

(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
2016 年 6 月 30 日(30.06.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/104490 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1-1 大阪大学免疫学フロンティア研究センター内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外(TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町 5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085806

(22) 国際出願日: 2015 年 12 月 22 日(22.12.2015)

(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 2014-259464 2014 年 12 月 22 日(22.12.2014) JP
特願 2015-083939 2015 年 4 月 16 日(16.04.2015) JP

(71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(71) 出願人: 岸本 忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1-1 大阪大学免疫学フロンティア研究センター内 Osaka (JP). 増田 和哉(MASUDA, Kazuya) [JP/JP];

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

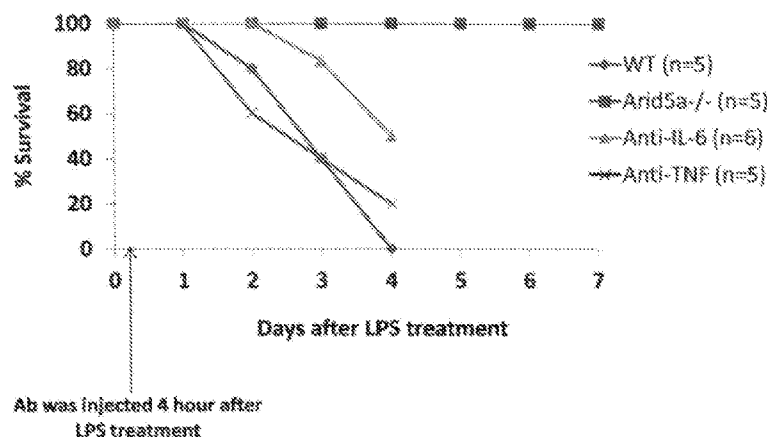
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: NOVEL THERAPEUTIC AGENT FOR SEPTICEMIA, AND A METHOD FOR SCREENING FOR SAME

(54) 発明の名称: 新規な敗血症治療剤及び／又はそのスクリーニング方法

[図2]



(57) Abstract: Provided are: a therapeutic agent for septicemia and/or septic shock; and a method for screening for same. The present invention pertains to a therapeutic agent for septicemia and/or septic shock, containing, as an active ingredient, an Arid5A inhibitor. The present invention is also a method for screening for candidate substances effective in the treatment of septicemia and/or septic shock, said method comprising: (a) a step of evaluating the impact of a test substance on the expression and/or function of Arid5A; and (b) a step which involves the selection of a substance that reduces the expression and/or function of Arid compared to a case in which the test substance is not used.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/104490 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 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))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、敗血症及び／または敗血症性ショックの治療剤ならびにそのスクリーニング方法を提供する。本発明は、A r i d 5 A 阻害剤を有効成分として含有する敗血症及び／または敗血症性ショックの治療剤に関する。本発明はまた、敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、(a) 被験物質のA r i d 5 A の発現及び／又は機能に対する影響を評価する工程、及び (b) 被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 A の発現及び／又は機能を減少させる物質を選択する工程、とを含んでなる方法に関する。

明 細 書

発明の名称：

新規な敗血症治療剤及び／又はそのスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規な敗血症治療剤及び／又はそのスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 敗血症は、病原体によって引き起こされた全身性炎症反応症候群（S y s t e m i c I n f l a m m a t o r y R e s p o n s e S y n d r o m e）によって特徴付けられる疾患である。敗血症は、発熱、頻呼吸、頻脈、白血球増加等の症状を現し、進行すれば意識障害、血圧低下などの循環不全、さらに、腎・肺・肝・凝固機能異常などの臓器機能障害をきたす。そして重篤に至れば、急性呼吸窮迫症候群（A R D S）や播種性血管内凝固症候群（D I C）などを併発し、敗血症性ショックによる心停止・死亡に至る。敗血症は、段階が進むにつれて予後が悪くなり、死亡率が高くなるので、可能な限り初期の段階で早期診断・早期治療を行なう必要がある。

[0003] 敗血症性ショックは重症の敗血症で、初期の輸液組成にほとんど反応しない臓器低灌流と低血圧を伴うものであり、その大部分は院内感染によるグラム陰性桿菌またはグラム陽性球菌によって引き起こされる。敗血症性ショックは免疫不全状態の患者、慢性および消耗性疾患患者でしばしばおこり、その死亡率の平均は約40%である。

[0004] 敗血症の治療としては、一般的には輸液蘇生法や、リポポリサッカライド（L P S）の産生を抑制する目的の抗生物質や炎症性反応を抑える非ステロイド抗炎症薬の投与が行なわれている。

[0005] 敗血症は、感染原因菌と患者の免疫、炎症並びに凝固系の間の複雑な相互作用の結果として発生するものと理解されている。敗血症で生じる臓器不全は、患者の感染原因菌に対する反応が増幅しすぎることにより、宿主の臓器

損傷を引き起こすと考えられている。そのため、患者の炎症反応に大きくかわる炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6などに対する拮抗物質による敗血症の治療剤としての可能性が検討されているが、有効な治療法の開発にはいたっていない（例えば、非特許文献1～2参照）。このように高い死亡率を示すにもかかわらず、未だ確実な治療剤が開発されていない敗血症及び敗血症性ショックに対する、より有効な治療方法の開発が求められている。

[0006] ATリッチインターラクティブドメイン5A (AT Rich Interactive Domain 5A、以下Arid5Aと略す)はIL-6 mRNAの安定化タンパク質として報告されている（例えば、非特許文献3参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 289, R1048-R1053 (2005)

非特許文献2: Int J Clin Pract, 68, 4, 520-528 (2014)

非特許文献3: PNAS, 110, 23, 9404-9414 (2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、Arid5Aと敗血症性ショックとの関係は知られていなかった。

本発明は、より有効な敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療剤、並びにそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、具体的には以下を含む。

[1] Arid5A阻害剤を有効成分とする、敗血症及び／又は敗血症性シ

ショック治療剤である。

〔２〕 A r i d 5 A 阻害剤が、核酸オリゴ、及び A r i d 5 A 抗体からなる群より選ばれる１種以上の物質である、〔１〕記載の敗血症及び／又は敗血症性ショック治療剤である。

〔３〕 核酸オリゴが、天然及び非天然の R N A または D N A からなるオリゴである、〔２〕記載の敗血症及び／又は敗血症性ショック治療剤である。

〔４〕 敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、

（ａ）被験物質の A r i d 5 A の発現及び／又は機能に対する影響を評価する工程、及び

（ｂ）被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 A の発現及び／又は機能を減少させる物質を選択する工程、

とを含んでなる方法である。

〔５〕 〔４〕に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、

（ａ）被験物質の A r i d 5 A の発現に対する影響を評価する工程、及び

（ｂ）被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 A の発現を減少させる物質を選択する工程、

とを含んでなる方法である。

〔６〕 〔４〕に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、

（ａ）被験物質を、実験動物に投与する工程、

（ｂ）該 A r i d 5 A の発現に対する影響について P C R にて測定する工程、及び

（ｃ）被験物質を実験動物に投与しない場合と比較して、A r i d 5 A を減少させる物質を選択する工程、

とを含んでなる方法である。

〔７〕 〔４〕に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候

補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、

(a) 被験物質の A r i d 5 A の機能に対する影響を評価する工程、及び
(b) 被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 A の機能を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる方法である。

〔8〕〔7〕に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該 A r i d 5 A の機能が I L - 6 m R N A の安定化である方法である。

〔9〕A r i d 5 A 阻害剤を投与することを含んでなる、敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療方法である。

〔10〕敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に使用するための A r i d 5 A 阻害剤である。

〔11〕敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療剤の製造のための A r i d 5 A 阻害剤の使用である。

発明の効果

[0010] 本発明の敗血症および／または敗血症性ショック治療剤により、敗血症及び／または敗血症性ショックの高い治療効果が奏される。また、本発明により高い治療効果を示す治療剤のスクリーニング方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] A r i d 5 A 欠損マウスの作製：(A)上：野生型 A r i d 5 A アレル、中：ターゲティングベクター、下：予想変異アレル。DNA結合ドメインの主要部分は、両端を loxp 配列で挟んだ N e o - c a s s e t t e で置換されている。(B) サザンブロッティング解析による遺伝子型解析；野生型(+ / +)、ヘテロ接合型(+ / -)。

[図2]敗血症性ショックモデルによる7日生存率を示すグラフである。

[図3]マクロファージ細胞株における A r i d 5 A の m R N A レベルを q P C R によって定量したグラフである。

[図4]マクロファージ細胞株の培養上清中のIL-6の濃度をELISA法により特定したグラフである。

[図5]マクロファージ細胞株の培養上清中のTNF- α の濃度をELISA法により特定したグラフである。

[図6]腹腔マクロファージにおけるArid5AのmRNAの発現を示したグラフである。

[図7]腹腔マクロファージにおけるIL-6のmRNAの発現を示したグラフである。

[図8]腹腔マクロファージにおけるTNF- α のmRNAの発現を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、敗血症および／又は敗血症性ショック治療剤、並びにそのスクリーニング方法に関する。本発明の敗血症および／又は敗血症性ショック治療剤は、Arid5A阻害剤を有効成分とする。

[0013] 本発明における「Arid5A」とは、ATリッチインターラクティブドメイン5A (AT Rich Interactive Domain 5A、以下Arid5Aと略す) のことであり、IL-6 mRNAの安定化タンパク質として報告されている。例えばヒトArid5Aとしては、各種アイソフォームも含まれる (NCBIアクセッション番号NP997646.1、XP006712266.1、XP006712265.1、XP005263918.1、XP005263913.1、XP005263917.1など)。また、マウスArid5Aについても同様に、各種アイソフォームも含まれる (NCBIアクセッション番号NP00165676.1、NP00165677.1、NP001277655.1、NP001277656.1、NP666108.2など)。

[0014] 本発明における「Arid5A阻害剤」とは、Arid5Aの発現を阻害する物質及び／またはArid5Aの機能を阻害する物質のことをいう。A

Ar id 5 A阻害剤は、Ar id 5 Aの発現自体を直接阻害する物質でもよいし、Ar id 5 Aにより影響を受ける分子（IL-6 mRNA等）に結合してAr id 5 Aの生物学的機能を間接的に阻害する物質でもよいが、好ましくは、Ar id 5 Aと競合的にIL-6 mRNAと結合することによりIL-6 mRNAの安定化を阻害する物質が挙げられる。例えばヒトIL-6 mRNAとしては、各種アイソフォームも含まれる（NCBIアクセッション番号NM000600.3、XM005249745.2など）。また、マウスIL-6 mRNAについても同様に、各種アイソフォームも含まれる（NCBIアクセッション番号NM031168.1など）。

[0015] 本発明におけるAr id 5 A阻害剤としては、例えば、抗Ar id 5 A抗体、核酸オリゴ、クロルプロマジンなどの低分子物質などが挙げられるが、特に限定されるものではない。本発明のAr id 5 A阻害剤の好ましい例として、核酸オリゴ、及びAr id 5 A抗体からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、より好ましくは、核酸オリゴが挙げられ、さらに好ましくは、siRNAが挙げられる。

[0016] Ar id 5 Aの発現阻害は、例えばAr id 5 A遺伝子の発現に対するRNA干渉（RNA interference）効果を利用することによって実現可能である。RNA干渉は、RNAを利用して遺伝子の発現を抑制する方法として報告された方法（Genes and Development, 16, 948-958（2002））であり、標的遺伝子と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在遺伝子の発現がいずれも抑制される減少である。具体的には、Ar id 5 A遺伝子の発現に対するRNA干渉効果を示すsiRNAやアンチセンス核酸を使用して、Ar id 5 A遺伝子の発現阻害が可能である。

[0017] 本発明における「核酸オリゴ」は、天然及び非天然のRNAまたはDNAからなるオリゴであり、Ar id 5 A遺伝子もしくはタンパク質の機能を制御する核酸のオリゴマーを意味する。本発明における核酸オリゴとしては、

s i R N A、s h R N A、アンチセンス核酸、デコイ核酸、核酸アプタマーが含まれる。

[0018] 本発明における核酸オリゴとして好ましくは、s i R N Aまたはs h R N Aを挙げることができ、より好ましくは、s i R N Aを挙げることができる。s i R N Aは、細胞で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖R N Aを意味し、例えば15～49塩基対と、好適には15～35塩基対と、さらに好適には21～30塩基対とすることが出来る。また、s h R N Aは、一本鎖のR N Aがヘアピン構造を介して二重鎖を構成しているR N Aである。

[0019] s i R N Aおよびs h R N Aは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の相同性を有する。

[0020] s i R N Aおよびs h R N AにおけるR N A同士が対合した二重鎖R N Aの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不對合部分が含まれていてもよい。本発明においてはd s R N AにおけるR N A同士が対合する二重鎖R N A領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよい。

[0021] また、本発明における「アンチセンス核酸」は、A r i d 5 AをコードするD N Aの転写産物と相補的なアンチセンス核酸である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、R N A二重鎖認識によるR N a s e活性による分解、三重鎖形成による転写開始阻害、R N Aポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるR N Aとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、m R N Aとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、m R N Aの翻訳領域やポリソーム結

合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらの中でも、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する。

[0022] 本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、A r i d 5 A の m R N A の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であるものと考えられる。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域に相補的な配列も使用しうる。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく、非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。アンチセンス核酸は標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンス R N A の長さは、特に制限されない。

[0023] 本発明における「デコイ核酸」は A r i d 5 A が認識する I L - 6 の m R N A 配列と相同性がある核酸オリゴである。I L - 6 の m R N A 配列の代わりに A r i d 5 A に結合し、A r i d 5 A の機能を阻害する。本発明における「核酸アプタマー」は、I L - 6 3' U T R に存在するステムループ領域をコードする核酸あるいはそれに類する核酸のことである。

[0024] 本発明における「抗 A r i d 5 A 抗体」は、公知の手段を用いてポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で 사용되는抗体の由来は特に限定されるものではないが、好ましくは哺乳動物由来であり、より好ましくはヒト由来の抗体を挙げることが出来る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体は A r i d 5 A と結合することによ

り、A r i d 5 A の機能発現を阻害する。

[0025] 抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、A r i d 5 A を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング方法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

[0026] 具体的には、抗A r i d 5 A 抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の抗原として使用されるヒトA r i d 5 A は公知の文献に開示されたA r i d 5 A 遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

[0027] A r i d 5 A の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のA r i d 5 A タンパク質を公知の方法で精製し、この精製A r i d 5 A タンパク質を感作抗原として用いればよい。また、化学合成によって作製したA r i d 5 A タンパク質も感作抗原として用いても良い。また、A r i d 5 A タンパク質と他のタンパク質との融合タンパク質を感作抗原として用いてもよい。

[0028] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

[0029] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行なわれる。具体的には、感作抗原をPBS (P h o s p h a t e - B u f f e r e d S a l i n e) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバンド、例えば、フロイント完全アジュバンドを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与するの

が好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

[0030] このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

[0031] 前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 (J . I m m u n o l . 1 2 3 , 1 5 4 8 - 1 5 5 0 (1 9 7 9)) 等が適宜使用される。

[0032] 前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルシュタインらの方法 (M e t h o d s E n z y m o l . , 7 3 , 3 - 4 6 (1 9 8 1)) 等に準じて行なうことができる。

[0033] より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (P E G) 、センダイウィルス (H V J) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

[0034] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに牛胎児血清 (F C S) 等の血清補液を併用することもできる。

[0035] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加熱したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合

剤等を除去できる。

[0036] 当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、H A T培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該H A T培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行なわれる。

[0037] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原タンパク質又は抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU 2 6 6と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1－59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO93／12227等を参照）。

[0038] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

[0039] 当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得する方法としては、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

[0040] 本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J.

W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。

[0041] 具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することが出来る。

[0042] 得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行なうことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

- [0043] 目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。
- [0044] 本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。
- [0045] 本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体、ヒト（Human）抗体等を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。
- [0046] キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAを、ヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 1 250 23、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。
- [0047] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体またはヒト型化抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 1 250 23、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。
- [0048] 具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（Framework region）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これ

を宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号E P 2 3 9 4 0 0、国際特許出願公開番号W O 9 2 - 1 9 7 5 9 参照）。

[0049] C D Rを介して連結されるヒト抗体のF Rは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（S a t o, K. e t a l., C a n c e r R e s. (1993) 53, 851-856）。

[0050] キメラ抗体、ヒト化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、C γ が挙げられ、例えばC γ 1、C γ 2、C γ 3又はC γ 4を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

[0051] キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

[0052] また、ヒト抗体の取得方法としては先に述べた方法のほか、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（s v F v）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することもできる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するs c F vのDNA配列が明らかになれば、当該配列の適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、W O 9 2 / 0 1 0 4 7、W O 9 2 / 2 0 7 9 1、W O 9 3 / 0 6 2 1 3、W O 9 3 / 1 1 2 3 6、W O 9 3 / 1 9 1 7 2、W O 9 5 / 0 1 4 3 8、W O 9 5 / 1 5 3 8 8等の各号を参考にすることができる。

[0053] 前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

[0054] また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) 等の哺乳類細胞由来のプロモーターエンハンサーを用いればよい。

[0055] 例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

[0056] 大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることが出来る。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al., S

c i e n c e (1 9 8 8) 2 4 0 , 1 0 4 1 - 1 0 4 3) に従えばよい。

[0057] 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、p e l Bシグナル配列 (L e i , S . P . e t a l . , J . B a c t e r i o l . (1 9 8 7) 1 6 9 , 4 3 7 9 - 4 3 8 3) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (r e f o l d) して使用する (例えば、WO 96 / 3 0 3 9 4 を参照)。

[0058] 複製起源としては、SV 4 0、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (B P V) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (A P H) 遺伝子、チミジンキナーゼ (T K) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (E c o g p t) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (d h f r) 遺伝子等を含むことができる。

[0059] 本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、i n v i t r oおよびi n v i v oの産生系がある。i n v i t r oの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

[0060] 真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (b a b y h a m s t e r k i d n e y)、H e l a、V e r oなど、(2) 両性類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、s f 9、s f 2 1、T n 5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (N i c o t i a n a t a b a c u m) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)、糸状菌、例えばアスペルギルス

属 (*Aspergillus*)、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

[0061] これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔内へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系などがある。

[0062] 哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

[0063] これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調整する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから得られるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology

gy (1994) 12, 699-702)。

[0064] また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現ベクター、例えば pMON530 に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

[0065] 上記のように *in vitro* 又は *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H鎖および L鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

[0066] 前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行なうことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。プロテイン A カラムに用いる担体として、例えば、HyperD、POROS、Sephacrose F. F 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

[0067] 例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィー

としては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (high performance liquid chromatography) に適用しうる。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

[0068] 上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA等により行なうことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS (－) で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.35ODとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1μg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAG製) 100μlを96穴プレート (Nunc製) に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100μlを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

[0069] 洗浄後、5000倍アルカリフォスフォターゼ標識ヒトIgG (BioSource製) 100μl加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad製) を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

[0070] 本発明に使用する抗体は、ポリエチレングリコール (PEG)、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

[0071] 本発明の抗体には、Arid5Aに結合する限り、IgGに代表される二価抗体だけでなく、一価抗体、若しくはIgMに代表される多価抗体も含ま

れる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。

[0072] さらに、本発明の抗体は、A r i d 5 Aに結合する限り、二重特異性抗体（b i s p e c i f i c a n t i b o d y）であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいうが、当該エピトープは異なる分子中に存在していてもよいし、同一の分子中に存在していてもよい。すなわち本発明において、二重特異性抗体はA r i d 5 Aの異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有することもできる。また、一方の認識部位がA r i d 5 Aを認識し、他方の認識部位がA r i d 5 A以外の抗原を認識する二重特異性抗体とすることも可能である。

[0073] 二重特異性抗体を製造するための方法は公知である。たとえば、認識抗原が異なる2種類の抗体を結合させて、二重特異性抗体を作製することができる。結合させる抗体は、それぞれがH鎖とL鎖を有する抗体の1/2分子であっても良いし、H鎖のみからなる抗体の1/4分子であっても良い。あるいは、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体が作製できる。

[0074] 本発明の抗体は、A r i d 5 Aに結合する限り、低分子化抗体であってもよい。低分子化抗体は、全長抗体（w h o l e a n t i b o d y、例えばw h o l e I g G等）の一部分が欠損している抗体断片を含む。A r i d 5 Aに結合する限り、抗体分子の部分的な欠損は許容される。本発明における抗体断片は、重鎖可変領域（V H）および軽鎖可変領域（V L）のいずれか、または両方を含んでいることが好ましい。V HまたはV Lのアミノ酸配列は、付加、欠失および／または置換を含むことができる。さらにA r i d 5 Aに結合する限り、V HおよびV Lのいずれか、または両方の一部を欠損させることもできる。また、抗体断片はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、F a b、F a b'、F（a b'）₂、

Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv (single-chain Fv)、ダイアボディー (Diabody)、sc(Fv)₂ (single-chain (Fv)₂)などを挙げることができる。これら抗体の多量体（例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー）も、本発明の抗体に含まれる。

[0075] 抗体断片は、抗体を酵素で消化して生成させることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが公知である。あるいは、これら抗体断片をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることができる（例えば、Co M. S. ら、J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better M. & Horwitz A. H.、Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Pluckthun A. & Skerra A.、Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515、Lamoyi E.、Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663、Rousseaux J. ら、Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669、Bird R. E. & Walker B. W.、Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137）。

[0076] 消化酵素は、抗体を特定の位置で切断し、次のような特定の構造の抗体断片を与える。一方、遺伝子工学的手法を利用すると、抗体の任意の部分を欠失させることができる：

パパイン消化：Fab；

ペプシン消化：F(ab')₂またはF(ab')；

プラスミン消化：Fabc。

[0077] scFvは、抗体のVHとVLとを連結することにより得られる。scFvにおいて、VHとVLは、リンカー、好ましくはペプチドリナーを介し

て連結される (H u s t o n J . S . ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 8 8) 8 5 , 5 8 7 9 - 5 8 8 3) 。 s c F v における V H および V L は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの抗体由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリンカーには、特に制限はない。例えば 3 から 2 5 残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。

[0078] V 領域は、たとえば上記のような P C R 法によって連結することができる。P C R 法による V 領域の連結のために、抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする D N A 配列、および抗体の L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする D N A 配列の全部あるいは所望の部分アミノ酸配列をコードする D N A が鋳型として利用される。増幅すべき D N A の両端の配列に対応する配列を有するプライマーを用いた P C R 法によって、H 鎖と L 鎖の V 領域をコードする D N A がそれぞれ増幅される。次いで、ペプチドリンカー部分をコードする D N A を用意する。ペプチドリンカーをコードする D N A も P C R を利用して合成することができる。このとき利用するプライマーの 5' 側に、別に合成された各 V 領域の増幅産物と連結できる塩基配列を付加しておく。次いで、[V H D N A]、[ペプチドリンカー D N A]、[V L D N A] の各 D N A と、アセンブリー P C R 用のプライマーを利用して P C R 反応を行う。アセンブリー P C R 用のプライマーは、[V H D N A] の 5' 側にアニールするプライマーと、[V L D N A] の 3' 側にアニールするプライマーとの組み合わせからなる。すなわちアセンブリー P C R 用プライマーとは、合成すべき s c F v の全長配列をコードする D N A を増幅することができるプライマーセットである。一方 [ペプチドリンカー D N A] には各 V 領域 D N A と連結できる塩基配列が付加されている。その結果、これらの D N A が連結され、さらにアセンブリー P C R 用のプライマーによって、最終的に s c F v の全長が増幅産物として生成される。一旦 s c F v をコードする D N A が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された組換え細胞が常法に従って取得できる。また、その結果得られ

る組換え細胞を培養して該 s c F v をコードする D N A を発現させることにより、該 s c F v が取得できる。

[0079] ダイアボディーは、遺伝子融合により構築された二価 (b i v a l e n t) の低分子化抗体を指す (H o l l i g e r P. ら、P r o c. N a t l . A c a d. S c i. U S A (1993) 90, 6444-6448、E P 404097、W O 93/11161)。ダイアボディーは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーである。通常、ダイマーを構成するポリペプチド鎖は、各々、同じ鎖中で V L および V H がリンカーにより結合されている。ダイアボディーにおける当該ポリペプチド鎖のリンカーは、一般に、同一鎖中の V L と V H が互いに結合できない程度に十分短い。具体的には、リンカーを構成するアミノ酸残基は、2~12残基が好ましく、さらに3~10残基が好ましく、特には5残基程度である。そのため、同一ポリペプチド鎖上にコードされる V L と V H とは、s c F v を形成できず、別のポリペプチド鎖間で2つの F v を形成するように二量体化する。その結果、ダイアボディーは2つの抗原結合部位を有することとなる。

[0080] s c (F v) 2 は、2つの V H および2つの V L をリンカーで結合して一本鎖にした低分子化抗体である (H u d s o n P. J. & K o r t t A. A.、J. I m m u n o l. M e t h o d s (1999) 231, 177-189)。s c (F v) 2 は、例えば、2つの s c F v をリンカーで結ぶことによって作製できる。あるいは、一本鎖ポリペプチドの N 末端側を基点として2つの V H および2つの V L をリンカーで、

[V H] - [リンカー] - [V L] - [リンカー] - [V H] - [リンカー] - [V L]

の順に結ぶことによっても作製できる。なお2つの V H と2つの V L の順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような配置も挙げることができる。

[V L] - [リンカー] - [V H] - [リンカー] - [V H] - [リンカー] - [V L]

[VH] — [リンカー] — [VL] — [リンカー] — [VL] — [リンカー] — [VH]

[VH] — [リンカー] — [VH] — [リンカー] — [VL] — [リンカー] — [VL]

[VL] — [リンカー] — [VL] — [リンカー] — [VH] — [リンカー] — [VH]

[VL] — [リンカー] — [VH] — [リンカー] — [VL] — [リンカー] — [VH]

複数のリンカーは、同じ種類のリンカーであってもよいし、異なる種類のリンカーであってもよい。

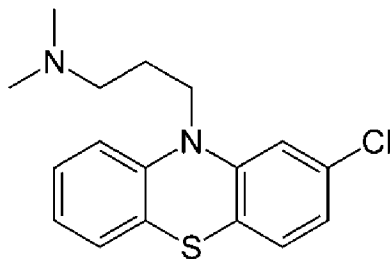
[0081] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリinker、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering (1996) 9, 299-305に開示されるリンカー）等を用いることができる。本発明においてはペプチドリinkerが好ましい。ペプチドリinkerの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。通常、ペプチドリinkerを構成するアミノ酸残基は、1から100アミノ酸、好ましくは3から50アミノ酸、更に好ましくは5から30アミノ酸、特に好ましくは12から18アミノ酸（例えば、15アミノ酸）である。ペプチドリinkerを構成するアミノ酸配列は、scFvの結合作用を阻害しない限り、任意の配列とすることができる。

[0082] あるいは、合成化学物リンカー（化学架橋剤）を利用してV領域を連結することもできる。ペプチド化合物などの架橋に通常用いられている架橋剤を本発明に利用することができる。例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシ

ネート) (スルホーEGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホーDST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などを用いることが可能である。

[0083] 本発明において使用されるArid5A阻害剤は、一般式：

[化1]



で表されるクロルプロマジン又はその医薬上許容しうる塩を含む。クロルプロマジンは、Arid5A発現の阻害を介してIL-6のmRNAの発現も阻害し、IL-6のmRNAの安定化を特異的に阻害する。

[0084] 本発明における敗血症および／または敗血症性ショックの治療剤または予防剤には、保存剤や安定剤等の製剤上許容しうる材料が添加されていてもよい。製剤上許容しうるとは、それ自体は上記の敗血症および／または敗血症性ショックの治療効果を有する材料であってもよいし、当該治療効果を有さない材料であってもよく、上記治療剤とともに投与可能な製剤上許容される材料を意味する。また、治療効果を有さない材料であって、Arid5A阻害剤と併用することによって相乗的效果もしくは相加的な安定化効果を有する材料であってもよい。

[0085] 製剤上許容される材料としては、例えば滅菌水や生理食塩水、保存剤、安定剤、賦形剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。

[0086] 本発明において、界面活性剤としては非イオン界面活性剤を挙げることができ、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソ

ルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル等のHLB 6～18を有するもの、等を典型的例として挙げることができる。

[0087] また、界面活性剤としては陰イオン界面活性剤も挙げることができ、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10～18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2～4でアルキル基の炭素原子数が10～18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8～18のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数12～18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。

[0088] 本発明における薬剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせて添加することができる。本発明の製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20、40、60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックF-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

[0089] 本発明において緩衝剤としては、リン酸、クエン酸緩衝液、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、乳酸、リン酸カリウム、グルコン酸、カプリル酸、デオキシコール酸、サリチル酸、トリエタノールアミン、フマル酸等、他の有機酸等、あるいは、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げる事が出来る。

[0090] また溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製してもよい。緩衝液の濃度は一般には1～500mMであり、好まし

くは5～100mMであり、さらに好ましくは10～20mMである。

[0091] また、本発明における薬剤は、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、アミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、糖アルコールを含んでいてもよい。

[0092] 本発明において、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物としては、例えばデキストラン、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース等を挙げることができる。

[0093] 本発明において、糖アルコールとしては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール等を挙げることができる。

[0094] 本発明における薬剤を注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられる）、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HCO-50）等と併用してもよい。

所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。

[0095] また、必要に応じ、本発明における薬剤をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)としたりすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed., 1980等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556; EP第133,988号)。

使用される製剤上許容しうる担体は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0096] 本発明のA r i d 5 A阻害剤をヒトや他の動物の医薬として使用する場合には、これらの物質自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。製剤化する場合には、上記に記載の製剤上許容される材料を添加しても良い。

[0097] 本発明におけるすべての薬剤は、医薬品の形態で投与することが可能であり、経口的または非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 k gあたり0. 001 m gから100 m gの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0. 1～1000 m g、好ましくは0. 1～50 m gの投与量を選ぶことができる。好ましい投与量、投与方法は、たとえば抗A r i d 5 A抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1 k gあたり1ヶ月（4週間）に0. 1 m gから40 m g、好ましくは1 m gから20 m gを1回から数回に分けて、例えば2回／週、1回／週、1回／2週、1回／4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与方法などである。投与スケジュールは、投与後の状態の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回／週あるいは1回／週から1回／2週、1回／3週、1回／4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

[0098] 本発明は、A r i d 5 Aの発現および／または機能を抑制することによる、敗血症および／または敗血症性ショックの治療または予防に有用な候補物質のスクリーニング方法に関する。当該スクリーニング方法は、

（a）被験物質のA r i d 5 Aの発現及び／又は機能に対する影響を評価する工程、及び

（b）被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 Aの発現及び／又は

機能を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる。

[0099] 本発明のスクリーニング方法は、まず被験物質の A r i d 5 A の発現および/または機能に対する影響を評価することを含む。A r i d 5 A の機能としては例えば、I L - 6 m R N A のステムループに特異的に結合し、I L - 6 m R N A を特異的に破壊する R e g n a s e - 1 の作用を拮抗的に阻害することにより、I L - 6 m R N A の安定化に寄与することが挙げられる。したがって、A r i d 5 A の発現および/または機能に対する影響としては例えば、A r i d 5 A の発現を抑制すること、A r i d 5 A に結合することにより A r i d 5 A の機能を阻害すること、A r i d 5 A と競合的に I L - 6 m R N A と結合することにより A r i d 5 A の機能を阻害すること等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

また、被験物質を用いない場合と比較して、該 A r i d 5 A の発現および/または機能を減少させる物質を選択する工程を含む。

[0100] 本発明のスクリーニング方法の第一の態様においては、まず A r i d 5 A に被験物質を接触させる。

[0101] 本発明の方法に使用されるヒト由来の A r i d 5 A のアミノ酸配列は既述の通りである。本発明の方法に使用される A r i d 5 A には、上記の公知の A r i d 5 A と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、A r i d 5 A の変異体、アレル、バリエント、ホモログ、A r i d 5 A の部分ペプチド、または他のタンパク質との融合タンパク質などが挙げられるがこれらに限定されない。

[0102] 本発明における A r i d 5 A の変異体としては、既述のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなる天然由来のタンパク質であって、既述のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を挙げることができる。また、既述の塩基配列からなる D N A とストリジェントな条件下でハイブリダイズする天然由来の D N A よりコードされるタンパク質であって、既述の

アミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質も、A r i d 5 Aの変異体として挙げることができる。

[0103] 本発明において、変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えば、アミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A, I, L, M, F, P, W, Y, V）、親水性アミノ酸（R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G, A, V, L, I, P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S, T, Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C, M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D, N, E, Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R, K, H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H, F, Y, W）を挙げるることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸配列による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することは既に知られている。

[0104] 本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、A r i d 5 Aと同等の生物学的機能や生化学的機能を有することを指す。A r i d 5 AはIL-6 mRNAのステムループに特異的に結合し、IL-6 mRNAを特異的に破壊するRegnase-1の作用を拮抗的に阻害することにより、IL-6 mRNAの安定化に寄与する。本発明において、A r i d 5 Aの生物学的機能や生化学的機能としてはIL-6 mRNAの安定化を挙げるることができる。

[0105] 目的のタンパク質と「機能的に同等なタンパク質」をコードするDNAを調製するために、当業者に良く知られた方法としては、ハイブリダイゼーション技術やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を利用する方法が挙げられ

る。即ち、当業者にとっては、A r i d 5 Aの塩基配列もしくはその一部をプローブとして、またA r i d 5 Aに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、A r i d 5 Aと高い相同性を有するDNAを単離することは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離しうるA r i d 5 Aと同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAもまた本発明のDNAに含まれる。

[0106] このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、6 M尿素、0.4 % SDS、0.5 × SSCの条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを指す。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6 M尿素、0.4 % SDS、0.1 × SSCの条件を用いることにより、より相同性の高いDNAの単離を期待することができる。これにより単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、目的タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で、少なくとも50 %以上、さらに好ましくは70 %以上、さらに好ましくは90 %以上（例えば、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %以上）の配列の同一性を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc Natl Acad Sci USA 90:5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215:403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100, wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50, wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラム

を用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0107] 本発明の方法に使用される A r i d 5 A の由来となる生物種としては、特定の生物種に限定されるものではない。例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ウシ、酵母、昆虫などが挙げられる。

[0108] 第一の態様に用いられる A r i d 5 A の状態としては、特に制限はなく、例えば精製された状態、細胞内に発現した状態、細胞抽出液内に発現した状態などであってもよい。

[0109] A r i d 5 A の精製は周知の方法で行うことができる。また、A r i d 5 A が発現している細胞としては、内在性の A r i d 5 A を発現している細胞、又は外来性の A r i d 5 A を発現している細胞が挙げられる。上記内在性の A r i d 5 A を発現している細胞としては、動物の組織由来の細胞、培養細胞などを挙げるができるが、これに限定されるものではない。上記培養細胞としては、特に制限はなく、例えば、市販のものを用いることが可能である。内在性の A r i d 5 A を発現している細胞が由来する生物種としては、特に制限はなく、ヒト、サル、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ウシ、酵母、昆虫などが挙げられる。また、上記外来性の A r i d 5 A を発現している細胞は、例えば、A r i d 5 A をコードする DNA を含むベクターを細胞に導入することで作製できる。ベクターの細胞への導入は、一般的な方法、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法、リポフェクタミン法、マイクロインジェクション法等によって実施することができる。また、上記外来性の A r i d 5 A を有する細胞は、例えば A r i d 5 A をコードする DNA を、相同組み替えを利用した遺伝子導入法により、染色体へ挿入することで作製することができる。このような外来性の A r i d 5 A が導入される細胞が由来する生物種としては、哺乳類に限定されず、外来タンパク質を細胞内に発現させる技術が確立されている生物種であればよい。

[0110] また、A r i d 5 A が発現している細胞抽出液は、例えば試験管内転写翻訳系に含まれる細胞抽出液に、A r i d 5 A をコードする DNA を含むベク

ターを添加したものを挙げるができる。該試験管内転写翻訳系としては、特に制限はなく、市販の試験管内転写翻訳キットなどを使用することが可能である。

[0111] 本発明における「被験物質」は、特に限定されるものではなく、例えば天然化合物、有機化合物、無機化合物、核酸、タンパク質、ペプチド等の単一物質、並びに化合物ライブラリー、核酸ライブラリー、ペプチドライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核単細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物等を挙げるができる。上記被験物質は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げるができる。また、上記被験物質に加えて、これらの被験物質を複数種混合した混合物も含まれる。

[0112] また、本発明において「接触」は、A r i d 5 Aの状態に応じて行う。例えば、A r i d 5 Aが精製された状態であれば、精製標品に被験物質を添加することにより行うことができる。また、細胞内に発現した状態または細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液または該細胞抽出液に被験物質を添加することにより、若しくは被験物質を実験動物に直接投与することにより、行うことができる。被験物質がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質をコードするDNAを含むベクターをA r i d 5 Aが発現している細胞へ導入する、または該ベクターをA r i d 5 Aが発現している細胞抽出液に添加することで行うことも可能である。また、例えば、酵母又は動物細胞等を用いた2ハイブリッド法を利用することも可能である。

[0113] 第一の態様では、次いで、A r i d 5 Aの発現および/または機能を測定することで、被験物質のA r i d 5 Aの発現および/または機能に対する影響を評価する。A r i d 5 Aの機能としては、I L - 6 m R N Aの安定化を挙げるができる。具体的にはA r i d 5 Aと被験物質を共存させ、I L - 6 m R N Aの分解抑制効果を測定すること等により間接的にA r i d 5 Aの機

能を測定することができる。次いで被験物質を接触させない場合と比較して、上記 A r i d 5 A の発現および/または機能を減少させた被験物質を選択する。なお、被験物質を実験動物に投与した場合には、脾臓等の組織を摘出し、マクロファージ等の特定の細胞における A r i d 5 A の発現および/または機能、I L - 6 m R N A の発現量等を測定する。発現量の測定は P C R (polymerase chain reaction) や R T - P C R (reverse transcription- polymerase chain reaction)、リアルタイム P C R などの増幅を基にした技術やハイブリダイゼーションを基にした技術、および/または他の検出技術など適宜選択できる。本願における「P C R」は P C R およびそれから派生した増幅を基にした技術による各種 D N A、R N A 等の測定方法が含まれる。A r i d 5 A は I L - 6 の m R N A の安定化に寄与するタンパクであるため、細胞内で A r i d 5 A の発現が阻害されると、I L - 6 の m R N A の発現は抑制されるが、T N F - α の m R N A 発現には影響がないことが知られている。そこで、被験物質について、I L - 6 の m R N A の発現には影響を与えるが T N F - α の m R N A の発現には影響を与えないことを確認することで、A r i d 5 A の発現に影響を与える物質、即ち、結果的に敗血症および/または敗血症性ショックを治療または予防する効果を有する物質をスクリーニングすることも可能である。選択された被験物質には、A r i d 5 A の発現および/または機能を減少させる物質が含まれ、A r i d 5 A の発現および/または機能を抑制することによって、結果的に敗血症および/または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。

[0114] 第二の態様では、まず A r i d 5 A に被験物質を接触させ、次いで A r i d 5 A と被験物質との結合を検出することで、被験物質の A r i d 5 A の発現および/または機能に対する影響を評価する。検出方法としては、特に制限はない。A r i d 5 A と被験物質との結合は、例えば、A r i d 5 A に結合した被験物質に付された標識（例えば、放射標識や蛍光標識など定量的測定が可能な標識）によって検出することができる。また、A r i d 5 A に標識剤を結合することもできる。被験物質または A r i d 5 A を樹脂やチップな

どに固定化して結合を検出することもできる。A r i d 5 Aへの被験物質の結合により生じるA r i d 5 Aの機能変化を指標に検出することもできる。

本態様では、次いで、A r i d 5 Aと結合する被験物質を選択する。選択された物質には、被験物質を接触させない場合と比較して、A r i d 5 Aの発現または機能を減少させる物質が含まれ、A r i d 5 Aの発現または機能を抑制することによって、結果的に敗血症および／または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。

[0115] 本発明のスクリーニング法の第三の態様としては、まずA r i d 5 Aを発現する細胞に被験物質を接触させ、次いでA r i d 5 Aの発現レベルを測定することで、被験物質のA r i d 5 Aの発現に対する影響を評価する。A r i d 5 Aの発現レベルの測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば該遺伝子のmRNAを定法に従って抽出し、このmRNAを鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法、またはRT-PCR法を実施することによって該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。さらに、DNAアレイ技術を用いて、該遺伝子の発現レベルを測定することも可能である。

[0116] また、該遺伝子からコードされるA r i d 5 Aを含む画分を定法に従って回収し、該A r i d 5 Aの発現をSDS-PAGE等の電気泳動法で検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うこともできる。また、A r i d 5 Aに対する抗体を用いて、ウェスタンブロッディング法を実施し、A r i d 5 Aの発現を検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うことも可能である。A r i d 5 Aに対する抗体については、上記に記載したものをを用いることができる。

[0117] 第三の態様では、次いで被験物質を接触させていない場合と比較して、該A r i d 5 Aの発現レベルを減少させた被験物質を選択する。選択された物質には、A r i d 5 Aの発現を減少させる物質が含まれ、A r i d 5 Aの発現を抑制することによって、結果的に敗血症および／または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。なお、A r i d 5 A

は I L - 6 の m R N A の安定化に寄与するタンパクであるため、細胞内で A r i d 5 A の発現が阻害されると、I L - 6 の m R N A の発現は抑制されるが、T N F - α の m R N A 発現には影響がないことが知られている。そこで、被験物質について、I L - 6 の m R N A の発現には影響を与えるが T N F - α の m R N A の発現には影響を与えないことを確認することで、A r i d 5 A の発現に影響を与える物質、即ち、結果的に敗血症および／または敗血症性ショックを治療または予防する効果を有する物質をスクリーニングすることも可能である。

[0118] 本発明のスクリーニング法の第四の態様としては、まず A r i d 5 A をコードする D N A のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した D N A を有する細胞または細胞抽出液を提供する。

第四の態様において、「機能的に結合した」とは、A r i d 5 A 遺伝子のプロモーター領域に転写因子が結合することにより、レポーター遺伝子の発現が誘導されるように、A r i d 5 A 遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子とが結合していることをいう。従って、レポーター遺伝子が他の遺伝子と結合しており、他の遺伝子産物との融合タンパク質を形成する場合であっても、A r i d 5 A 遺伝子のプロモーター領域に転写因子が結合することによって、該融合タンパク質の発現が誘導されるものであれば、上記「機能的に結合した」の意に含まれる。

[0119] 上記レポーター遺伝子としては、その発現が検出可能なものであれば特に制限されず、例えば、当業者において一般的に使用される C A T 遺伝子、I a c Z 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (G U S) および G F P 遺伝子等を挙げることができる。また、上記レポーター遺伝子には、A r i d 5 A をコードする D N A もまた含まれる。

A r i d 5 A をコードする D N A のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した D N A を有する細胞または細胞抽出液は、上述の方法にて調製することが可能である。

[0120] 第四の態様では、次いで上記細胞または上記細胞抽出液に被験物質を接触

させる。次いで、該細胞または該細胞抽出液における上記レポーター遺伝子の発現レベルを測定することで、被験物質の A r i d 5 A の発現に対する影響を評価する。

[0121] レポーター遺伝子の発現レベルは、使用するレポーター遺伝子の種類に応じて、当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、レポーター遺伝子が C A T 遺伝子である場合には、該遺伝子産物によるクロラムフェニコールのアセチル化を検出することによって、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。レポーター遺伝子が l a c Z 遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による色素化合物の発色を検出することにより、また、ルシフェラーゼ遺伝子である場合には、該遺伝子産物の触媒作用による蛍光化合物の蛍光を検出することにより、また、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (G U S) である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による G l u c u r o n (I C N 社) の発光や 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -グルクロニド (X-G l u c) の発色を検出することにより、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。

[0122] また、A r i d 5 A 遺伝子をレポーターとする場合、該遺伝子の発現レベルの測定は、上述した方法で行うことができる。

[0123] 第四の態様においては、次いで被験物質を接触させていない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを減少または増加させた被験物質を選択する。選択された物質には A r i d 5 A の発現を減少させる物質が含まれ、A r i d 5 A の発現を抑制することによって、結果的に敗血症および／または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。

[0124] 第五の態様においては、まず I L - 6 m R N A に被験物質を接触させ、次いで I L - 6 m R N A と被験物質との結合を検出することで、被験物質の A r i d 5 A の発現および／または機能に対する影響を評価する。検出方法としては、特に制限はない。I L - 6 m R N A と被験物質との結合は、例えば、I L - 6 m R N A に結合した被験物質に付された標識（例えば、放射標識や蛍光標識など定量的測定が可能な標識）によって検出することができる。ま

た、IL-6 mRNAに標識剤を結合することもできる。被験物質またはIL-6 mRNAを樹脂やチップなどに固定化して結合を検出することもできる。IL-6 mRNAへの被験物質の結合により生じるIL-6 mRNAの活性変化を指標に検出することもできる。

本態様では、次いで、IL-6 mRNAと結合する被験物質を選択する。選択された物質にはArld5Aの発現および/または機能を減少させる物質が含まれ、Arld5Aの発現または機能を抑制することによって、結果的に敗血症および/または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。

[0125] 第六の態様においては、まずIL-6 mRNAに被験物質を接触させ、さらにArld5Aを接触させ、次いで、Arld5Aの機能を測定することで、Arld5Aの機能に対する影響を評価する。Arld5Aの機能としては、上述のような形で測定することができる。次いで被験物質を接触させない場合と比較して、上記機能を減少させた被験物質を選択する。選択された被験物質には、Arld5A機能を減少させる物質が含まれ、Arld5Aの機能を抑制することによって、結果的に敗血症および/または敗血症性ショックを治療または予防する効果を示すものと考えられる。

[0126] 第七の態様においては、まず被験物質を実験動物に投与し、さらにArld5Aの発現に対する影響についてPCRにて測定し、次いで被験物質を実験動物に投与しない場合と比較して、Arld5Aの発現を減少させる物質を選択する。実験動物への投与や、PCRでの測定については、上記のとおりである。

実施例

[0127] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0128] 実施例1. Arld5Aノックアウトマウスの作製(図1)

CLEA社からC57BL/6野生型マウス(6-8週)を入手し、Arld5Aノックアウトマウス(No. CDB0602K:www.cdb.riken.jp/ar)

[g/mutant%20mice%20list.html](http://www.cdb.riken.jp/arg/Methods.html))をwww.cdb.riken.jp/arg/Methods.htmlの方法により作製した。A r i d 5 A 遺伝子のDNA結合ドメインの主要部分を、両端をloxP配列で挟んだN e o - c a s s e t t e によって置換するように構築したターゲティングベクターを、T T 2 株E S 細胞にエレクトロポレーション法により導入した。相同的組み換えによる遺伝子破壊は、A r i d 5 A の遺伝子の3' U T R に対するプローブを使用したサザンブロッティング法により確認し、得られた変異E S 細胞を用いてキメラマウスを作製した。変異アレルのジャームライントランスミッションの確認は、キメラマウスをC 5 7 B L マウスと交配して得られた次世代のマウスのゲノムDNAを用いた、サザンブロッティング解析およびゲノムPCR（プライマー1：5' - A T A C T T T C T C G G C A G G A G C A - 3' ; プライマー2：5' - T G A A T G A A C T G C A G G A C G A G - 3' ）により行った。ヘテロ接合型の変異マウスは特定病原体のフリーの環境下で飼育し、C 5 7 B L マウスと5回の戻し交配を行った。

[0129] 実施例2：A r i d 5 A ノックアウトマウスにおける敗血症性ショック

8～9週齢のA r i d 5 A ノックアウトマウス（A r i d 5 A ^{-/-}）及び野生型マウス（それぞれ体重18-20g）に対し、Escherichia coli 血清型O 1 2 7 : B 8 から得られたL P S （シグマーアルドリッチ社）を腹腔内に投与し、7日間死亡率を観察した。また、L P S 投与4時間後にI L - 6 とI F N γ の役割を調べるために抗I L - 6 受容体抗体（M R 1 6 - 1 抗体、250mg/kg）、抗I F N γ 抗体（R 4 - 6 A 2 BioLegend, 25mg/kg）を投与し、7日間死亡率を観察した。

その結果、野生型、I L - 6 受容体抗体、T N F 抗体を投与したマウスは死亡したのに対し、A r i d 5 A ノックアウトマウスでは敗血症性ショックが起こらなかった。

[0130] 実施例3：A r i d 5 A のs i R N A によるI L - 6 の発現制御

マウスマクロファージ細胞株R A W 2 6 4 . 7 に、A r i d 5 A のs i R N A （S A S I _ M m 0 2 _ 0 0 3 4 1 5 2 3 （sigma））又はコントロールのs i R N A （1

0.0 nM) をエレクトロポレーション法にて導入した。24時間の培養後、細胞をLPS (100 ng/mL) で24時間刺激し、得られた細胞からRNAを抽出した。Arid5AのmRNAレベルをqPCRによって定量した(図3)。また、それぞれの培養上清中のIL-6及びTNF- α の濃度をELISA法によって定量した(図4及び5)。図3に示す通り、RAW 264.7にArid5AのsiRNAを導入したことにより、Arid5AのmRNA発現レベルが顕著に低下した。また、図4及び図5に示す通り、Arid5AのsiRNAを導入した細胞においては、LPS刺激によって産生されるIL-6の量が減少したのに対して、TNF- α の量には変化がなかった。

[0131] 実施例4：敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法

C57BL/6マウス(6～8週齢)の腹腔マクロファージを、被験物質(20 μ M)存在下又は非存在下において、LPS(1 μ g/mL)で刺激した。定量PCR(qPCR)によって、上記刺激した腹腔マクロファージにおけるArid5A、IL-6及びTNF- α のmRNAの相対発現レベルを測定した。Arid5AのmRNAについては、LPS刺激2時間後、IL-6のmRNA及びTNF- α のmRNAについては、LPS刺激2時間後、6時間後、12時間後、24時間後の発現レベルを測定した。被験物質として、クロルプロマジン(CPZ)を使用した結果を図6～8に示す。

[0132] 図6に示す通り、CPZ存在下でLPS刺激した腹腔マクロファージにおいては、CPZ非存在下の場合と比較して、LPS刺激2時間後において、Arid5AのmRNAの発現が顕著に抑制された。また、図7に示す通り、CPZ存在下でLPS刺激した腹腔マクロファージにおいては、CPZ非存在下の場合と比較して、LPS刺激2時間後、6時間後において、IL-6のmRNAの発現が顕著に抑制された。一方、図8に示す通り、CPZは、TNF- α のmRNAの発現に対しては何らの影響も与えなかった。

[0133] この結果より、CPZは、Arid5AのmRNAの発現自体を阻害する

物質であることがわかった。また、CPZは、Arid5Aにより影響を受けるIL-6のmRNAの発現も阻害する物質であり、かつ、Arid5Aにより影響を受けないことが知られているTNF- α のmRNAには何ら影響を与えない物質であった。このことから、CPZはIL-6のmRNAの安定化を特異的に阻害する物質であり、IL-6等の炎症性サイトカインが関与する敗血症及び／又は敗血症ショックの治療に有効であることが示唆された。このように、細胞内のArid5AのmRNAの発現を阻害する物質をスクリーニングすることにより、敗血症及び／又は敗血症ショックの治療に有効である物質を得ることが可能であるし、また、IL-6のmRNAの発現を阻害するが、TNF- α のmRNAには何ら影響を与えない物質をスクリーニングすることによっても、Arid5Aの作用を阻害する物質を効率的にスクリーニングすることが可能であると考えられる。これらの方法によって、敗血症及び／又は敗血症ショックの治療に有効である物質を効率よくスクリーニングすることができる。

産業上の利用可能性

[0134] 本発明の敗血症および／または敗血症性ショック治療剤により、敗血症及び敗血症性ショックの高い治療効果を有する医薬組成物が提供される。また、本発明により高い治療効果を示す治療剤のスクリーニング方法を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] A r i d 5 A阻害剤を有効成分とする、敗血症及び／又は敗血症性ショック治療剤。
- [請求項2] A r i d 5 A阻害剤が、核酸オリゴ、及びA r i d 5 A抗体からなる群より選ばれる1種以上の物質である、請求項1記載の敗血症及び／又は敗血症性ショック治療剤。
- [請求項3] 核酸オリゴが、天然及び非天然のRNAまたはDNAからなるオリゴである請求項2記載の敗血症及び／又は敗血症性ショック治療剤。
- [請求項4] 敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、
 (a) 被験物質のA r i d 5 Aの発現及び／又は機能に対する影響を評価する工程、及び
 (b) 被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 Aの発現及び／又は機能を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる方法。
- [請求項5] 請求項4に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、
 (a) 被験物質のA r i d 5 Aの発現に対する影響を評価する工程、及び
 (b) 被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 Aの発現を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる方法。
- [請求項6] 請求項4に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、
 (a) 被験物質を、実験動物に投与する工程、
 (b) 該A r i d 5 Aの発現に対する影響についてPCRにて測定する工程、及び
 (c) 被験物質を実験動物に投与しない場合と比較して、A r i d 5

Aの発現を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる方法。

[請求項7] 請求項4に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該方法は、

(a) 被験物質のA r i d 5 Aの機能に対する影響を評価する工程、
及び

(b) 被験物質を用いない場合と比較して、A r i d 5 Aの機能を減少させる物質を選択する工程、
とを含んでなる方法。

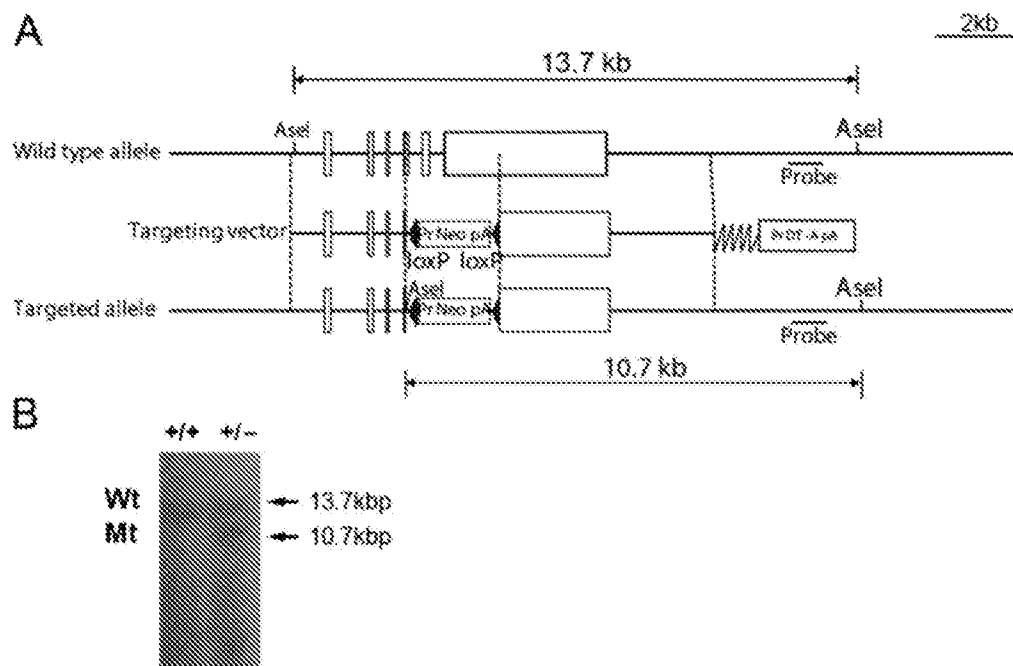
[請求項8] 請求項7に記載の敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に有用な候補物質のスクリーニング方法であって、該A r i d 5 Aの機能がI L - 6 m R N Aの安定化である方法。

[請求項9] A r i d 5 A阻害剤を投与することを含んでなる、敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療方法。

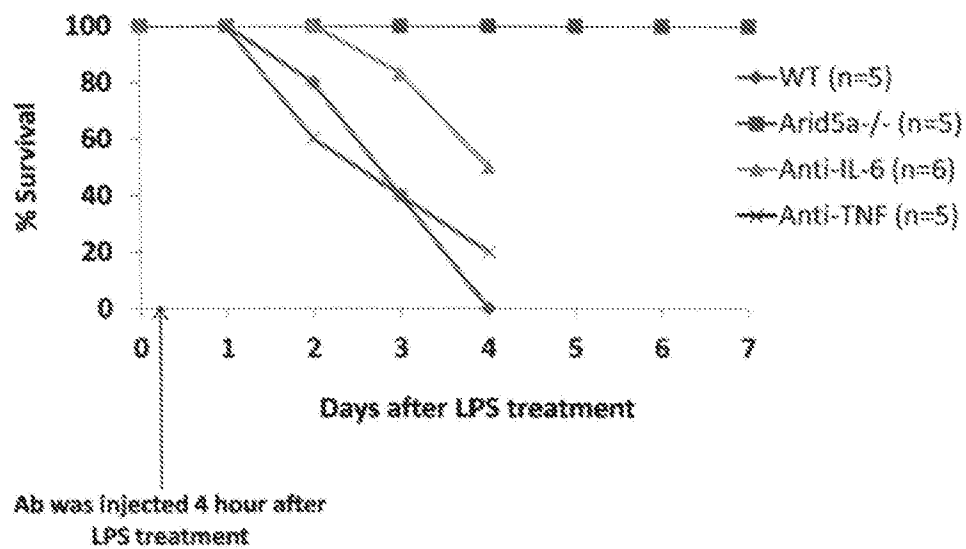
[請求項10] 敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療に使用するためのA r i d 5 A阻害剤。

[請求項11] 敗血症及び／又は敗血症性ショックの治療剤の製造のためのA r i d 5 A阻害剤の使用。

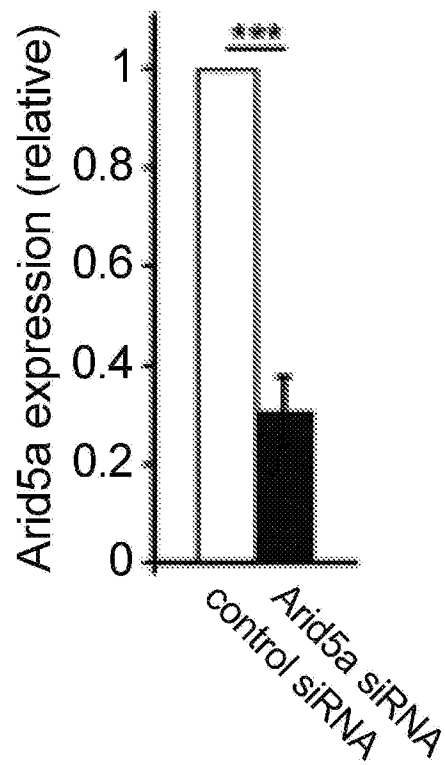
[図1]



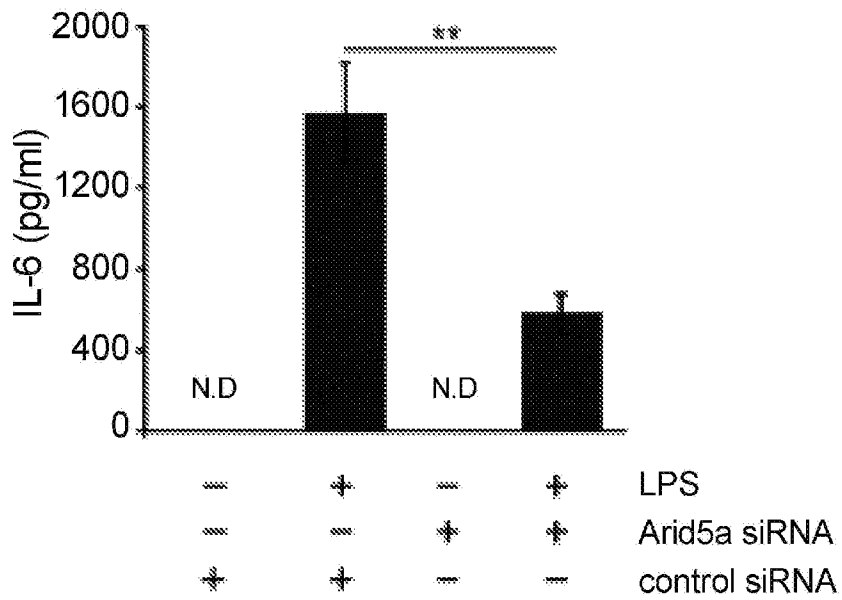
[図2]



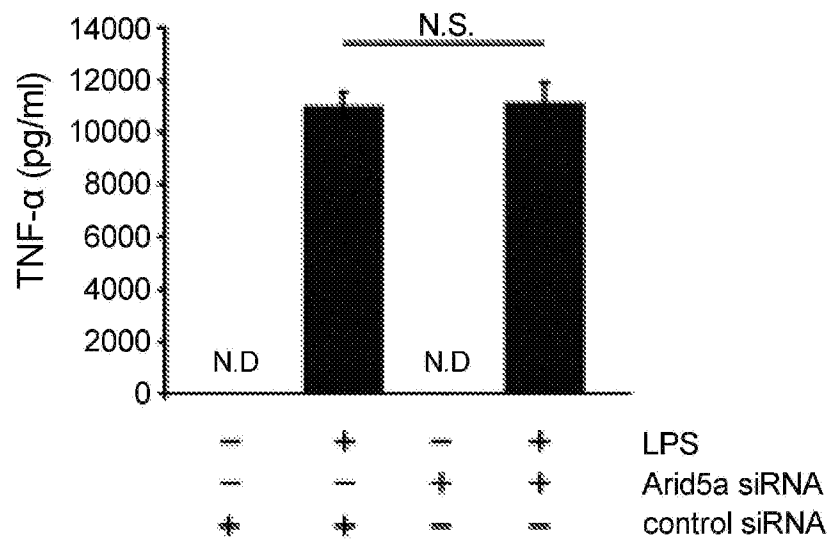
[図3]



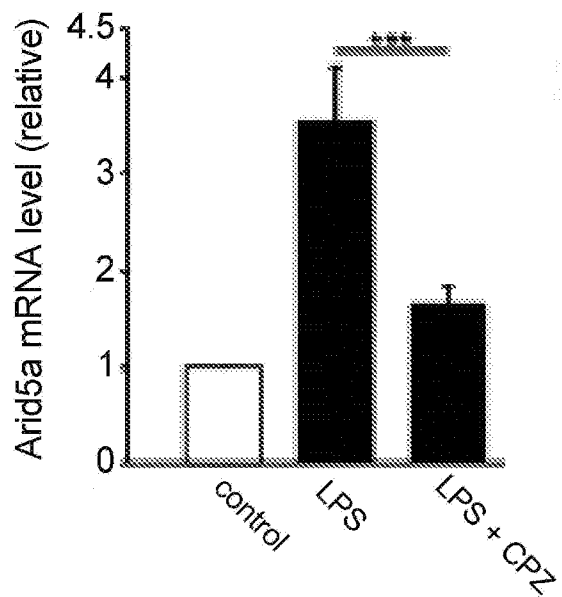
[図4]



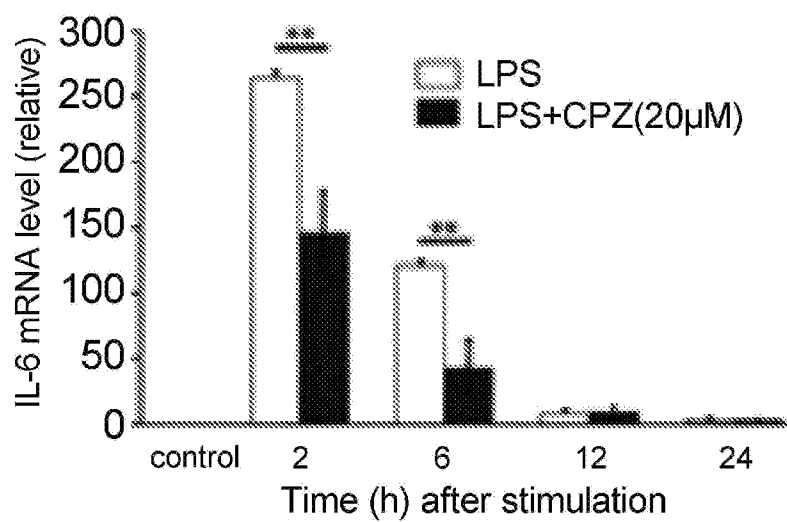
[図5]



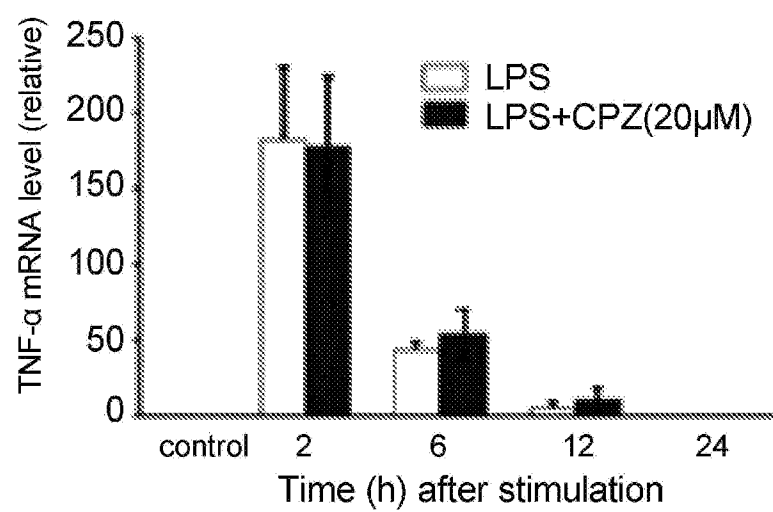
[図6]



[図7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/713, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12N15/113, C12N15/115, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TARAZONA. R, et al.; "Chlorpromazine amplifies macrophage-dependent IL-10 production in vivo.", J. Immunol., 1995, vol.154, pp.861-870, entire text, particularly, summary	1, 9-11
X	Osaka University Saishin Joho [online], 'Men'eki Nanbyo no Hassho Kiko no Kaimei ni Hitotsu no Kagi', 14 May 2013 (14.05.2013), URL< http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/05/20130514_1 >, [retrieval date 03 March 2016 (03.03.2016)], entire text, particularly, column of 'Kenkyu no Shosai na Setsumei'	1-11

☒ 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
03 March 2016 (03.03.16)

Date of mailing of the international search report
29 March 2016 (29.03.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085806

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sachiko TAKAMURA (AKASHI); "Endotoxic Shock to TLR", Inflammation & Immunology, 2005, vol.13, no.1, pages 37 to 44, entire text, particularly, page 37	1-11
Y	MASUDA, K. et al.; "Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo", PNAS, 2013, vol.110, No.23, pp.9409-9414, entire text, particularly, summary, page 9413, right column, lines 45 to 57	1-11
Y	GREENHILL, C. J. et al.; "IL-6 Trans-Signaling Modulates TLR4-Dependent Inflammatory Responses via STAT3", J. Immunol., 2011, vol.186, pp.1199-1208, entire text, particularly, summary	1-11
Y	RIEDEMANN, N. C. et al.; "Protective Effects of IL-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression", J. Immunol., 2003, vol.170, pp.503-507, entire text, particularly, summary	1-11
P,X	MAHABUB-UZ, Z. M. et al.; "Pathogenic role of Arid5a in endotoxin shock", Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 30 October 2015 (30.10.2015), vol.44, page 192, 3-G-W44-8-P	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085806

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
C12N15/113(2010.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

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. A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/713, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12N15/113, C12N15/115, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	TARAZONA. R, et al.; “Chlorpromazine amplifies macrophage-dependent IL-10 production in vivo.”, J. Immunol., 1995, vol.154, pp.861-870, 全文、特に、要旨	1, 9-11

☒ 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

03.03.2016

国際調査報告の発送日

29.03.2016

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)

長岡 真

4 U

5277

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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 請求項の番号
X	大阪大学 最新情報[online], 「免疫難病の発症機構の解明に1つの鍵」, 2013.05.14, URL< http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/05/20130514_1 >, [2016.03.03 検索] 全文、特に、「研究の詳細な説明」欄	1-11
A	高村 (赤司) 祥子; 「エンドトキシンショックとTLR」, 炎症と免疫, 2005, vol.13, No.1, pp.37-44, 全文、特に、第37頁	1-11
Y	MASUDA, K. et al.; “Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo” , PNAS, 2013, vol.110, No.23, pp.9409-9414, 全文、特に、要旨、第9413頁右欄第45-57行	1-11
Y	GREENHILL, C. J. et al.; “IL-6 Trans-Signaling Modulates TLR4-Dependent Inflammatory Responses via STAT3” , J. Immunol., 2011, vol.186, pp.1199-1208, 全文、特に、要旨	1-11
Y	RIEDEMANN, N. C. et al.; “Protective Effects of IL-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression” , J. Immunol., 2003, vol.170, pp.503-507, 全文、特に、要旨	1-11
P, X	MAHABUB-UZ, Z. M. et al.; “Pathogenic role of Arid5a in endotoxin shock” , 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2015.10.30, vol.44, p.192, 3-G-W44-8-P	1-11

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i,
C12N15/115(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i