値よりも低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を正に制御する物質として選択する工程。

[0046] （V-2）グロビン合成を正に亢進する物質（グロビン合成亢進物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、EEB, F-36P、K562、KU-812-F、胚性幹細胞に由来するヒト赤血球細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、末梢血、骨髓細胞、F5-5, f1、フ

レンド赤白血病細胞株、TSA8、32D、C-8052 & C-8049、赤白血病細胞、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、末梢血、腎髄細胞（以上、ゼブラフィッシュ由来細胞）を用いることを特徴とする（V-1）記載の方法。

- [0047] （V-3）メラニン合成を正に制御する物質（メラニン合成亢進物質）をスクリーニングする方法であって、Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞として、胎児または成体の皮膚から採取したメラノブラスト及びメラノサイト、B16メラノーマ、B16メラノーマ4A5、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、マウス由来細胞）、HWV-I & HWV-II、G-361、HOMM、胚性幹細胞、人工多能性細胞（以上、ヒト由来細胞）、胚または成体のゼブラフィッシュに由来するメラノブラスト及びメラノサイト、GEM-81、GEM-199 & GEM-218（以上、金魚由来細胞）を用いることを特徴とする（V-1）記載の方法。

発明の効果

- [0048] 本発明によれば、上記するように、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物について、グロビン合成制御剤、好ましくはグロビン合成を負または正に制御することにより α グロビンと β グロビンの比率を調節することが可能な薬剤としての新たな用途を提供することができる。当該グロビン合成制御剤によれば、前述するサラセミア等の異常ヘモグロビン症の治療用医薬組成物として応用することができる。
- [0049] また、本発明によれば、上記するように、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物について、メラニン合成抑制剤としての新たな用途を提供することができる。当該メラニン合成抑制剤によれば、メラニンの合成を抑制することにより、肌への色素沈着、例えばシミやソバカスの発生を抑制し、美白効果を期待することができる。
- [0050] さらに本発明のスクリーニング方法によれば、Gm16515またはそのホモログの発現の増減を指標とすることで、新規なグロビン合成制御剤またはメラニン合成制御剤の有効成分（候補物質）、具体的には新規なグロビン合成抑制剤またはメラニン合成抑制剤の有効成分（候補物質）、ならびにグロビン合

成亢進剤またはメラニン合成亢進剤の有効成分（候補物質）を取得することができる。

[0051] グロビン合成抑制剤及びグロビン合成亢進剤は、それぞれ単独または組み合わせてグロビン合成制御剤として、グロビン合成異常に起因する疾患、例えばグロビン合成異常を伴う血液疾患、特に骨髓異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症の治療薬として有用である。またメラニン合成抑制剤は、肌への色素沈着、例えばシミやソバカスの発生を抑制し、美白効果を発揮する経口または外用組成物（医薬品、医薬部外品、化粧品）として有用である。またメラニン合成亢進剤は、メラニンの欠如あるいは減少に起因する白髪、皮膚の白斑などの予防、緩和または改善する経口または外用組成物（医薬品、医薬部外品、化粧品）として有用である。

図面の簡単な説明

[0052] [図1] Gm16515タンパク（マウス）、及びそのホモログ（ヒト、ゼブラフィッシュ）のアミノ酸配列とそのアセチルCoA結合部位（下線部）を示す。

[図2] 実験例1において、低温飼育したゼブラフィッシュ（図中、coldとして示す）と常温飼育した健常なゼブラフィッシュ（図中、Normalとして示す）とで、腎臓組織におけるGm16515の発現量を対比した結果を示す。縦軸のRQは、低温飼育したゼブラフィッシュの腎臓組織でのGm16515の発現量を1とした相対量（Relative Quantity）を意味する。

[図3] 造血幹細胞の分化及び成熟過程において、Gm16515の発現レベルが、CFU-E前駆細胞が赤芽球を経て赤血球に分化し成熟するにつれて、グロビン遺伝子の発現増加（ヘモグロビンの合成）とともに、増大することを示す（実験例2）。縦軸のRQは、Gm16515の発現レベルの相対量（Relative Quantity）を意味する。

[図4] (A) 実験例3において、マウスのフレンド白血病細胞株にGm16515を過剰発現させた細胞（Gm16515）と、Gm16515を過剰発現させない同細胞株（Control）について、免疫細胞染色法により、ヒストン4のアセチル化レベル

を測定した結果を示す。(B) 実験例 3 において、マウスのフレンド白血病細胞株に Gm16515 を過剰発現させた細胞 (Gm16515) と、Gm16515 を過剰発現させない同細胞株 (Control) について、 α グロビン遺伝子と β グロビン遺伝子の発現量を測定した結果を示す。縦軸の RQ は、Gm16515 の発現レベルの相対量 (Relative Quantity) を意味する。

[図 5] (A) 実験例 4 において、Gm16515 の発現を抑制したゼブラフィッシュ (Morpholino[M0]) と正常のゼブラフィッシュ (Control) について、ヘモグロビン染色を行った結果を示す。(B) 実験例 4 において、Gm16515 の発現を抑制したゼブラフィッシュ (Morpholino[M0]) と正常のゼブラフィッシュ (Control) について、 α グロビン遺伝子と β グロビン遺伝子の発現量を測定した結果を示す。縦軸の RQ は、各グロビン遺伝子の発現レベルの相対量 (Relative Quantity) を意味する。

[図 6] メラニン細胞の分化過程とそれに関連する遺伝子との関係、及びメラノサイト中の色素の凝集と分散に関する遺伝子の関係を示す模式図である。

[図 7] 実験例 4 において、Gm16515 の発現を抑制したゼブラフィッシュ (Morpholino[M0]) と正常のゼブラフィッシュ (Control) について、メラニン合成関連遺伝子 (メラニン細胞の分化に関係する遺伝子 : *kita*, *kitlga*, *mitfa*、メラニン合成遺伝子 : *tyr*, *dct*、メラノソーム分布に関係する遺伝子 : *pomca*) の発現を比較した結果を示す。縦軸の RQ は、各遺伝子の発現レベルの相対量 (Relative Quantity) を意味する。

[図 8] 実験例 5 において、Gm16515 タンパクのアセチル CoA に対する結合能を評価した結果を示す。横軸は、アセチル CoA の濃度 (pmol)、縦軸は蛍光強度 (Ex/Em=535nm/589nm) を示す。

[図 9] 実験例 6 において、Gm16515 タンパク (—◇—) または HAT (Histon Acetyl-Transferase) (—△—) を、それぞれヒストンおよびアセチル CoA とともにインキュベーションして、遊離したフリーの CoA の量を測定した結果を示す。横軸は反応時間 (hour)、縦軸は遊離した CoA の量を示す。

[図 10] 実験例 3 ~ 6 の結果から得られた知見を模式図にて纏めたものである

。つまり、Gm16515タンパクは、アセチル化酵素と競合してアセチルCoAを結合補足する。その結果、ヒストンのアセチル化が抑制されて、グロビン合成が低下する（グロビン合成を負に制御する）。この点、アセチルCoAを結合補足し、それをヒストンに転移することでヒストンをアセチル化し、グロビン合成を正に制御するHATと作用が相違する。

[図11]E. coliより精製したマウスGm16515タンパクを用いて、実験例6（1）で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515ポリクローナル抗体でウエスタンブロッティングを行った結果を示す（実験例6（1））。

[図12]マウス胎児肝臓赤血球系細胞（BFU-E：赤芽球バースト形成細胞、CFU-E：赤芽球コロニー形成細胞、Erythroblast：赤芽球、Erythrocyte：成熟赤血球）について、実験例6（1）で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbを用いて免疫細胞化学染色を行い、これらの赤血球系細胞におけるGm16515タンパクの発現状況を調べた結果を示す。核は青色に発色し、Gm16515タンパクは緑色に発色する。

[図13]（A）マウスGm16515を、GFP発現プラスミドにクローンし、得られたGm16515を含むプラスミドをマウスのフレンド白血病細胞株にトランスフェクトして調製したGm16515細胞の、ウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbを用いた免疫染色画像を示す。細胞の核にGm16515が発現していることがわかる。（B）GFP陽性細胞（Gm16515細胞、コントロール細胞[Mock]）における細胞内遊離アセチルCoAの量を測定した結果を示す。

[図14]ヒストンアセチル転移酵素（tGcn5）とマウスのGm16515タンパクのモチーフ領域（ヒストン結合部位、アセチルCoA部位）の配置、並びにヒストン結合部位を含む領域（tGcn5：71-101領域、Gm16515：1-31領域）のアミノ酸配列を対比した図である。

[図15]完全長Gm16515（Full）及び欠失型Gm16515（-20aa）をそれぞれ導入したフレンド白血球病細胞株について、Klf1遺伝子、 α -グロビン遺伝子、及び β -グロビン遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCR法により解析した結果を示す。図中、Controlは、Gm16515を導入していないフレンド白血球病

細胞株を意味する。

[図16] Gm16515を導入したマウスフレンド白血球細胞（Gm16515細胞）と、Gm16515を導入しないマウスフレンド白血球細胞（mock）について、グロビン合成を制御する赤血球系転写因子（図A：Gata1、図B：Klf1）の発現を調べた結果を示す。

発明を実施するための形態

[0053] (I) 用語の説明

本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又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」（日本国特許庁編）および当該分野における慣用記号に従う。

[0054] 本明細書において「遺伝子」または「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する趣旨で用いられる。またその長さによって特に制限されるものではない。従って、本明細書において遺伝子またはDNAとは、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA(正鎖)並びに該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(相補鎖)、およびこれらの断片のいずれもが含まれる。

[0055] また、当該「遺伝子」または「DNA」には、特定の塩基配列で示される「遺伝子」（例えばマウスGm16515）または「DNA」だけでなく、これらによりコードされる蛋白質（遺伝子産物）と生物学的機能が同等である蛋白質（例えば、同族体、変異体、誘導体など）をコードする「遺伝子」または「DNA」が含まれる（本明細書においては、これらを総括して上記特定の塩基配列で示される「遺伝子」（マウスGm16515）または「DNA」の「ホモログ」ともいう。）。かかるホモログとしては、具体的には、後述する(1-1)項に記載のストリンジントな条件で、特定塩基配列で示される「遺伝子」または「DNA」とハイブリダイズするものを挙げることができる。なお、上記DNAには、cDNA、

ゲノムDNAおよび合成DNAのいずれもが含まれる。

[0056] 例えば同族体をコードする遺伝子(ホモログ)としては、マウス遺伝子 (Gm16515) に対応するラットやヒトなどの哺乳類、またはゼブラフィッシュ等の魚類などといった他生物種の遺伝子が例示できる。これらの遺伝子(ホモログ)は、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>)により同定することができる。具体的には、特定塩基配列をBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 5873-5877, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)にかけて一致する(Scoreが最も高く、E-valueが0でかつIdentityが100%を示す)配列のアクセッション番号を取得する。そのアクセッション番号をUniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>)に入力して得られたUniGene Cluster ID (Hs. で示す番号)をHomoloGeneに入力する。

[0057] 結果として得られた他生物種遺伝子とマウス遺伝子 (Gm16515) との遺伝子ホモログの相関を示したリストから、マウス遺伝子 (Gm16515) に相当するラットやヒト、またはゼブラフィッシュなどの他生物種の遺伝子を選抜することができる。なお、遺伝子またはDNAは機能領域の別を問うものではなく、例えば発現制御領域、コード領域、エキソンまたはイントロンを含むことができる。

[0058] 本明細書において、「核酸」または「ポリヌクレオチド」とは、遺伝子、RNAおよびDNAのいずれをも包含する趣旨で用いられる。なお、上記RNAには、total RNA、mRNA、rRNAおよび合成のRNAのいずれもが含まれる。

[0059] 本明細書において「遺伝子産物」には、「遺伝子転写産物」であるmRNA 及びmRNAの派生物(例えば、mRNAの塩基配列をDNA配列に置き換えたDNA(cDNA))、並びに「遺伝子翻訳産物」である蛋白質(タンパク)または(ポリ)ペプチドが含まれる。

[0060] 本明細書において、遺伝子産物に含まれる「蛋白質(タンパク)」または「(ポリ)ペプチド」には、特定のアミノ酸配列で示される「蛋白質(タンパク)」または「(ポリ)ペプチド」だけでなく、これらと生物学的機能が同等である「蛋白質(タンパク)」または「(ポリ)ペプチド」(例えば、同族体

、変異体、誘導体など）が包含される。なお、本明細書において、これらを上記特定のアミノ酸配列で示される蛋白質（タンパク）または(ポリ)ペプチドの「ホモログ」と総称する。例えば、同族体としては、マウスの蛋白質（Gm16515タンパク）に相当するラットやヒト、またはゼブラフィッシュなどの他生物種の蛋白質（オルソログ）が例示でき、これらはHomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>)により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また、上記変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体および人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、かかる変異体としては、変異のない蛋白質（タンパク）または(ポリ)ペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、特に好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げることができる。

[0061] （II）グロビン合成制御剤、及びそれを含む医薬組成物

（II-1）Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とする薬剤

本発明のグロビン合成制御剤は、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とする。これらの成分は、 α -グロビン及び／または β -グロビンの合成を負または正に制御する作用を有している。従って、これらの成分を有効成分とするグロビン合成制御剤は、好ましくはグロビン合成を負または正に制御することにより、 α グロビンと β グロビンの比率を調節する薬剤として使用することができる。この一態様として、後述する実験例では、マウスGm16515、及びそのホモログであるゼブラフィッシュGm16515（並びにその遺伝子産物）がグロビン合成を負に制御することを示す。

[0062] Gm16515 (Official Full Name: Gm16515 predicted gene) (Gene ID:24083, MGI ID:1344388)は、マウス (Mus musculus) の体内の多くの組織で発現しているタンパクコーディング遺伝子であり、別名「F3-2」、「Gtlf3b」、「Al256713」とも称される。第11染色体 (NC_000077.6) の60902246..60913792b

pに位置する。

[0063] Gm16515の遺伝子産物のうち、遺伝子転写産物に相当するmRNA (NCBI Reference Sequence: NM_025294.5、GI:254028190) の塩基配列を配列番号 1 に示す (但し、ここではmRNAの塩基配列をDNAの塩基配列として示す。以下、mRNAの塩基配列について同じ)。全長4159bpからなる塩基配列のうち、68~400番目の領域がコード領域である。また、Gm16515の遺伝子産物のうち、遺伝子翻訳産物に相当する蛋白質 (NCBI Reference Sequence: NP_079570.1、GI:13384646) のアミノ酸配列 (110 aa) を配列番号 2 に示す。当該蛋白質は正式には「protein GTLF3B」と称されるが、本明細書では便宜上「Gm16515タンパク」と称する。

[0064] Gm16515のホモログ及びその遺伝子産物の一例を表 1 に示す。

[0065]

[表1]

由来	名称	Gene ID	遺伝子産物
ヒト (Homo sapiens)	C17orf103 (chromosome 17 open reading frame 103)	256302	名称:protein GTLF3B mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_152914.2 GI: 116325984 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_690878.2 GI:116325985
チンパンジー (Pan troglodytes)	LOC740609 (LOC740609 protein GTLF3B-like)	740609	名称:PREDICTED: protein GTLF3B-like mRNA: NCBI Ref. Seq.: XM_001150817.2 Protein: NCBI Ref. Seq.:XP_001150817.1 GI:114668634
ウシ(Bos taurus)	C19H17orf103 (C19H17orf103 chromosome 19 open reading frame, human C17orf103)	783664	名称:protein GTLF3B mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_001102331.1 GI: 156121306 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_001095801 GI:156121307
ラット (Rattus norvegicus)	Gtlf3b (Gtlf3b gene trap locus F3b)	363614	名 称 : transcript expressed during hematopoiesis 2 mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_001170541.1 GI:281485619 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_001164012.1 GI:281485620
トリ (Gallus gallus)	C14H17orf103 (C14H17orf103 chromosome 14 open reading frame, human C17orf103)	416497	名称:protein GTLF3B mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_001030633.1 GI:71894780 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_001025804.1 GI:71894781
カエル Xenopus (Silurana) tropicalis	c17orf103 (c17orf103 chromosome 17 open reading frame 103)	493452	名称:protein GTLF3B mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_001008089.1 GI:56118541 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_001008090.1 GI:56118542
ゼブラフィッシュ (Danio rerio)	Gtlf3b (ORF Names: zgc:110779)	100002945	名称:protein GTLF3B mRNA: NCBI Ref. Seq.: NM_001013318.1 Protein: NCBI Ref. Seq.:NP_001013336.1 GI:61651794

[0066] Gm16515のホモログとしては、上記表1に示すように、Gm16515に相当するヒト遺伝子、チンパンジー遺伝子、ウシ遺伝子、及びラット遺伝子等の哺乳類遺伝子のほか、トリ遺伝子等の鳥類遺伝子、カエル遺伝子等のは虫類遺伝

子、ゼブラフィッシュ等の魚類遺伝子を挙げることができる。これらはそれぞれ表 1 に示す個別の名称を有しているが、本明細書では便宜上「Gm16515のホモログ」と総称する。但し、由来を明確にする場合は、例えば各正式名称を記載するか、または「ヒトGm16515」または「ゼブラフィッシュGm16515」などのように「Gm16515」の前に由来を表記する。

[0067] またGm16515のホモログの遺伝子産物としては、上記表 1 に示すように、Gm16515に相当するヒト遺伝子、チンパンジー遺伝子、ウシ遺伝子、及びラット遺伝子等の哺乳類遺伝子の遺伝子産物（遺伝子転写産物及び遺伝子翻訳産物が含まれる。以下、同じ。）のほか、トリ遺伝子等の鳥類の遺伝子、カエル遺伝子等のは虫類遺伝子、ゼブラフィッシュ等の魚類遺伝子の遺伝子産物を挙げることができる。これらもそれぞれ表 1 に示す個別の名称を有しているが、本明細書では便宜上「Gm16515ホモログの遺伝子産物」または「Gm16515タンパクのホモログ」と総称する。但し、由来を明確にする場合は、例えば各正式名称を記載するか、または「ヒトGm16515の遺伝子産物」または「ヒトGm16515タンパク」などのように「Gm16515」や「Gm16515タンパク」の前に由来を表記する。

[0068] なお、Gm16515ホモログに相当するヒト遺伝子（C17orf103）の遺伝子産物のうち、遺伝子転写産物に相当するmRNA（NM_152914.2、GI:116325984）の塩基配列を配列番号 3 に示す。全長4787bpからなる塩基配列のうち、3～344番目の領域がコード領域である。また、ヒト遺伝子（C17orf103）の遺伝子産物のうち、遺伝子翻訳産物に相当する蛋白質（NP_690878.2、GI:116325985）のアミノ酸配列（113 aa）を配列番号 4 に示す。

[0069] さらにGm16515ホモログに相当するゼブラフィッシュ遺伝子（Gtlf3b、zgc:110779）の遺伝子産物のうち、遺伝子転写産物に相当するmRNA（NM_001013318.1）の塩基配列を配列番号 5 に示す。全長1260bpからなる塩基配列のうち、45～377番目の領域がコード領域である。また、ゼブラフィッシュ遺伝子（Gtlf3b、zgc:110779）の遺伝子産物のうち、遺伝子翻訳産物に相当する蛋白質（NP_001013336.1、GI:61651794）のアミノ酸配列（110 aa）を配列番号 6

に示す

なお、Gm16515ホモログ、及び当該ホモログの遺伝子産物（＝Gm16515タンパクのホモログ）は、上記表 1 に記載するものに限定されない。例えば、Gm16515タンパクのホモログとしては、Gm16515タンパクのアミノ酸配列と好ましくは 70%以上、より好ましくは 75%以上、さらに好ましくは 80%以上同一であり、Gm16515タンパクと同様の機能（例えば、グロビン合成制御作用を有する、Coenzyme A (CoA) 結合機能を有する、アセチルCoA転移作用を有しない、メラニン合成制御作用を有する等）を有するものを挙げることができる。またGm16515ホモログとしては、上記Gm16515タンパクのホモログをコードする遺伝子を挙げることができる。この限りにおいて、将来見出されるGm16515ホモログ、及び当該ホモログの遺伝子産物も、本発明の対象に含まれる。

[0070] 本発明のグロビン合成制御剤は、これらのGm16515、Gm16515ホモログ、Gm16515遺伝子産物、及びGm16515ホモログの遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有するものであればよく、1種のみならず、2種以上を任意に組み合わせて含有するものであってもよい。

[0071] なお、Gm16515、及びGm16515ホモログ、並びにそれらの遺伝子転写産物等の核酸は、被験者、好ましくはヒトを含む哺乳動物への投与に適した形態を備えていることが好ましい。

[0072] かかる形態としては、遺伝子治療用の発現ベクターを挙げることができる。当該遺伝子治療に用いられる発現ベクターは、所望の投与経路に応じて当業界で公知の方法で処方することができる。また、発現ベクターが標的器官（造血組織、造血細胞）に到達するまで、当該発現ベクターから目的核酸の放出あるいは吸収を防止するための方法も当業界で公知であり、同様に本発明に適用することができる。また、当該発現ベクターは、他のベヒクル（vehicle）（例えば、リボソームのような脂質ベースの分子、凝集タンパク質、またはトランスポーター分子）などと複合体を形成した状態で使用することもできる。これらの発現ベクターは、血管内直截注入（つまり、通常の静脈

内注射と動脈内注射)、または骨髓直截注入により造血組織に送達することができる。発現ベクターには、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが含まれる。ウイルスベクターの場合、Gm16515タンパクまたはそのホモログをコードする核酸は、造血細胞における発現に必要な機能性DNA配列を作動可能に結合した状態で、ウイルス粒子内に封入された状態で使用される。かかるウイルスベクターとしても当業界で公知のものを任意に使用することができ、例えばアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、及びポリオーマウイルス等を挙げることができる。

[0073] また、上記ウイルスベクターに代えて、粒子形成能を有する物質に造血組織若しくは造血細胞を特異的に認識できる生体認識分子が導入されてなる中空ナノ粒子を用いることもできる。当該中空ナノ粒子は、標的とする細胞及び組織に所望の物質を導入するための運搬体として当業界で公知のものである。当該中空ナノ粒子の詳細は、例えば特開2001-316298号公報に記載されており、その内容は本明細書に援用されて本発明の内容に組み込まれる。

[0074] また、本発明のグロビン合成制御剤が、有効成分としてGm16515若しくはそのホモログの遺伝子翻訳産物等の蛋白質を含む場合、タンパク製剤として被験者、好ましくはヒトを含む哺乳動物への投与に適した形態を備えていることが好ましい。

[0075] なお、本発明のグロビン合成制御剤は、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物だけからなるものであってもよいし、またこれらの有効成分が有するグロビン合成制御作用を妨げない限り、他の成分を含んでも良い。かかる他の成分としては、薬学的に許容される担体や添加剤を挙げることができる。この場合のグロビン合成制御剤中のGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の配合量は、上記を満たす限り制限はされないが、通常10～99重量%の範囲のなかから適宜選択をすることができる。

[0076] (II-2) Gm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物の造血細胞における機能発現を抑制する物質を有効成分とする薬剤

また別の態様として、本発明のグロビン合成制御剤は、Gm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物の造血細胞における機能発現を抑制する物質を有効成分とする。これらの成分は、特に α -グロビン及び／または β -グロビンの合成を正または負に制御する作用を有している。従って、これらの成分を有効成分とするグロビン合成制御剤は、好ましくはグロビン合成を正または負に制御することにより、 α グロビンと β グロビンの比率を調節する薬剤として使用することができる。

[0077] ここで「機能発現」の一つとして、Gm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物、言い換えればGm16515タンパクまたはそのホモログが有するアセチルCoA捕捉機能を挙げることができる。当該アセチルCoA捕捉機能は、クロマチンのアセチル化に際して、アセチル化酵素と競合してアセチルCoAを捕捉し、クロマチンのアセチル化を阻害する機能であり、特に β グロビンの合成を制御する機能として作用する。ここで「制御」には、正の制御（亢進）と負の制御（抑制）が含まれる。また、「抑制」には、Gm16515タンパクまたはそのホモログの機能発現を100%抑制（阻止）する場合と、100%抑制（阻止）しなくても本来Gm16515タンパクまたはそのホモログが有する機能を低下させる場合の両方が含まれる。

[0078] 例えば、造血細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現または産生を制御する物質としては、造血細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現または産生において、Gm16515またはそのホモログの転写、RNAプロセッシング、輸送、翻訳、及び／又は安定性を制御する物質を挙げることができる。こうした物質として具体的には、Gm16515またはそのホモログの塩基配列にハイブリダイズし、その転写、RNAプロセッシング、輸送、翻訳、及び／又は安定性を抑制し得るアンチセンス分子、リボザイム、及びRNAiエフェクターを例示することができる。

[0079] 本発明で用いられるアンチセンス分子は、Gm16515またはそのホモログのプ

ロモーターまたはその他の制御領域、エキソン、イントロンあるいはエキソン-イントロン境界に結合するように設計される。多くの効果的なアンチセンス分子は、イントロン／エキソン・スプライス接合部とハイブリダイズし得るように設計されている。よって、本発明におけるアンチセンス分子も、Gm16515またはそのホモログのイントロン／エキソン・スプライス接合部の50～200塩基内の領域にハイブリダイズするように、当該領域に対して実質的に相補的な塩基配列を有するものであることが好ましい。

[0080] リボザイムは、RNA-タンパク質複合体であり、対象の遺伝子（mRNA）に部位特異的に結合してそれを切断することで、タンパク質への翻訳を阻害し、遺伝子機能の発現を抑制する機能を発揮する物質である。本発明で用いられるリボザイムは、Gm16515またはそのホモログから転写されたmRNAの任意領域とハイブリダイズするように当該領域に対して実質的に相補的な塩基配列を有し、そして結合した対象のオリゴヌクレオチド領域内のリン酸エステルを切断して、Gm16515タンパクまたはそのホモログへの翻訳を阻害するように設計される。

[0081] RNAiエフェクターは、RNAi（RNA干渉）の機能を発揮することによって、Gm16515またはそのホモログのDNAもしくはmRNAの上流域にハイブリダイズし、Gm16515またはそのホモログの発現を特異的に抑制するものである。RNAiエフェクターとしては、si RNA（small interfering RNA）、stRNA（small temporally regulated RNA）及びshRNA（short hairpin RNA）等を挙げることができる。なお、RNAiエフェクターを利用したRNAi技術並びにその方法は、多比良和誠ら編、「RNAi実験プロトコル」, 羊土社発行, 2003年等に詳細に記載されており、その内容は援用により本発明の内容に組み込まれる。

[0082] また造血細胞におけるGm16515タンパクまたはそのホモログの機能を制御する物質としては、具体的には、Gm16515タンパクまたはそのホモログとアセチルCoAとの結合を阻害する物質、例えばGm16515タンパクまたはそのホモログのアセチルCoA結合部位に選択的に結合して、Gm16515タンパクまたはそのホモログとアセチルCoAとの結合を抑制する物質を挙げることができる。なお、

Gm16515タンパク及びそのホモログのアセチルCoA結合部位は公知である。例えばGm16515タンパク（配列番号2）のアセチルCoA結合部位は、配列番号2に示すアミノ酸配列中、アミノ酸番号62～67の領域である。またGm16515タンパクのヒトホモログ（配列番号4）のアセチルCoA結合部位は、配列番号4に示すアミノ酸配列中、アミノ酸番号65～70の領域であり、Gm16515タンパクのゼブラフィッシュホモログ（配列番号6）のアセチルCoA結合部位は、配列番号6に示すアミノ酸配列中、アミノ酸番号62～67の領域である（図1参照）。

[0083] かかる物質として、具体的には、Gm16515タンパクまたはそのホモログに対する抗体、特にアセチルCoA結合部位に結合する抗体を挙げることができる。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよい。好ましくはモノクローナル抗体である。ポリクローナル抗体並びにモノクローナル抗体の調製方法は、当業界で周知であり、本発明の抗体もこれに準じて調製することができる（例えば、Harlow and Lane, Antibodies; A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988；米国特許第4,196,265号公報等参照、これらの文献の内容は援用により本発明の内容に組み込まれる）。本発明で好適に用いられる抗体としては、具体的には、抗-Gm16515タンパク[またはそのホモログ]抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の両方を意味する）、Gm16515タンパクまたはそのホモログのアセチルCoA結合部位に対する抗体などを挙げることができる。

[0084] (II-3) 医薬組成物

上記のグロビン合成制御剤（グロビン合成を負に制御する薬剤〔グロビン合成抑制剤ともいう〕、およびグロビン合成を正に制御する薬剤〔グロビン合成亢進剤ともいう〕）は、グロビン合成の亢進または低下により、または α グロビン合成や β グロビン合成のアンバランスにより、正常にグロビンが合成されないことに起因して発生及び増悪する疾患の治療及び症状の改善に有効に使用することができる。

[0085] 従って、上記のグロビン合成制御剤を有効成分とする本発明の医薬組成物

は、当該疾患の治療薬または症状の改善薬として有効に使用することができる。

[0086] ここで、グロビン合成の亢進または低下により、または α グロビン合成や β グロビン合成のアンバランスにより、正常にグロビンが合成されないことに起因して発生及び増悪する疾患としては、グロビン合成異常を伴う血液疾患を挙げることができる。ここでグロビン合成異常を伴う血液疾患には、骨髓異形成症候群、及び異常ヘモグロビン症などが含まれる。また、異常ヘモグロビン症としてはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症などを挙げることができる。サラセミアは、前述するように、(1)正常なヘモグロビン合成低下による小球性低色素性貧血、(2)合成障害を受けていないグロビン鎖の産生過剰が引き起こす溶血性貧血、この両者が混合したものである。

[0087] 本発明のグロビン合成制御剤のうち、グロビン合成を負に制御する作用を有するグロビン合成抑制剤（例えば、グロビン合成を負に制御する作用を有するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするか、グロビン合成を負に制御する作用を有するようにGm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物の造血細胞における機能発現を制御する物質を有効成分とするもの）を含む医薬組成物をグロビン合成異常を伴う血液疾患に罹患した患者に投与することで、 α グロビン合成や β グロビン合成のバランスを調節して、上記のグロビン合成異常を伴う血液疾患を治療ないし改善することができる。また、本発明のグロビン合成制御剤のうち、グロビン合成を正に制御する作用を有するグロビン合成亢進剤（例えば、グロビン合成を正に制御する作用を有するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするか、グロビン合成を正に制御する作用を有するように、Gm16515若しくはそのホモログの遺伝子産物の造血細胞における機能発現を制御する物質を有効成分とするもの）を含む医薬組成物をグロビン合成異常を伴う血液疾患に罹患した患者に投与することで、 α グロビン合成や β グロビン合成のバランスを調節して、上記のグロビン合成異常を伴う血液疾患

を治療ないし改善することができる。

[0088] 本発明の医薬組成物は、上記有効成分とともに、その種類や投与経路に応じて、自体公知の薬学的に許容される担体や添加剤を含んでいてもよい。当該医薬組成物は、所望の投与方法、例えば経口投与、非経口投与（例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経肺投与、経鼻投与、経腸投与、腹腔内投与、または冠動脈もしくは冠状静脈洞投与）などによって投与することができ、その投与経路に応じて、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、凍結乾燥剤、及びカプセル剤などの固形剤形態；溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、リポソーム製剤、注射剤、静注剤、点滴剤及びエリキシルなどの液剤形態に、調合、成形乃至調製することができる。

[0089] これらの医薬組成物（医薬製剤）の調製に利用される担体としては、製剤の投与形態に応じて通常使用される賦形剤、希釈剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、吸収促進剤、滑沢剤、溶解補助剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤などが例示できる。また添加剤としては、製剤の投与形態に応じて通常使用される安定化剤、保存剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤、着色剤、香料、風味剤、甘味剤などが例示できる。

[0090] 上記医薬組成物中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。投与量は、投与経路によっても異なるが、通常、1回投与あたりの有効成分の量に換算して、0.1 μ g $\sim$ 100mg/kgの範囲で投与することができる。

[0091] (III) メラニン合成抑制剤

本発明のメラニン合成抑制剤もまた、前述するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とすることを特徴とする。

[0092] ここで使用するGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物は、前述（II-1）の通りであり、上記記載をここでも援用することができる。

[0093] 本発明のメラニン合成抑制剤は、これらのGm16515、Gm16515のホモログ、G

m16515の遺伝子産物（Gm16515タンパク）、及びGm16515ホモログの遺伝子産物（Gm16515タンパクのホモログ）からなる群から選択される少なくとも１種を有効成分として含有するものであればよく、１種のみならず、２種以上を任意に組み合わせて含有するものであってもよい。

[0094] なお、Gm16515、及びGm16515ホモログ、並びにそれらの遺伝子転写産物等の核酸は、被験者、好ましくはヒトを含む哺乳動物への投与に適した形態を備えていることが好ましい。

[0095] かかる形態としては、遺伝子治療用の発現ベクターを挙げることができる。発現ベクターは、前述（II-1）の通りであり、上記記載をここでも援用することができる。

[0096] また、本発明のメラニン合成抑制剤が、有効成分としてGm16515若しくはそのホモログの遺伝子翻訳産物等の蛋白質を含む場合、タンパク製剤として被験者、好ましくはヒトを含む哺乳動物への投与に適した形態を備えていることが好ましい。

[0097] なお、本発明のメラニン合成抑制剤は、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物だけからなるものであってもよいし、またこれらの有効成分が有するメラニン合成抑制作用を妨げない限り、他の成分を含んでも良い。かかる他の成分としては、薬学的に許容される担体や添加剤、または食用できる成分を挙げることができる。この場合のメラニン合成抑制剤中のGm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の配合量は、上記を満たす限り制限はされないが、通常１０～９９重量％の範囲のなかから適宜選択をすることができる。

[0098] 当該メラニン合成抑制剤は、皮膚内でのメラニンの合成を抑制することにより、皮膚への色素沈着を抑制し、シミやソバカスを予防または改善するうえで有用であり、美白用組成物として応用することができる。

[0099] 本発明の美白用組成物は、上記有効成分とともに、その種類や投与経路に応じて、自体公知の薬学的に許容される担体や添加剤を含んでもよい。当該美白用組成物は、所望の投与方法、例えば経口投与、非経口投与（例え

ば皮内投与、皮下投与、経皮投与）などによって投与することができ、その投与経路に応じて、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、凍結乾燥製剤、及びカプセル剤などの固形剤形態；溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、リポソーム製剤、注射剤などの液剤形態に、調合、成形乃至調製することができる。

[0100] これらの美白用組成物（例えば医薬品または医薬部外品）の調製に利用される担体としては、製剤の投与形態に応じて通常使用される賦形剤、希釈剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、吸収促進剤、滑沢剤、溶解補助剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤などが例示できる。また添加剤としては、製剤の投与形態に応じて通常使用される安定化剤、保存剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤、着色剤、香料、風味剤、甘味剤などが例示できる。さらに上記成分以外に、本発明の効果を妨げない範囲で、他の美白成分、抗酸化剤、アミノ酸、ビタミン類、無機酸塩などを配合することもできる。

[0101] なお、美白用組成物がGm16515、及びGm16515ホモログ、並びにそれらの遺伝子転写産物等の核酸を有効成分とする場合は、被験者、好ましくはヒトを含む哺乳動物への投与に適した形態を備えていることが好ましい。当該被験者としては、好ましくはメラニン合成が亢進して、シミやソバカス等の皮膚への色素沈着が発生しやすいか、若しくは既に生じている者を挙げることができる。

[0102] かかる形態としては、(II-1)にて前述した遺伝子治療用の発現ベクターを挙げることができる。当該遺伝子治療に用いられる発現ベクターは、所望の投与経路に応じて当業界で公知の方法で処方することができる。また、当該発現ベクターは、他のベヒクル（例えば、リポソームのような脂質ベースの分子、凝集タンパク質、またはトランスポーター分子）などと複合体を形成した状態で使用することもできる。これらの発現ベクターは、目的とする皮膚部位に、注射針を用いて注入することにより所望の皮膚細胞に送達することができる。ここで使用される発現ベクターも前述の通りであり、(II-1

）の記載が援用される。

[0103] 上記美白用組成物中に含有されるべき有効成分の量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与法、治療期間、被験者（患者）の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。投与量は、投与経路によっても異なるが、通常、1回投与あたりの有効成分の量に換算して、0.1 pg～100 mg/kgの範囲で投与することができる。

[0104] 本発明の美白用組成物には、外用組成物（外用医薬組成物、外用医薬部外品、及び化粧料組成物）の形態に製造することもできる。

[0105] 外用組成物の剤型は、特に制限されないが、例えば、液剤、乳剤、懸濁剤等の液状製剤；軟膏剤、ゲル剤、クリーム等の半固形製剤が挙げられる。このような剤型を有する製剤は、当業界の慣用法に従って調製することができる。外用組成物は、上述の外用投与形態に製剤化するため、また、その安定化のために、薬学上外用投与に許容される各種の担体並びに添加剤を配合することもできる（例えば、日本薬局方、「医薬品添加物事典」（薬事日報社発行）等が参照できる。）。

[0106] 外用を化粧料組成物とする場合、化粧料の分野において許容される担体や添加剤と共に様々な剤型に調製してもよい。化粧料組成物の形状については特に制限されないが、例えば、ペースト状、ローション状、ムース状、ジェル状、ゼリー状、液状、乳液状、懸濁液状、クリーム状、軟膏状、シート状、エアゾール状、スプレー状等が挙げられる。また、当該化粧料組成物の形態についても、制限されるものではないが、例えば、ファンデーション、頬紅、白粉等のメイクアップ化粧料；化粧水、乳液、クリーム、ローション、オイル及びパック等の基礎化粧料；洗顔料、クレンジング、ボディ洗浄料等の皮膚洗浄料；マッサージ剤、清拭剤；清浄剤；入浴剤等が挙げられる。

[0107] （IV）グロビン合成またはメラニン合成を制御する有効成分のスクリーニング方法

本発明は、グロビン合成を制御することのできる物質、言い換えればグロビン合成制御剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングす

る方法を提供する。当該候補物質は、前述するグロビン合成異常を伴う血液疾患を治療する医薬組成物 n お有効成分としての候補物質にもなりえる。また、本発明は、メラニン合成を制御することのできる物質、言い換えればメラニン合成制御剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングする方法を提供する。

[0108] 本発明のスクリーニング方法は、少なくとも下記（１）～（３）の工程を有する：

（１）Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

（２）上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

（３）上記被験測定値が対照測定値よりも高いかまたは低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質として選択する工程。

[0109] かかる工程により、グロビン合成を制御する作用を有する物質（グロビン合成制御物質）またはメラニン合成を制御する作用を有する物質（メラニン合成制御物質）を取得することができる。

[0110] ここで使用される細胞は、内来性及び外来性を問わず、Gm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有するものであり、その由来は特に制限されない。例えば、Gm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する、マウス由来またはマウス以外の哺乳動物由来（ヒト、チンパンジー、ウシ、及びラット等の哺乳類）の細胞、並びにトリ等の鳥類、カエル等のは虫類、またはゼブラフィッシュ等の魚類の細胞を挙げることができる。好ましくは哺乳動物由来の細胞である。なお、これらは培養細胞株であってもよい。

[0111] 本発明のスクリーニング方法の具体的な態様を、一例として下記（IV-1）及び（IV-2）に説明する。

[0112] （IV-1）グロビン合成またはメラニン合成を負に制御する有効成分のスク

リーニング方法

上記（IV）のスクリーニング方法の一態様として、グロビン合成を負に制御することのできる物質、言い換えればグロビン合成抑制剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングする方法を挙げることができる。当該スクリーニング方法で取得される物質は、グロビン合成の亢進に起因して発生または増悪する疾患を治療する医薬組成物の有効成分として使用できると期待される。

[0113] また、上記（IV）のスクリーニング方法の一態様として、メラニン合成を負に制御することのできる物質、言い換えればメラニン合成抑制剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングする方法を挙げることができる。当該スクリーニング方法で取得される物質は、メラニン合成の亢進に起因して発生または増悪する状態、例えば肌にシミやソバカス等の色素沈着が生じるのを予防したり、またその状態を改善するために使用される内服用または外用組成物の有効成分として使用できると期待される。

[0114] 当該本発明のスクリーニング方法は、少なくとも下記（１）～（３'）の工程を有する：

（１）Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

（２）上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

（３'）上記被験測定値が対照測定値よりも高い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を負に制御する物質として選択する工程。

[0115] かかる工程により、グロビン合成を負に制御する作用を有する物質（グロビン合成抑制物質）またはメラニン合成を負に制御する作用を有する物質（メラニン合成抑制物質）を取得することができる。

[0116] ここで使用される細胞は、内来性及び外来性を問わず、Gm16515またはその

ホモログを発現可能な状態で有するものであり、その由来は特に制限されない。好ましくは、Gm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する、ヒト由来またはヒト以外の哺乳動物由来の細胞である。

[0117] 具体的には、グロビン合成抑制物質のスクリーニング系においては、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物に由来する細胞を挙げることができる。なお、これらは培養細胞株であってもよい。かかるものとしては、制限されないが、一例として下記のことを例示することができる。

[0118] <ヒト由来細胞>

- ・末梢血細胞
- ・骨髓細胞
- ・EEB: 赤芽球性白血病に由来するヒト細胞株 (human cell line derived from erythroblastic leukemia)
- ・F-36P: ヒト赤白血病細胞
- ・K562
- ・KU-812-F: ヒトヒト好塩基球性白血病細胞株 (glycophorin A+)
- ・胚性幹細胞由来のヒト赤血球細胞
- ・人工多能幹細胞。

[0119] <マウス由来細胞>

- ・末梢血液細胞
- ・骨髓細胞
- ・F5-5.fl: フレンド赤白血病細胞
- ・K-1.fl、T-3-CI-2-0.fl、またはTSFAT-3.flに由来するフレンド赤白血病細胞株
- ・707.fl, GM86.fl & FVTCT.fl
- ・TSA8: フレンド白血病ウイルスで形質転換された赤白血病細胞に由来するマウス細胞株
- ・32D: フレンド白血病ウイルス感染マウス骨髓に由来するIL-3依存性細胞

- ・ C-8052 & C-8049: mouse C3H/Heに由来するTer119+ 赤白血病細胞株
- ・ マウス赤白血病細胞(MEL)
- ・ マウス胚性幹細胞
- ・ 人工多能幹細胞。

[0120] <魚由来細胞>

- ・ ゼブラフィッシュの末梢血液細胞、または腎髄細胞

またヒト由来またはヒト以外の哺乳動物に由来するGm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する原核細胞または真核細胞（昆虫細胞を含む）を用いることもできる。

[0121] また、メラニン合成抑制物質のスクリーニング系においては、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物に由来する細胞を挙げることができる。なお、これらは培養細胞株であってもよい。かかるものとしては、制限されないが、一例として下記のを例示することができる。

[0122] <マウス由来細胞>

- ・ マウス胚 (embryo) または成体に由来するメラノブラストまたはメラノサイト
- ・ B16 melanoma & B16 melanoma 4A5: マウスのメラニン産生メラノーマ細胞
- ・ マウス胚性幹細胞
- ・ 人工多能幹細胞。

[0123] <ヒト由来細胞>

- ・ HMV-I & HMV-II: ヒトのメラニン産生細胞株
- ・ G-361: ヒトのメラニン産生メラノーマ細胞
- ・ HOMM:メラニン顆粒を含む ヒトのメラノーマ細胞
- ・ ヒト胚性幹細胞
- ・ 人工多能幹細胞。

<魚由来細胞>

- ・ ゼブラフィッシュの胚 (embryo) または成体に由来するメラノブラストまたはメラノサ

イト

・ GEM-81, GEM-199 & GEM-218: Gold fish 赤血球色素細胞に由来する腫瘍細胞

また細胞の集合体である組織も当該範疇に含まれる。さらに生物個体そのものも当該範疇に含まれ、かかる例としては、特にゼブラフィッシュなどの小生物を好適に挙げることができる。さらにまた、さらにヒト由来またはヒト以外の哺乳動物やその他の生物に由来するGm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する原核細胞または真核細胞（昆虫細胞を含む）を用いることもできる。

[0124] 被験物質としては、制限はされないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、または無機化合物などであり、スクリーニングは、具体的には、これらの被験物質またはこれらを含む組成物（例えば、細胞抽出物、遺伝子ライブラリーの発現産物等を含む）を対象の細胞と接触させることにより行うことができる。また、スクリーニングに際して採用される被験物質と細胞との接触条件は、特に制限されないが、細胞が死滅せず所望の遺伝子を発現できる培養条件を選択することが好ましい（以下のスクリーニング方法においても同じ）。

[0125] Gm16515またはそのホモログの発現レベルは、Gm16515またはそのホモログの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／またはその相補的なポリヌクレオチドをプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダーゼーション解析法、デファレンシャル・ハイブリダーゼーション法、DNAチップ法、RNase保護アッセイなどの公知の方法を行うことにより測定することができる。また、Gm16515またはそのホモログの発現レベルは、発現産生されたGm16515タンパクまたはそのホモログの量を測定することによっても評価することができる。この場合は、Gm16515タンパクまたはそのホモログを認識する抗体をマーカーとして用いて、ウエスタンブロット法などの公知の方法で、産生されたGm16515タンパクまたはそのホモログを検出し、定量する。

[0126] かかるスクリーニング方法によるグロビン合成を負に制御する作用を有する物質の選別は、被験物質を接触させた細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現レベルが、被験物質を接触させない細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現レベルに比して、高くなることを指標として行うことができる。

[0127] 実験例3に示すように、Gm16515またはそのホモログを過剰発現させると α 及び β -グロビンの合成量が低下する。このことから、上記スクリーニングで選別されるGm16515またはそのホモログの発現、及びGm16515タンパクまたはそのホモログの産生を亢進する物質は、 α または β -グロビンの合成を負に制御することができる。このため、グロビン合成制御剤、特にグロビン合成を負に制御することでグロビン合成を調節する薬剤の有効成分の候補物質として、例えばグロビン合成異常に起因する疾患（例えば、前述するグロビン合成異常を伴う血液疾患、具体的には骨髓異形成症候群；○○○○○；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症）の治療剤または症状改善剤の有効成分の候補物質として用いることができる。かくして選別される候補物質は、さらにグロビン合成異常を伴う血液疾患を模した病態非ヒト動物を用いた薬効試験、安全性試験、さらにグロビン合成異常を伴う血液疾患に罹患した患者（ヒト）への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的なグロビン合成抑制剤またはグロビン合成異常に起因する疾患の予防または治療剤の有効成分として調製することができる。

[0128] このようにして選別された物質は、必要に応じて構造解析を行った後、その物質の種類に応じて、化学的合成、生物学的合成（発酵を含む）または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができ、グロビン合成抑制剤またはグロビン合成異常、特に合成亢進に起因する疾患の予防または治療用医薬組成物の調製に使用することができる。

[0129] また実験例4に示すように、Gm16515またはそのホモログの発現を抑制するとメラニンの合成量が増加する。このことから、上記スクリーニングで選別

されるGm16515またはそのホモログの発現、及びGm16515タンパクまたはそのホモログの産生を亢進する物質は、メラニンの合成を負に制御することができ、ゆえにメラニン合成抑制剤の有効成分の候補物質として、また、メラニン合成亢進に起因する症状（皮膚への色素沈着、シミ、ソバカスなど）の予防、治療または症状改善のための有効成分の候補物質として、用いることができる。かくして選別される候補物質は、さらにメラニン合成亢進に起因する症状を有する非ヒト動物を用いた薬効試験、安全性試験、さらにメラニン合成亢進に起因する症状を有する患者（ヒト）への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的なメラニン合成抑制剤またはメラニン合成亢進に起因する症状の予防または改善のための有効成分、例えば美白成分を選別取得することができる。

[0130] このようにして選別された物質は、必要に応じて構造解析を行った後、その物質の種類に応じて、化学的合成、生物学的合成（発酵を含む）または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができ、メラニン合成抑制剤またはメラニン合成亢進に起因する症状の予防または改善用組成物（美白用組成物）の調製に使用することができる。

[0131] （IV-2）グロビン合成またはメラニン合成を正に制御する物質のスクリーニング方法

前記（IV）のスクリーニング方法の別の態様として、グロビン合成を正に制御することのできる物質、言い換えればグロビン合成亢進剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングする方法を挙げることができる。当該スクリーニング方法で取得される物質は、グロビン合成の抑制に起因して発生または増悪する疾患を治療する医薬組成物の有効成分として使用できると期待される。

[0132] また、前記（IV）のスクリーニング方法の別の態様として、メラニン合成を正に制御することのできる物質、言い換えればメラニン合成亢進剤の有効成分となり得る物質（候補物質）をスクリーニングする方法を挙げることができる。当該スクリーニング方法で取得される物質は、メラニン合成の減少

に起因して発生または増悪する状態、例えば、白髪や皮膚の白斑などの状態を予防、緩和または改善するために使用される内服用または外用組成物（医薬品、医薬部外品、化粧品）の有効成分として使用できると期待される。

[0133] 当該本発明のスクリーニング方法は、少なくとも下記（１）～（３”）の工程を有する：

（１）Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

（２）上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログ発現量（対照測定値）を測定する工程、

（３”）上記被験測定値が対照測定値よりも低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を正に制御する物質として選択する工程。

[0134] かかる工程により、グロビン合成を正に制御する作用を有する物質（グロビン合成亢進物質）またはメラニン合成を正に制御する作用を有する物質（メラニン合成亢進物質）を取得することができる。

[0135] ここで使用される細胞は、（IV-1）において前述した通りであり、内来性及び外来性を問わず、Gm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有するものであり、その由来は特に制限されない。好ましくは、Gm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する、ヒト由来またはヒト以外の哺乳動物由来の細胞である。また培養細胞株を用いることもできるし、さらにヒト由来またはヒト以外の哺乳動物やその他の生物に由来するGm16515またはそのホモログを発現可能な状態で有する原核細胞または真核細胞（昆虫細胞を含む）を用いることもできる。

[0136] 被験物質、及びGm16515またはそのホモログの発現レベルの測定方法についても、前述（IV-1）の通りであり、当該記載をここに援用することができる。

[0137] 本発明のスクリーニング方法によるグロビン合成またはメラニン合成を正

に制御する作用を有する物質の選別は、被験物質を接触させた細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現レベルが、被験物質を接触させない細胞におけるGm16515またはそのホモログの発現レベルに比して、低くなることを指標として行うことができる。

[0138] 実験例4に示すように、Gm16515またはそのホモログの発現を抑制すると、 α 及び β -グロビンの合成量が増大する。このことから、上記スクリーニングで選別されるGm16515またはそのホモログの発現、及びGm16515タンパクまたはそのホモログの産生を低下させる物質は、 α 及び β -グロビンの合成を正に制御することができる。このため、グロビン合成制御剤、特にグロビン合成を正に制御することでグロビン合成を調節する薬剤の有効成分の候補物質として、また、グロビン合成異常に起因する疾患（例えば、前述するグロビン合成異常を伴う血液疾患、具体的には骨髓異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症）の治療剤または症状改善剤の有効成分の候補物質として用いることができる。かくして選別される候補物質は、さらにグロビン合成異常を伴う血液疾患を模した病態非ヒト動物を用いた薬効試験、安全性試験、さらにグロビン合成異常を伴う血液疾患に罹患した患者（ヒト）への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的なグロビン合成亢進剤またはグロビン合成異常に起因する疾患の予防または治療剤の有効成分として調製することができる。

[0139] このようにして選別された物質は、必要に応じて構造解析を行った後、その物質の種類に応じて、化学的合成、生物学的合成（発酵を含む）または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができ、グロビン合成亢進剤またはグロビン合成異常、特に合成抑制に起因する疾患の予防または治療用医薬組成物の調製に使用することができる。

[0140] また実験例4に示すように、Gm16515またはそのホモログの発現を抑制するとメラニンの合成量が増加する。このことから、上記スクリーニングで選別されるGm16515またはそのホモログの発現、及びGm16515タンパクまたはその

ホモログの産生を抑制する物質は、メラニンの合成を亢進することができ、ゆえにメラニン合成亢進剤の有効成分の候補物質として、また、メラニン合成低下に起因する症状（白髪、白斑症など）の予防、治療または症状改善のための有効成分の候補物質として、用いることができる。かくして選別される候補物質は、さらにメラニン合成低下に起因する症状を有する非ヒト動物を用いた薬効試験、安全性試験、さらにメラニン合成低下に起因する症状を有する患者（ヒト）への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的なメラニン合成亢進剤またはメラニン合成低下に起因する症状の予防または改善のための有効成分、例えば美白成分を選別取得することができる。

[0141] このようにして選別された物質は、必要に応じて構造解析を行った後、その物質の種類に応じて、化学的合成、生物学的合成（発酵を含む）または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができ、メラニン合成亢進剤またはメラニン合成低下に起因する症状の予防または改善用組成物（美白用組成物）の調製に使用することができる。

実施例

[0142] 以下、本発明の構成及び効果を、下記の実験例を例として説明する。但し、本発明はかかる実験例等によって何等制限されるものではない。

[0143] なお、前述するように、「Gm16515」は本来マウスに由来する遺伝子の名称であるが、以下の実験例では、Gm16515のホモログであるゼブラフィッシュ由来の遺伝子も総称して「Gm16515」と称し、その遺伝子産物（タンパク質）を「Gm16515タンパク」と総称する。

[0144] 実験例 1 Gm16515遺伝子の発現挙動

低温飼育したゼブラフィッシュ（貧血モデル・ゼブラフィッシュ）の腎臓組織におけるGm16515の発現量を、常温飼育した健常なゼブラフィッシュのGm16515の発現量と比較した。

[0145] ゼブラフィッシュのGm16515（正式名称は、表1に示すようにGtlf3blまたはzgc:110779）の遺伝子転写産物（mRNA）の塩基配列を配列番号5に、遺伝

子翻訳産物（蛋白質）（ここでは「Gm16515タンパク」という。正式名称は表 1 に示すようにprotein GTLF3B）のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。なお、マウスGm16515タンパクのアミノ酸配列とゼブラフィッシュのGm16515タンパクのアミノ酸配列との同一性は、77%である。

[0146] （1）方法

一般に、成体のゼブラフィッシュは、水温26.5℃の条件で飼育されるが、水温17℃の条件で低温飼育すると貧血状態を惹起することが知られている（非特許文献2）。

[0147] 本実験例では、生後1ヵ月のゼブラフィッシュを水温17℃の条件で、一週間低温飼育して、貧血モデルのゼブラフィッシュを作製した。

[0148] 常温飼育した健常ゼブラフィッシュと低温飼育した貧血モデル・ゼブラフィッシュのそれぞれから造血組織である腎髄を取り出し、そこからtotal RNAを抽出し、cDNAを調製した。各ゼブラフィッシュの腎髄組織での遺伝子発現の変化を、DNAマイクロアレイ分析およびリアルタイムPCRによって測定し、発現量が相違する遺伝子を探索した。

[0149] （2）結果

その結果を図2に示す。図に示すように、貧血モデル・ゼブラフィッシュ（cold）では、健常ゼブラフィッシュ（Normal）と比べて、腎髄組織におけるGm16515の発現が約2.5倍低下していることが判明した。このことから、貧血の発症にかかわる過程、例えば造血幹細胞の分化・成熟過程やグロビン合成過程に、Gm16515またはその遺伝子産物が関わっている可能性が示唆された。

[0150] 実験例2 造血幹細胞の分化・成熟過程におけるGm16515の発現挙動

上記実験例1の結果を受けて、造血幹細胞の分化及び成熟過程において、Gm16515の発現がどのように変化するかを、マウスを用いて調べた。

[0151] （1）方法

マウスの胎児の肝臓から、フローサイトメトリーによるセルソーティングを用いて、造血幹細胞(HSC)および様々なステージの赤血球系細胞(BFU-E前駆

細胞、CFU-E前駆細胞、赤芽球および赤血球)を単離した。各細胞画分から total RNAを抽出し、cDNAを調製し、マウスGm16515の発現をリアルタイムPCRによって測定した。

[0152] (2) 結果

結果を図3に示す。図3に示すように、Gm16515の発現レベルは、赤血球の前駆細胞であるCFU-E前駆細胞が赤芽球を経て赤血球に分化し成熟するにつれて、グロビン合成の亢進に伴い（非特許文献10～12参照）、増大することが判明した。この結果から、赤血球産生の造血幹細胞の分化及び成熟過程において、Gm16515またはその遺伝子産物はグロビン遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

[0153] 実験例3 グロビン合成におけるGm16515の機能評価 (in vitro試験)

上記実験例2の結果を受けて、マウスのフレンド白血病細胞株にGm16515を過剰発現させて、グロビン合成におけるGm16515またはその遺伝子産物の機能を評価した。

[0154] (1) 方法

マウスGm16515を、GFP (Green fluorescence protein) 発現プラスミド (pIRES2-AcGFP1:Clontech Laboratories, Inc.,) にクローンし、次いで得られたGm16515を含むプラスミドをエレクトロポレーションによりマウスのフレンド白血病細胞株にトランスフェクトした (Gm16515細胞)。コントロールとして、Gm16515を含まないGFP発現プラスミド (上記と同じ) を、同様にエレクトロポレーションによりマウスのフレンド白血病細胞株にトランスフェクトした (コントロール細胞)。なお、トランスフェクトによりGFP発現プラスミドが導入された細胞は、GFPが発現することにより緑色を呈する (GFP陽性細胞)。そこで、この発色を指標として、GFP陽性の細胞をフローサイトメトリーによるセルソーティングによって集めた。

[0155] 次いで、回収したGFP陽性細胞 (Gm16515細胞、コントロール細胞) を、1-2%パラフォルムアルデヒドと0.1%Triton X-100を含む緩衝液で固定化し、1%BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich)を含むPBSによってブロッキン

グした後、一次抗体としてAnti-acetyl-Histone H3 (rabbit polyclonal)(MILLIPORE社製)、二次抗体としてAlexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen社製)を用いて免疫細胞染色を行った。二次抗体を洗浄した後、包埋緩衝液を用いて細胞をスライドガラスに固定した後、コンフォーカルレーザー顕微鏡にて観察し、染色度合からヒストンH4のアセチル化を測定した。また回収したGFP陽性細胞 (Gm16515細胞、コントロール細胞) について、リアルタイムPCR法により、 α グロビン遺伝子及び β グロビン遺伝子の発現をそれぞれ調べた。

[0156] (2) 結果

免疫細胞染色の結果を図4 (A) に、 α 及び β グロビン遺伝子の発現を調べた結果を図4 (B) に示す。上記の免疫細胞染色によれば、アセチル化されたヒストンH4が選択的に染色されるため、ヒストンのアセチル化のレベルを評価することができる。

[0157] 図4 (A) に示すように、Gm16515細胞の核内 (図中、青で示す) におけるヒストンH4のアセチル化レベルは、コントロール細胞と比較して、顕著に低いことが確認された。また図4 (B) に示すように、Gm16515細胞の α グロビン遺伝子及び β グロビン遺伝子の発現はいずれも、コントロール細胞と比較して、顕著に低いことが確認された。つまり、これらの結果から、フレンド白血病細胞株にGm16515を過剰発現させると、ヒストンH4のアセチル化が阻害されるとともに、 α 及び β グロビン遺伝子の発現も抑制されることがわかる。

[0158] これらの結果は、Gm16515またはその遺伝子産物は、 α グロビン遺伝子座または β グロビン遺伝子座におけるヒストンのアセチル化を抑制し、主として β グロビンの合成を阻害するように作用することを示唆している。

[0159] 実験例4 グロビン合成及びメラニン合成におけるGm16515の機能評価 (in vivo試験)

ゼブラフィッシュについて、Gm16515の発現を抑制して、グロビン合成及びメラニン合成におけるGm16515の機能を評価した。

[0160] (1) 方法

1-2細胞期のゼブラフィッシュ胚に、Gm16515に対するMorpholino anti-sense oligonucleotide (MO) (Gene Tool, LLC) を注射し、Gm16515のスプライシングを抑制した。当該ゼブラフィッシュの胚 (MO処理胚)、及びコントロールとしてMO処理しない通常のゼブラフィッシュの胚 (コントロール胚) のそれぞれについて授精させ、授精から48時間めのゼブラフィッシュの幼体 (MO、コントロール) を、ヘモグロビン染色および遺伝子発現解析のために用いた。なお、ヘモグロビン染色は、o-dianisidine染料を用いて行い、染色後、各ゼブラフィッシュの幼体 (MO、コントロール) を立体顕微鏡で観察した。

[0161] 遺伝子発現解析は、グロビン遺伝子 (α グロビン遺伝子、 β グロビン遺伝子)、及びメラニン合成関連遺伝子 (kita, kitlga, mitfa, tyr, dct, pomc a) を対象として行い、リアルタイムPCRによって測定した。

[0162] なお、kita及びそのリガンドであるkitlga (kit ligand a) は、メラノブラストの分化に重要な役割を担っている遺伝子であり (非特許文献4 : Rawls, J.F. & Johnson, S.L., Development (2000) 127, 3715-3724; 非特許文献5 : Rawls, J.F. & Johnson, S.L., Development (2001) 128, 1943-1949)、mitfa (Microphthalmia-associated transcription factor a) もまた、メラニン合成酵素であるチロシナーゼやドーパクロム・トートメラーゼをコードする遺伝子 (チロシナーゼ遺伝子 [tyr]、ドーパクロム・トートメラーゼ遺伝子 [dct]) の発現をコントロールする重要な役割を果たしている (非特許文献6 : White, R.M. & Zon, L.I., Cell Stem (2008) 3, 242-252)。Mitf aは、メラノブラスト分化の初期のマーカーであり、それに引き続いてkitaおよびdctが発現することが知られている (非特許文献7 : Lister, J.A., et al., Development (1999) 126, 3757-3767; 非特許文献8 : Parichy, D.M., et al., Development (2000) 127, 3715-3724; 非特許文献9 : Kejsh, R.N. & Eisen, J.S., Development (2000) 127, 515-525) (図5参照)。メラニンの生合成は、メラノソームの中で行われるが、プロメラニン濃縮ホルモン (p

mch : melanin-concentration hormone) から誘導されるメラニン濃縮ホルモン (MCH : melanin-concentration hormone) がメラノソームの凝集を引き起こし、プロオピオメラノコルチン (pomca : proopio-melanocortin a) から誘導されるメラノサイト刺激ホルモン (MSH : melanocyte-stimulating hormone) がメラノソームの分散に引き起こすことが知られている。

[0163] (2) 結果

(2-1) ヘモグロビン合成

ヘモグロビン染色の結果を図5 (A) に、 α 及び β グロビン遺伝子の発現結果を図5 (B) に示す。図5 (A) に示すように、ヘモグロビン発現細胞(図中、赤茶色で示す)のレベルは、MO処理しなかったコントロールのゼブラフィッシュに比べて、MO処理したゼブラフィッシュにおいて有意に増加していた。また図5 (B) に示すように、 α 及び β グロビン遺伝子の発現はいずれも、MO処理しなかったコントロールに比べて、MO処理したゼブラフィッシュにおいて顕著に増加していた。つまり、これらの結果から、ゼブラフィッシュについてGm16515の発現を抑制すると、 α 及び β グロビン遺伝子の発現が増加し、グロビン合成 (ヘモグロビン産生) が亢進することが判明した。

[0164] この実験結果と前述する実験例3の結果から、Gm16515またはその遺伝子産物はグロビン遺伝子の発現を制御する機能を有すると考えられる。具体的には、Gm16515の発現増加 (Gm16515遺伝子産物の増加) は、グロビン合成 (ヘモグロビン産生) を負に制御するように作用し (dawn-regulation)、逆にGm16515の発現低下 (Gm16515遺伝子産物の低下) は、グロビン合成 (ヘモグロビン産生) を正に制御するように作用する (up-regulation) と考えられる。つまり、このことから、Gm16515若しくはその遺伝子産物、並びにGm16515の発現やGm16515タンパクの産生を亢進する作用を有する物質は、グロビン合成 (ヘモグロビン産生) 亢進によって発症または悪化する疾患の治療または改善剤として有効であると考えられる。

[0165] (2-2) メラニン合成

上記ヘモグロビン染色の結果（図5（A））から、MO処理しなかったコントロールのゼブラフィッシュに比べて、MO処理したゼブラフィッシュの目は黒く、また黒い縞模様を呈していることが判明した。目の黒色化及び黒の縞模様は、黒色色素メラニン（ユーメラニン）の合成及び沈殿によって生じることから、Gm16515の発現を抑制することでメラニン合成が促進されると考えられる。つまり、Gm16515またはその遺伝子産物にはメラニン合成を抑制する作用があると考えられる。

[0166] メラニン合成関連遺伝子 (kita, kitlga, mitfa, tyr, dct, pomca) の発現結果を図7に示す。図7に示すように、MO処理しなかったコントロールのゼブラフィッシュに比べて、MO処理したゼブラフィッシュにおいて、kitlgaを除く全てのメラニン合成関連遺伝子の発現が増加していた。このことは、上記ゼブラフィッシュの観察結果と一致しており、Gm16515の発現を抑制することでメラニン合成が促進されること、つまり、Gm16515にはメラニン合成を抑制する作用があると考えられる。

[0167] 実験例5 Gm16515タンパクのアセチルCoA結合能の評価

下記方法により、Gm16515タンパクのアセチルCoA (AcCoA) に対する結合能を評価した。

[0168] (1) 方法

マウスGm16515タンパクを、6ヒスタグ(6xHis)で標識化した。かかる標識化Gm16515タンパク (15 μ g) を室温条件 (25 $^{\circ}$ C) で、アセチルCoAとともに1時間インキュベートした。6ヒスタグに結合性を有する樹脂 (ProBondTM Resin: Invitrogen) を用いて、6ヒスタグ(6xHis)で標識化したGm16515タンパク (6xHis-labeled Gm16515) を結合させた後、当該樹脂を3回洗浄して、非結合のアセチルCoAを除去した。次いで、イミダゾールを用いてアセチルCoAを結合した標識化Gm16515タンパク (Gm16515結合アセチルCoA) を樹脂から脱離させて、脱離したGm16515結合アセチルCoAの量を、PicoProbeアセチルCoA分析キット (BioVision社製) を用いて、そのマニュアルに従って測定した (蛍光検出: Ex/Em=535nm/589nm)。

[0169] (2) 結果

図8に、PicoProbeアセチルCoA分析キットに附属のアセチルCoA標準品を用いて作成した検量線（図中、—◆—で示す）と、上記測定値（図中、■で示す）を示す。

[0170] 図において、測定値が検量線よりも下の領域内にあるということは、Gm 16515タンパクがアセチルCoAに結合していることを意味する。図に示すように、15 μ gのGm16515タンパクあたり28pmolのアセチル CoAが結合することが確認された。

[0171] 実験例6 Gm16515タンパクのヒストンアセチル化能の評価

下記方法により、Gm16515タンパクのヒストンに対するアセチル化能を評価した。

[0172] (1) 方法

マウスGm16515タンパクを、ヒストンおよびアセチルCoAとともにインキュベーションした。

[0173] ポジティブコントロールとして、ヒストンをアセチル化する酵素（HAT：Histone Acetyl-Transferase）を使用した。当該酵素は、ヒストン結合領域とともにCoA結合領域を有し、アセチルCoAをヒストンに運搬してアセチル基を転移する作用を有する。つまり、HATとの反応において、アセチルCoAのアセチル基はヒストンに転移され、フリーのCoAが遊離する。このため、反応により遊離したフリーのCoAの量を、ヒストン・アセチル化分析キット(Histone acetylation Assay Kit: BioVision)を用いて測定した。

[0174] (2) 結果

結果を図9に示す。横軸は反応時間（hour）、縦軸は遊離したCoAの量を示す。Gm16515タンパク（—◇—）は、HAT（—△—）と比べて、遊離するフリーのCoA量は顕著に少なく、これからGm16515タンパクにはヒストンにアセチル基を転移する能力、すなわちヒストンをアセチル化する能力が極めて低いか、欠けていると判断された。

[0175] HATは、アセチルCoAと結合してヒストンにアセチル基を転移することで（

ヒストンアセチル化)、グロビン合成を正に制御する。これに対して、Gm16515タンパクは、HATと同様にCoA結合領域を有しアセチルCoAと結合する能力を有するものの、上記結果で示すように、ヒストンにアセチル基を転移する能力(ヒストンアセチル化能力)を有しない。この結果は、実験例3におけるマウスのフレンド白血病細胞株を用いた実験結果と一致する(図4(A))。また、Gm16515タンパクは、HATとは異なり、グロビン合成を正に制御する作用を有しないどころか、実験例3に示すように、グロビン合成を負に制御する作用を有する。

[0176] またこの実験例に示す結果から、実験例3及び4で確認されたGm16515タンパクによるヒストンのアセチル化抑制作用、及びグロビン遺伝子の発現制御作用は、Gm16515タンパクの直接的な作用ではなく、Gm16515またはその遺伝子産物が主として間接的にヒストンのアセチル化を抑制し、またグロビン遺伝子の発現を制御しているものと考えられる。但し、本発明はこの理論に拘束されるものではない。

[0177] 以上の*in silico*分析、アセチルCoA結合およびヒストンアセチル化能力に関する、Gm16515タンパクの機能性評価の結果から、Gm16515タンパクは、Gm16515タンパクは従来アセチル化の阻害を担うと考えられて来た“脱アセチル化酵素”とは異なる作用を有し、ヒストンのアセチル化酵素と競合して、アセチルCoAを捕捉することにより、ヒストンのアセチル化を抑制するアセチル化酵素競合阻害因子として機能すると考えられる。すなわち、Gm16515タンパクのグロビン合成を負に制御する作用は、アセチル化酵素と競合してアセチルCoAを捕捉し、ヒストンのアセチル化を抑制する作用に基づいている(図10参照)。

[0178] 実験例7 赤血球系細胞におけるGm16515タンパクの発現評価

(1) ウサギ抗マウス・ヒトGm16515クローナル抗体の作製

マウスGm16515タンパクのアセチルCoA結合部位を含む16アミノ酸残基からなるペプチド(HTEVPDAYRGRGIAKH: 配列番号7)(分子量1,910 Da)を免疫原として用いて、定法に従ってウサギを免疫し、ポリクローナル抗体(ウサ

ギ抗マウス・ヒトGm16515ポリクローナル抗体、以下、「ウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAb」ともいう)を作製した。

[0179] なお、当該“マウスGm16515タンパク”に由来するペプチドのアミノ酸配列(配列番号7)は、それに対応するヒトGm16515タンパク(C17orf103の遺伝子産物、「protein GTLF3B」とも称される。表1参照)の該当領域のアミノ酸配列と100%一致し、ゼブラフィッシュGm16515タンパク(Gtlf3bの遺伝子産物、「protein GTLF3B」とも称される。表1参照)の該当領域のアミノ酸配列と88%一致する。従ってこのペプチドを免疫原として作製した上記抗体は、マウスGm16515タンパクのみならず、そのホモログであるヒトGm16515タンパクを特異的に識別し結合する抗体である。

[0180] E. coliより精製したマウスGm16515タンパクを用いて、上記で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbでウエスタンブロッティングを行うことで、当該ウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbがマウスGm16515タンパクに特異的に結合することを確認した(図11)。

[0181] (2) マウス胎児肝臓赤血球系細胞におけるGm16515タンパクの発現

マウス胎児肝臓赤血球系細胞(BFU-E:赤芽球バースト形成細胞、CFU-E:赤芽球コロニー形成細胞、Erythroblast:赤芽球、Erythrocyte:成熟赤血球)について、上記(1)で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbを用いて免疫細胞化学染色を行い、これらの赤血球系細胞におけるGm16515タンパクの発現状況を調べた。なお、Gm16515タンパクの発現状況は共焦点顕微鏡で観察した。

[0182] 結果を図12に示す。核は青色に発色し、発現したGm16515タンパクは緑色に発色する。図12に示すように、Gm16515タンパクはBFU-E(赤芽球バースト形成細胞)の核、CFU-E(赤芽球コロニー形成細胞)の核及び細胞質、赤芽球の細胞質、及び成熟赤血球の細胞質でそれぞれ検出された。これらの結果から、Gm16515タンパクがマウス赤血球系細胞において異なる発現(局在)を示すことが確認された。

[0183] 実験例8 Gm16515過剰発現系フレンド細胞におけるアセチルC o Aの減少

前述する実験例3において、マウスフレンド白血病細胞にGm16515を過剰発現させると、ヒストンのアセチル化が阻害され、またグロビン遺伝子の発現も抑制されることを示した。この実験では、実験例7(1)で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbを用いて、マウスフレンド白血病細胞の核においてGm16515タンパクが発現していることを確認し、Gm16515タンパクの過剰発現により細胞内遊離アセチルCoAが減少することを確認した。

[0184] 具体的には、実験例3と同様に、マウスGm16515を、GFP (Green fluorescence protein) 発現プラスミド (pIRES2-eGFP1:Clontech Laboratories, Inc.,) にクローンし、次いで得られたGm16515を含むプラスミドをエレクトロポレーションによりマウスのフレンド白血病細胞株にトランスフェクトした (Gm16515細胞)。コントロールとして、Gm16515を含まないGFP発現プラスミド (mock) を、同様にエレクトロポレーションによりマウスのフレンド白血病細胞株にトランスフェクトした (コントロール細胞)。エレクトロポレーションの2日後、GFP陽性の細胞をフローサイトメトリーによるセルソーティングによって純化・採取した。

[0185] 図13(A)に示すように、実験例7(1)で作製したウサギ抗マウス・ヒトGm16515PAbを用いて、Gm16515細胞は核においてGm16515タンパクを発現していることを確認した。

[0186] 得られたGFP陽性細胞 (Gm16515細胞、コントロール細胞 [Mock]) をトリクロル酢酸沈殿処理して全タンパク質を除去し、細胞内遊離アセチルCoAの量をPico Probe Acetyl CoA Assay kit (Biovision)を用いて測定した。結果を図13(B)に示す。

[0187] 図13(B)に示すように、マウスのフレンド白血病細胞におけるGm16515タンパクの過剰発現により遊離アセチルCoAが減少することが確認された。この結果は、Gm16515タンパクがアセチルCoAを捕捉することを示した実験例6の結果を裏付けるものと思われる。

[0188] 実験例9 Gm16515タンパクの機能発現におけるヒストン結合部位の必要性
Gm16515タンパクの機能発現にヒストン結合部位が必要かどうかを調べた。

[0189] (1) Gm16515のヒストン結合部位の確認

Gm16515のヒストン結合部位を同定するため、マウスGm16515タンパクのアミノ酸配列とテトラヒメナGcn5 (tGcn5) アセチル転移酵素のアミノ酸配列とを、PRALINE 多重配列アラインメント (PRALINE multiple sequence alignment) プログラム2013版 (Integrative Bioinformatics VU) (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) により比較した。なお、tGcn5アセチル転移酵素 (以下、単に「tGcn5」ともいう) のヒストン結合部位はすでに同定されて公知になっている (Lin Y et al., Nature 1999)。図14にアラインメントの結果を示す。

[0190] 図14に示すアミノ酸配列 (上段: 配列番号8、下段: 配列番号9) において、下線を引いたtGcn5のアミノ酸領域は、tGcn5のN末端におけるヒストン結合に関与する「ヒストン結合部位」である。アラインメントに使用したPRALINEプログラムは、対比するアミノ酸配列の相同性の程度を低い方から0→10の11段階でスコア化している。

[0191] 図14には、併せてGm16515タンパクの1-31位の領域のアミノ酸配列と、tGcn5の71-101位の領域のアミノ酸配列の相同性を、そのスコアとともに示す。図14に示すように、Gm16515タンパクの10-21位の領域のアミノ酸配列は、対応するtGcn5の80-91位の領域のアミノ酸配列と高い相同性を示した (図中、*で示す)。そこで、暫定的にこの領域を、Gm16515タンパクにおける「ヒストン結合部位」とした。

[0192] (2) Gm16515タンパクにおける「ヒストン結合部位」の機能

Gm16515タンパクにおける上記「ヒストン結合部位」の機能を調べるために、マウスGm16515タンパク (配列番号2) から、当該「ヒストン結合部位」を含む2-21位のアミノ酸領域 (AHATPPSALEQGGPIRVEHD: 配列番号10) を欠失させた欠失型Gm16515タンパク (配列番号11) をコードする欠失型Gm16515を作製した。完全長のGm16515及び欠失型Gm16515を、エレクトロポレーション法を用いてそれぞれマウスフレンド白血球病細胞株に導入して形質転換をした。斯くして得られた完全長Gm16515及び欠失型Gm16515をそれぞれ導入し

たフレンド白血球病細胞株について、KLF1遺伝子、 α -及び β -グロビン遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により解析した。

[0193] 結果を図15に示す。図15に示すように、測定した全ての遺伝子（KLF1遺伝子、 α -及び β -グロビン遺伝子）の発現レベルは、完全長Gm16515と欠失型Gm16515との間で有意な差はなかった。この結果は、Gm16515によるグロビン遺伝子の抑制が、ヒストン結合部位を必要としないことを示唆している。

[0194] 実験例10 赤血球系転写因子の発現

赤血球の造血において、Gata1はKlf1遺伝子発現の正の調節因子として作用する。具体的には、Gata1によってKlf1遺伝子発現が活性化され、その結果、 α -及び β -グロビンが活性化される。つまり、Gata1とKlf1はともに、ヒストンのアセチル化とは独立して α -、及び β -グロビン遺伝子の発現を制御する赤血球系転写因子である。

[0195] この実験では、マウスフレンド白血球細胞においてGm16515がどのようにグロビンの発現を制御するかについて理解するため、Gm16515を導入したマウスフレンド白血球細胞（Gm16515細胞）と、Gm16515を導入しないマウスフレンド白血球細胞（mock）について、グロビン合成を制御する赤血球系転写因子（Gata1、Klf1）の発現を調べた。

[0196] 結果を図16に示す。図16に示すように、Gata1遺伝子の発現はGm16515の有無で変化しないが（ $p>0.05$ ）（図16（A））、Klf1遺伝子の発現はGm16515により有意に減少しており、Gm16515によって負の制御を受けていた（ $p<0.05$ ）。この結果は、マウスフレンド白血球病細胞におけるグロビン遺伝子発現の低下が、Klf1遺伝子の発現低下の影響である可能性を示唆している。

請求の範囲

- [請求項1] Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするグロビン合成制御剤。
- [請求項2] 請求項1に記載するグロビン合成制御剤、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する、グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療用医薬組成物。
- [請求項3] グロビン合成異常を伴う血液疾患が、骨髓異形成症候群；またはサラセミア、鎌状赤血球貧血、及び不安定ヘモグロビン症からなる群から選択される異常ヘモグロビン症である、請求項2に記載する医薬組成物。
- [請求項4] Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する医薬組成物をグロビン合成異常を伴う血液疾患に罹患した患者に投与する工程を有する、グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療方法。
- [請求項5] グロビン合成異常を伴う血液疾患を治療するために用いられる、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。
- [請求項6] グロビン合成異常を伴う血液疾患の治療用医薬組成物を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。
- [請求項7] Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物を有効成分とするメラニン合成抑制剤。
- [請求項8] 請求項7に記載するメラニン合成抑制剤を含有する、美白用組成物。
- [請求項9] Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物、及び薬学的に許容される担体または添加剤を含有する組成物をメラニン合成が亢進した患者またはその部位に投与する工程を有する、メラニン合成の抑制方法。
- [請求項10] Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物、及び

薬学的に許容される担体または添加剤を含有する組成物をメラニン合成が亢進した患者またはその部位に投与する工程を有する、美白方法。

[請求項11] 美白方法に用いられる、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物。

[請求項12] 美白用組成物を製造するための、Gm16515若しくはそのホモログ、またはこれらの遺伝子産物の使用。

[請求項13] 下記の工程を有する、グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質をスクリーニングする方法：

(1) Gm16515またはそのホモログを発現しえる細胞と被験物質を接触させる工程、

(2) 上記細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（被験測定値）と、被験物質を接触させない対照のGm16515またはそのホモログを発現しえる細胞のGm16515またはそのホモログの発現量（対照測定値）を測定する工程、

(3) 上記被験測定値が対照測定値よりも高いかまたは低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質として選択する工程。

[請求項14] 上記グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質がグロビン合成またはメラニン合成を抑制する物質であって、上記（3）の工程として下記（3'）を実施する、請求項14に記載するスクリーニング方法：

（3'）工程（2）で得られた被験測定値が対照測定値よりも高い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を抑制する物質として選択する工程。

[請求項15] 上記グロビン合成またはメラニン合成を制御する物質がグロビン合成またはメラニン合成を亢進する物質であって、上記（3）の工程として下記（3''）を実施する、請求項14に記載するスクリーニング

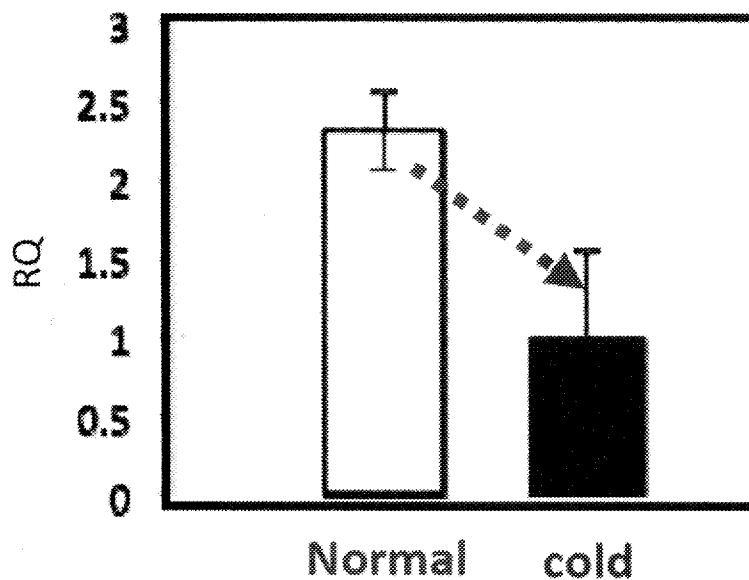
方法：

（３”）工程（２）で得られた被験測定値が対照測定値よりも低い場合に、当該被験物質を、上記グロビン合成またはメラニン合成を亢進する物質として選択する工程。

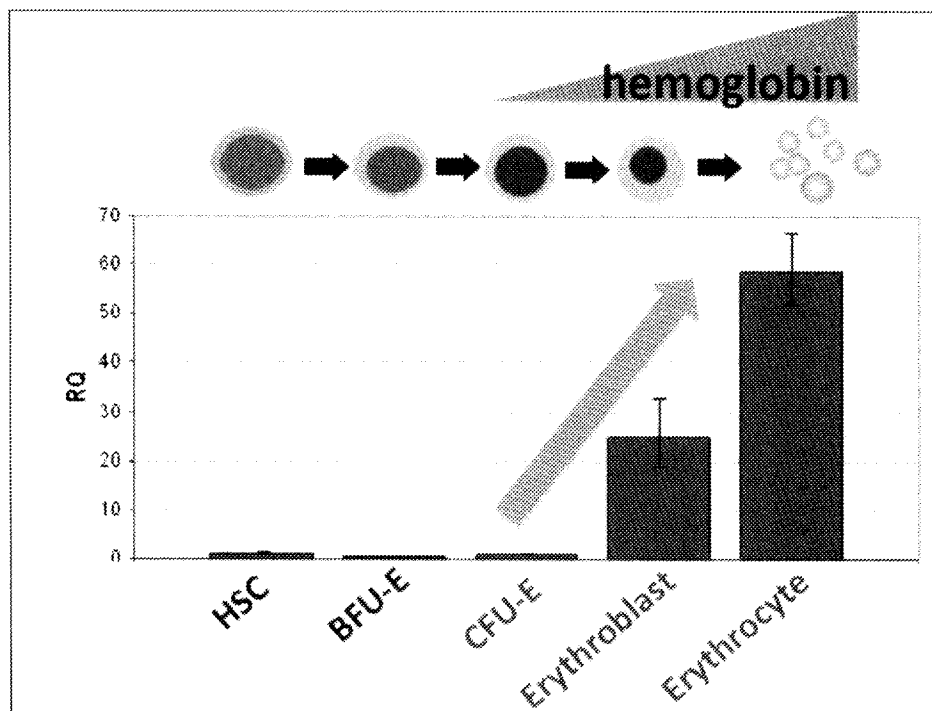
[図1]

<i>H. sapiens</i>	NP_690879.2	1	MAHSAAAVPLGALEQQGPIRVEHDPRRRQFTVRLNGCHDRAVLLYEYVGK	50
<i>M. musculus</i>	NP_079570.1	1	MAHAT---PPSALEQQGGPIRVEHDPQRRQFSVRLNGCHDRAVLLYEYVGK	47
<i>D. rerio</i>	NP_001013336.1	1	MAQAA---QINVLDISTRLRVEHDKKRQFSIRLNGSHDKAVLLYEYVGK	47
<i>H. sapiens</i>	NP_690879.2	51	RIVDLQHTTEVPDAYRGRGI AKHLAKAALDFVVEEDLKAHLTCWYIQKYVK	100
<i>M. musculus</i>	NP_079570.1	48	RIVDLQHTTEVPDAYRGRGI AKHLAKAALDFVVEEDLKAHLTCWYIQKYVK	97
<i>D. rerio</i>	NP_001013336.1	48	KTVDLQHTTEVPEAYRGRGI AKHLAKAAMDFVVEEDLKAHLTCWYIQKFVK	97
<i>H. sapiens</i>	NP_690879.2	101	ENPLPQYLERLQF	113
<i>M. musculus</i>	NP_079570.1	98	ENPLPQYLERLQF	110
<i>D. rerio</i>	NP_001013336.1	98	ENPHPQYLERILH	110

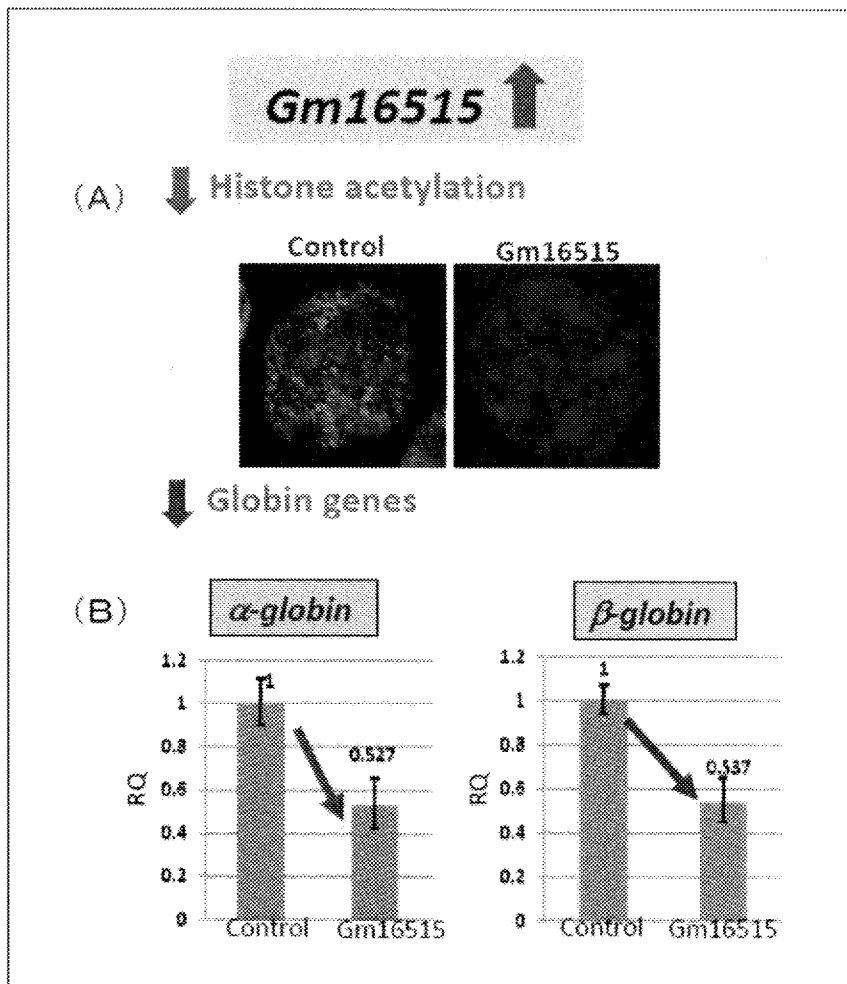
[図2]



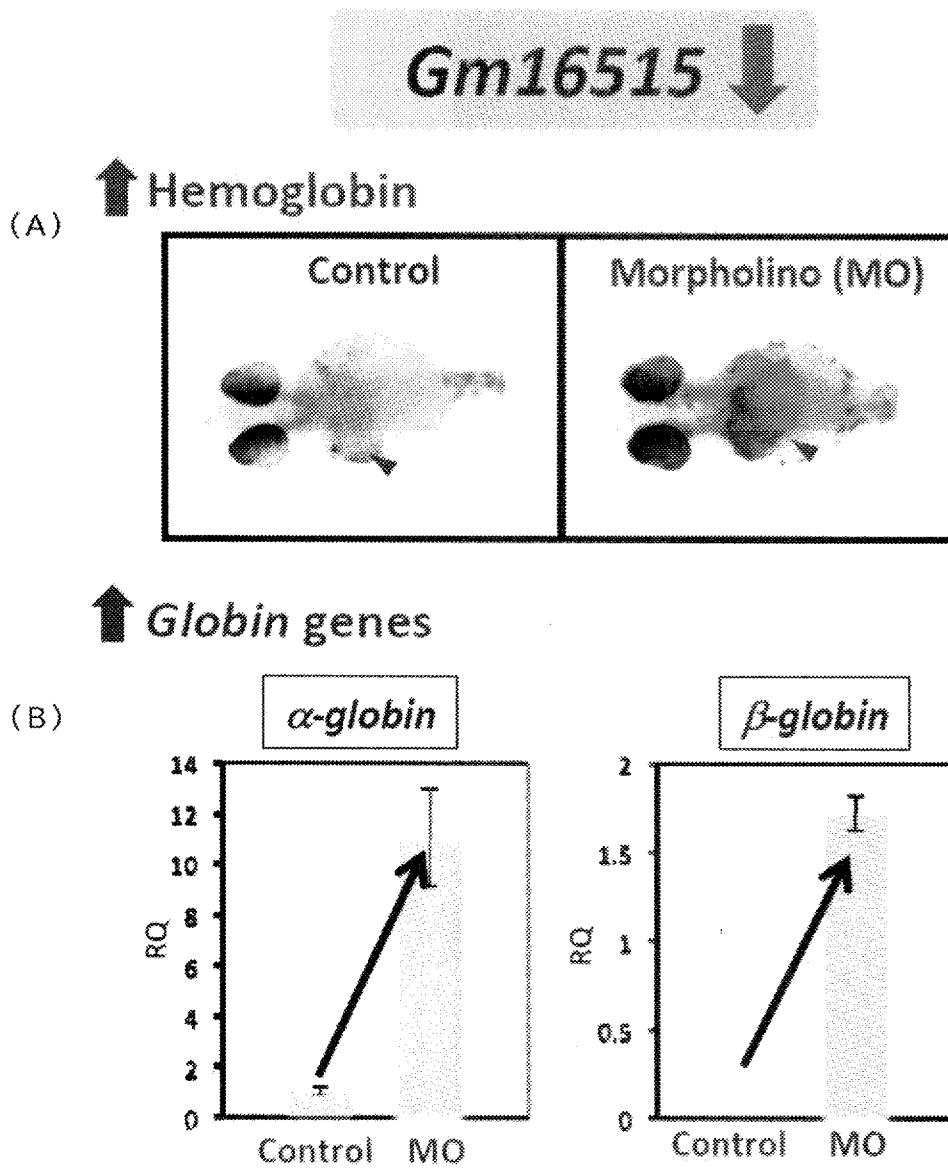
[図3]



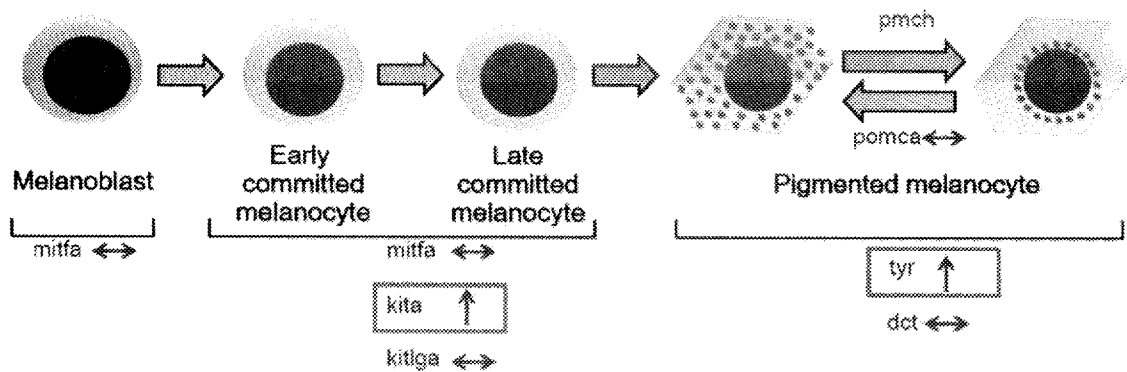
[図4]



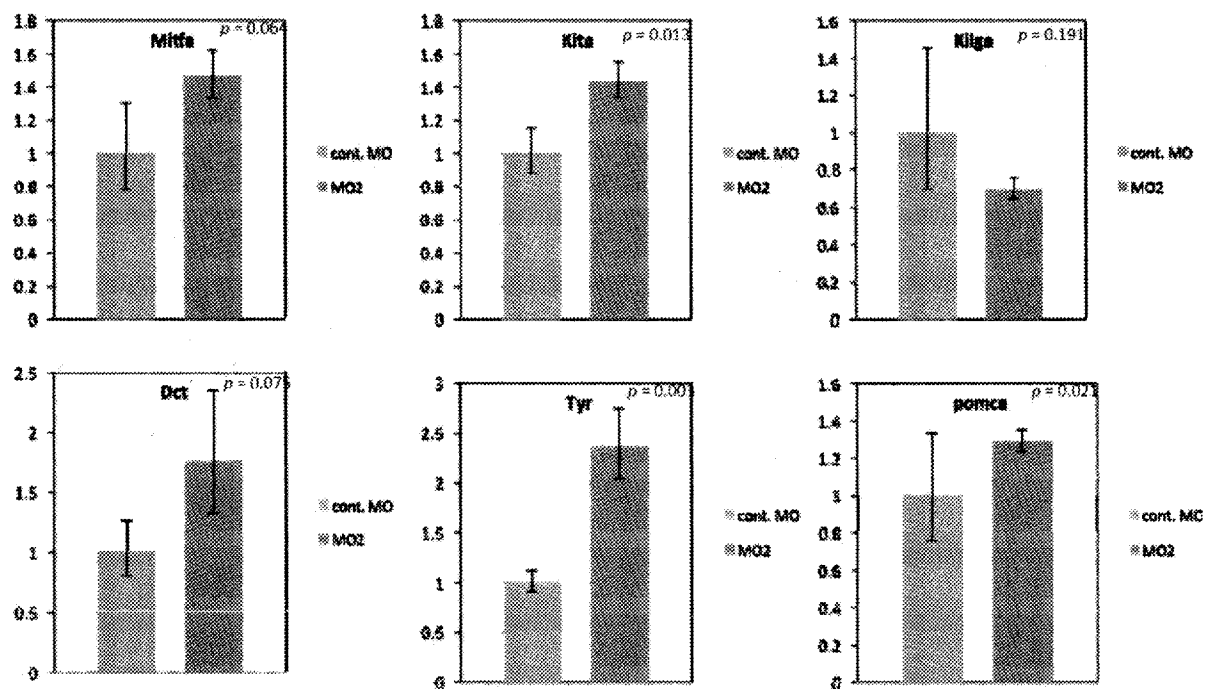
[図5]



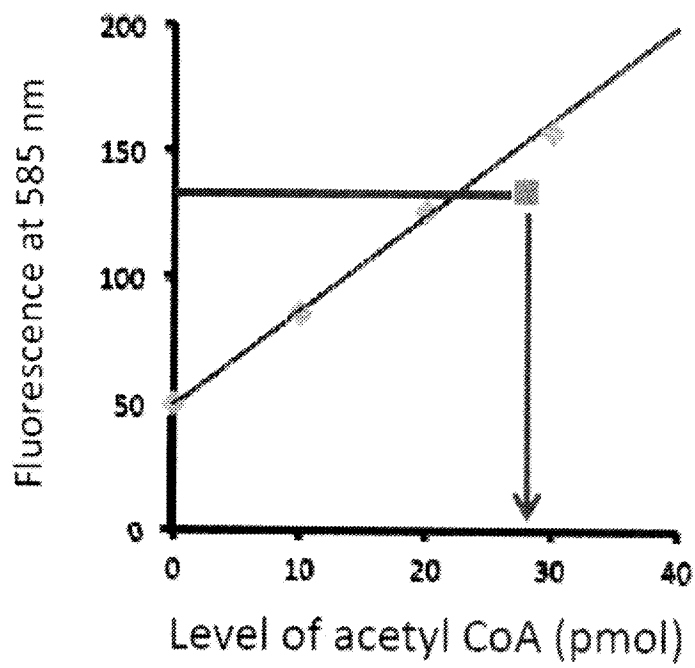
[図6]



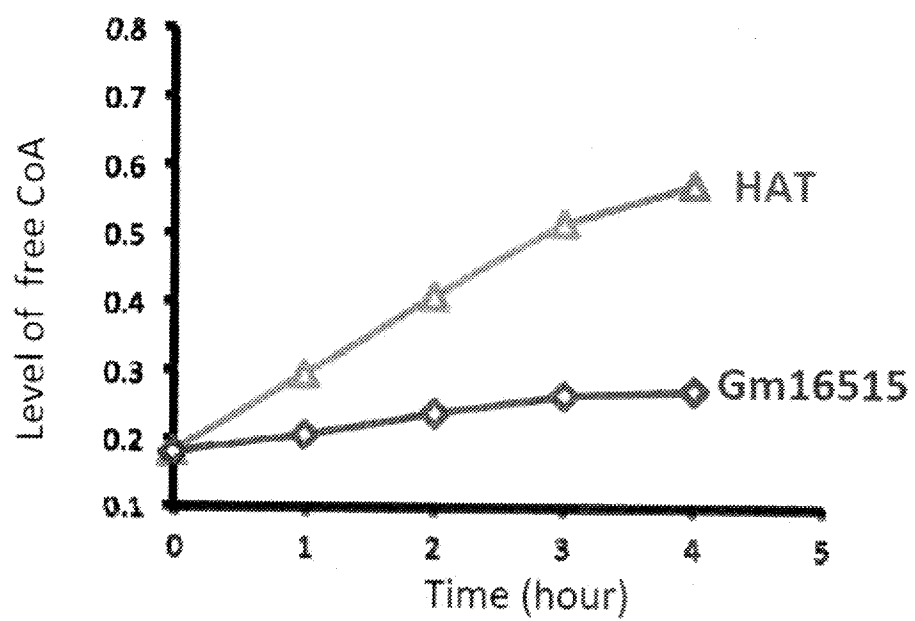
[図7]



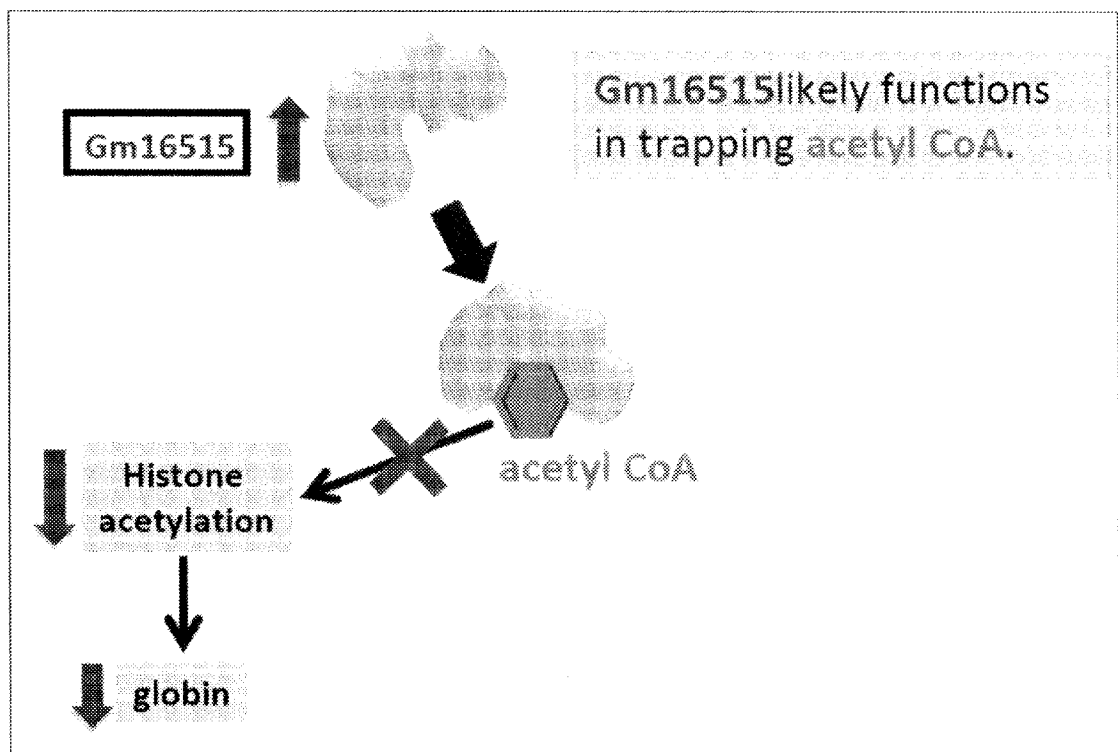
[図8]



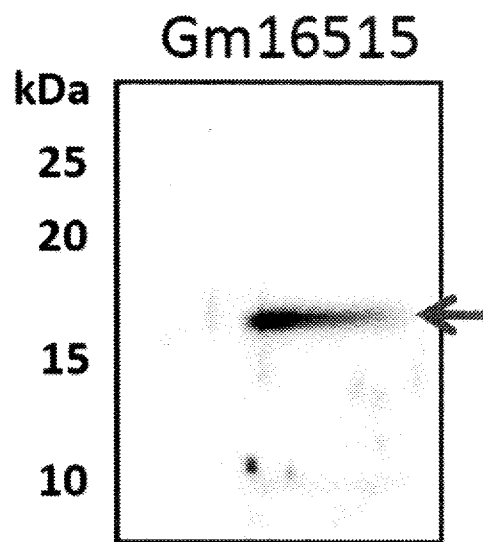
[図9]



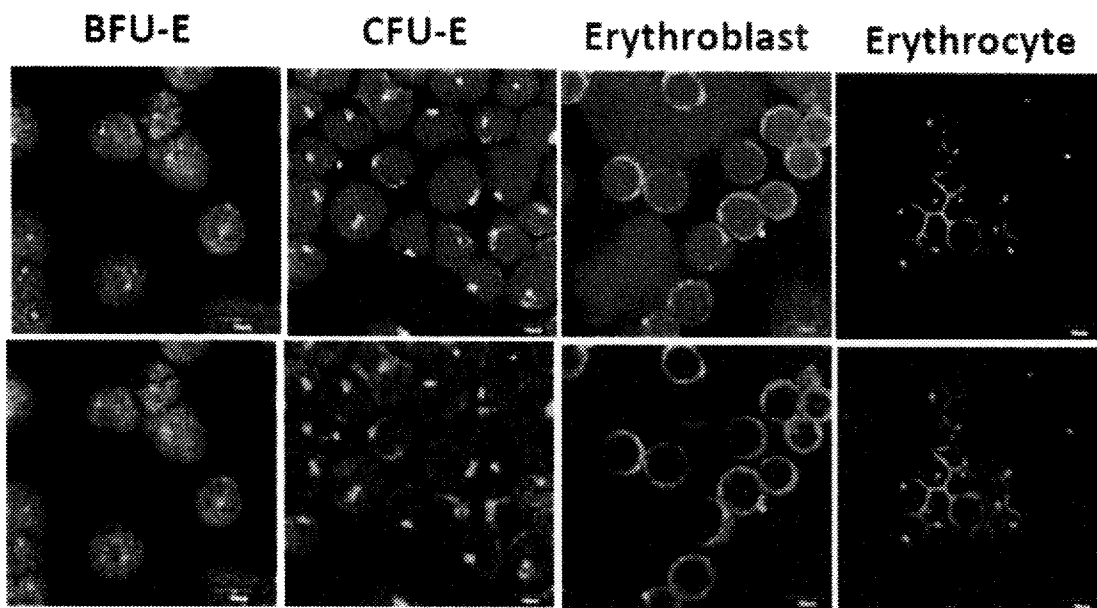
[図10]



[図11]

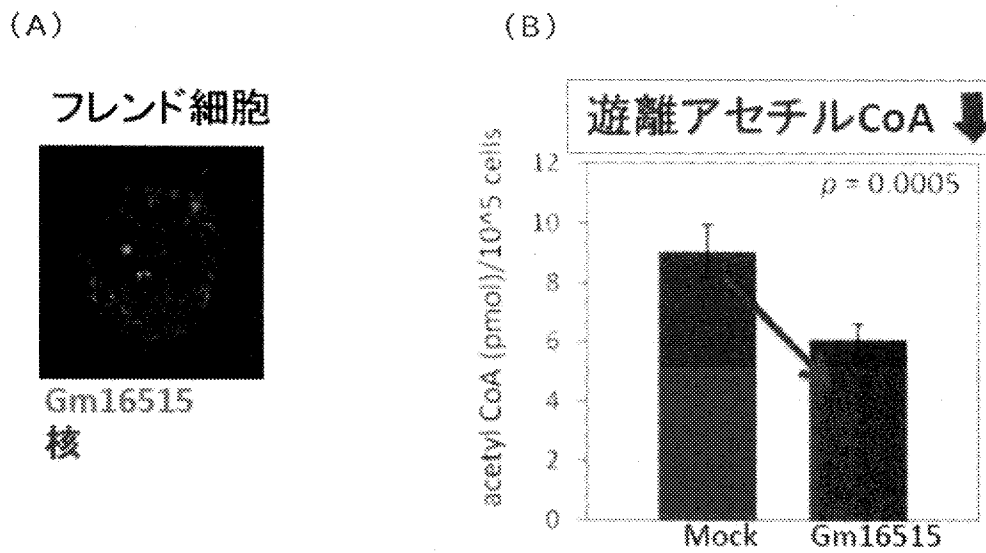


[図12]

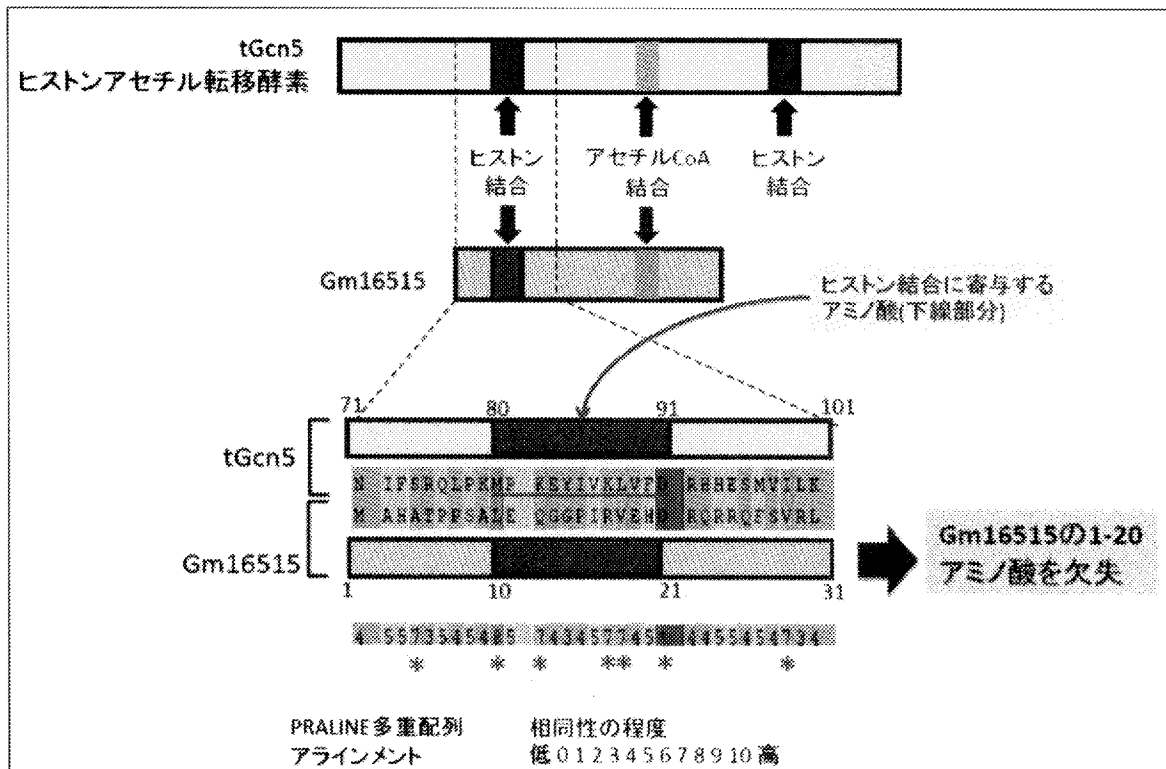


Gm16515
核

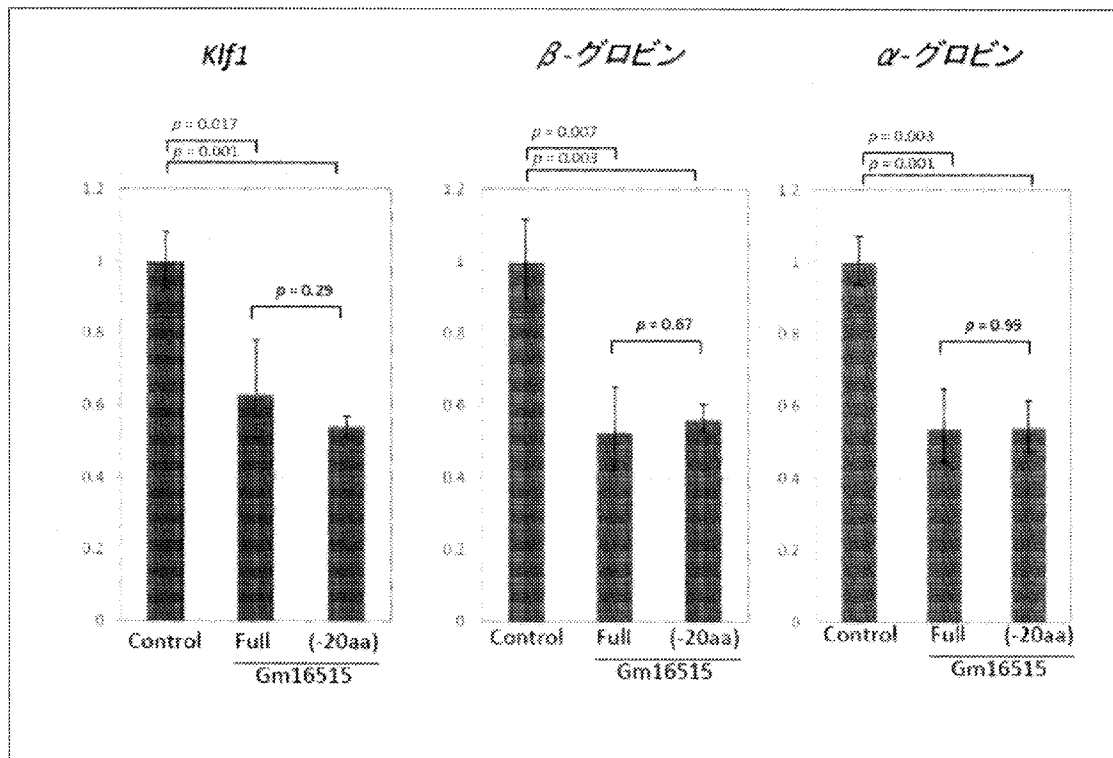
[図13]



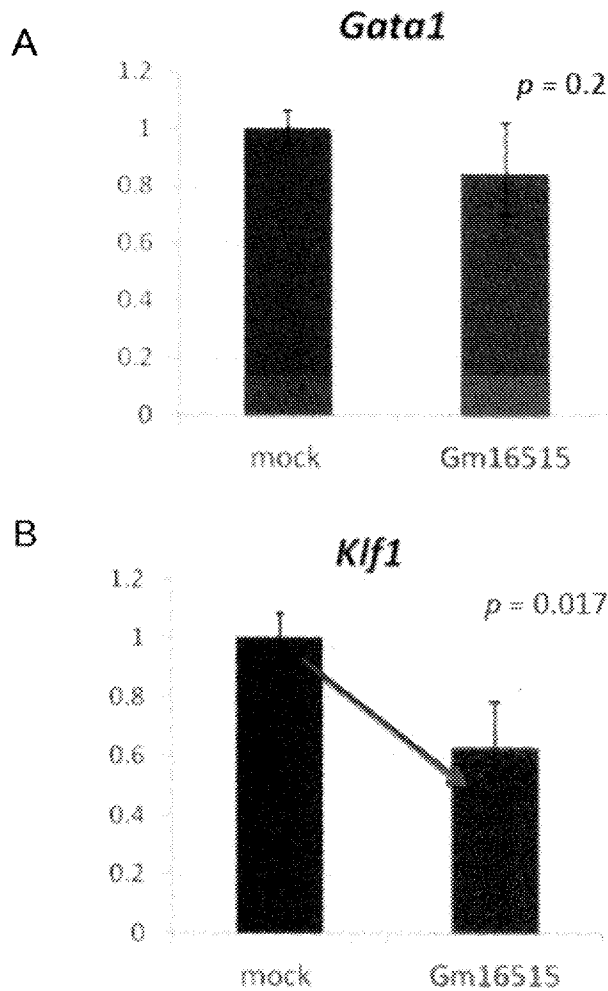
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i,
A61P17/00(2006.01) i, A61P43/00(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)

A61K38/00-38/58, A61K31/00-31/80, A61K48/00, A61P17/00, A61P43/00

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 1996-2013

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580

(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	DATABASE UniProt [Online], 2012.03.21, "GTL3B_HUMAN", [retrieval date 2013.05.13], Accession No.Q8N6N6	5, 11 1-3, 6-8, 12-15
A	Yuzo OBA, "Ijo Hemoglobin-sho", Modern Medical Laboratory, 1996, vol.24, no.3, pages 186 to 192	1-3, 5-8, 11-15
A	BANK, A. et al, "Disorders of human hemoglobin", Science, 1980, Vol.207, No.4430, p.486-93	1-3, 5-8, 11-15



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

13 May, 2013 (13.05.13)

Date of mailing of the international search report

21 May, 2013 (21.05.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059744

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, 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4, 9 and 10 involve methods for treatment of the human body or animal body by therapy and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1.
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(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. A61K38/00-38/58, A61K31/00-31/80, A61K48/00, A61P17/00, A61P43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 3 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 3 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 3 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） CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ, UNIPROT/GENESEQ, SWISSPROT/GENESEQ			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	DATABASE UniProt [Online], 2012.03.21, "GTL3B_HUMAN", [検索日 2013.05.13], Accession No. Q8N6N6	5, 11 1-3, 6-8, 12-15	
A	大庭雄三, 「異常ヘモグロビン症」, 検査と技術, 1996, Vol. 24, No. 3, p. 186-192	1-3, 5-8, 11-15	
A	BANK, A. et al, "Disorders of human hemoglobin", Science, 1980, Vol. 207, No. 4430, p. 486-93	1-3, 5-8, 11-15	
☐ 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 1 3 . 0 5 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 2 1 . 0 5 . 2 0 1 3	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 荒巻 真介 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9	4 U 4 7 6 4

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. ☒ 請求項 _____ 4, 9, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項4, 9, 10は、治療による人体又は動物の体の処置方法を包含するものであって、PCT規則39.1の規定により、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。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって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。

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

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

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

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。