(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年12 月31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/000345 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 38/17, 31/7088, 39/395, 45/00, 48/00, A61P 19/00, 19/02, 29/00, 43/00 // C12N 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007741

(22) 国際出願日: 2003 年6 月18 日 (18.06.2003)

(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2002-178715 2002 年6 月19 日 (19.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺 辰也 (WATANABE,Tatsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日１丁目７−９−１１０２ Ibaraki (JP). 稲塚 雅一 (INAZUKA,Masakazu) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代３丁目１２−１−４０８ Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI,Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町２丁目１７番８５号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

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

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/000345 A1

(54) Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR BONE AND JOINT DISEASES

(54) 発明の名称: 骨・関節疾患の予防・治療剤

(57) Abstract: A compound or its salt inhibiting the activity of a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, an antibody against the above protein, an antisense nucleotide having a base sequence which is complementary or substantially complementary to the base sequence of a DNA encoding the above protein or its peptide fragment, etc. are usable as preventives/remedies for bone and joint diseases.

(57) 要約: 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスヌクレオチドなどは、骨・関節疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

明 細 書

骨・関節疾患の予防・治療剤

技術分野

本発明は、骨・関節疾患の予防・治療剤および診断薬などに関する。

背景技術

関節は骨と骨が接して動く部分をいい、この部分の骨は動きをスムーズにするために関節軟骨でおおわれている。また、関節の中では滑膜でつくられた関節液が、関節軟骨とともにはたらくことで摩擦を少なくし潤滑液となって軽快に動くことを可能にしている。変形性関節症は、慢性の関節炎を伴う関節疾患で、軟骨の退行変性により、軟骨の破壊と骨や軟骨の増殖性変化を来たす病気である。骨端に骨棘形成するなどの関節の変形も認められる。変形性関節症は年令とともに増加し、60才以上になると膝、肘、股関節や脊椎では、80％以上が変形性関節症の症状を呈すると言われている。変形性関節症の治療は痛みを抑制する対処療法が中心であり、非ステロイド性消炎鎮痛剤や関節に直接注射するヒアルロン酸やステロイド剤などが使用される。進行した場合は関節鏡視下手術、痛みや変形が強い場合、膝や股関節において骨切り術や人工関節置換などの手術が適応される。しかし、人工関節には寿命があるため55才迄はこの手術を避けることが好ましいと考えられ、関節の退行性変化を抑制する治療法の開発が望まれている。さらに、変形性関節症はX腺撮影などの装置による診断法しかなく、より簡便な診断法の開発も望まれている。

遺伝子発現を網羅的に解析するために、cDNAまたはオリゴヌクレオチドを固定化したマイクロアレイ法が開発され、疾患特異的な遺伝子発現の変化を見出す技術が普及し、その有用性が確認されている。例えば、Affymetrix社のGeneChipシステムは癌などの疾患の診断や創薬標的遺伝子の発見に多用されつつある。

変形性関節症患者の関節で特異的に発現している遺伝子やタンパク質を見出し、

そこから変形性関節症の治療薬や診断薬を創出する試みが行われている。例えば、MMP-13などのマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）は変形性関節症の関節で発現が上昇していることが知られており、MMP阻害剤を関節破壊抑制薬として検討されている。

KIAA1077は、ウズラ胚発生プロセスにおいてShhシグナルに誘導される遺伝子として同定されたQsurf1のヒト相同遺伝子である（Science, 289巻, 265-270頁, 2000年）。そのアミノ酸配列からKIAA1077は硫酸エステル加水分解酵素であることが推測され、また遺伝子導入細胞の研究から、Wntシグナルの伝達に関与することが示されている（Science, 289巻, 265-270頁, 2000年）。しかしながら、KIAA1077と変形性関節症との関連についての報告はない。

安全で優れた骨・関節疾患の予防・治療剤が求められている。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、変形性関節症軟骨に発現が顕著に増加する遺伝子を見出し、この知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（1） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（2） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（3） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスヌクレオチドを含有してなる骨・関節疾患の予防・治療

剤、

（4） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（5） 骨・関節疾患が、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害である上記（1）、（2）、（3）または（4）記載の予防・治療剤、

（6） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる骨・関節疾患の診断薬、

（7） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる骨・関節疾患の診断薬、

（8） 骨・関節疾患が、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害である上記（6）または（7）記載の診断薬、

（9） 硫酸エステル加水分解酵素活性阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（10） 硫酸エステル加水分解酵素発現阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（11） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法、

（11a） 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

（11b） 医薬用化合物が、骨・関節疾患の予防・治療用の化合物、骨・関節疾患の予防・治療に用いられる化合物および／または骨・関節疾患の予防・治療

効果を有する化合物である上記（１１ａ）記載のスクリーニング方法、

（１２） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

（１２ａ） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

（１２ｂ） 医薬用化合物が、骨・関節疾患の予防・治療用の化合物、骨・関節疾患の予防・治療に用いられる化合物および／または骨・関節疾患の予防・治療効果を有する化合物である上記（１２ａ）記載のスクリーニング用キット、

（１３） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法、

（１３ａ） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング方法、

（１３ｂ） 医薬用化合物が、骨・関節疾患の予防・治療用の化合物、骨・関節疾患の予防・治療に用いられる化合物および／または骨・関節疾患の予防・治療効果を有する化合物である上記（１３ａ）記載のスクリーニング方法、

（１４） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット、

（１４ａ） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする医薬用化合物のスクリーニング用キット、

（１４ｂ） 医薬用化合物が、骨・関節疾患の予防・治療用の化合物、骨・関節疾患の予防・治療に用いられる化合物および／または骨・関節疾患の予防・治療効果を有する化合物である上記（１４ａ）記載のスクリーニング用キット、

（１５） 上記（１１）もしくは（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１２）もしくは（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（１５ａ） 上記（１１ａ）もしくは（１３ａ）記載のスクリーニング方法または上記（１２ａ）もしくは（１４ａ）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる医薬用化合物またはその塩、

（１５ｂ） 医薬用化合物が、骨・関節疾患の予防・治療用の化合物、骨・関節疾患の予防・治療に用いられる化合物および／または骨・関節疾患の予防・治療効果を有する化合物である上記（１５ａ）記載の化合物またはその塩、

（１５ｃ） 上記（１５ａ）または（１５ｂ）記載の化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤、

（１６） 哺乳動物に対して、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療方法、

（１７） 配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療方法、

（１８） 骨・関節疾患の予防・治療剤を製造するための、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用などを提供する。

図面の簡単な説明

図１は、KIAA1077遺伝子の強制発現によるATDC5細胞の増殖抑制結果を示す。図中、縦軸はウェル当たりのATP含量を反映した化学発光強度を、横軸はトランスフェクション後の日数をそれぞれ示す。－○－はコントロール細胞を、－●－はKIAA1077導入細胞をそれぞれ示す。ｎ＝２。バーは最大値および最小値を示す。

図２は、KIAA1077遺伝子の強制発現によるATDC5細胞のアグリカン発現抑制結果を示す。図中、縦軸は20ngのtotal RNA に含まれるアグリカン遺伝子由来メッセンジャーRNAの量を反映した蛍光強度を、横軸はトランスフェクション後の日数をそれぞれ示す。□はコントロール細胞を、■はKIAA1077導入細胞をそれぞれ示す。ｎ＝３。バーは標準偏差値を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、

子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、さらに好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、硫酸エステル加水分解活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、硫酸エステル加水分解活性が同等（例、約０．０１～１００倍、好ましくは約０．１～１０倍、より好ましくは０．５～２倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

硫酸エステル加水分解活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができる。例えばJ.Inher.Metab.Dis., 16巻, 935-941頁, 1993年に記載の方法またはそれに準じる方法に従い、蛍光基質4-methyl umbelliferyl α-N-アセチルグルコサミン-6-硫酸を用いて行うことができる。または、適当な基質を用いて、その硫酸エステル加水分解反応産物をMorgan-Elson反応を利用して定量することにより、硫酸エステル加水分解活性を測定することもできる。

例えば、KIAA1077 cDNA挿入プラスミドを導入してKIAA1077タンパク質を高発現させた細胞を培養後、回収し、細胞破砕物を調製する。該細胞破砕物および基質を混合し、保温した後、Morgan-Elson反応を行い、得られた反応液中のA_{585}（585nmにおける吸収）の増加を測定することにより、硫酸エステル加水分解活性を測定する。

基質としては、例えば糖の硫酸エステル〔例、chondroitin disaccharide Δdi-6S、chondroitin disaccharide Δdi-4S、硫酸化グリコサミノグリカン（例、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸など）またはその分解物など〕などが用いられる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、①配列番号：１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表されるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：１で表されるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、Ｃ末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるＲとしては、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}ア

ルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

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

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

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質（KIAA1077）などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

具体的には、後述する本発明の抗体を調製する目的には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列において第２３番目～第３３番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどがあげられる。例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも２０個以上、好ましくは５０個以上、さらに好ましくは７０個以上、より好ましくは１００個以上、最も好ましくは２００個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のア

ミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～１０個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは１～５個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはＣ末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（$-COO^-$）、アミド（$-CONH_2$）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、Ｃ末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、Ｎ末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

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

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法に

よって製造することもできるし、タンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

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

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

化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N，N－ジメチルホルムアミド，N，N－ジメチルアセトアミド，N－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン，クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

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

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

シカルボニルヒドラジド化、ｔ－ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

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

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

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

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

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Ｐｄ－黒あるいはＰｄ－炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約－２０℃～４０℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスル

フィド、１，４－ブタンジチオール、１，２－エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2，４－ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の１，２－エタンジチオール、１，４－ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

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

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

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

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼ

で切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはＤＮＡである。ＤＮＡとしては、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalＲＮＡまたはｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接 Reverse

Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ－ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡ、または配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするＤＮＡであれば何れのものでもよい。

配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表される塩基配列と約５０％以上、好ましくは約６０％以上、さらに好ましくは約７０％以上、より好ましくは約８０％以上、特に好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

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

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０ｍＭ、好ましくは約１９～２０ｍＭで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９ｍＭで温度が約６５℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよく、ＤＮＡが好ましい。ＤＮＡとしては、ゲノ

ムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、前記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡの一部分を含有するＤＮＡ、または配列番号：２で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡの一部分を含有するＤＮＡなどが用いられる。

配列番号：２で表される塩基配列とハイブリダイズできるＤＮＡは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするＤＮＡのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成ＤＮＡプライマーを用いてＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、ＰＣＲ、公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することが

できる。該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

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

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、ＣＭＶ（サイトメガロウィルス）プロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｒｅｃＡプロモーター、λP_Lプロモーター、ｌｐｐプロモーター、Ｔ７プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、Ｐ１０プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシ

グナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、ＳＶ４０複製オリジン（以下、ＳＶ４０ｏｒｉと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、ｄｈｆｒと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（ＭＴＸ）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Ａｍｐ^{r}と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ｎｅｏ^{r}と略称する場合がある、Ｇ４１８耐性）等が挙げられる。特に、ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてｄｈｆｒ遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のＮ端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、ＭＦα・シグナル配列、ＳＵＣ２・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

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

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）Ｋ１２・ＤＨ１〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)〕，ＪＭ１０３〔Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)〕，ＪＡ２２１〔Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)〕，ＨＢ１０１〔Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)〕，Ｃ６００〔Genetics, 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス（Bacillus subtilis）ＭＩ１１４〔Gene, 24巻, 255(1983)〕，２０７－２１〔Journal of

Biochemistry,95巻,87(1984)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）ＡＨ２２，ＡＨ２２Ｒ⁻，ＮＡ８７－１１Ａ，ＤＫＤ－５Ｄ，２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピキア パストリス（Pichia pastoris）ＫＭ７１などが用いられる。

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

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、Nature,315巻,592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７，Ｖｅｒｏ，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記），ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ⁻）細胞と略記），マウスＬ細胞，マウスＡｔＴ－２０，マウスミエローマ細胞，ラットＧＨ３，ヒトＦＬ細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,69巻,2110(1972)やGene,17巻,107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics,168巻,111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology,194巻,182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,75巻,1929(1978)などに記載の方法に

従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology,6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８　新細胞工学実験プロトコール. 263-267(1995)（秀潤社発行）、Virology,52巻,456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci.

USA,77巻,4505(1980)〕や０．５％カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,81巻,5330(1984)〕が挙げられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養は通常約２０～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature,195,788(1962)) に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔Science,122巻,501(1952)〕，ＤＭＥＭ培地〔Virology,8巻,396(1959)〕，ＲＰＭＩ １６４０培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻,519(1967)〕，１９９培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine,73巻,1(1950)〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンＸ－１００™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

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

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

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

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０、ＡＰ－１などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくはＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、２０～４０℃、好ましくは３０～３７℃で１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物

質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ １６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（ｂ）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインＡあるいはプロテインＧなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製

造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

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

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

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするＤＮＡ（以下、アンチセンスヌクレオチドの説明においては、これらのＤＮＡを本発明のＤＮＡと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のＤＮＡの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を含有し、該ＤＮＡの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスヌクレオチドであっても

よいが、アンチセンスＤＮＡが好ましい。

本発明のＤＮＡに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のＤＮＡに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のＤＮＡの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のＤＮＡの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のＮ末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが、（ロ）ＲＮａｓｅＨによるＲＮＡ分解を指向するアンチセンスヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のＤＮＡの全塩基配列の相補鎖と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を含有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を含有するアンチセンスヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を含有するアンチセンスヌクレオチド）が挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、１０～４０個程度、好ましくは１５～３０個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスＤＮＡを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、２’－Ｏ－メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、

塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：２で表される塩基配列を含有するＤＮＡにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のＤＮＡ合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするＤＮＡ（以下、本発明のＤＮＡと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のＤＮＡのアンチセンスヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

本発明のタンパク質は、変形性関節症軟骨で発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、変形性関節症軟骨における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。よって、本発明のタンパク質をコードする遺伝子のアンチセンスヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

（１）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は変形性関節症軟骨で発現が増加し、軟骨細胞および軟骨前駆細胞増殖抑制作用を有するので、本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、硫酸エステル加水分解活性など）を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、例えば、（i）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の硫酸エステル加水分解活性と、（ii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の硫酸エステル加水分解活性を比較することを特徴する本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合において、細胞を培養後、細胞を回収し、細胞破砕物を調製する。該細胞破砕物および基質を混合し、保温した後、Morgan-Elson反応を行い、得られた反応液中のA_{585}（585nmにおける吸収）の増加を測定し、比較する。

基質としては、例えば糖の硫酸エステル〔例、chondroitin disaccharide Δdi-6S、chondroitin disaccharide Δdi-4S、硫酸化グリコサミノグリカン（例、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸など）またはその分解物など〕などが用いられる。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするＤＮＡを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、ＣＨＯ細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげら

れる。

例えば、上記（ii）の場合における硫酸エステル加水分解活性を、上記（i）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上上昇させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物として、上記（ii）の場合における硫酸エステル加水分解活性を、上記（i）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上減少させる試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のタンパク質の活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の作用を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬、例えば骨・関節疾患の予防・治療剤などとして有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質をコードする遺伝子も、変形性関節症軟骨において発現が増加し、軟骨細胞および軟骨前駆細胞増殖抑制作用を有するので、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩も、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

したがって、本発明のＤＮＡは、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

スクリーニング方法としては、（iii）本発明のタンパク質を産生する能力を

有する細胞を培養した場合と、（iv）試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、（iii）と（iv）の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするｍＲＮＡ量）を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ＥＬＩＳＡ法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

ｍＲＮＡ量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：２で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：２で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるＰＣＲ法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、上記（iv）の場合における遺伝子発現量を、上記（iii）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上上昇させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進する化合物として、約２０％以上、好ましくは３０％以上、より好ましくは約５０％以上阻害（減少）させる試験化合物を、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制（阻害）する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物

組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、硫酸エステル加水分解活性など）を調節する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、それぞれ、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール

（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常５～５００ｍｇ、とりわけ注射剤では５～１００ｍｇ、その他の剤形では１０～２５０ｍｇの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、変形性関節症の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、変形性関節症の治療の目的で本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重６０ｋｇとして）に

投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を関節内注射により投与する。他の動物の場合も、体重６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（２）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（ｉ）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のＮ端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のＣ端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のＦ(ａｂ')$_2$、Ｆａｂ'、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これ

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

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

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

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

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

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

照することができる。

例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加または減少、好ましくは増加が検出された場合、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

（３）遺伝子診断薬

本発明のＤＮＡは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該ＤＮＡまたはｍＲＮＡの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のＤＮＡを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやＰＣＲ－ＳＳＣＰ法（Genomics, 第5巻, 874～879頁(1989年)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766～2770頁(1989年)）などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多または減少が検出された場合やＰＣＲ－ＳＳＣＰ法によりＤＮＡの突然変異が検出された場合は、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患である可能性が高いと診断することができる。

（4）アンチセンスヌクレオチドを含有する医薬

本発明のＤＮＡに相補的に結合し、該ＤＮＡの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のＤＮＡの活性・機能（例、硫酸エステル加水分解活性）を抑制することができるので、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

上記アンチセンスヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下または関節腔内等に投与してもよい。

該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、変形性関節症の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇ）においては、一日につき該アンチセンスヌクレオチドを約０．１～１００ｍｇ投与する。

さらに、該アンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のＤＮＡの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするＲＮＡの一部を含有する二重鎖ＲＮＡ、本発明のタンパク質をコードするＲＮＡの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるＤＮＡの機能を抑制することができるので、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤などとして使用することができる。

二重鎖ＲＮＡは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、

本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするＲＮＡの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするＲＮＡの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のＲＮＡ上の切断部位に近接した部分（ＲＮＡ断片）が挙げられる。

上記の二重鎖ＲＮＡまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

（５）本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、関節内投与）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の変形性関節症の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を１回量として、通常０．０１～２０ｍｇ／ｋｇ体重程度、好ましくは０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重程度、さらに好ましくは０．１～５ｍｇ／ｋｇ体重程度を、１月１～１０回程度、好ましくは１月１～３回程度、関節内注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許

容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、関節内投与）に適する剤形として提供される。好ましくは吸入剤として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

（6）本発明の「硫酸エステル加水分解酵素活性調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤」および「硫酸エステル加水分解酵素発現調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤」について

該「硫酸エステル加水分解酵素活性調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物」は、硫酸エステル加水分解酵素活性調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として用いられる。

該「硫酸エステル加水分解酵素体発現調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物」は、硫酸エステル加水分解酵素発現調節（好ましくは阻害）作用を有する化合物であればいかなるものでもよく、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として用いられる。

該予防・治療剤は、上記と同様にして製造される。

（7）ＤＮＡ転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするＤＮＡ（以下、本発明の外来性ＤＮＡと略記する）またはその変異ＤＮＡ（本発明の外来性変異ＤＮＡと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

（1）本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物、

（2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）記載の動物、

（3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第（2）記載の動物、および

（4）本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性ＤＮＡまたはその変異ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のＤＮＡ転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に８細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、ＤＥＡＥ－デキストラン法などにより目的とするＤＮＡを転移することによって作出することができる。また、該ＤＮＡ転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性ＤＮＡを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のＤＮＡ転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、Ｃ５７ＢＬ／６系統，ＤＢＡ２系統など、交雑系として、Ｂ６Ｃ３$Ｆ_1$系統，ＢＤ$Ｆ_1$系統，Ｂ６Ｄ２$Ｆ_1$系統，ＢＡＬＢ／ｃ系統，ＩＣＲ系統など）またはラット（例えば、Ｗｉｓｔａｒ，ＳＤなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性ＤＮＡとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のＤＮＡではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のＤＮＡをいう。

本発明の変異ＤＮＡとしては、元の本発明のＤＮＡの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたＤＮＡなどが用いられ、また、異常ＤＮＡも含まれる。

該異常ＤＮＡとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるＤＮＡを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるＤＮＡなどが用いられる。

本発明の外来性ＤＮＡは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のＤＮＡを対象動物に転移させるにあたっては、該ＤＮＡを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したＤＮＡコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトＤＮＡを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のＤＮＡを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のＤＮＡを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトＤＮＡを結合したＤＮＡコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のＤＮＡを高発現するＤＮＡ転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはバキュロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のＤＮＡ発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、ＪＣウィルス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するＤＮＡのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンＩＩ、ウロプラキンＩＩ、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋ク

レアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンＫ１，Ｋ１０およびＫ１４、コラーゲンＩ型およびＩＩ型、サイクリックＡＭＰ依存タンパク質キナーゼβＩサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にＴｉｅ２と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン３リン酸化酵素（Ｎａ，Ｋ－ＡＴＰａｓｅ）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインＩおよびＩＩＡ、メタロプロティナーゼ１組織インヒビター、ＭＨＣクラスＩ抗原（Ｈ－２Ｌ）、Ｈ－ｒａｓ、レニン、ドーパミンβ－水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（ＴＰＯ）、ペプチド鎖延長因子1α（ＥＦ－１α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖１および２、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Ｔｈｙ－１、免疫グロブリン、Ｈ鎖可変部（ＶＮＰ）、血清アミロイドＰコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンＣ、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンＡ、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウィルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子１α（ＥＦ－１α）のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、ＤＮＡ転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーＲＮＡの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各ＤＮＡの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのＳＶ４０ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性ＤＮＡをさらに高発現させる目的で各ＤＮＡのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核ＤＮＡのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝

臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ＤＮＡおよび市販の各種ゲノムＤＮＡライブラリーよりゲノムＤＮＡの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ＲＮＡより公知の方法により調製された相補ＤＮＡを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常ＤＮＡは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるＤＮＡコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のＤＮＡ工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性ＤＮＡが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性ＤＮＡを保持することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性ＤＮＡを有する。

本発明の外来性正常ＤＮＡを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性ＤＮＡを安定に保持することを確認して、該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性ＤＮＡが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性ＤＮＡを過剰に有することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性ＤＮＡを過剰に有する。

導入ＤＮＡを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常ＤＮＡが高発現

させられており、内在性の正常ＤＮＡの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常ＤＮＡ転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常ＤＮＡを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性ＤＮＡを安定に保持することを確認して該ＤＮＡ保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来ＤＮＡを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのＤＮＡコンストラクトは、通常のＤＮＡ工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常ＤＮＡの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。ＤＮＡ転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常ＤＮＡが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常ＤＮＡを有することを意味する。本発明の外来性ＤＮＡを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常ＤＮＡを有する。導入ＤＮＡを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該ＤＮＡを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常ＤＮＡを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常ＤＮＡが高発現させられており、内在性の正常ＤＮＡの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常ＤＮＡ転移動物を用いて、本

発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常ＤＮＡ高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常ＤＮＡを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記２種類の本発明のＤＮＡ転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のＤＮＡ転移動物の組織中のＤＮＡもしくはＲＮＡを直接分析するか、またはＤＮＡにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

③ＤＮＡを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のＤＮＡ転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のＤＮＡ転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したＤＮＡ転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のＤＮＡ転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のＤＮＡ転移動物または本発明の外来性ＤＮＡ発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のＤＮＡ治療法を検討、開発することが可能である。

（９）ノックアウト動物

本発明は、本発明のＤＮＡが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

（１）本発明のＤＮＡが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

（２）該ＤＮＡがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（１）項記載の胚幹細胞、

（３）ネオマイシン耐性である第（１）項記載の胚幹細胞、

（４）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（１）項記載の胚幹細胞、

（５）ゲッ歯動物がマウスである第（４）項記載の胚幹細胞、

（６）本発明のＤＮＡが不活性化された該ＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物、

（７）該ＤＮＡがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のＤＮＡに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（６）項記載の非ヒト哺乳動物、

（８）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（６）項記載の非ヒト哺乳動物、

（９）ゲッ歯動物がマウスである第（８）項記載の非ヒト哺乳動物、および（１０）第（７）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のＤＮＡが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のＤＮＡに人為的に変異を加えることにより、ＤＮＡの発現能を抑制するか、もしくは該ＤＮＡがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、ＤＮＡが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトＤＮＡと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ＥＳ細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のＤＮＡに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該ＤＮＡ配列の一部又は全部の削除、他ＤＮＡを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトＤＮＡを作製すればよい。

本発明のＤＮＡが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のＤＮＡ不活性化ＥＳ細胞または本発明のノックアウトＥＳ細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のＤＮＡを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはｌａｃＺ（β－ガラクトシダーゼ遺伝子）、ｃａｔ（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるＤＮＡ配列（例えば、ｐｏｌｙＡ付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーＲＮＡを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したＤＮＡ配列を有するＤＮＡ鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたＥＳ細胞について

本発明のＤＮＡ上あるいはその近傍のＤＮＡ配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のＤＮＡ配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のＤＮＡ以外の近傍領域のＤＮＡ配列をプライマーとしたＰＣＲ法により解析し、本発明のノックアウトＥＳ細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のＤＮＡを不活化させる元のＥＳ細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのＥＳ細胞の場合、現在、一般的には１２９系のＥＳ細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなＥＳ細胞を取得するなどの目的で例えば、Ｃ５７ＢＬ／６マウスやＣ５７ＢＬ／６の採卵数の少なさをＤＢＡ／２との交雑により改善したＢＤＦ$_1$マウス（Ｃ５７ＢＬ／６とＤＢＡ／２とのＦ$_1$）を用いて樹立したものなども良好に用いうる。ＢＤＦ$_1$マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、Ｃ５７ＢＬ／６マウスを背景に持つので、これを用いて得られたＥＳ細胞は病態モデルマウスを作出したとき、Ｃ５７ＢＬ／６マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をＣ５７ＢＬ／６マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ＥＳ細胞を樹立する場合、一般には受精後３．５日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に８細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのＥＳ細胞を用いてもよいが、通常雄のＥＳ細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ＥＳ細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、ＰＣＲ法によりＹ染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その１例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10^6個の細胞数を要していたのに対して、１コロニー程度のＥＳ細胞数（約５０個）で済むので、培養初

期におけるＥＳ細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、Ｇ－バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるＥＳ細胞の染色体数は正常数の１００％が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ＥＳ細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が２ｎ＝４０である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、ＳＴＯ繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5％炭酸ガス、95％空気または5％酸素、5％炭酸ガス、90％空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5％トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1％トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ＥＳ細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature、第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のＥＳ細胞を分化させて得られる本発明のＤＮＡ発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のｍＲＮＡ量を公知方法を

用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のＤＮＡが不活性化されたＤＮＡ配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のＤＮＡと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のＤＮＡをノックアウトさせることができる。

本発明のＤＮＡがノックアウトされた細胞は、本発明のＤＮＡ上またはその近傍のＤＮＡ配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のＤＮＡ配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のＤＮＡ以外の近傍領域のＤＮＡ配列とをプライマーとしたＰＣＲ法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のＤＮＡが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、８細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のＤＮＡ座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のＤＮＡ座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のＤＮＡ座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のＤＮＡ座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でＤＮＡ溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入

したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のＤＮＡ座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のＤＮＡがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該ＤＮＡがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化ＤＮＡの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化ＤＮＡを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体１，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化ＤＮＡを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のＤＮＡが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

（９ａ）本発明のＤＮＡの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のＤＮＡの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のＤＮＡの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の関節や軟骨などを経時的に観察し、上記疾患の症状を観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約１０％以上、好ましくは約３０％以上、より好ましくは約５０％以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物

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

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）の変形性関節症患者においては、一日につき該化合物を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重６０ｋｇとして）の変形性関節症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

（９ｂ）本発明のＤＮＡに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のＤＮＡに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のＤＮＡがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のＤＮＡに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β－ガラクトシダーゼ遺伝子（ｌａｃＺ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のＤＮＡをレポーター遺伝子で置換された本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のＤＮＡに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡ領域の一部を大腸菌由来のβ－ガラクトシダーゼ遺伝子（ｌａｃＺ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ－ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－ガラクトピラノシド（Ｘ－ｇａｌ）のようなβ－ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ）で洗浄後、Ｘ－ｇａｌを含む染色液で、室温または３７℃付近で、約３０分ないし１時間反応させた後、組織標本を１ｍＭ ＥＤＴＡ／ＰＢＳ溶液で洗浄することによって、β－ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、ｌａｃＺをコードするｍＲＮＡを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性

を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の調節、該タンパク質の機能を調節することができるので、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘など）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）の変形性関節症患者においては、一日につき該化合物を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のＤＮＡに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注

射剤の形で通常成人（体重６０ｋｇとして）の変形性関節症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重６０ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のＤＮＡ発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のＤＮＡに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のＤＮＡ発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するＤＮＡを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

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

ＤＮＡ　：デオキシリボ核酸
ｃＤＮＡ　：相補的デオキシリボ核酸
Ａ　：アデニン
Ｔ　：チミン
Ｇ　：グアニン
Ｃ　：シトシン

RNA ：リボ核酸
mRNA ：メッセンジャーリボ核酸
dATP ：デオキシアデノシン三リン酸
dTTP ：デオキシチミジン三リン酸
dGTP ：デオキシグアノシン三リン酸
dCTP ：デオキシシチジン三リン酸
ATP ：アデノシン三リン酸
EDTA ：エチレンジアミン四酢酸
SDS ：ドデシル硫酸ナトリウム
Gly ：グリシン
Ala ：アラニン
Val ：バリン
Leu ：ロイシン
Ile ：イソロイシン
Ser ：セリン
Thr ：スレオニン
Cys ：システイン
Met ：メチオニン
Glu ：グルタミン酸
Asp ：アスパラギン酸
Lys ：リジン
Arg ：アルギニン
His ：ヒスチジン
Phe ：フェニルアラニン
Tyr ：チロシン
Trp ：トリプトファン
Pro ：プロリン
Asn ：アスパラギン

Ｇｌｎ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸
Ｓｅｃ　：セレノシステイン（selenocysteine）

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

Ｍｅ　：メチル基
Ｅｔ　：エチル基
Ｂｕ　：ブチル基
Ｐｈ　：フェニル基
ＴＣ　：チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
Ｔｏｓ　：p-トルエンスルフォニル
ＣＨＯ　：ホルミル
Ｂｚｌ　：ベンジル
Cl_2-Bzl　：2,6-ジクロロベンジル
Ｂｏｍ　：ベンジルオキシメチル
Ｚ　：ベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ　：2-クロロベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ　：2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｂｏｃ　：t-ブトキシカルボニル
ＤＮＰ　：ジニトロフェニル
Ｔｒｔ　：トリチル
Ｂｕｍ　：t-ブトキシメチル
Ｆｍｏｃ　：N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ　：1-ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ　：3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン
ＨＯＮＢ　：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド

ＤＣＣ　　：N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：１〕

KIAA1077タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するKIAA1077タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：３〕

実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：４〕

実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：５〕

実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

実施例２で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

実施例１

変形性関節症軟骨（OA軟骨）で発現亢進している遺伝子群を明らかにするため、OA軟骨（膝関節1例、股関節5例）、正常関節軟骨（膝関節1例、股関節1例）、その他21種類の正常組織（各1例）から抽出されたtotal RNA（表１）を材料とし、oligonucleotide microarray (Human Genome U95A; Affymetrix社）を用いて遺伝子発現解析を行った。

実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書（Expression analysis technical manual）に従った。OA軟骨と正常関節軟骨の遺伝子発現profileを比較した結果、KIAA1077遺伝子がOA軟骨で発現亢進しており、KIAA1077遺伝子の発現量は、解析

した全ての組織中、OA軟骨において最大であった(表2)。

〔表1〕

RNAを抽出した組織	販売元
変形性膝関節症軟骨	Direct Clinical Access 社
変形性股関節症軟骨	Direct Clinical Access 社
正常膝関節軟骨	Direct Clinical Access 社
正常股関節	Direct Clinical Access 社
肋軟骨	BioChain Institute 社
脂肪	BioChain Institute 社
骨格筋	Clontech 社
心臓	Clontech 社
腎臓	Clontech 社
副腎	Clontech 社
肝臓	Clontech 社
膵臓	Clontech 社
脾臓	Clontech 社
気管	Clontech 社
肺	Clontech 社
全脳	Clontech 社
小脳	Clontech 社
甲状腺	Clontech 社
胸腺	Clontech 社
乳腺	Clontech 社
胃	Clontech 社
直腸	BioChain Institute 社
大腸	BioChain Institute 社
子宮	Clontech 社
子宮頸	BioChain Institute 社

〔表２〕

組　織	遺伝子発現量[a]
変形性膝関節症軟骨	3.1[b]
正常膝関節軟骨	ND
正常股関節	ND
肋軟骨	0.3
脂肪	0.7
骨格筋	ND
心臓	ND
脾臓	ND
胸腺	ND
全脳	ND
小脳	ND
気管	ND
肺	ND
副腎	ND
甲状腺	0.5
膵臓	ND
胃	ND
肝臓	ND
直腸	0.5
大腸	0.5
腎臓	ND
乳腺	ND
子宮	0.7
子宮頸	ND

[a]遺伝子発現量は、oligonucleotide microarray で発現が検出された全遺伝子の発現量の中央値を１として標準化した。

[b]平均値を示した（n=6）

ND; not detected

実施例２

（１）KIAA1077の塩基配列、GenBank Accession No. XM_053496に基づき、2種の合成プライマー（配列番号：３および配列番号：４）を設計した。この2種のプライマーを用い、ヒト各種組織由来cDNA（クロンテック社）を鋳型としてPCRを行った。耐熱性DNAポリメラーゼにはStratagene社から購入したPfuTurboを用いた。反応溶液の組成は、PfuTurboの使用説明書に従った。始めに95℃2分の加熱を行い、次に98℃10秒－65℃30秒－72℃3分30秒の増幅過程を35サイクル行い、最後に72℃10分のインキュベーションを行った。脳のcDNAから得られた反応液で、予想される約3kbpのPCR産物が認められた。これらを混合し、Strataprep PCR purification kit（Stratagene社）を用いてPCR増幅産物を精製した。得られた約3kbのDNA断片をpCR-Script cloning kit（Stratagene社）を用いて大腸菌DH5αにクローン化した。得られた大腸菌からプラスミドDNAを単離し、クローニング部位に挿入された約3kbのDNA断片を、蛍光Dye-Terminator法によりその塩基配列を決定した。得られた塩基配列において、PCRで用いた2種のプライマー配列間にKIAA1077遺伝子の塩基配列（GenBank Accession No. XM_053496）を含むオープンリーディングフレーム（配列番号：２）が見出された。配列番号：２で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列が、配列番号：１に示された配列である。

得られたプラスミドpCR-Script-K1077から制限酵素Bam HIおよびNot Iを用いてKIAA1077のcDNAを切り出し、哺乳動物（細胞）系での発現プラスミドであるpcDNA5/TO（Invitrogen社）のBam HIとNot I切断部位に挿入し、発現ベクターpcDNA5/TO-K1077を得た。

（２）マウス軟骨前駆細胞株ATDC5細胞（J. Bone Miner. Res., 12巻, 1174-1188頁, 1997年）を、5×10^4細胞/wellの密度で12穴培養プレートに播種した。翌日、pcDNA5/TO（Invitrogen社）または上記（１）で得られた発現ベクターpcDNA5/TO-K1077を、それぞれ0.7μg DNA/wellの用量にて、ATDC5細胞をトランスフェクションした。トランスフェクション試薬にはGeneJammer transfection

reagent（Stratagene社）を用いた。8時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、10%仔牛血清および100μg/mlカナマイシンを含むDMEM/F-12培地で培養を継続した。トランスフェクションの1、2および3日後に、それぞれ細胞をCell Titer-Glo 緩衝液（Promega社）で溶解し、-80℃に保存した。これらサンプルを解凍し、Cell Titer-Glo基質液（Promega社）と混合した後、化学発光を測定してサンプル内のATP含量を測定し、細胞数の指標とした（J. Immunol. Methods., 160巻, 81-88 頁, 1993年 ）。pcDNA5/TOでトランスフェクションした細胞（コントロール細胞）およびpcDNA5/TO-K1077でトランスフェクションした細胞（KIAA1077導入細胞）の細胞数を比較した結果、トランスフェクション後1日では、well当たりのATP含量は同等であったが、2日および3日後では、KIAA1077発現細胞のwell当たりATP含量が、コントロール細胞より低値を示した（図１）。

このことから、KIAA1077遺伝子の導入により、ATDC5細胞の増殖が抑制されることが示された。

（３）マウス軟骨前駆細胞株ATDC5細胞（J. Bone Miner. Res. ,12巻, 1174-1188頁, 1997年）を5×10^4細胞/wellの密度で12穴培養プレートに播種した。翌日、pcDNA5/TO（Invitrogen社）または上記（１）で得られた発現ベクターpcDNA5/TO-K1077を、それぞれ0.7μg DNA/wellの用量にて、ATDC5細胞をトランスフェクションした。トランスフェクション試薬にはGeneJammer transfection reagent（Stratagene社）を用いた。8時間後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、10%仔牛血清および100μg/mlカナマイシンを含むDMEM/ F-12培地で培養を継続した。1および2日後に、細胞をRLT緩衝液（Qiagen 社）で溶解し、QIAshredder（Qiagen 社）処理した後、-80℃に保存した。このサンプルを解凍し、RNeasy mini kit（Qiagen 社）を用いて細胞由来total RNAを調製した。この際、混在する微量のゲノムDNAを除去するために、カラム上でDnase処理を行うオプションプロトコールに従った。得られたtotal RNAを鋳型として定量的RT-PCRを行い、アグリカン遺伝子の発現量を比較した。Genbank登録の塩基配列gi|6671522| ref| NM_007424を基に、2種のマウスアグリカンmRNAに対するプライマ

ー（配列番号：５および配列番号：６）を設計して用いた。試薬にはQuanti-Tect SYBR green RT-PCR kit (Qiagen社)を使用し、7700 sequence detection system (Applied Biosystems社) 上で RT-PCRシグナル検出およびデータ解析を行った。始めに50℃，30分のインキュベーションを行い、次に95℃で15分間の加熱を行った後、94℃，15秒－60℃，60秒の増幅過程を40サイクル行った。pcDNA5/TOでトランスフェクションした細胞（コントロール細胞）およびpcDNA5/TO-K1077でトランスフェクションした細胞（KIAA1077導入細胞）に由来するサンプルそれぞれにつき、20ngのtotal RNAを解析し、コントロール細胞とKIAA1077導入細胞とを比較した結果、トランスフェクション後1日で、KIAA1077導入細胞におけるアグリカン遺伝子発現量が低下傾向を示し、2日後ではコントロール細胞の50％以下にまで低下した（図２）。

このことから、KIAA1077遺伝子の導入により、ATDC5細胞の内在性アグリカン遺伝子の発現が抑制されることが示された。

産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質は変形性関節症軟骨で発現が増加し、軟骨細胞および軟骨前駆細胞増殖抑制作用を有するため、例えば骨・関節疾患の診断マーカーとして有用であり、該タンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩、該タンパク質に対する中和抗体、本発明のアンチセンスヌクレオチドは、例えば、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害（例、テニス肘）などの骨・関節疾患の予防・治療剤として安全に使用することができる。

請 求 の 範 囲

1． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

2． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

3． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスヌクレオチドを含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

4． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

5． 骨・関節疾患が、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害である請求項1、請求項2、請求項3または請求項4記載の予防・治療剤。

6． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる骨・関節疾患の診断薬。

7． 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる骨・関節疾患の診断薬。

8． 骨・関節疾患が、軟骨形成異常、骨形成異常、骨粗鬆症、変形性関節症、慢性関節リウマチ、関節炎、滑膜炎、代謝性関節症またはスポーツによる関節障害である請求項6または請求項7記載の診断薬。

９．　硫酸エステル加水分解酵素活性阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

１０．　硫酸エステル加水分解酵素発現阻害作用を有する化合物またはその塩を含有してなる骨・関節疾患の予防・治療剤。

１１．　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

１２．　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

１３．　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法。

１４．　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

１５．　請求項１１もしくは請求項１３記載のスクリーニング方法または請求項１２もしくは請求項１４記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる骨・関節疾患の予防・治療剤。

１６．　哺乳動物に対して、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療方法。

１７．　配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性

を阻害する、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする骨・関節疾患の予防・治療方法。

１８．　骨・関節疾患の予防・治療剤を製造するための、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の使用。

図 1

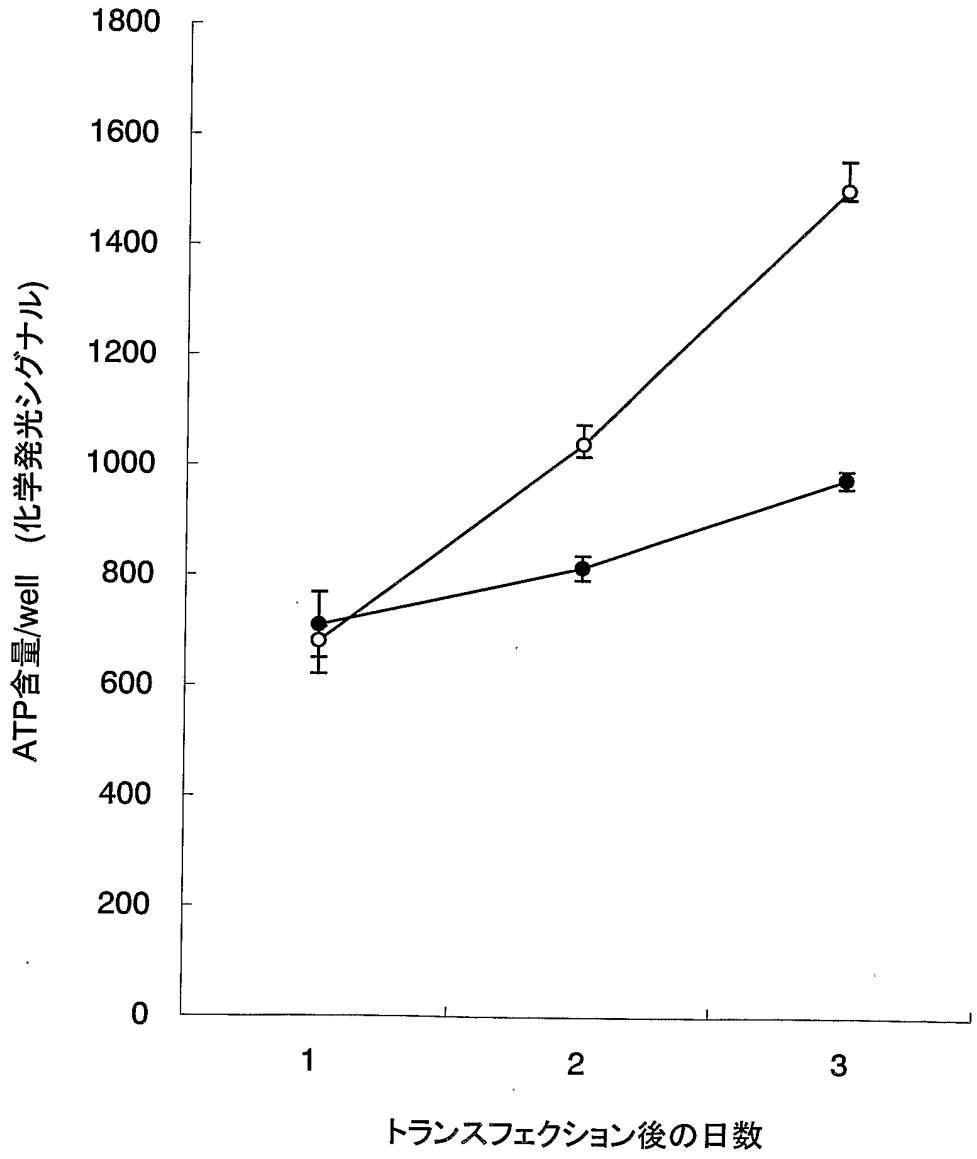
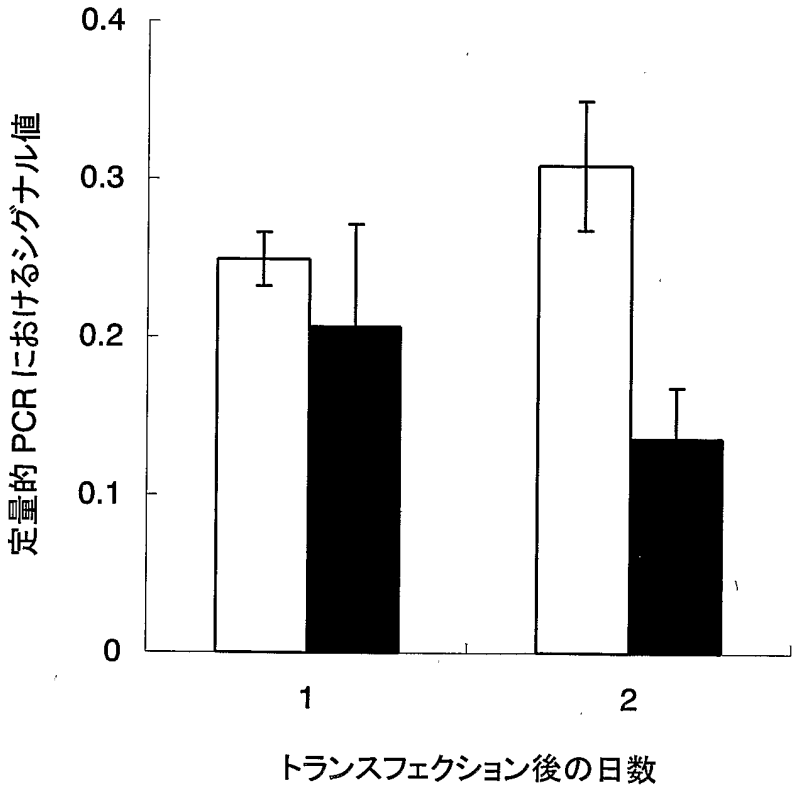

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
ATP含量/well (化学発光シグナル)
1
2
3
トランスフェクション後の日数

図 2



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Preventing and treating agent for bone or joint diseases

<130> 3057WOOP

<150> JP2002-178715

<151> 2002-6-19

<160> 6

<210> 1

<211> 871

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Lys Tyr Ser Cys Cys Ala Leu Val Leu Ala Val Leu Gly Thr Glu
5 10 15

Leu Leu Gly Ser Leu Cys Ser Thr Val Arg Ser Pro Arg Phe Arg Gly
20 25 30

Arg Ile Gln Gln Glu Arg Lys Asn Ile Arg Pro Asn Ile Ile Leu Val
35 40 45

Leu Thr Asp Asp Gln Asp Val Glu Leu Gly Ser Leu Gln Val Met Asn
50 55 60

Lys Thr Arg Lys Ile Met Glu His Gly Gly Ala Thr Phe Ile Asn Ala
65 70 75 80

Phe Val Thr Thr Pro Met Cys Cys Pro Ser Arg Ser Ser Met Leu Thr
85 90 95

Gly Lys Tyr Val His Asn His Asn Val Tyr Thr Asn Asn Glu Asn Cys
100 105 110

Ser Ser Pro Ser Trp Gln Ala Met His Glu Pro Arg Thr Phe Ala Val
115 120 125

Tyr Leu Asn Asn Thr Gly Tyr Arg Thr Ala Phe Phe Gly Lys Tyr Leu

130 135 140

Asn Glu Tyr Asn Gly Ser Tyr Ile Pro Pro Gly Trp Arg Glu Trp Leu
145 150 155 160

Gly Leu Ile Lys Asn Ser Arg Phe Tyr Asn Tyr Thr Val Cys Arg Asn
165 170 175

Gly Ile Lys Glu Lys His Gly Phe Asp Tyr Ala Lys Asp Tyr Phe Thr
180 185 190

Asp Leu Ile Thr Asn Glu Ser Ile Asn Tyr Phe Lys Met Ser Lys Arg
195 200 205

Met Tyr Pro His Arg Pro Val Met Met Val Ile Ser His Ala Ala Pro
210 215 220

His Gly Pro Glu Asp Ser Ala Pro Gln Phe Ser Lys Leu Tyr Pro Asn
225 230 235 240

Ala Ser Gln His Ile Thr Pro Ser Tyr Asn Tyr Ala Pro Asn Met Asp
245 250 255

Lys His Trp Ile Met Gln Tyr Thr Gly Pro Met Leu Pro Ile His Met
260 265 270

Glu Phe Thr Asn Ile Leu Gln Arg Lys Arg Leu Gln Thr Leu Met Ser
275 280 285

Val Asp Asp Ser Val Glu Arg Leu Tyr Asn Met Leu Val Glu Thr Gly
290 295 300

Glu Leu Glu Asn Thr Tyr Ile Ile Tyr Thr Ala Asp His Gly Tyr His
305 310 315 320

Ile Gly Gln Phe Gly Leu Val Lys Gly Lys Ser Met Pro Tyr Asp Phe
325 330 335

Asp Ile Arg Val Pro Phe Phe Ile Arg Gly Pro Ser Val Glu Pro Gly
340 345 350

Ser Ile Val Pro Gln Ile Val Leu Asn Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ile
355 360 365

Leu Asp Ile Ala Gly Leu Asp Thr Pro Pro Asp Val Asp Gly Lys Ser

370 375 380

Val Leu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Lys Pro Gly Asn Arg Phe Arg Thr
385 390 395 400

Asn Lys Lys Ala Lys Ile Trp Arg Asp Thr Phe Leu Val Glu Arg Gly
405 410 415

Lys Phe Leu Arg Lys Lys Glu Glu Ser Ser Lys Asn Ile Gln Gln Ser
420 425 430

Asn His Leu Pro Lys Tyr Glu Arg Val Lys Glu Leu Cys Gln Gln Ala
435 440 445

Arg Tyr Gln Thr Ala Cys Glu Gln Pro Gly Gln Lys Trp Gln Cys Ile
450 455 460

Glu Asp Thr Ser Gly Lys Leu Arg Ile His Lys Cys Lys Gly Pro Ser
465 470 475 480

Asp Leu Leu Thr Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn Leu Tyr Ala Arg Gly
485 490 495

Phe His Asp Lys Asp Lys Glu Cys Ser Cys Arg Glu Ser Gly Tyr Arg
500 505 510

Ala Ser Arg Ser Gln Arg Lys Ser Gln Arg Gln Phe Leu Arg Asn Gln
515 520 525

Gly Thr Pro Lys Tyr Lys Pro Arg Phe Val His Thr Arg Gln Thr Arg
530 535 540

Ser Leu Ser Val Glu Phe Glu Gly Glu Ile Tyr Asp Ile Asn Leu Glu
545 550 555 560

Glu Glu Glu Glu Leu Gln Val Leu Gln Pro Arg Asn Ile Ala Lys Arg
565 570 575

His Asp Glu Gly His Lys Gly Pro Arg Asp Leu Gln Ala Ser Ser Gly
580 585 590

Gly Asn Arg Gly Arg Met Leu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Val Gly Pro
595 600 605

Pro Thr Thr Val Arg Val Thr His Lys Cys Phe Ile Leu Pro Asn Asp

610 615 620

Ser Ile His Cys Glu Arg Glu Leu Tyr Gln Ser Ala Arg Ala Trp Lys
625 630 635 640

Asp His Lys Ala Tyr Ile Asp Lys Glu Ile Glu Ala Leu Gln Asp Lys
645 650 655

Ile Lys Asn Leu Arg Glu Val Arg Gly His Leu Lys Arg Arg Lys Pro
660 665 670

Glu Glu Cys Ser Cys Ser Lys Gln Ser Tyr Tyr Asn Lys Glu Lys Gly
675 680 685

Val Lys Lys Gln Glu Lys Leu Lys Ser His Leu His Pro Phe Lys Glu
690 695 700

Ala Ala Gln Glu Val Asp Ser Lys Leu Gln Leu Phe Lys Glu Asn Asn
705 710 715 720

Arg Arg Arg Lys Lys Glu Arg Lys Glu Lys Arg Arg Gln Arg Lys Gly
725 730 735

Glu Glu Cys Ser Leu Pro Gly Leu Thr Cys Phe Thr His Asp Asn Asn
740 745 750

His Trp Gln Thr Ala Pro Phe Trp Asn Leu Gly Ser Phe Cys Ala Cys
755 760 765

Thr Ser Ser Asn Asn Asn Thr Tyr Trp Cys Leu Arg Thr Val Asn Glu
770 775 780

Thr His Asn Phe Leu Phe Cys Glu Phe Ala Thr Gly Phe Leu Glu Tyr
785 790 795 800

Phe Asp Met Asn Thr Asp Pro Tyr Gln Leu Thr Asn Thr Val His Thr
805 810 815

Val Glu Arg Gly Ile Leu Asn Gln Leu His Val Gln Leu Met Glu Leu
820 825 830

Arg Ser Cys Gln Gly Tyr Lys Gln Cys Asn Pro Arg Pro Lys Asn Leu
835 840 845

Asp Val Gly Asn Lys Asp Gly Gly Ser Tyr Asp Leu His Arg Gly Gln

850 855 860

Leu Trp Asp Gly Trp Glu Gly

865 870

<210> 2

<211> 2613

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atgaagtatt cttgctgtgc tctggttttg gctgtcctgg gcacagaatt gctgggaagc 60

ctctgttcga ctgtcagatc cccgaggttc agaggacgga tacagcagga acgaaaaaac 120

atccgaccca acattattct tgtgcttacc gatgatcaag atgtggagct ggggtccctg 180

caagtcatga acaaaacgag aaagattatg gaacatgggg gggccacctt catcaatgcc 240

tttgtgacta cacccatgtg ctgcccgtca cggtcctcca tgctcaccgg gaagtatgtg 300

cacaatcaca atgtctacac caacaacgag aactgctctt ccccctcgtg gcaggccatg 360

catgagcctc ggacttttgc tgtatatctt aacaacactg gctacagaac agccttttt 420

ggaaaatacc tcaatgaata taatggcagc tacatccccc ctgggtggcg agaatggctt 480

ggattaatca agaattctcg cttctataat tacactgttt gtcgcaatgg catcaaagaa 540

aagcatggat ttgattatgc aaaggactac ttcacagact taatcactaa cgagagcatt 600

aattacttca aaatgtctaa gagaatgtat ccccataggc ccgttatgat ggtgatcagc 660

cacgctgcgc cccacggccc cgaggactca gccccacagt tttctaaact gtaccccaat 720

gcttcccaac acataactcc tagttataac tatgcaccaa atatggataa acactggatt 780

atgcagtaca caggaccaat gctgcccatc cacatggaat ttacaaacat tctacagcgc 840

aaaaggctcc agactttgat gtcagtggat gattctgtgg agaggctgta taacatgctc 900

gtggagacgg gggagctgga gaatacttac atcatttaca ccgccgacca tggttaccat 960

attgggcagt ttggactggt caaggggaaa tccatgccat atgactttga tattcgtgtg 1020

cctttttta ttcgtggtcc aagtgtagaa ccaggatcaa tagtcccaca gatcgttctc 1080

aacattgact tggcccccac gatcctggat attgctgggc tcgacacacc tcctgatgtg 1140

gacggcaagt ctgtcctcaa acttctggac ccagaaaagc caggtaacag gtttcgaaca 1200

aacaagaagg ccaaaatttg gcgtgataca ttcctagtgg aaagaggcaa atttctacgt 1260

aagaaggaag aatccagcaa gaatatccaa cagtcaaatc acttgcccaa atatgaacgg 1320
gtcaaagaac tatgccagca ggccaggtac cagacagcct gtgaacaacc ggggcagaag 1380
tggcaatgca ttgaggatac atctggcaag cttcgaattc acaagtgtaa aggacccagt 1440
gacctgctca cagtccggca gagcacgcgg aacctctacg ctcgcggctt ccatgacaaa 1500
gacaaagagt gcagttgtag ggagtctggt taccgtgcca gcagaagcca aagaaagagt 1560
caacggcaat tcttgagaaa ccaggggact ccaaagtaca agcccagatt tgtccatact 1620
cggcagacac gttccttgtc cgtcgaattt gaaggtgaaa tatatgacat aaatctggaa 1680
gaagaagaag aattgcaagt gttgcaacca agaaacattg ctaagcgtca tgatgaaggc 1740
cacaaggggc caagagatct ccaggcttcc agtggtggca acaggggcag gatgctggca 1800
gatagcagca acgccgtggg cccacctacc actgtccgag tgacacacaa gtgttttatt 1860
cttcccaatg actctatcca ttgtgagaga gaactgtacc aatcggccag agcgtggaag 1920
gaccataagg catacattga caaagagatt gaagctctgc aagataaaat taagaattta 1980
agagaagtga gaggacatct gaagagaagg aagcctgagg aatgtagctg cagtaaacaa 2040
agctattaca ataaagagaa aggtgtaaaa aagcaagaga aattaaagag ccatcttcac 2100
ccattcaagg aggctgctca ggaagtagat agcaaactgc aacttttcaa ggagaacaac 2160
cgtaggagga agaaggagag gaaggagaag agacggcaga ggaaggggga agagtgcagc 2220
ctgcctggcc tcacttgctt cacgcatgac aacaaccact ggcagacagc cccgttctgg 2280
aacctgggat ctttctgtgc ttgcacgagt tctaacaata acacctactg gtgtttgcgt 2340
acagttaatg agacgcataa ttttcttttc tgtgagtttg ctactggctt tttggagtat 2400
tttgatatga atacagatcc ttatcagctc acaaatacag tgcacacggt agaacgaggc 2460
attttgaatc agctacacgt acaactaatg gagctcagaa gctgtcaagg atataagcag 2520
tgcaacccaa gacctaagaa tcttgatgtt ggaaataaag atggaggaag ctatgaccta 2580
cacagaggac agttatggga tggatgggaa ggt 2613

<210> 3
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer

<400> 3

tggaccaaat acaatgaagt attcttgctg tgctctggt 39

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

ggcaaggtca aatgaggtgt tttcccaacc t 31

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

gagagaggcg aatggaacga 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

cgcaccaggg agctgatct 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K38/17, 31/7088, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/00, 19/02, 19/10, 29/00, 43/00 // C12N15/09

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K38/17, 31/7088, 39/395, 45/00, 48/00, A61P19/00, 19/02, 19/10, 29/00, 43/00 // C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JOIS), Swissprot/PIR/Geneseq, Genebank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/44268 A1 (STERIX LTD.), 21 June, 2001 (21.06.01), Claim 1; page 43, line 28 & AU 200121906 A & EP 1237902 A1 & JP 2003-517002 A	9,10 1-8,11-15,18
X Y	WO 99/64013 A1 (STERIX LTD.), 16 December, 1999 (16.12.99), Claim 4; page 38, line 31 & AU 9942807 A & EP 1085876 A1 & JP 2002-517449 A	9,10 1-8,11-15,18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 September, 2003 (02.09.03)	16 September, 2003 (16.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07741

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99/52890 A1 (NOVARTIS AG), 21 October, 1999 (21.10.99), Page 4, 4th line from the bottom to page 15, line 8; particularly, page 15, line 4 & AU 9936054 A & EP 1070059 A1 & US 6346626 B1 & JP 2002-511459 A	9,10 1-8,11-15,18
Y	WO 01/55411 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 02 August, 2001 (02.08.01), Full text; particularly, Fig. 5 & AU 200133208 A	1-8,11-15,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07741

Box I 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. [X] Claims Nos.: 16, 17

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

Claims 16 and 17 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. [ ] Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II 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:

As reported by the following documents, it was already publicly known at the point of the application of the present case to use a compound having an inhibitory effect on sulfatase in treating bone and joint diseases. Thus, it does not appear that there is a technical relationship between the inventions as set forth in claims 1 to 8, 11 to 15 and 18 and the inventions as set forth in claims 9 and 10 involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

(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. [X] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07741

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Document: WO 01/44268 A1 (STERIX LIMITED) 21 June, 2001 (21.06.01)
WO 99/64013 A1 (STERIX LIMITED) 06 December, 1999 (06.12.99)
WO 99/52890 A1 (NOVARTIS AG) 21 October, 1999 (21.10.99)

<Subject of search>

In claims 1, 2, 5, 9, 10, 15 and 18, it is specified to use as the active ingredient compounds defined by desired properties such as "a compound inhibiting the activity of a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1", "a compound inhibiting the expression of a gene of a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1" or "a compound having an effect of inhibiting sulfatase". Although any compounds having these properties are involved in the scopes of the above claims, it is recognized that only parts of the claimed compounds are supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as described in PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is impossible to specify the scopes of the compounds defined by the desired properties as described above. Therefore, the above claims fail to fulfill the requirement of clearness as described in PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made exclusively on the cases comprising an antisense nucleotide and an antibody against the protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 as the active ingredient.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０７７４１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ[7] Ａ６１Ｋ３８／１７，３１／７０８８，３９／３９５，４５／００，４８／００，Ａ６１Ｐ１９／００，１９／０２，１９／１０，２９／００，４３／００ // Ｃ１２Ｎ１５／０９

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ[7] Ａ６１Ｋ３８／１７，３１／７０８８，３９／３９５，４５／００，４８／００，Ａ６１Ｐ１９／００，１９／０２，１９／１０，２９／００，４３／００ // Ｃ１２Ｎ１５／０９

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	１９２６－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００３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／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ），
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＯＩＳ），
Ｓｗｉｓｓｐｒｏｔ／ＰＩＲ／Ｇｅｎｅｓｅｑ，Ｇｅｎｅｂａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／Ｇｅｎｅｓｅｑ

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	WO 01/44268 A1 (STERIX LIMITED) 2001.06.21, Claim1, 第43頁第28行等参照, & AU 200121906 A & EP 1237902 A1 & JP 2003-517002 A	9, 10 1-8, 11-15, 18
X Y	WO 99/64013 A1 (STERIX LIMITED) 1999.12.16, Claim4, 第38頁第31行等参照 & AU 9942807 A & EP 1085876 A1 & JP 2002-517449 A	9, 10 1-8, 11-15, 18

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０２．０９．０３	国際調査報告の発送日 16.09.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員） 冨永　保　印　　４Ｃ　３０３９ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０７７４１

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	WO 99/52890 A1 (NOVARTIS AG) 1999.10.21, 第14頁下4行-第15頁第8行、特に第15頁第4行参照 & AU 9936054 A & EP 1070059 A1 & US 6346626 B1 & JP 2002-511459 A	9,10 1-8,11-15,18
Y	WO 01/55411 A2 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS,INC.) 2001.08.02, 全文、特にFIGURE5参照 & AU 200133208 A	1-8,11-15,18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０７７４１

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

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

1．☒ 請求の範囲 １６，１７ 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、
請求の範囲１６，１７は、治療による人体の処置方法に関するものであって、ＰＣＴ第１７条(2)(a)(i)及びＰＣＴ規則３９．１(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

下記文献に記載のとおり、硫酸エステル加水分解酵素に対する阻害作用を有する化合物を骨・関節疾患の予防・治療に用いることは本願出願時に公知であるので、請求の範囲１－８，１１－１５，１８に係る発明と、請求の範囲９，１０に係る発明の間に、同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がないので、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

文献：WO 01/44268 A1 (STERIX LIMITED) 2001.06.21
WO 99/64013 A1 (STERIX LIMITED) 1999.12.06
WO 99/52890 A1 (NOVARTIS AG) 1999.10.21

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

＜調査の対象について＞

請求の範囲１，２，５，９，１０，１５，１８では、「配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を阻害する化合物」、「配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物」、あるいは「硫酸エステル加水分解酵素活性阻害作用を有する化合物」等の、所望の性質により定義された化合物を有効成分とすることが規定されている。上記請求の範囲には、そのような性質を有するあらゆる化合物が包含されるが、ＰＣＴ６条の意味において明細書に裏付けられ、また、ＰＣＴ５条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、上記所望の性質により定義された化合物は、出願時の技術常識を勘案しても、包含される化合物の範囲を特定できないから、上記請求の範囲は、ＰＣＴ６条における明確性の要件も欠いている。

よって、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質に対するアンチセンスヌクレオチド、及び、抗体を有効成分とする場合についてのみ調査を行った。