

(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



(10) 国際公開番号

WO 2010/061902 A1

(43) 国際公開日

2010年6月3日(03.06.2010)

PCT

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C07D 307/935 (2006.01) G01N 21/27 (2006.01)
C07K 5/037 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/069985

(22) 国際出願日: 2009年11月26日(26.11.2009)

(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:
12/315069 2008年11月26日(26.11.2008) US

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): レ
ドックス・バイオサイエンス株式会社(Redox
Bioscience Inc.) [JP/JP]; 〒6068396 京都府京都市左
京区川端通丸太町下る下堤町8番地1恵美
須ビル3階 Kyoto (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 淀井 淳司
(YODOI Junji) [JP/JP]; 〒6068225 京都府京都市左
京区北白川西瀬ノ内町39 Kyoto (JP). 近藤 則
彦(KONDO, Norihiko) [JP/JP]; 〒2260018 神奈川県
横浜市緑区長津田みなみ台1-4-2 2-2
04 Kanagawa (JP). 孫 安生(SON Aoi) [KR/JP];
〒6150835 京都府京都市右京区西京極堤下町8

- 9 Kyoto (JP). 加藤 紀子(KATO Noriko)
[JP/JP]; 〒6590021 兵庫県芦屋市春日町14-2
2-406 Hyogo (JP). 原 富次郎(HARA Tomi-
jiro) [JP/JP]; 〒9900411 山形県東村山郡中山町あ
おば7-7 Yamagata (JP). 堀部 智久(HORIBE
Tomohisa) [JP/JP]; 〒6048036 京都府京都市中京区
東入る寺町12 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 清原 義博(KIYOHARA Yoshihiro); 〒
5300004 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番3号
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, 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, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

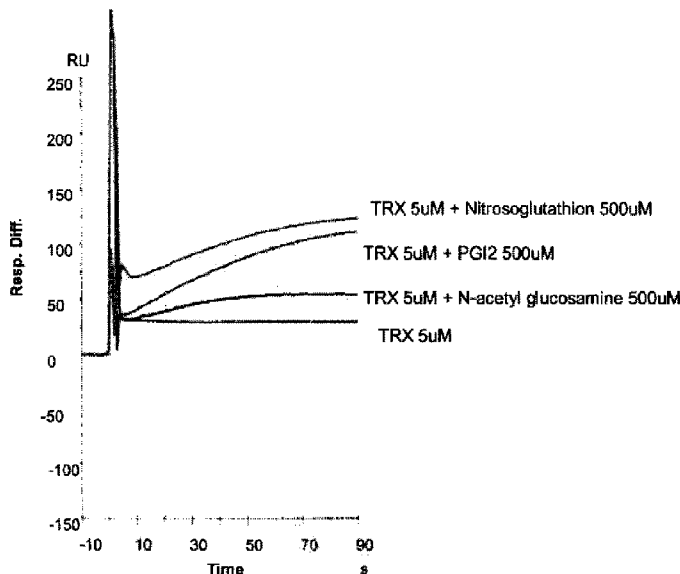
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: SCREENING METHOD, COMPOSITION CONTAINING SUBSTANCE SELECTED BY THE SCREENING METHOD, AND BINDING SUBSTANCE

(54) 発明の名称: スクリーニング方法、該スクリーニング方法で選ばれた物質を含有する組成物、結合物質

[図7]



(57) Abstract: Disclosed is a screening method which can select a substance having an influence on the binding between thioredoxin and MIF. The screening method is characterized in that a test substance capable of enhancing the binding between a polypeptide belonging to the thioredoxin family and a macrophage migration inhibitory factor is selected through the steps of mixing at least one binding substance selected from the substances (1) to (4) shown below with the test substance, allowing the binding substance to bind to the macrophage migration inhibitory factor, and confirming the binding between the binding substance and the macrophage migration inhibitory factor: (1) a polypeptide belonging to the thioredoxin family; (2) a protein which comprises an amino acid sequence produced by deleting, substituting or adding one or several amino acid residues in an amino acid sequence for a polypeptide belonging to the thioredoxin family and has the same activity as that of a polypeptide belonging to the thioredoxin family; (3) a gene encoding the polypeptide (1); and (4) a gene encoding the protein (2).

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/061902 A1



(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, 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))

(課題) チオレドキシシンと M I F の結合に影響を与える物質を選び出すスクリーニング方法を提供することを主たる目的とする。(解決手段) 下記(1)乃至(4)から選択される少なくとも一種以上の結合物質と試験物質を混合し、前記結合物質とマクロファージ遊走阻止因子の結合処理を行い、前記結合物質と前記マクロファージ遊走阻止因子の結合状態を確認することで、チオレドキシシンファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する試験物質を選び出すことを特徴とするスクリーニング方法とする。(1)チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド(2)チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチドのアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つチオレドキシシンファミリーのポリペプチドと同等の活性を有するタンパク質(3)(1)をコードする遺伝子(4)(2)をコードする遺伝子とする。

明 細 書

発明の名称：

スクリーニング方法、該スクリーニング方法で選ばれた物質を含有する組成物、結合物質

技術分野

[0001] 本発明は、チオレドキシシンファミリーのポリペプチド（以下「TRXs」と略記する）とマクロファージ遊走阻止因子（Macrophage migration inhibitory factor：以下「MIF」と略記する）の結合を増強する試験物質を選ぶためのスクリーニング方法、該スクリーニング方法で選ばれた物質を含有する組成物、結合物質に関する。

背景技術

[0002] マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は、炎症部位中にマクロファージがランダムに遊走するのを阻止する炎症性サイトカインで、全身／局所の炎症と免疫応答に重要な役割を果たす（非特許文献1、2）。

MIFは、（リンパ球、マクロファージ等の）免疫担当細胞や、脳下垂体などから生体侵襲（例えば、酸化ストレスを引き起こすエンドトキシン、活性酸素、紫外線などの刺激）に即応して産生され、炎症性サイトカインカスケードの上流に位置し、（MIFが他の炎症性サイトカインの発現を誘導することによって）炎症反応を制御することが報告されている（非特許文献3、4）。

他にも、（MIFが）グルココルチコイドの抗炎症作用を抑制し、炎症反応促進させること、Tリンパ球の活性化促進因子であること、さらにはp53の機能を抑制することや、脂肪細胞・癌細胞等の増殖・分化に関与すること等、様々な生体反応に重要な役割を果たしていることなどが報告されている（非特許文献2、5、6）。

[0003] しかしながら、MIFは炎症作用を有する為、その過剰な産生が過度の炎症反応を引き起こし、（炎症を伴う）各種障害の原因となる。

M I Fによって引き起こされる障害（疾病）は多岐に渡り、代表的なものとして、慢性リウマチ様関節炎等の遅延型アレルギー（IV型：細胞免疫性反応）が挙げられるが、近年、その関連疾患は拡大を見せ、動脈硬化、子宮内膜症などへの寄与も明らかにされている。他にも、急性呼吸急迫症候群（ARDS）の肺胞洗浄液、腎臓移植を受けた患者の拒絶反応時における尿、及び急性心筋梗塞、糖尿病、全身性エリテマトーデス、クローン病、アトピー性皮膚炎患者で、血清中のM I F濃度が健常人と比べて顕著に上昇していることを示した報告などが挙げられる。

加えて、腎炎、肝炎、肺炎、関節炎、エンドトキシンショック等の動物病態モデルでは、抗M I F中和抗体の投与群で明らかな改善効果が認められた（非特許文献7）。

このことはM I Fの炎症作用がこれら病態の悪化に関与することを示す。

[0004] M I Fと各種疾患との関係について、詳しく報告された公知文献として、非特許文献8～16を例示することができる。

1) 非特許文献8

肺障害モデルラットにリポポリサッカライド（L P S : lipopolysaccharide）刺激を与えることによって、M I FのmRNAが上昇し、好中球や単球の肺胞への浸潤や気管支肺胞洗浄液中への誘導がみられるが、L P S投与前に抗M I F抗体を投与するとこれらの浸潤や誘導は減少し、肺出血も抑制されたことが確認されている。

このことはM I F活性の阻害が肺障害の予防乃至治療に有効であることを示す。

又、血小板減少が抑制されたことから、M I F活性の阻害が感染症による敗血症治療にも有効であることが示されている。

2) 非特許文献9

B C G (bacilli Calmette Guerin) - L P S誘導急性肝炎モデルマウスにおいて、抗M I F抗体を投与することにより、生存率の改善やT N F - α の増加抑制が確認されている。このことはM I F活性の阻害が急性肝炎の予防

乃至治療に有効であることを示す。

3) 非特許文献 10 及び 11

type II collagen 関節炎や、adjuvant 関節炎モデル動物実験において、抗 M I F 抗体による炎症反応の軽減が見られたことから、M I F 活性の阻害が関節リウマチの予防乃至治療に有効であることが報告されている。

4) 非特許文献 12

急性呼吸急迫症候群 (ARDS) 患者に対し、抗 M I F 抗体を投与することにより、炎症性サイトカインの上昇が抑制されていることが確認されている。

即ち、M I F 活性の阻害が急性呼吸急迫症候群 (ARDS) の予防乃至治療に有効であることが示されている。

5) 非特許文献 13

マウス気管支喘息モデルにおいて、抗 M I F 抗体が病態改善に有効であったことから、M I F 活性の阻害が気管支喘息の予防乃至治療に有効であることが示されている。

6) 非特許文献 14 及び 15

急速進行性糸球体腎炎モデルにおいて、抗 M I F 抗体が病態改善に有効であったことから、M I F 活性の阻害が急速進行性糸球体腎炎の予防乃至治療に有効であることが示されている。

7) 非特許文献 16

I g A 腎症モデルにおいて、抗 M I F 抗体が病態改善に有効であったことから、M I F 活性の阻害が I g A 腎症の予防乃至治療に有効であることが示されている。

[0005] このように、M I F は多くの疾患と深く関わっており、これらの疾患の症状を緩和するために、M I F の活性を阻害する物質を探索することが望まれている。

[0006] 一方、チオレドキシン (Thioredoxin) は、その活性部位配列：-C y s -G l y -P r o -C y s - : の 2 つのシステイン残基間でのジスルフィド /

ジチオール交換反応による酸化還元（レドックス）活性を有する12kDaの多機能ポリペプチドである（非特許文献17）。チオレドキシンは、リボヌクレオチドリダクターゼに対する水素イオン供与体、デオキシリボヌクレオチドの合成に重要な酵素として大腸菌から単離されて以来、多くの原核生物、真核生物から単離同定されてきた。

成人T細胞白血病誘導因子（ADF）は、本発明者らがHTLV-1に感染したTリンパ球によって産生されるIL-2受容体誘導因子として最初に同定したもので、ヒトチオレドキシンである。

細胞内チオレドキシンはラジカル消去や、activator protein-1（AP-1）、nuclear factor-kappa B（NF- κ B）などのレドックスに関する転写因子の制御に重要な役割を果たしている（非特許文献18）。

ヒトチオレドキシンは、p38 mitogen activating protein kinase（MAPK）やapoptosis signal regulating kinase-1（ASK-1）のシグナル伝達を制御する。

チオレドキシスが細胞外に放出され、サイトカインまたはケモカイン作用を示すこと（非特許文献19）、更には細胞外TRXが細胞内へ移行すること（非特許文献20）が本発明者らによって報告されてきた。

しかしながら、MIFとチオレドキシンとの関係や、MIFと関連する物質をスクリーニングする方法については、現在に至るまで、報告されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nishihira J., J Interferon Cytokine Res, (2000) 20:751-762

非特許文献2：Bucala R., FASEB J (1996) 7:19-24)

非特許文献3：Annual Reports in Medicinal Chemistry, 第33巻, 24頁, 1998年

非特許文献4：Advances in Immunology, 第66巻, 197頁, 1997年

- 非特許文献 5 : Bernhagen J, et al Nature 365: 756–759, 1993
- 非特許文献 6 : Calandra T, et al Nature 377: 68–71, 1995
- 非特許文献 7 : International Journal of Molecular Medicine, 第2巻, 17頁, 1998年
- 非特許文献 8 : Makita H, et al Am J Respir Crit Care Med 158:573–579, 1998
- 非特許文献 9 : Kobayashi S, et al Hepatology 29:1752–1759, 1999
- 非特許文献 10 : Mikulowaska A, et al J Immunol 158:5514–5517, 1997
- 非特許文献 11 : Ichiyama H, et al Cytokine 26:187–194, 2004
- 非特許文献 12 : Donnelly SC, et al Nat Med 3:320–323, 1997
- 非特許文献 13 : Mizue Y, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:14410–14415, 2005
- 非特許文献 14 : Yang N, et al Mol Med 4:413–424, 1998
- 非特許文献 15 : Lan HY, et al J Exp Med 185:1455–1465, 1997
- 非特許文献 16 : Leung JC, et al Nephrol Dial Transplant 19:36–45, 2003
- 非特許文献 17 : Redox regulation of cellular activation Ann. Rev. Immunol. 1997;15:351–369
- 非特許文献 18 : AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1 PNAS. 1997;94:3633–3638
- 非特許文献 19 : Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis PNAS. 2001; 98: 15143–15148
- 非特許文献 20 : Redox-sensing release of thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops J. Immunol. 2004;172:442–448

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、チオレドキシンとMIFが結合することを明らかとし、チオレドキシンとMIFの結合を増強する物質を選び出すスクリーニング方法、該スクリーニング方法で選ばれた物質を含有する組成物、結合物質を提供する

ことを解決課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、鋭意研究の結果、チオレドキシファミリーのポリペプチド（TRXs）が、MIFに直接結合することを見出し、TRXsを用いることによりTRXsとMIFの結合に影響を与える物質をスクリーニングすることができるとの結論に達し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明のある実施形態は、下記（１）乃至（４）から選択される少なくとも一種以上の結合物質と試験物質を混合し、前記結合物質とマクロファージ遊走阻止因子の結合処理を行い、前記結合物質と前記マクロファージ遊走阻止因子の結合状態を確認することで、チオレドキシファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する試験物質を選び出すことを特徴とするスクリーニング方法に関する。

（１）チオレドキシファミリーに属するポリペプチド

（２）チオレドキシファミリーに属するポリペプチドのアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つチオレドキシファミリーのポリペプチドと同等の活性を有するタンパク質

（３）（１）をコードする遺伝子

（４）（２）をコードする遺伝子

本発明の他の実施形態は、前記結合物質と前記マクロファージ遊走因子の結合状態の確認を分子間相互作用解析で行うことを特徴とするスクリーニング方法に関する。

本発明の他の実施形態は、ニトロソグルタチオン、プロスタグランジンI₂から選ばれる一種以上を含有する、チオレドキシファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する組成物に関する。

本発明の他の実施形態は、下記（１）乃至（４）から選択される少なくとも一種以上を含み、マクロファージ遊走阻止因子と直接結合する結合物質に関する。

- (1) チオレドキシンファミリーに属するポリペプチド
- (2) チオレドキシンファミリーに属するポリペプチドのアミノ酸配列のうち、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つチオレドキシンファミリーのポリペプチドと同等の活性を有するタンパク質
- (3) (1) をコードする遺伝子
- (4) (2) をコードする遺伝子

本発明の他の実施形態は、活性中心に $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Tyr-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-His-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Pro-Cys-$ のいずれかを有するポリペプチドであることを特徴とする結合物質に関する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、チオレドキシンとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する試験物質を選び出すことにより、結合物質（チオレドキシンファミリーのポリペプチド等）が有するマクロファージ遊走阻止因子の活性の阻害をより強めることができる。

また、分子間相互作用解析を用いることにより、リアルタイムで分子間の結合状態を確認することができる。

また、ニトロソグルタチオンやプロスタグランジン I₂ は、チオレドキシンファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を確実に増強させることができる。

また、活性中心に $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Tyr-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-His-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Pro-Cys-$ のいずれかを有することにより、チオレドキシンファミリーのポリペプチドがマクロファージ遊走阻止因子と確実に結合する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]細胞内におけるTRXとMIFの結合を確認した結果である。

- [図2]細胞外におけるTRXとMIFの結合を確認した結果である。
- [図3]TRXによるMIFの細胞内への取り込み抑制を確認した結果である。
- [図4]TRXによるMIFの活性阻害をTNF- α の濃度(pg/mL)で確認した結果である。
- [図5]TRXとMIFの結合を分子間相互作用解析によって確認した結果である。
- [図6]TRXとMIFの結合を分子間相互作用解析によって確認した結果である。
- [図7]三種類の試験物質夫々とTRXを混合したものをアナライトとして用いた場合の分子間相互作用解析の結果である。
- [図8]試験物質としてN-アセチルグルコサミンを用いた場合の分子間相互作用解析の結果である。
- [図9]試験物質としてニトロソグルタチオンを用いた場合の分子間相互作用解析の結果である。
- [図10]試験物質としてプロスタグランジンI₂を用いた場合の分子間相互作用解析の結果である。
- [図11]試験物質としてプロスタグランジンI₂を用いた場合の分子間相互作用解析の結果である。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明者らは、鋭意研究の結果、チオレドキシンファミリーのポリペプチド(TRXs)の新たな機能として、炎症作用を有するマクロファージ遊走阻止因子(MIF)に直接結合することを解明した。

このことから、TRXsを用いることで、MIFとTRXsの結合に影響を与える物質を選び出すことができるとの結論に達し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明に係るスクリーニング方法の実施形態について詳説する。

- [0013] 本実施形態に係るスクリーニング方法は、試験物質の中から、TRXsとMIFの結合を増強するものを選び出すための方法である。

具体的には、下記（a）～（c）の工程を経ることにより行うことができる。

- （a）TRXs等の結合物質（詳細は後述する）と試験物質を混合する
- （b）試験物質と混合した結合物質をMIFに結合させる結合処理を行う
- （c）試験物質と混合した結合物質とMIFの結合状態を確認し、試験物質を混合しない場合の結合物質とMIFの結合状態と比較する

[0014] 解析の結果、試験物質と混合した結合物質とMIFの結合が、試験物質と混合しない結合物質とMIFの結合に比して強い場合、試験物質は結合物質とMIFの結合を增強している物質であるといえる。

結合物質（TRXs等）はMIFに結合し、MIFの活性を阻害するMIF阻害剤としての役割を有するが、結合物質とMIFの結合を增強する物質を選び出すことにより、結合物質のMIF阻害剤としての効果をより顕著にすることができる。

[0015] 試験物質としては各種ペプチド、リピッド、糖鎖等を挙げることもできる。

また、ニトロソグルタチオンやプロスタグランジンI2は、本発明のスクリーニング方法により、TRXsとMIFの結合を增強することが確認できた。そのため、ニトロソグルタチオン、プロスタグランジンI2から選ばれる一種以上を含有する組成物はTRXsとMIFの結合を增強するのに好適に利用することができる。

さらに、プロスタグランジンJ2（PGJ2）ファミリー、ヒアルロン酸、S_Nitrosylation、Glutathionylation等も挙げることもできる。

[0016] 結合物質とMIFの結合状態の確認方法としては、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance：SPR）現象を利用した分子間相互作用解析（Biacore）を挙げることもできる。当該解析は、標識を使わずに分子間の相互作用をリアルタイムにモニタリングすることができる。

分子間相互作用解析を用いる場合、センサーチップにリガンドとしてMIFを固定化し、アナライトとして結合物質（TRXs等）と試験物質の混合

物を用い、試験物質と混合した結合物質とM I Fの結合状態（相互作用）を解析する。そして、当該解析結果を、試験物質を混合しない場合の結合物質とM I Fの結合状態と比較することで、試験物質のスクリーニングを行う。

[0017] [T R X s]

以下、本発明の結合物質について説明する。

本発明の結合物質は、下記（１）乃至（４）をいい、単独の他、これらの組み合わせ等が挙げられる。

（１）チオレドキシシンファミリーのポリペプチド（T R X s）

（２）T R X sのアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つT R X sと同等の活性を有するポリペプチド

（３）（１）をコードする遺伝子

（４）（２）をコードする遺伝子

[0018] チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド（T R X s）と同等の活性とは、M I Fに直接結合し得たるものをいう。

[0019] T R X sとは、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元活性を有するポリペプチド類であって、もともと、生物細胞中に存在するポリペプチドである（特開2002-179588等参照）。

[0020] 本発明のT R X sには、天然のヒトを含む動物、植物、大腸菌、酵母からの抽出ポリペプチド類以外に、遺伝子組み換えにより酵母や大腸菌等から抽出されるポリペプチド類、化学合成で作成されるポリペプチド類等も含まれる。但し、ヒト由来のもの、及びそれを大腸菌、酵母において遺伝子組み換えで作成したもの、及びそれらと同一又は類似の配列からなる合成ペプチドが、生体に与える影響がより少ないと考えられるため好ましい。

[0021] T R X sは、システイン残基を含む活性部位（-C y s - X 1 - X 2 - C y s - : X 1, X 2は、任意のアミノ酸残基を表し、同一であっても異なるものでも良い）を有し、類似の3次元構造を持つ分子群である。従って、本発明のT R X sには、上記の他、ジチオール結合やジスルフィド結合の酸化還元

活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸が欠失又は置換されたものや、他のアミノ酸、ペプチドが融合されたものであってもよい。

[0022] 活性部位の具体例としては、 $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Tyr-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-His-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Pro-Cys-$ 等が挙げられるが、中でも、 $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ が種を超えて保存されている配列であるため、マウスモデルによる実験結果の人間への応用がより確実であるという理由で好ましい。

[0023] TRXsには、具体的には、例えば、活性部位が $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ であるチオレドキシシン (TRX)、グルタレドキシシン等が挙げられる。

[0024] チオレドキシシン (TRX)には、ヒト、大腸菌、酵母由来のものがあり、グルタレドキシシンには、ヒト、大腸菌由来のものがある。

ここで、ヒト由来のヒトチオレドキシシン (hTRX)は、配列番号1に示される105個のアミノ酸からなるポリペプチドである。hTRXの塩基配列は、配列番号2に示される。

[0025] ヒト細胞からTRXsを抽出する具体的な方法としては、以下の方法が例示される。

(A) ヒト由来の細胞株から抽出する方法 (特開平1-85097号公報等参照)。

(B) 遺伝子組み換え法を用いる方法 (特開平1-85097号公報等参照)。

(C) ペプチド合成法を用いる方法 (特開平5-139992号公報等参照)。

[0026] また、MIFに直接結合し得るものであれば、配列番号1のヒトチオレドキシシンをもとにして公知の遺伝子工学的手法により作製されたTRX改変体であってもよい。

該改変体としては、配列番号1の32位と35位以外、好ましくは32位

～35位以外のアミノ酸の1又は複数個が置換、欠失、付加、挿入されているものが挙げられる。

[0027] また、上記のチオレドキシンファミリーに属するポリペプチド（TRXs）を、単独又は2種以上を組み合わせることもできる。

[0028] さらに、（3）、（4）に記載のコードする遺伝子を用いる場合、細胞内で（1）（2）に記載のポリペプチドを産出させて用いればよい。

[0029] [マクロファージ遊走阻止因子（MIF）]

次いで、本発明のスクリーニング方法に用いられるMIFについて説明する。

MIFは、ヒトをはじめ様々な動物種に存在し、配列番号3で示される115個のアミノ酸残基からなる分子量12.3kDaタンパク質で、分子内にレドックス活性領域であるCys-X-X-Cysモチーフ（Xは任意のアミノ酸）を有することから、チオレドキシンファミリーに属する。

MIFは、リンパ球のみならず、脳や腎臓など種々の臓器で発現し、特に腎臓では尿細管上皮細胞、皮膚や角膜では細胞増殖の盛んな基底膜細胞等で発現が強い。

MIFを発現する細胞・組織としては、T細胞、単球・マクロファージ、樹状細胞、メサングウム細胞、尿細管上皮細胞、角膜上皮細胞、肝細胞、卵細胞、セルトリ細胞、ケラチノサイト、骨芽細胞、滑膜細胞、脂肪細胞、アストロサイト、癌細胞、粘膜、脳下垂体などを例示することができる。

[0030] 本発明の限定的解釈を望むものではないが、結合物質（TRXs等）は炎症作用を有するMIFに直接結合することにより、MIFの活性を低減させ、MIFによる炎症（並びに炎症による繊維化）を抑えることができる。詳細には、結合物質（TRXs等）がMIFのレドックス活性領域に直接結合することによって、MIFの活性を阻害するものと考えられる。

また、結合物質（TRXs等）はMIFの細胞内への取り込みを抑制することにより、MIFによる炎症（並びに炎症による繊維化）を抑えることができる。

本発明のスクリーニング方法では、結合物質（TRXs等）とMIFの結合を増強する物質を選び出すことができる。そのため、本発明のスクリーニング方法を用いることにより、結合物質（TRXs等）が有するMIFに対する効果をさらに強化することのできる物質を探索することが可能である。

実施例

[0031] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

（実施例1）

[0032] [細胞内におけるTRXとMIFの結合確認実験]

ATL2細胞及びHL60細胞内におけるTRXとMIFの結合を（後述の如く）免疫沈降法によって確認した。

[0033] [実験材料]

ATL2細胞 : ヒト成人型T白血病細胞株

公開特許公報 昭62-19532、Tagaya, Y., Y. Maeda, A. Mitsui, N. Kondo, H. Matsui, J. Hamuro, N. Brown, K. Arai, T. Yokota, H. Wakasugi, et al 1989. EMBO J. 8:75 参照

HL60細胞 : ヒト急性前骨髄性白血病細胞株

京都大学ウイルス研究所 淀井淳司教授譲渡分

Protein G Sepharose 4 Fast Flow : (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)

抗TRX抗体 (ADF11抗体) : (レドックスバイオサイエンス社製)

抗MIF抗体 : (サンタクルズ社製)

抗Rabbit抗体 : (upstate社製)

[0034] [実験方法]

細胞は175cm²フラスコ内で、10% FCS, 100U/ml penicillin, 100μg/ml ストレプトマイシンを含むRPMI 1640 (シグマ社製) 培地を用い培養した。

1×10^{7~8}/cellの細胞を回収し、1000rpm, 4°C, 15分間

で遠心後、得られた沈殿を l y s i s b u f f e r で可溶化し30分間氷上で静置した。

溶液を1000rpm, 4°C, 15分間遠心し、得られた上清を免疫沈降実験に使用した。タンパク質の濃度測定は、DCプロテインアッセイキット(BIO RAD社製)を用いた。

マイクロチューブに20μlのProtein G Sepharose、500μgの細胞溶液を加え、phosphate bufferで1mlに調整し、小型回転培養機で4°C, 3時間反応させた。細胞溶液を15000rpm, 4°C, 2分間遠心し、得られた上清を新しいマイクロチューブに加え、さらに20μlのProtein G Sepharose、4μg/mlの抗MIF抗体を添加した。

また、コントロールには抗MIF抗体の代わりに抗Rabbit抗体を加えた。

反応は小型回転培養機を用い、4°Cで一晩行った。反応溶液を15000rpm, 4°C, 2分間遠心し、沈殿を洗浄buffer(50mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP40)で洗浄した。

沈殿にSDS-PAGE sample bufferを加え、15% SDS-PAGEゲルに供した。泳動後、ウエスタンブロッティングを行い抗TRX抗体(ADF11抗体)で確認した(図1)。

[0035] 図1より、ATL2細胞及びHL60細胞内のいずれにおいても、TRXがMIFに直接結合することが示された。

(実施例2)

[0036] [細胞外におけるTRXとMIFの結合実験]

ATL2細胞外でのTRXとMIFの結合を免疫沈降法によって確認した。

[0037] [実験材料]

ATL2細胞 : ヒト成人型T白血病細胞株

公開特許公報(特開昭62-19532)、Tagaya, Y., Y. Maeda, A. Mitsui, N.

Kondo, H. Matsui, J. Hamuro, N. Brown, K. Arai, T. Yokota, H. Wakasugi, et al 1989. EMBO J. 8:75 参照

Protein G Sepharose 4 Fast Flow : (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)

抗TRX抗体 (ADF11抗体) : (レドックスバイオサイエンス社製)

抗MIF抗体 : (サンタクルズ社製)

抗Rabbit抗体 : (upstate社製)

amicon ultra-4 (ミリポア社製)

[0038] [実験方法]

1×10^5 / cell のATL2細胞を 175 cm^2 フラスコで、 100 U/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを含むRPMI 1640 (シグマ社製) 培地で3日間培養した。そして、培地を回収し、 10000 rpm , 4°C , 15分間で遠心後、得られた上清を最終濃度が10%になるようにFCSを加え、amicon ultra-4で濃縮し、得られた濃縮液を免疫沈降実験に使用した。マイクロチューブに $20 \mu\text{l}$ のProtein G Sepharose、 $30 \mu\text{l}$ の培養上清を加え、phosphate bufferで 1 ml に調整し、小型回転培養機で 4°C , 3時間反応させた。細胞溶液を 15000 rpm , 4°C , 2分間で遠心し、得られた上清を新しいマイクロチューブに加え、さらに $20 \mu\text{l}$ のProtein G Sepharose、 $4 \mu\text{g/ml}$ の抗MIF抗体を添加した。

また、コントロールには抗MIF抗体の代わりに抗Rabbit抗体を加えた。

反応は小型回転培養機を用い、 4°C で一晩行った。反応溶液を 15000 rpm , 4°C , 2分間で遠心し、沈殿を洗浄buffer (50 mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.5$), 150 mM NaCl , 0.1% NP40) で洗浄した。

沈殿にSDS-PAGE sample bufferを加え、15% SDS-PAGEゲルに供した。泳動後、ウエスタンブロッティングを行い抗T

RX抗体（ADF11抗体）で確認した（図2）。

[0039] 図2より、ATL2細胞外でTRXがMIFに直接結合することが示された。

[0040] （実施例3）

〔TRXによるMIFの細胞内への取り込み抑制確認実験〕

MIFはオートクライン、パラクライン作用により細胞内に取り込まれ、炎症性サイトカインTNF- α （ α ）やIL-1の産生を誘導する。そこでTRXによるMIFの細胞内取り込みに対する影響を調べ、炎症応答制御メカニズムの解明を試みた。

[0041] 〔実験材料〕

ATL2細胞：ヒト成人型T白血病細胞株、

組換え型MIF（rMIF）：発現ベクターpQE30（キアゲン社）を用いてHis tag付き組換え型MIFを大腸菌内で発現し、MagneHis™ Protein Purification System（プロメガ社製）によるカラム精製した。

組換え型TRX（rTRX）：（味の素株式会社製）

抗His tag抗体：（プロメガ社製）

[0042] 〔実験方法〕

ATL2細胞は、75 cm²フラスコで10%FCS、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地で培養した。

24穴プレートにATL2細胞を 1×10^6 /cell加え、終濃度0~250 μ g/mlのrTRXと25 μ g/mlのrMIFを加え37°C、0.5%CO₂条件下で24時間培養した。

培養後細胞を回収し、沈殿にSDS-PAGE sample bufferを加え、15%SDS-PAGEゲルで電気泳動後、ウエスタンブロッティングを行い抗His tag抗体で細胞内に取り込まれたMIFを検出した。ウエスタンブロッティングによるバンドの変化をデンストメーターで解析した。測定結果を図3に示す。

[0043] 図3より、TRXは濃度依存的にATL2細胞へのMIFの取り込みを抑制した。

このことから、TRXはMIFの細胞内取り込みを抑制することにより、炎症応答を抑制することが示唆された。

(実施例4)

[0044] [TRXによるMIF活性阻害確認実験]

TRXによるMIFの活性阻害実験を(後述の如く)炎症性サイトカインTNF- α の濃度を測定することによって確認した。

[0045] [実験材料]

RAW 264.7細胞: マウス由来マクロファージ細胞株、
現理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 石井保之博士譲渡分

組換え型MIF (rMIF): (ATGEN社製)

組換え型TRX (rTRX): (味の素株式会社製)

lipopolysaccharide (LPS): (SIGMA社製)

TNF- α ELISAキット: (R&D systems社製)

[0046] [実験方法]

RAW 264.7細胞は、75 cm²フラスコで10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地で培養した。24穴プレートにRAW 264.7細胞を 1×10^6 /cellになるように加え、終濃度10 ng/ml MIFを加え、0~500 ng/mlのTRXを添加し、37°C, 5%CO₂条件下で4時間静置した。

さらに、100 ng/mlのLPSを加え(LPS (+)と表記)、37°C, 5%CO₂条件下で4時間静置した後、培養液を回収した。

産生するTNF- α の量はDuo Set ELISA Development system mouse TNF- α キットにより測定した。

測定方法はキットに添付のプロトコールに従った。測定結果を図4に示す。

[0047] 図4より、rTRXは、濃度依存的にrMIFの活性を阻害し、炎症性サイトカインであるMIF由来のTNF- α の産生を抑制することが確認された。

[0048] 上記実施例1～3の結果から、TRXはMIFに直接結合することで、MIFの細胞内への移行を抑制することが確認された。

また、上記実施例4の結果から、チオレドキシンファミリーのポリペプチドがMIFの細胞内への移行を抑制することでTNF- α の産生を抑制し、炎症応答を抑制することが確認された。

従って、TRXが、MIFによって引き起こされる障害に、広く有効であると考えられる。

(実施例5)

[0049] [TRXとMIFの結合確認実験1]

TRXとMIFの結合を表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance : SPR) 現象を利用した分子間相互作用解析 (Biacore) (以下、単に分子間相互作用解析と称す) によって確認した。

[0050] [実験材料]

組換え型MIF (rMIF) : 発現ベクターpQE30 (キアゲン社) を用いて His tag付き rMIF を大腸菌内で発現し、MagneHis™ Protein Purification System (プロメガ社製) によるカラム精製した。

組換え型TRX (rTRX) : 発現ベクターpQE80L (キアゲン社) を用いて His tag付き rTRX を大腸菌内で発現し、MagneHis™ Protein Purification System (プロメガ社製) によるカラム精製した。

抗His tag抗体 : (プロメガ社製)

BIAcore 2000 (CM5センサーチップ使用) (ピアコア社製)

[0051] [実験方法]

CM5センサーチップにリガンドとしてrMIFを固定化した。リガンド

は、Running Buffer、10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20を用い、MIFを200nM以下となるように調整した。

そして、アナライトとして、rTRXを用い、rTRXとrMIFの相互作用を解析した。また、rTRXの濃度については、2 μ M, 4 μ M, 6 μ M, 8 μ M, 10 μ M, 12 μ Mと変化させて解析を行った。

[0052] 図5は実施例5の分子間相互作用解析の結果を示す図である。

図5に示すように、rTRXの濃度に依存して表面プラズモン共鳴が増加しているため、rTRXとrMIFの結合は濃度依存性を有するといえる。

また、センサーチップNTA (Ni-Histag) を用いて同様の実験を行った場合も同様の結果が得られた。

(実施例6)

[0053] [TRXとMIFの結合確認実験2]

TRXとMIFの結合において、TRXの活性部位である32位と35位のシステイン残基が関与しているのかを、分子間相互作用解析によって確認した。

[0054] [実験材料]

rWT TRX (実施例5のrTRXと同じ)

rDM TRX (実施例5のrTRXの32位と35位のシステイン残基をセリンに変換させたもの)

rC35S TRX (実施例5のrTRXの35位のシステイン残基をセリンに変換させたもの)

rMIF (実施例5のrMIFと同じ)

BIAcore2000 (CM5センサーチップ)

[0055] [実験方法]

CM5センサーチップにリガンドとして200nM以下の濃度に調整したrMIFを固定化した。

そして、アナライトとして、rWT TRX、rDM TRX、rC35S

TRXを用い、これらの rTRX と rMIF の相互作用を、酸化状態と還元状態の夫々について解析した。

なお、酸化状態では、Running Buffer、10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20 を用いリガンドの調整を行い、還元状態ではRunning Buffer、10mM HEPES (pH7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20 に加えて、1M DTT を添加してリガンドの調整を行った。

図6は実施例6の分子間相互作用解析の結果を示す図である。

また、表1、2は図6から算出した解離定数値 (KD値) を示したものであり、表1は酸化状態での rTRX と rMIF のKD値を示した表であり、表2は還元状態での rTRX と rMIF のKD値を示した表である。

[0056] [表1]

酸化状態	KD
rWT TRX	2.53×10^{-5}
rDM TRX	1.19×10^{-5}
rC35S TRX	3.95×10^{-6}

[0057] [表2]

還元状態	KD
rWT TRX	2.97×10^{-5}
rDM TRX	1.66×10^{-5}
rC35S TRX	4.32×10^{-4}

[0058] 図6、表1、2に示すように、rWT TRX、rDM TRX、rC35S TRXのいずれにおいても、rMIFと直接的に結合していることが確認された。

特に、rMIFとrC35S TRXの結合は、rWT TRX又はrDM TRXとMIFの結合より強いことが確認された。

また、rWT TRX、rDM TRXは酸化状態でも還元状態でも解離定数値に殆ど変化がなく、rC35S TRXは酸化状態でrMIFとの結合が

強いことが確認された。

つまり、TRX活性部位であるCys-Gly-Pro-Cys（32位～35位）に、酸化還元依存性を有する部分と酸化還元依存性を有さない部分が存在するといえる。

[0059] [TRXとMIFの結合に影響を与える分子のスクリーニング実験]

いくつかの試験物質において、TRXとMIFの結合を増強するものであるかを分子間相互作用解析により確認した。

[0060] [実験材料]

rTRX（実施例5のrTRXと同じ）

rMIF（実施例5のrMIFと同じ）

BIAcore2000（CM5センサーチップ）

（試験物質）

N-アセチルグルコサミン（N-acetyl glucosamine）

ニトロソグルタチオン（Nitrosoglutathione）

プロスタグランジンI2（Prostaglandin I2）

[0061] [実験方法]

CM5センサーチップにリガンドとしてrMIFを固定化した。リガンドは、Running Buffer、10mM HEPES（pH7.4）、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20を用い、rMIFの濃度が200nM以下となるように調整した。

そして、N-アセチルグルコサミン、ニトロソグルタチオン、プロスタグランジンI2の夫々をrTRXと混合し、三種類のアナライトを作成した。

夫々のアナライトにおいて、rTRXの濃度は5μM、試験物質の濃度は500μMとした。なお、プロスタグランジンI2については、アナライトにおける濃度を5μMとしたものも解析した。

[0062] 図7は三種類の試験物質夫々をrTRXと混合したものをアナライトとして用いた場合の分子間相互作用解析の結果を示した図であり、rTRX（5μM）のみの分子間相互作用解析の結果も示している。

図8は試験物質としてN-アセチルグルコサミンを用いた場合の分子間相互作用解析の結果を示し、rTRX (5 μM) のみの分子間相互作用解析の結果、N-アセチルグリコサミン (500 μM) のみの分子間相互作用解析の結果も示している。

図9は試験物質としてニトロソグルタチオンを用いた場合の分子間相互作用解析の結果を示し、rTRX (5 μM) のみの分子間相互作用解析の結果、ニトロソグルタチオン (500 μM) のみの分子間相互作用解析の結果も示している。

図10は試験物質としてプロスタグランジンI2を用いた場合の分子間相互作用解析の結果を示し、rTRX (5 μM) のみの分子間相互作用解析の結果、プロスタグランジンI2 (500 μM) のみの分子間相互作用解析の結果も示している。

図11は試験物質として、rTRXとプロスタグランジンI2を混合したアナライトにおいて、プロスタグランジンI2の濃度を5 μM、500 μMとしたアナライトを用い、分子間相互作用解析をした結果である。

[0063] 図7～11で示すように、ニトロソグルタチオン、プロスタグランジンI2をrTRXに混合することにより、rTRXとrMIFの結合が著しく増強されることが確認できた。

つまり、ニトロソグルタチオン、プロスタグランジンI2は、TRXsとMIFの結合を増強する物質であるということがわかった。

[0064] このように、本発明のスクリーニング方法は、TRXsとMIFの結合を増強させる物質をスクリーニングすることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 下記（１）乃至（４）から選択される少なくとも一種以上の結合物質と試験物質を混合し、
前記結合物質とマクロファージ遊走阻止因子の結合処理を行い、
前記結合物質と前記マクロファージ遊走阻止因子の結合状態を確認することで、
チオレドキシシンファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する試験物質を選び出すことを特徴とするスクリーニング方法。
（１）チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド
（２）チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチドのアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つチオレドキシシンファミリーのポリペプチドと同等の活性を有するタンパク質
（３）（１）をコードする遺伝子
（４）（２）をコードする遺伝子
- [請求項2] 前記結合物質と前記マクロファージ遊走因子の結合状態の確認を分子間相互作用解析で行うことを特徴とする請求項１記載のスクリーニング方法。
- [請求項3] ニトロソグルタチオン、プロスタグランジン I 2 から選ばれる一種以上を含有する、チオレドキシシンファミリーのポリペプチドとマクロファージ遊走阻止因子の結合を増強する組成物。
- [請求項4] 下記（１）乃至（４）から選択される少なくとも一種以上を含み、マクロファージ遊走阻止因子と直接結合する結合物質。
（１）チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチド
（２）チオレドキシシンファミリーに属するポリペプチドのアミノ酸配列のうち、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり且つチオレドキシシンファミリーのポリペプチ

ドと同等の活性を有するタンパク質

(3) (1) をコードする遺伝子

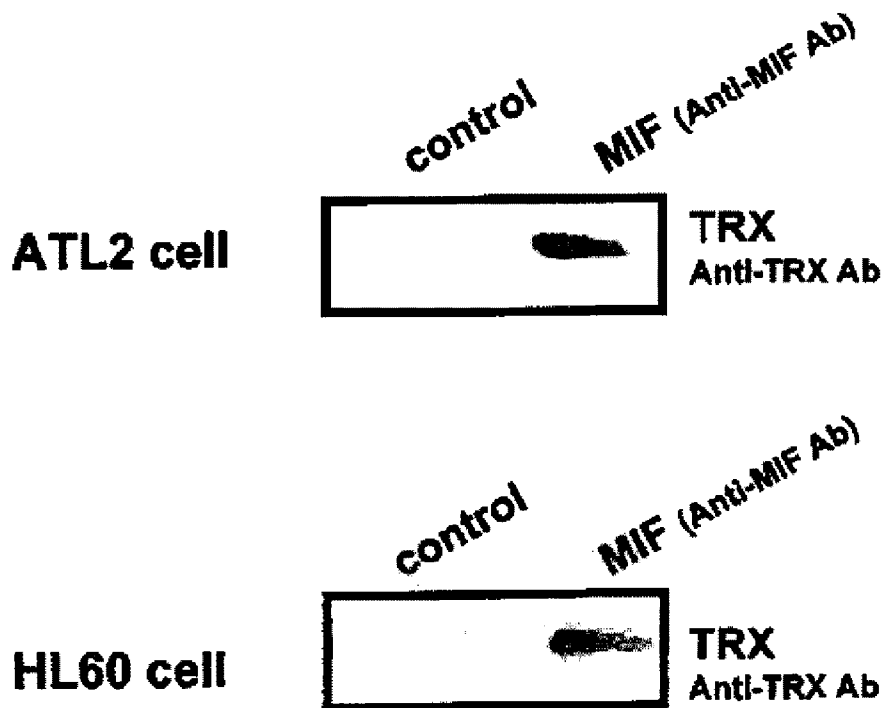
(4) (2) をコードする遺伝子

[請求項5]

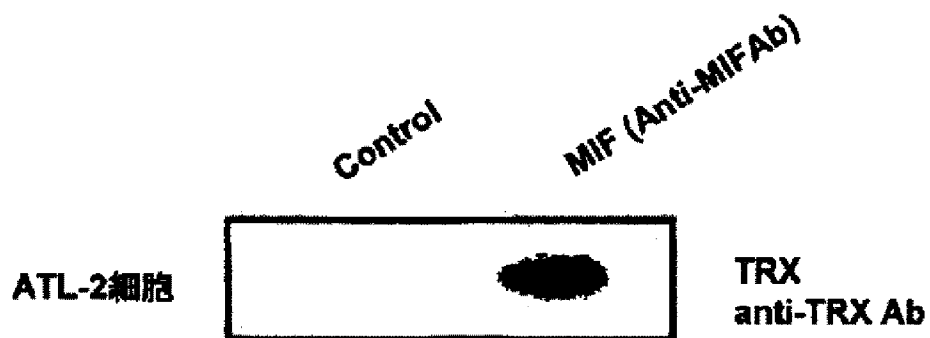
活性中心に $-Cys-Gly-Pro-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Tyr-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-His-Cys-$ 、 $-Cys-Pro-Pro-Cys-$ のいずれかを有するポリペプチドであることを特徴とする請求項4記載の結合物質。

[図1]

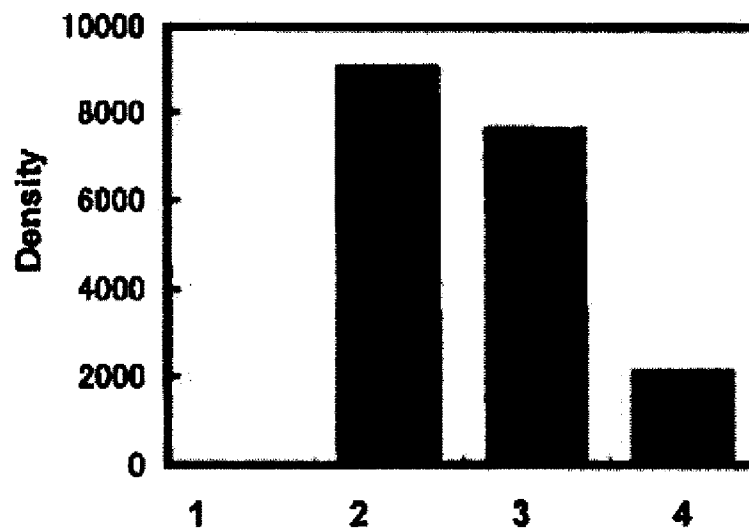
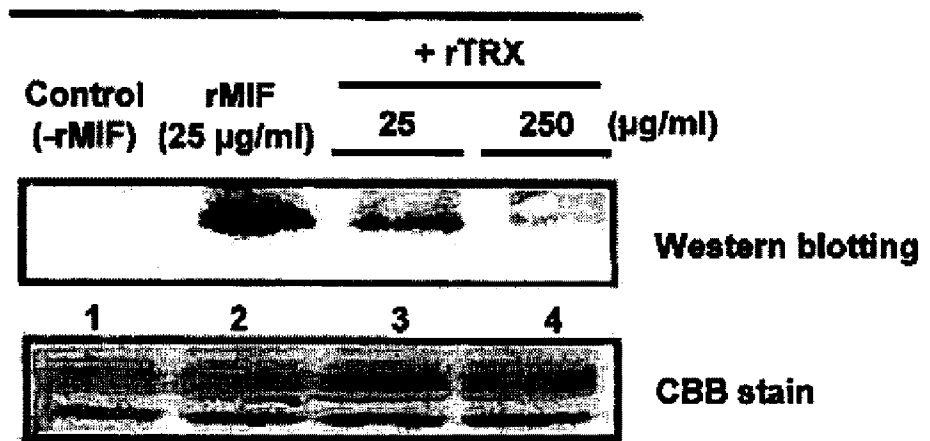
ATL2/HL60細胞内でのTRXとMIF結合確認実験 免疫沈降実験



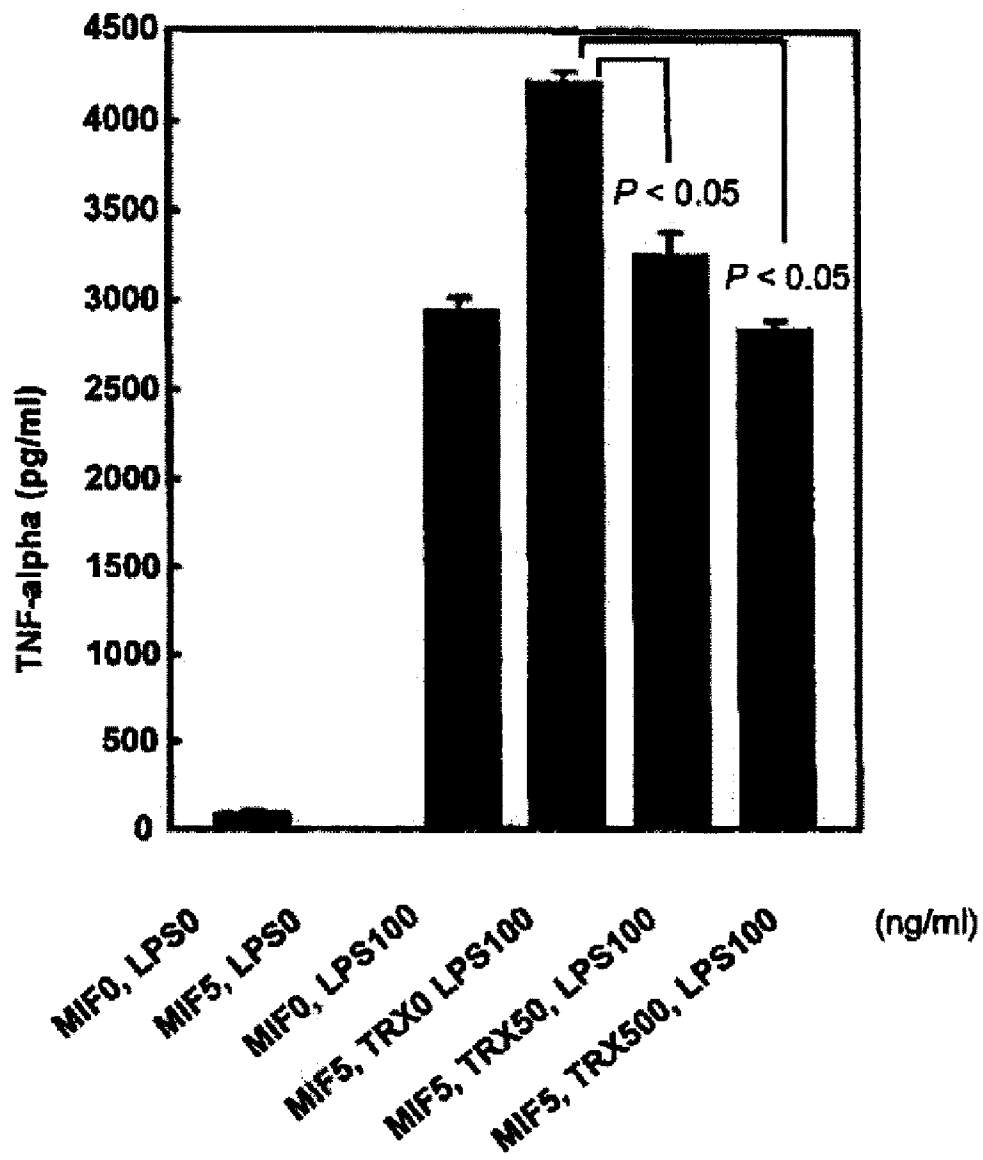
[図2]



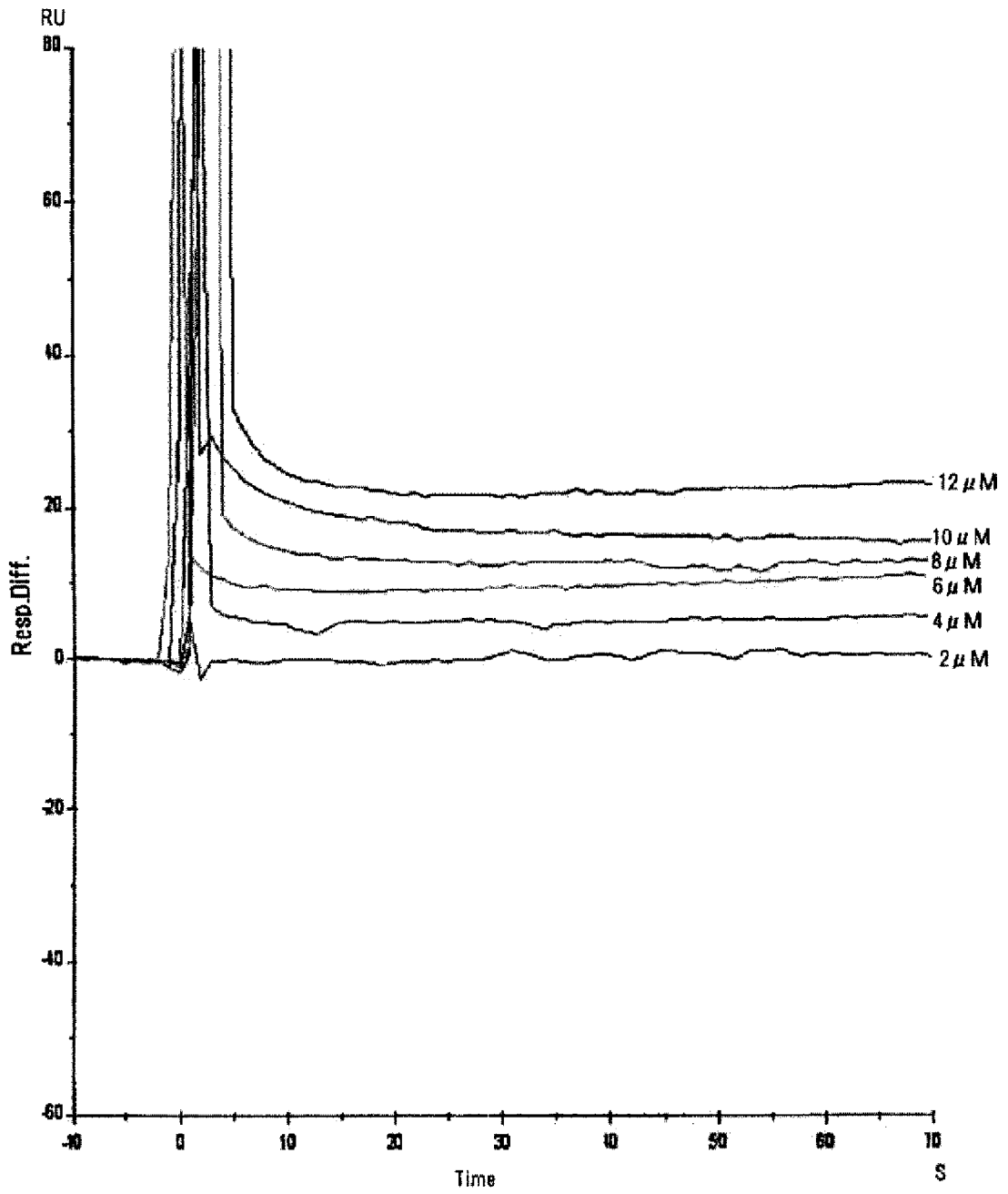
[3]

Western :Anti-His mAb

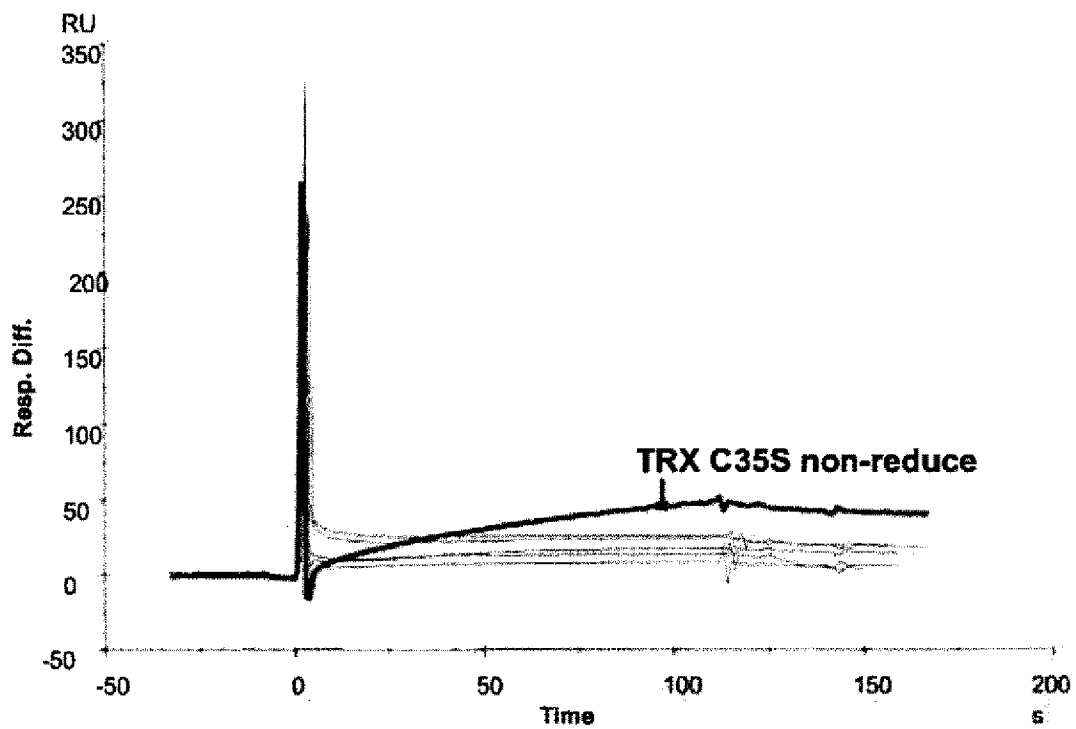
[図4]



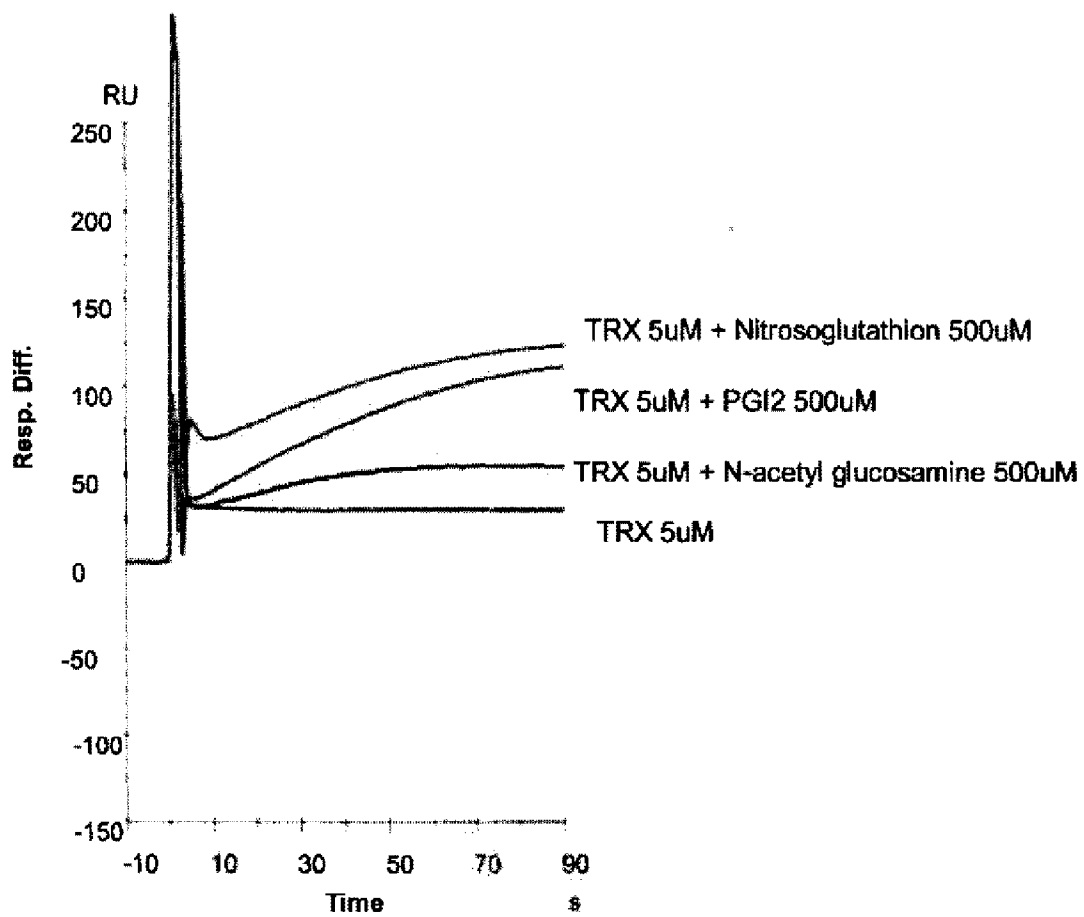
[圖5]



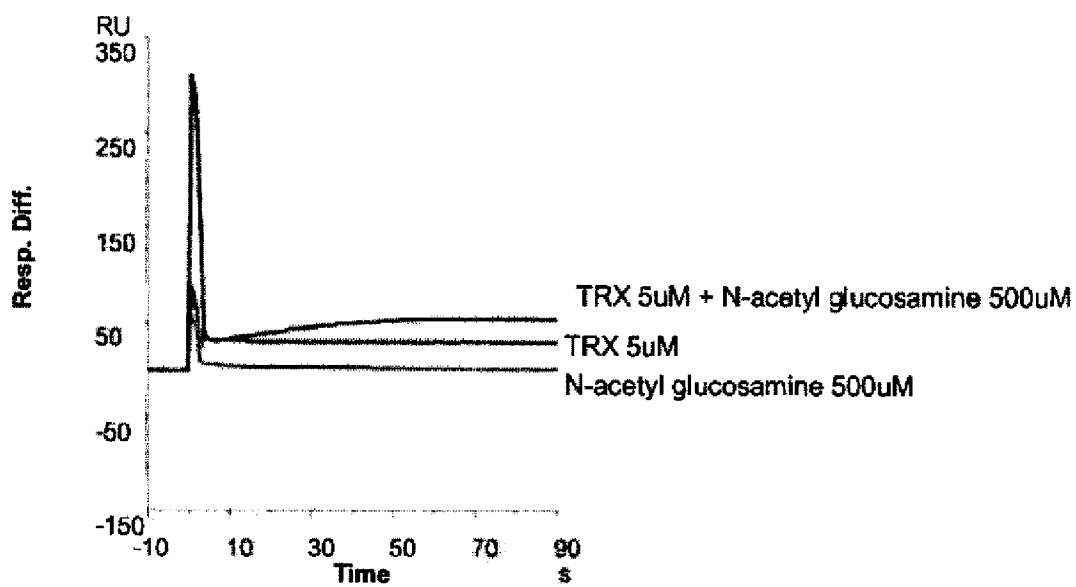
[6]



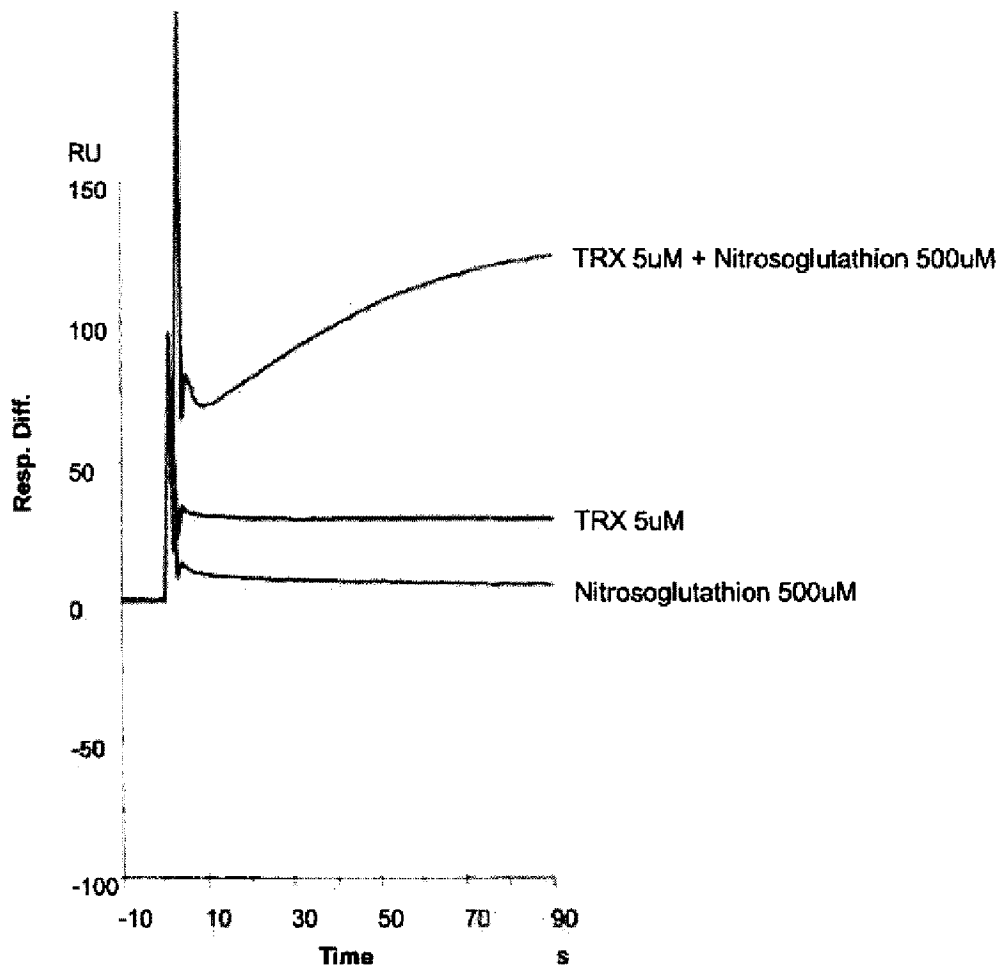
[7]



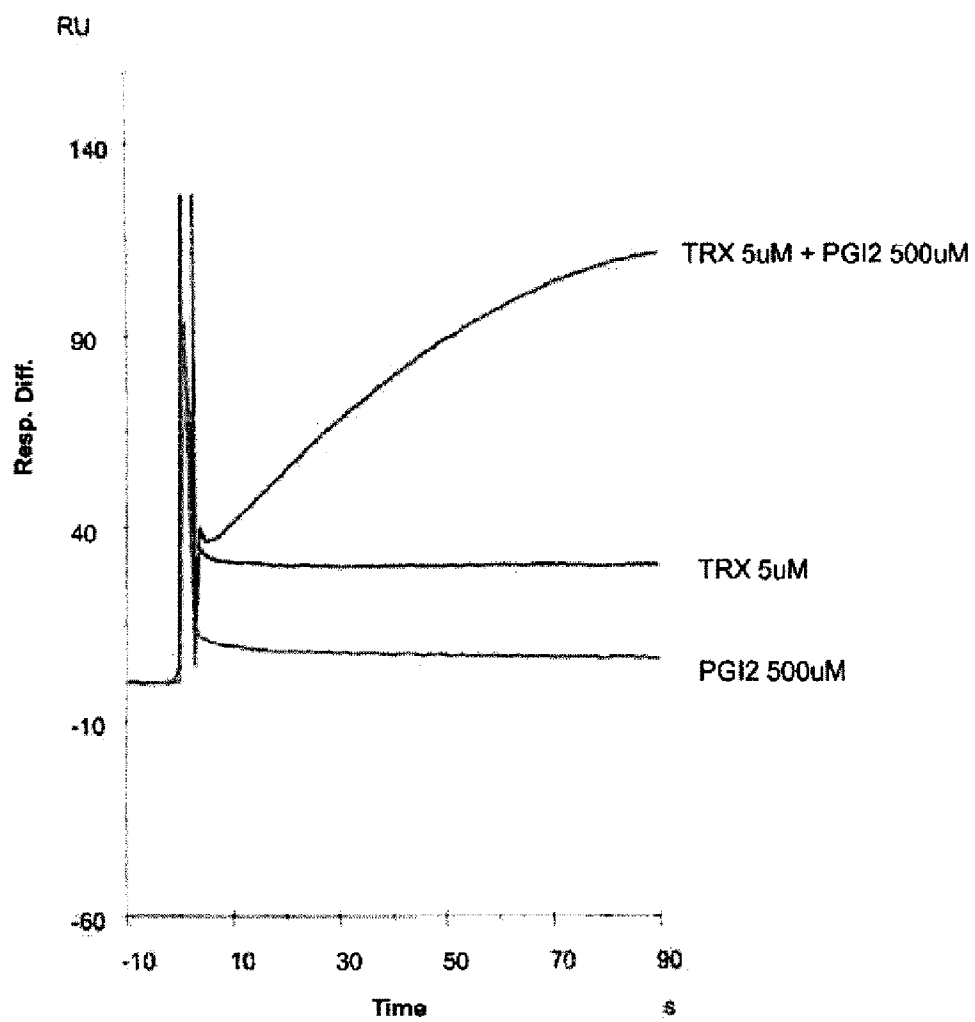
[图8]



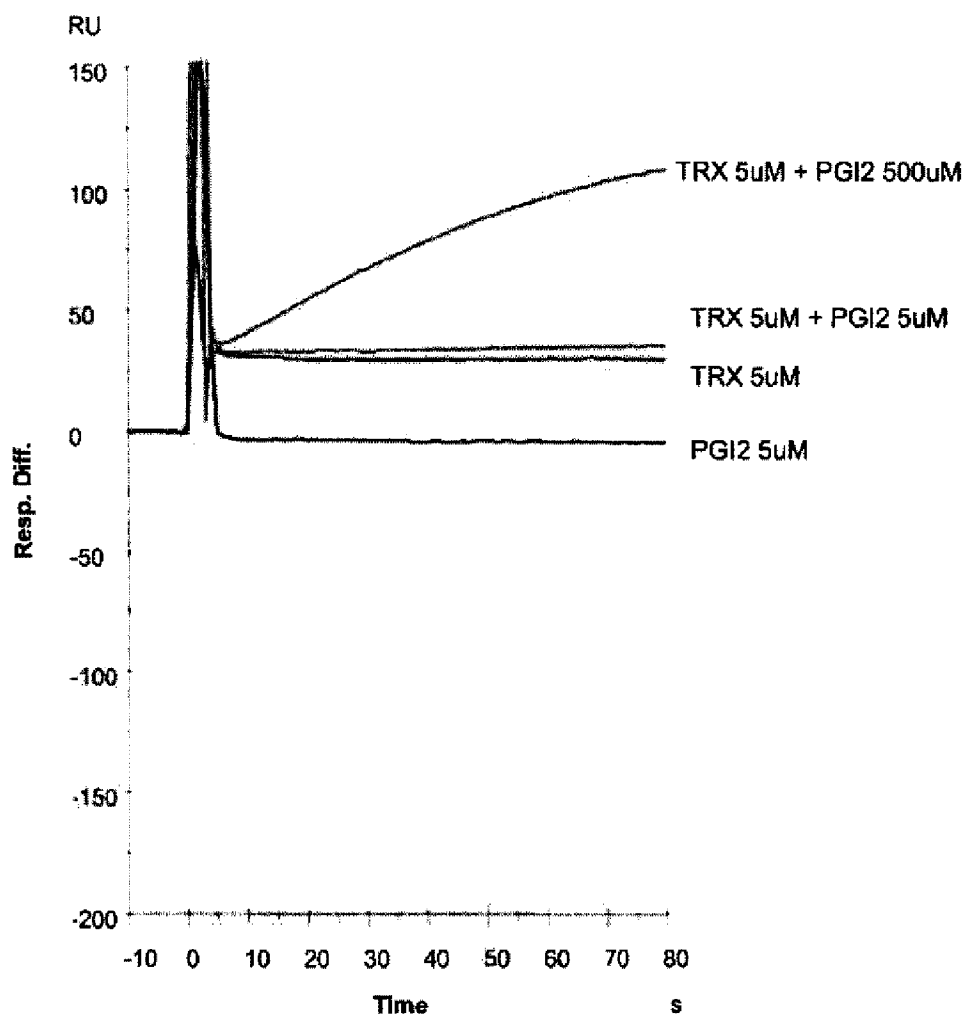
[图9]



[圖10]



[11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069985

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07D307/935(2006.01)i, C07K5/037(2006.01)i,
C07K14/47(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/53(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)

C12N15/09, C07D307/935, C07K5/037, C07K14/47, G01N21/27, G01N33/53

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	KATO N. ET AL, Cell surface thioredoxin (TRX) is involved in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-mediated inflammatory responses., Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 2007, vol.37, page 230(3-C-W36-24-P), lines 1 to 2, 5 to 7	1, 2, 4, 5/3

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
22 December, 2009 (22.12.09)

Date of mailing of the international search report
12 January, 2010 (12.01.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069985

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 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:

In the inventions of claims 1-3, the test substances, which can enhance the binding between a polypeptide belonging to the thioredoxin family and a macrophage migration inhibitory factor, have something in common. In the inventions of claims 4 and 5, the binding substances, each of which can directly bind to a macrophage migration inhibitory factor, have something in common. Therefore, it appears that the common matter among the above-stated inventions is a fact that the inventions somehow relate to macrophage migration inhibitory factors.

(continued to extra sheet)

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/069985

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

However, macrophage migration inhibitory factors are known (Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 2007, vol.37, page 230(3-C-W36-24-P)). Therefore, it cannot be considered that there is any "special technical feature" common to the above-stated inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07D307/935(2006.01)i, C07K5/037(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, G01N21/27(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C07D307/935, C07K5/037, C07K14/47, G01N21/27, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(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 請求項の番号
X/A	KATO N. ET AL, Cell surface thioredoxin (TRX) is involved in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-mediated inflammatory responses., 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2007, Vol.37, p.230(3-C-W36-24-P), 第1-2, 5-7 行目参照	1, 2, 4, 5/3

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、一般的な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 22.12.2009	国際調査報告の発送日 12.01.2010		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司	4B	3534
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. 請求項 _____ 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、
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PCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1-3に記載される発明群は、チオレドキシシンファミリーのポリペプチドとマクロフェージ遊走阻止因子の結合を増強する試験物質に何らかの共通点を有するものであり、請求項4,5に記載される発明群は、マクロフェージ遊走阻止因子と直接結合する結合物質に何らかの共通点を有するものであるから、これらの発明群はマクロフェージ遊走阻止因子に何らかの関係を有する点で共通しているといえる。

しかしながら、マクロフェージ遊走阻止因子は公知（日本免疫学会総会・学術集会記録，2007, Vol. 37, p. 230(3-C-W36-24-P)）であるから、これらの発明群に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求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ため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。