

(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
2010年12月2日(02.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/137547 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 35/12 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 35/30 (2006.01) C12Q 1/25 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/058722

(22) 国際出願日: 2010年5月24日(24.05.2010)

(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 2009-124811 2009年5月25日(25.05.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京工業大学(Tokyo Institute of Technology) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2-12-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 半田 宏 (HANDA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 安藤 秀樹 (ANDO, Hideki) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長

津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 伊藤 拓水 (ITO, Takumi) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 堀田 健太郎 (HOTTA, Kentaro) [JP/JP]; 〒2268503 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 野村 健一, 外(NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1農機舎4階 Kanagawa (JP).

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

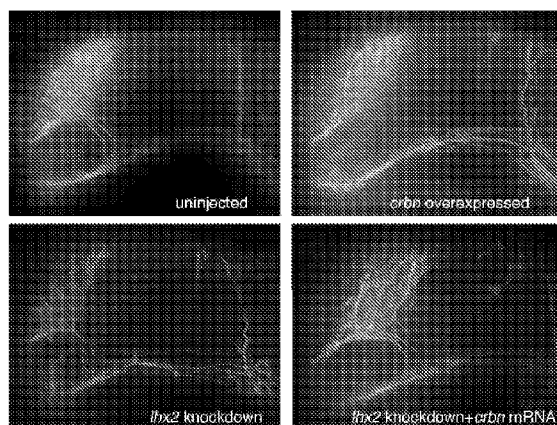
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING NUCLEAR FACTOR INVOLVED IN PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF CENTRAL NEURONAL CELLS

(54) 発明の名称: 中枢神経細胞の増殖及び分化に係る中核因子を含む医薬組成物

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a novel factor which can induce the proliferation of a neural stem cell and the differentiation of a neural stem cell into a neurocyte. Specifically disclosed are: a pharmaceutical composition which is characterized by comprising 1) CRBN, 2) a nucleic acid encoding CRBN or 3) a stem cell or a neural progenitor cell in which CRBN has been expressed; a method for inducing the proliferation of a neural stem cell or a neural progenitor cell of a non-human animal and also inducing the differentiation of the neural stem cell or the neural progenitor cell into a neurocyte by administering the pharmaceutical composition to the non-human animal; and a method for screening a therapeutic agent for diseases affecting cerebral cortex or surgical injury of cerebral cortex, which utilizes CRBN.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/137547 A1



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を誘導する新たな因子を提供することを目的として、
1) CRBN、2) CRBN をコードする核酸、又は 3) CRBN を発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を
含有することを特徴とする医薬組成物、及びこの医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神
経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖と神経細胞への分化を誘導する方法、並びに CRBN を利用した大脳皮
質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：

中枢神経細胞の増殖及び分化に係る中核因子を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、大脳皮質疾患等の治療のために用いられる医薬組成物、及びその医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖や神経細胞への分化を誘導する方法、並びに大脳皮質疾患等の治療薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の神経細胞に関する研究の進展によって、アルツハイマー病や外傷などによって失われた脳を再生できる可能性が生まれてきた。このような脳の再生においては、神経細胞への分化を誘導する因子の解明が重要である。

[0003] 神経細胞への分化誘導に関して、最近、Mangaleらは、Lhx2というタンパク質が神経幹細胞又は神経前駆細胞を皮質へ誘導し、海馬への誘導を抑制することを報告している（非特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Mangale, V. S. et al., Science, Vol.319, No.5861, 304-309, 2008

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上述のように、神経細胞への分化を誘導する因子を新たに見つけることができれば、神経細胞を再生し、アルツハイマー病などの大脳皮質疾患の治療に役立てることができる。

[0006] 本発明は、以上のような技術的背景の下になされたものであり、神経細胞への分化を誘導する新たな因子を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、1) CRBN (cereblon) というタンパク質が幹細胞を神経幹細胞又は神経前駆細胞へ分化させ、更に神経細胞へと分化させる機能をもつこと、2) CRBNが中枢神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖を誘導すること、及び3) CRBNは、既知の大脳皮質セレクター因子であるLhx2の機能的下流に位置することを見出した。
- [0008] CRBNはユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質であり、アミノ酸配列も公知であるが、中枢神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖と神経細胞への分化を誘導する機能があることは従来全く知られていなかった。
- [0009] CRBNと脳との関係については、Higginsらの報告がある (J. J. Higgins et al., (2004) Neurology 63, 1927-1931)。Higginsらは、軽度の精神遅滞を持つ家系には、crbn遺伝子の変異がみられることを報告している。しかし、この報告は、CRBNに上述したような機能が存在することを示唆するものではない。
- [0010] 本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。
- 即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔11〕を提供するものである。
- 〔1〕 1) CRBN、2) CRBNをコードする核酸、又は3) CRBNを発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を含有することを特徴とする医薬組成物。
- 〔2〕 CRBNをコードする核酸が、ウイルスベクター中に挿入されていることを特徴とする〔1〕に記載の医薬組成物。
- 〔3〕 CRBNの他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質も含有することを特徴とする〔1〕に記載の医薬組成物。
- 〔4〕 CRBNをコードする核酸の他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質をコードする核酸も含有することを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の医薬組成物。
- 〔5〕 CRBNの他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質も発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を含有することを特徴とする〔1〕に記載の医薬組成物。

〔6〕 大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療のために用いられることを特徴とする〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔7〕 大脳皮質の再生のために用いられることを特徴とする〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔8〕 〔1〕乃至〔7〕のいずれかに記載の医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞を増殖させる方法。

〔9〕 〔1〕乃至〔7〕のいずれかに記載の医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞を神経細胞へ分化させる方法。

〔10〕 被験物質をCRBNを含むユビキチンリガーゼ複合体に接触させる工程、及び前記ユビキチンリガーゼ複合体のユビキチンリガーゼ活性を測定し、ユビキチンリガーゼ活性を向上させた被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法。

〔11〕 被験物質の存在下で神経幹細胞又は神経前駆細胞を培養する工程、及び神経幹細胞又は神経前駆細胞中のCRBNの発現量を測定し、CRBNの発現量を増大させた被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法。

発明の効果

[0011] 本発明の医薬組成物中に含まれるCRBNは、中枢神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖と神経細胞への分化を誘導する。従って、本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病などの大脳皮質疾患の治療薬として有用である。また、CRBNは、大脳皮質疾患の新たな治療薬の開発のための標的物質としても有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ゼブラフィッシュの胚の蛍光顕微鏡写真。左上が正常胚、右上がcrbn遺伝子を過剰発現させた胚、左下がIhx2遺伝子をノックダウンした胚、右下がIhx2遺伝子をノックダウンし、crbn遺伝子を過剰発現させた胚を示す。

[図2]ゼブラフィッシュの胚の顕微鏡写真。右がcrbn遺伝子を過剰発現させた胚を示し、左が未処理の胚を示す。撮影倍率は両者とも同じである。

[図3]crbn遺伝子を過剰発現させた細胞（ローダミンで蛍光標識）を移植したゼブラフィッシュの顕微鏡写真。上段は200倍、下段は100倍で撮影したものである。また、左列は明視野像、右列は蛍光像である。

[図4]試験管内反応系を用いたCRBN複合体 (FH-CRBN complex) のユビキチンリガーゼ活性の検出のための電気泳動写真。左はユビキチンを、中央はCRBN複合体形成因子であるCul4Aを、右はCRBNのユビキチン化を、それぞれ免疫ブロッキングで検出している。Mockは、対照実験用のサンプル用いた場合を示す。

[図5]生細胞を用いたCRBN複合体のユビキチンリガーゼ活性の検出のための電気泳動写真。

[図6]グリア細胞を蛍光染色したゼブラフィッシュの頭部の拡大写真。左側が前端部である。左図が通常個体の写真であり、右図がCRBN過剰発現個体の写真である。

[図7]セロトニン産生細胞を蛍光染色したゼブラフィッシュの頭部の拡大写真。脳の背側から撮影している。上側が前端部である。左図が通常個体の写真であり、右図がCRBN過剰発現個体の写真である。図中の1は松果体を示し、2は腹側後方結節、3は縫線核を示す。

[図8]未分化細胞を脳室に移植したゼブラフィッシュの写真。A～Dは、CRBNを発現しない細胞を移植した場合を示し、E～Hは、CRBNを発現する細胞を移植した場合を示す。A及びEは明視野画像であり、B及びEはAlexaFluor（登録商標）の蛍光画像（チューブリンの分布を示す。）であり、C及びGはローダミンの蛍光画像（ドナー細胞の分布を示す。）であり、D及びHはAlexaFluor（登録商標）とローダミンの蛍光画像である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0014] 本発明の医薬組成物は、1) CRBN、2) CRBNをコードする核酸、又は3) C

RBNを発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を含有することを特徴とするものである。

- [0015] CRBNは既知のタンパク質であり、それをコードする遺伝子（crbn遺伝子）の塩基配列もデータベース上に公開されている。例えば、ヒト由来のcrbn遺伝子の塩基配列、マウス由来のcrbn遺伝子の塩基配列、ラット由来のcrbn遺伝子の塩基配列、及びゼブラフィッシュ由来のcrbn遺伝子の塩基配列は、それぞれGeneID:51185、GeneID:58799、GeneID:297498、及びGeneID:445491でEntrez Geneに登録されている。使用するCRBNやcrbn遺伝子は天然のものであってもよいが、天然のCRBNのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、活性を持つユビキチンリガーゼ複合体を形成できる改変型のCRBNやそれをコードする遺伝子を使用してもよい。
- [0016] 本発明の医薬組成物は、CRBN、CRBNをコードする核酸、CRBNを発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞のいずれを有効成分としていてもよい。これらを有効成分とする医薬組成物の調製及び使用は、タンパク質、核酸、幹細胞、前駆細胞を有効成分とする既知の医薬と同様に行うことができる。
- [0017] CRBNをコードする核酸はDNA、RNAいずれであってもよい。核酸は、脳内の神経幹細胞に作用できるよう適当なベクターに挿入されていることが好ましい。このようなベクターとしては、ウイルスベクターを挙げることができる。ウイルスベクターの具体例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどを挙げることができる。
- [0018] CRBNを発現させる幹細胞としては、拒絶反応を回避できるため患者由来のiPS細胞が好ましいが、他の幹細胞、例えば、ES細胞、成体幹細胞、臍帯血幹細胞などでもよい。CRBNは幹細胞に発現させればよいが、過剰発現させることが好ましい。CRBNを発現又は過剰発現させる方法は、例えば、安藤らの方法（Ando and Okamoto, *Mar Biotechnol* 8(3):295-303, 2006）などに従って行うことができるが、他の方法、例えば、他のマイクロインジェクション法、ケージドRNA法（安藤ら、*Nat Genet* 28:317-325, 2001）、電気穿孔法、リ

ン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、ウイルス法、ソノポレーション法、トランスポゾン法などによって行ってもよい。

- [0019] 本発明の医薬組成物の投与方法は特に限定されず、有効成分の種類などに応じて適宜決めることができる。CRBNやCRBNをコードする核酸を有効成分とする場合は、脳室内、皮内、腹腔内、静脈、動脈、又は脊髄液への注射又は点滴等によって投与することができる。CRBNは脳内の神経幹細胞又は神経前駆細胞に対し作用するので、脳室内に投与する場合以外は、脳血管関門を通過できるような処理がなされることが好ましい。このような処理としては、積極的に取り込まれる必須内因性物質と結合させる、排出トランスポーターの認識を避ける構造的修飾を行なう、最低限の機能領域のみを含む低分子量化等の方法が考えられる。幹細胞又は神経前駆細胞を有効成分とする場合は、脳室内に直接投与する。
- [0020] 本発明の医薬組成物の投与量は特に限定されず、有効成分の種類などに応じて適宜決めることができる。成人に対する1日当たりの投与量は、CRBNを投与する場合は0.5mg~100mg程度投与するのが好ましく、CRBNをコードする核酸を投与する場合は1mg~200mg程度投与するのが好ましく、CRBNを発現させる幹細胞又は神経前駆細胞を投与する場合は500細胞~5000細胞を50 μ l~500 μ l程度投与するのが好ましい。
- [0021] 本発明の医薬組成物を注射又は点滴によって投与する場合は、注射液や点滴液に通常含まれる成分を含んでいてもよい。このような成分としては、液体担体（例えば、リン酸カリウム緩衝液、生理食塩水、リンゲル液、蒸留水、ポリエチレングリコール、植物性油脂、エタノール、グリセリン、ジメチルスルホキサイド、プロピレングリコールなど）、抗菌剤、局所麻酔剤（例えば、塩酸プロカイン、塩酸ジブカインなど）、緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）、浸透圧調節剤（例えば、グルコース、ソルビトール、塩化ナトリウムなど）を例示できる。
- [0022] 本発明の医薬組成物は、1) CRBNの他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質を含んでいてもよく、2) CRBNをコードする核

酸の他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質をコードする核酸を含んでいてもよく、3) CRBNの他にCRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質も発現させた幹細胞又は神経前駆細胞を含んでいてもよい。CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質としては、DDB1 (Damaged DNA Binding protein)、Cul4A (Cullin 4A)、Cul4B (Cullin 4B)、Roc1 (RBX1)などを例示できる。これらのタンパク質は、CRBNと同様に既知のタンパク質であり、それらをコードする遺伝子 (ddb1遺伝子、cul4a遺伝子、cul4b遺伝子、roc1遺伝子) の塩基配列もデータベース上に公開されている。例えば、ヒト由来のddb1遺伝子の塩基配列、マウス由来のddb1遺伝子の塩基配列、ラット由来のddb1遺伝子の塩基配列、及びゼブラフィッシュ由来のddb1遺伝子の塩基配列は、それぞれGeneID: 1642、GeneID: 13194、GeneID: 64470、及びGeneID: 393599でEntrez Geneに登録されており、ヒト由来のcul4a遺伝子の塩基配列、マウス由来のcul4a遺伝子の塩基配列、ラット由来のcul4a遺伝子の塩基配列、及びゼブラフィッシュ由来のcul4a遺伝子の塩基配列は、それぞれGeneID: 8451、GeneID: 99375、GeneID: 361181、及びGeneID: 394002でEntrez Geneに登録されており、ヒト由来のcul4b遺伝子の塩基配列、マウス由来のcul4b遺伝子の塩基配列、ラット由来のcul4b遺伝子の塩基配列、及びゼブラフィッシュ由来のcul4b遺伝子の塩基配列は、それぞれGeneID: 8450、GeneID: 72584、GeneID: 302502、及びGeneID: 560313でEntrez Geneに登録されており、ヒト由来のroc1遺伝子の塩基配列、マウス由来のroc1遺伝子の塩基配列、ラット由来のroc1遺伝子の塩基配列、及びゼブラフィッシュ由来のroc1遺伝子の塩基配列は、それぞれGeneID: 9978、GeneID: 56438、GeneID: 300084、及びGeneID: 449846でEntrez Geneに登録されている。各タンパク質や遺伝子は天然のものであってもよいが、天然のタンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、活性を持つユビキチンリガーゼ複合体を形成できる改変型のタンパク質やそれをコードする遺伝子を使用してもよい。ユビキチンリガーゼ複合体には、CRBN以外にDDB1、Cul4A、Roc1

、又はDDB1、CuL4B、Roc1の3種類のタンパク質が含まれている。本発明の医薬組成物は、これら3種類のタンパク質（又はこれらのタンパク質をコードする核酸）をすべて含んでいる（又は発現させている）ことが好ましいが、これらの一部しか含まなくてもよい。

[0023] 本発明の医薬組成物は、大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療のためや大脳皮質の再生のために用いることができる。大脳皮質疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症などを挙げることができる。

[0024] 本発明の医薬組成物は、ヒトに用いるものであるが、ヒト以外の動物に投与し、その動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖や神経細胞への分化を誘導してもよい。対象となる動物は、主として脊椎動物であり、例えば、マウス、ラット、サル、イヌ、フェレット、ハムスター、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、メダカなどである。

[0025] CRBNが神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖及び神経細胞への分化を誘導することは、実施例に記載したように、ゼブラフィッシュでしか確認されていない。しかし、ヒトとゼブラフィッシュの間では、ゲノムシニテニーは70～80%保存されている（Nature Reviews Genetics 8, 353-367 (May 2007)）。従って、CRBNはヒトを含む他の脊椎動物においても、ゼブラフィッシュにおいて確認された作用と同様の作用を示すと予測される。

[0026] CRBNが神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖及び神経細胞への分化を誘導することから、このタンパク質を利用して大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。具体的には、以下の（A）及び（B）の方法を例示できる。

[0027] （A）被験物質をCRBNを含むユビキチンリガーゼ複合体に接触させる工程、及び前記ユビキチンリガーゼ複合体のユビキチンリガーゼ活性を測定し、ユビキチンリガーゼ活性を向上させた被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング

方法。

- [0028] (B) 被験物質の存在下で神経幹細胞又は神経前駆細胞を培養する工程、及び神経幹細胞又は神経前駆細胞中のCRBNの発現量を測定し、CRBNの発現量を増大させた被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法。
- [0029] (A) の方法において、ユビキチンリガーゼ活性の測定は、例えば、Angersら (Nature 443, 590-593, 2006) や Groismanら (Cell 113, 357-367, 2003) の方法に従って行なうことができる。
- [0030] (A) の方法において、被験物質がユビキチンリガーゼ活性を向上させたかどうかは、被験物質と接触させないでCRBNを含む複合体のユビキチンリガーゼ活性を測定し、その値と比較することにより、判定することができる。
- [0031] (A) の方法によって選択される物質は、生体内の神経幹細胞又は神経前駆細胞に存在するCRBNを含む複合体のユビキチンリガーゼ活性を向上させる働きをもつ。CRBNによる神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖及び神経細胞への分化は、この複合体の持つユビキチンリガーゼ活性を介して行われていると考えられる。従って、(A) の方法によって選択される物質は、CRBNによる神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖及び神経細胞への分化を促進し、大脳皮質疾患や大脳皮質の外科的損傷に対する治療効果を持つと考えられる。
- [0032] (B) の方法において、使用する神経幹細胞としては、基本的にES細胞、iPS細胞、成体幹細胞に神経分化誘導を施したもの等を用いる。または成体マウス脳室下帯由来あるいは成体ラット海馬由来の神経幹細胞などを用いてもよい。
- [0033] (B) の方法において、CRBNの発現量を測定する方法としては、CRBNに対する抗体を用いる方法、in situ hybridization法、RT-PCR法、ノーザンブロット法などによって行うことができる。
- [0034] (B) の方法において、被験物質がCRBNの発現量を増大させたかどうかは、被験物質の非存在下で神経幹細胞又は神経前駆細胞を培養し、CRBNの発現量を測定し、その値と比較することにより、判定することができる。

[0035] (B)の方法によって選択される物質は、生体内の神経幹細胞又は神経前駆細胞のCRBNの発現量を増大させる働きをもつ。従って、(B)の方法によって選択される物質は、CRBNによる神経幹細胞又は神経前駆細胞の増殖及び神経細胞への分化を促進し、大脳皮質疾患や大脳皮質の外科的損傷に対する治療効果を持つと考えられる。

実施例

[0036] 以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

[0037] (実験方法)

(1) ゼブラフィッシュ胚の全身での遺伝子過剰発現

成魚は常時28.5°Cで飼育し、照明オン14時間／オフ10時間の日周サイクルで継代、維持した。オスとメスの自然交配で受精卵を確保し、最初の卵割が始まる前(1細胞期)の胚に試験管内合成したCapped RNA水溶液を600 ng/ μ lの濃度で窒素ガス圧30 psi、30 msec(ミリ秒)間バルブ解放の条件で細胞質に注入した。Ihx2遺伝子以外のすべての遺伝子(crbn遺伝子, six3.2遺伝子, crbnとE3ユビキチンリガーゼ複合体を構成する蛋白質をコードする遺伝子)の発現は全身での発現でも発生への影響が少ないのでこの方法で最初のデータを得た。

[0038] (2) ゼブラフィッシュ胚の頭部に限局した遺伝子過剰発現

全身での発現で非特異的な胚の背側化を示すIhx2遺伝子および脳容積への影響を特異的に調べる精密な実験を行なう場合は、胚への予定頭部領域への生体内RNAリポフェクションを行なった。方法は、安藤らが開発、発表した技術(Ando and Okamoto, Efficient transfection strategy for the spatiotemporal control of gene expression in zebrafish. Mar Biotechnol 8(3):295-303. 2006)にすべて従った。

[0039] (3) ゼブラフィッシュ胚を用いた遺伝子ノックダウン

ノックダウンしたい遺伝子のcDNA配列の翻訳開始コドン周辺に対応した25-merのアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(AMO, Gene Tools社)水溶液(700 ng/ μ l, 注入条件はRNAと同じ)を1細胞期の胚に注入した。crbn

遺伝子のノックダウンに用いるAMOの配列は、5' AGAGCTGTAGCTGGTTCCCCATTTCC
3'、*lhx2*遺伝子のノックダウンの場合は、5' TCTGCAACCCAAGATTTCCGTGAGA3
'である。

[0040] (4) ゼブラフィッシュを用いた遺伝子機能階層性の決定

安藤ら (Ando et al., *Lhx2 mediates the activity of Six3 in zebrafish forebrain growth. Dev Biol.* 287(2):456-68. 2005) の手法に以下の過程以外はすべて従った。頭部特異的な遺伝子発現はRNAアンケーシング (特開2002-315576、Ando et al., *Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. Nat. Genet.* 28, 317-325, 2001) のかわりに上記(2)の方法の生体内リポフェクション法を用いた。基本的な原理は、機能的関連が示唆される2種の遺伝子の一方(A)を上記(3)の方法でノックダウンした胚を受精後6時間(原腸胚期)まで培養し、その予定前脳領域に上記(2)の方法の生体内リポフェクションで他方の遺伝子(B)の発現を誘導する。受精後24時間期でAのノックダウン効果が救済され、AとBの逆の組み合わせではBのノックダウン効果が救済されない場合はAはBの機能的上位に位置すると決定する。

[0041] (5) 免疫組織化学

ゼブラフィッシュの初期ニューロンの抗体染色は以下の手法で行なった。受精後24-28時間の胚を4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(pH 8.0)で4°C、12時間固定した。リン酸緩衝液で15分間洗浄を4回行なった後、0.5% Triton X-100/リン酸緩衝液に溶解した5%新生ヤギ血清中で常温1時間ブロッキングを行なった。同じ溶液中に1000倍希釈した抗アセチル化チューブリンモノクローナル抗体を含む溶液で4°C、12時間、一次抗体反応を行い、同様にリン酸緩衝液で洗浄後、一次抗体反応と同じ条件でAlexa Fluoro 488 (Molecular Probes社)をコンジュゲートした抗マウス抗体で二次抗体反応を行なった。リン酸緩衝液で洗浄した胚を30%/50%/70%グリセロール(リン酸緩衝液に溶解)中で透明化し、488 nmで励起し蛍光顕微鏡で観察した。

[0042] (6) Whole-mount in situハイブリダイゼーション

基本的にThisseらの手法 (Nat. Protcol. 3 (1) 59-69, 2008) に従った。異なる点は、プローブのハイブリダイゼーション溶液のブロッカーに5 mg/mlのTorulaイーストRNAを使用した点と、抗体反応液中のブロッカーとして0.5%のBlocking reagent (Roche社) を用いた点である。プローブに用いた遺伝子のcDNA (six3.2遺伝子, emx1遺伝子, pax2.1遺伝子, foxg1遺伝子, otx2遺伝子) は、それぞれオリジナルな供与者から譲渡された。Ihx2遺伝子のプローブは最初にクローン化した安藤のものを用いた。crbn遺伝子および関連遺伝子のプローブはゼブラフィッシュのESTデータベースからプライマーをデザインし、cDNAライブラリーからクローン化した。

[0043] (7) 細胞移植

1細胞期のゼブラフィッシュ胚に適宜濃度のローダミンデキストラン (分子量10,000) と最終濃度600 ng/ μ lのcrbn RNAを溶解したヌクレアーゼフリー水を上記(1)の方法の条件で注入しドナー (供与体) とした。ドナーが受精後3-4時間の時期に蛍光顕微鏡観察下で細胞をガラス製マイクロキャピラリーで10-50個吸引し、同時期の宿主 (宿主) 胚の動物極に移植した。そのまま宿主胚を2日間培養した後、蛍光顕微鏡でCRBNを発現するドナー由来細胞の分化の局在性を観察した。またネガティブコントロールとして発生に影響がないとされる緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現させた細胞も同じ条件で移植し、その分化の局在性を比較した。

[0044] (8) 試験管内反応系を用いたCRBNのユビキチンリガーゼ活性の検出・計測

基本的にGroismanらの方法に従った。まずFLAGエピトープタグを融合させたCRBNを発現する哺乳類細胞の破碎液よりM2 FLAGアガロースビーズ (SIGMA社) を用いてCRBNおよび結合タンパク質 (CRBN複合体と呼ぶ) を精製した。次に精製したCRBN複合体をUba1 (E1), UbcH5b (E2), GST融合ユビキチン (Ub) 組換えタンパク質の含まれた水溶液と混合し、ATPを加えた後30-37度で2時間静置した。その後SDSにより反応を停止させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および免疫ブロッティングを行うことにより、自己ユビキチン化および結合タンパク質のユビキチン化を可視化させることでユビキチンリガーゼ活性を検

出・計測した。

[0045] (9) 生細胞を利用したCRBNユビキチンリガーゼ活性の検出・計測

基本的にはOhtakeらの方法に従った。FLAGエピトープタグを融合させたCRBNを発現させた哺乳類細胞にプロテアソーム阻害剤であるMG132を投与し、静置した。その後、細胞を破碎し、その溶解液から上記と同様だがより厳格な条件でのFLAG精製を行い、CRBNを抽出し、免疫ブロッティングを行うことで、その自己ユビキチン化を検出・計測した。

[0046] (10) グリア細胞及びセロトニン産生細胞の蛍光染色

ゼブラフィッシュは2日齢（グリア細胞染色は、受精後56時間のものを用い、セロトニン産生細胞染色は、受精後49時間のものを用いた。）のものを用いた。ゼブラフィッシュを4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で固定後、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、次いで、10 μ g/mlのプロテアーゼKで処理し、表皮を部分消化した。消化反応後PBST(PBS+0.5%Triton X-100)で20分間洗浄し、PFAで再固定した。これをPBSTで室温1時間洗浄し、その後PBST+5%ヤギ血清でブロッキングした。この標本を抗グリアモノクローナル抗体(zrf-1/zrf-2)またはウサギ抗セロトニン抗体で4 $^{\circ}$ C、終夜(12~18時間)反応させた。その後、PBST+5%ヤギ血清で1時間、室温で洗浄し、ヤギ抗マウスIgG抗体(Cy-2コンジュゲート。グリア細胞染色)またはヤギ抗ウサギIgG抗体(Cy-5コンジュゲート。セロトニン産生細胞染色)に置換し二次抗体反応を行った。4 $^{\circ}$ C、終夜(12~18時間)反応後、PBSTで室温1時間洗浄した。洗浄後30%, 50%, 70%グリセロール/PBSで置換し、全身をスライドガラス上にマウントし、プレパラートを作製した。Cy-2およびCy-5の励起波長で蛍光を観察し、グリア細胞またはセロトニン産生細胞の分布を記録した。なお、グリア細胞の観察はゼブラフィッシュの側面から、セロトニン産生細胞はそれらの正中線に沿った分布を観察するため背側から撮影した。

[0047] (11) CRBN発現細胞の間脳室への移植

受精直後の1細胞期胚にCRBNをコードするRNA(700 ng/ μ l)と2%ローダミンデキストランの混合液を注入した。受精後4時間まで培養後、吸引キャピ

ラリーを用いて細胞を10～20個ほど採取し、受精後30時間胚の間脳室へ注入し移植した。移植された魚をゼブラフィッシュ生理食塩水（E3リングア）中で受精後3日まで飼育した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。常法に従い抗アセチル化チューブリンモノクローナル抗体による一次抗体反応とAlexa Fluor（登録商標）抗マウスIgG（488 nm励起）抗体による二次抗体反応を行い、神経細胞軸索を蛍光標識して観察しながらローダミンデキストラン（543 nm励起）で標識された移植細胞の分布を調べた。

[0048]（実験結果）

（1）Lhx2とCRBNの機能階層性の決定

lhx2遺伝子をノックダウンしたゼブラフィッシュの胚（図1左下）では、正常胚（図1左上）と比較し、脳の縮小がみられた。一方、lhx2遺伝子をノックダウンし、crbn遺伝子を過剰発現させた胚（図1右下）では、crbn遺伝子を過剰発現させた胚（図1右上）と同様に、脳の拡大がみられた。このことから、CRBNは、Lhx2の機能的下流に位置し、中枢神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を直接誘導していると考えられる。

[0049]（2）CRBNの過剰発現実験

CRBNが大脳で神経幹細胞への分化を誘導することを検証するため、ゼブラフィッシュ胚を用いた前脳および中脳でのCRBNの過剰発現実験を行なった。その結果、両脳は形態を保持したまま約1.5倍の容積に拡大した（図2右）。なおかつ脳のニューロンネットワークは形態上正常であった（図2右）。

[0050]（3）CRBNを過剰発現させた細胞の移植実験

まず供与体（ドナー）胚にCRBNをコードするメッセンジャーRNAを蛍光物質（ローダミン）と共に注入し過剰発現させた。この胚胞を他個体に移植し、脳室内に分布したドナー由来細胞の分化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、移植したドナー由来細胞は、有意に魚類の終脳組織である嗅球に分化した（図3矢頭）。このことはCRBNを発現した細胞が脳室内に分配された場合、神経幹細胞に分化しRostral Migratory Stream (RMS)という細胞移動経路によって哺乳動物では大脳皮質を発生する終脳背側部で脳組織に分化したこと

を示す。

[0051] (4) 試験管内反応系を用いたCRBNのユビキチンリガーゼ活性の検出・計測
Uba1 (ユビキチン活性化酵素)、UbcH5b (ユビキチン転移酵素)、及びGST融合ユビキチン組換えタンパク質を含む水溶液 (Ub/E1/E2) に、CRBN (FH-CRBN complex) を加えた場合には、CRBNを加えない場合には検出されないタンパク質が検出された (図4の左図、中央図、右図のレーン2)。タンパク質のユビキチン化には、ユビキチンのほか、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン転移酵素、ユビキチンリガーゼの3種類の酵素が必要である。左図、中央図、右図のレーン1では、ユビキチンリガーゼが存在しないためユビキチン化したタンパク質が生じなかったのに対し、左図、中央図、右図のレーン2では、CRBNがユビキチンリガーゼとして働いたことにより、ユビキチン化したタンパク質が生じ、そのタンパク質が電気泳動によって検出されたと考えられる。

[0052] (5) 生細胞を利用したCRBNユビキチンリガーゼ活性の検出・計測
MG132を加えた場合には、CRBNを含むタンパク質のバンドが多数検出された (図5の右レーン)。一方、MG132を加えない場合には、CRBNを含むタンパク質のバンドはほとんど検出されなかった (図5の左レーン)。

[0053] 生細胞内のCRBNは、他の因子と協同して自己ユビキチン化を行い、様々な分子量のユビキチン化タンパク質を生じると考えられる。しかし、それらの多くは、生細胞内のプロテアソームによって分解されてしまうと考えられる。図5の左レーンでは、MG132によってプロテアソームが阻害され、自己ユビキチン化によって生じたタンパク質が残存したことにより、多数のバンドが検出されたと考えられる。一方、図5の右レーンでは、生じたタンパク質の多くが、プロテアソームによって分解されてしまったため、ほとんどバンドが検出されなかったと考えられる。

[0054] (6) グリア細胞及びセロトニン産生細胞の蛍光染色

CRBNを過剰発現させた個体では、正常な空間的分布を保持しつつ、グリア細胞 (図6左図) やセロトニン産生細胞 (図7左図) が増加していた。この

ことは、CRBNが脳の空間的なパターンを正常に認識しつつ細胞を増殖、分化させることを意味する。

[0055] (7) CRBN発現細胞の間脳室への移植

CRBNを発現しない細胞を移植した場合、その細胞は脳組織に分化しないのに対し（図8A～D）、CRBNを発現する細胞を移植した場合、その細胞は脳組織に分化した（図8E～H）。

産業上の利用可能性

[0056] 本発明は、アルツハイマー病などの大脳皮質疾患の治療薬として有用である。また、大脳皮質疾患の新たな治療薬の開発にも有用である。

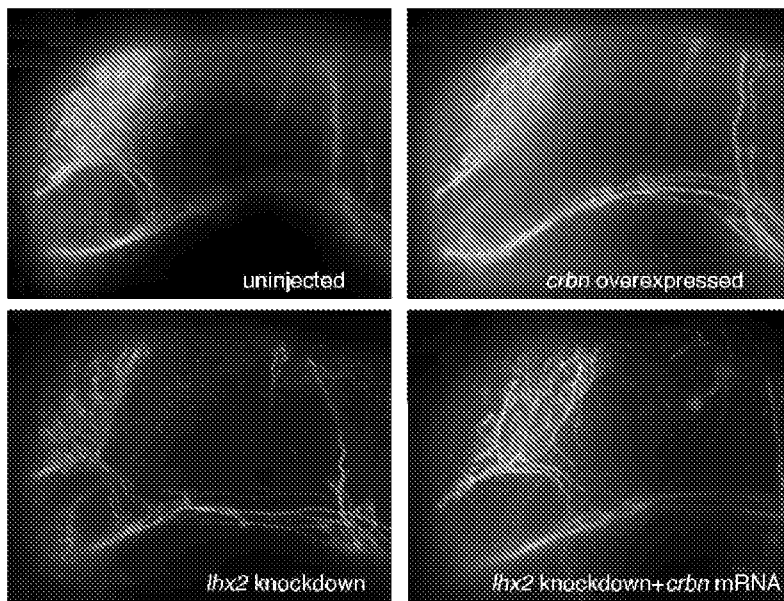
請求の範囲

- [請求項1] 1) CRBN、2) CRBNをコードする核酸、又は3) CRBNを発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を含有することを特徴とする医薬組成物。
- [請求項2] CRBNをコードする核酸が、ウイルスベクター中に挿入されていることを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] CRBNの他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質も含有することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] CRBNをコードする核酸の他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質をコードする核酸も含有することを特徴とする請求項1又は2に記載の医薬組成物。
- [請求項5] CRBNの他に、CRBNと共にユビキチンリガーゼ複合体を形成するタンパク質も発現させた幹細胞若しくは神経前駆細胞を含有することを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療のために用いられることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 大脳皮質の再生のために用いられることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項8] 請求項1乃至7のいずれか一項に記載の医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞を増殖させる方法。
- [請求項9] 請求項1乃至7のいずれか一項に記載の医薬組成物を非ヒト動物に投与し、その非ヒト動物の神経幹細胞又は神経前駆細胞を神経細胞へ分化させる方法。
- [請求項10] 被験物質をCRBNを含むユビキチンリガーゼ複合体に接触させる工程、及び前記ユビキチンリガーゼ複合体のユビキチンリガーゼ活性を測定し、ユビキチンリガーゼ活性を向上させた被験物質を選択する工程

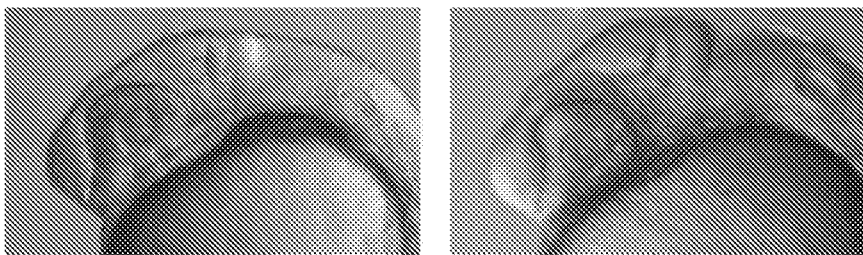
を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法。

[請求項11] 被験物質の存在下で神経幹細胞又は神経前駆細胞を培養する工程、及び神経幹細胞又は神経前駆細胞中のCRBNの発現量を測定し、CRBNの発現量を増大させた被験物質を選択する工程を含むことを特徴とする大脳皮質疾患又は大脳皮質の外科的損傷の治療薬のスクリーニング方法。

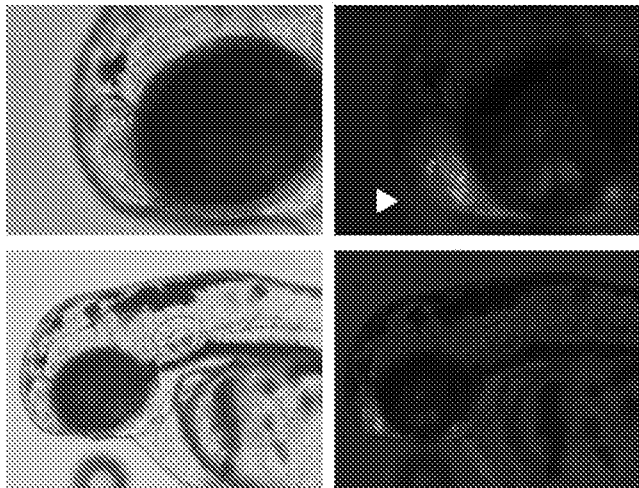
[圖1]



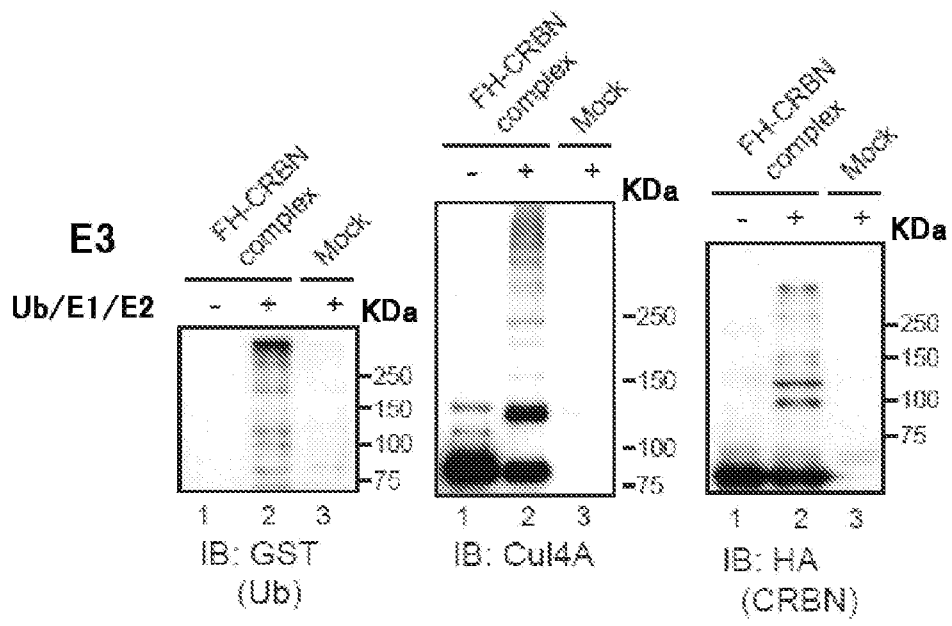
[圖2]



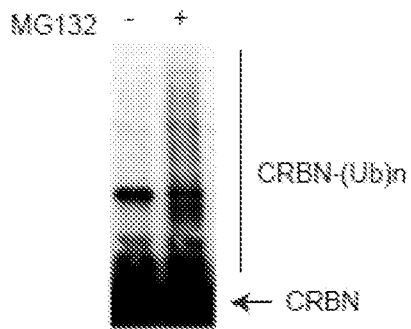
[圖3]



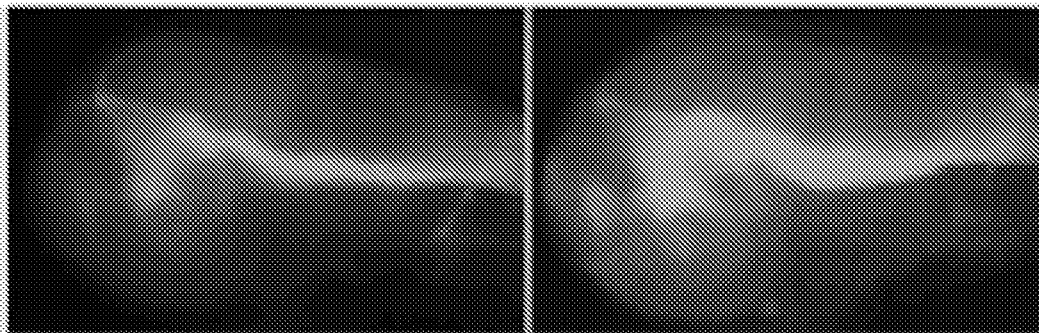
[圖4]



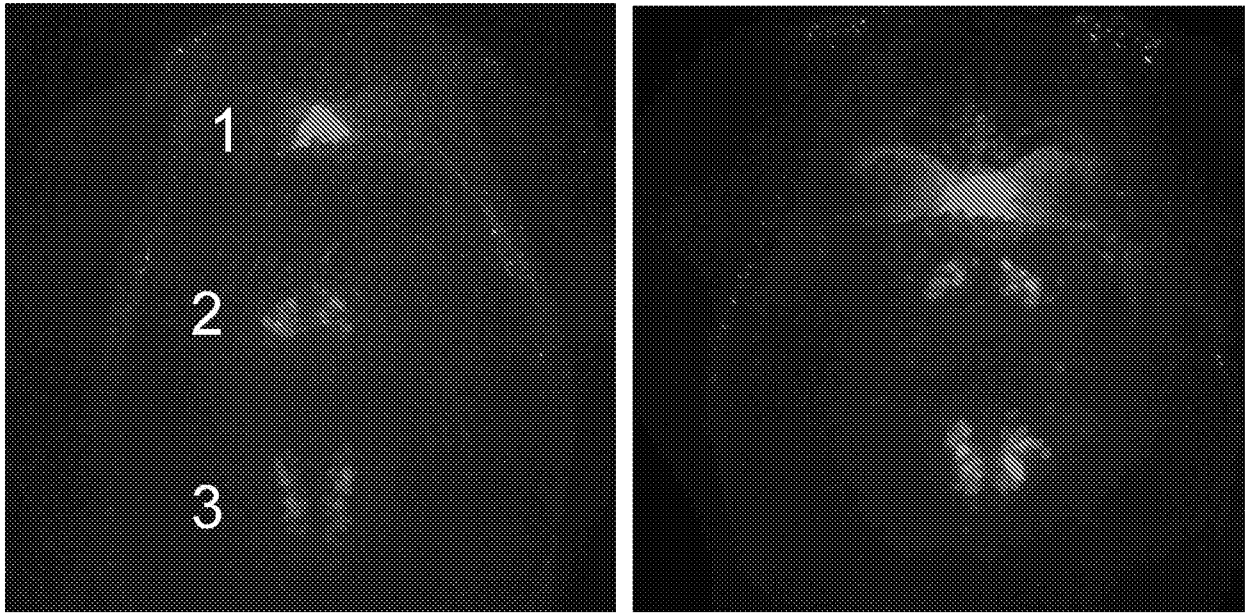
[圖5]



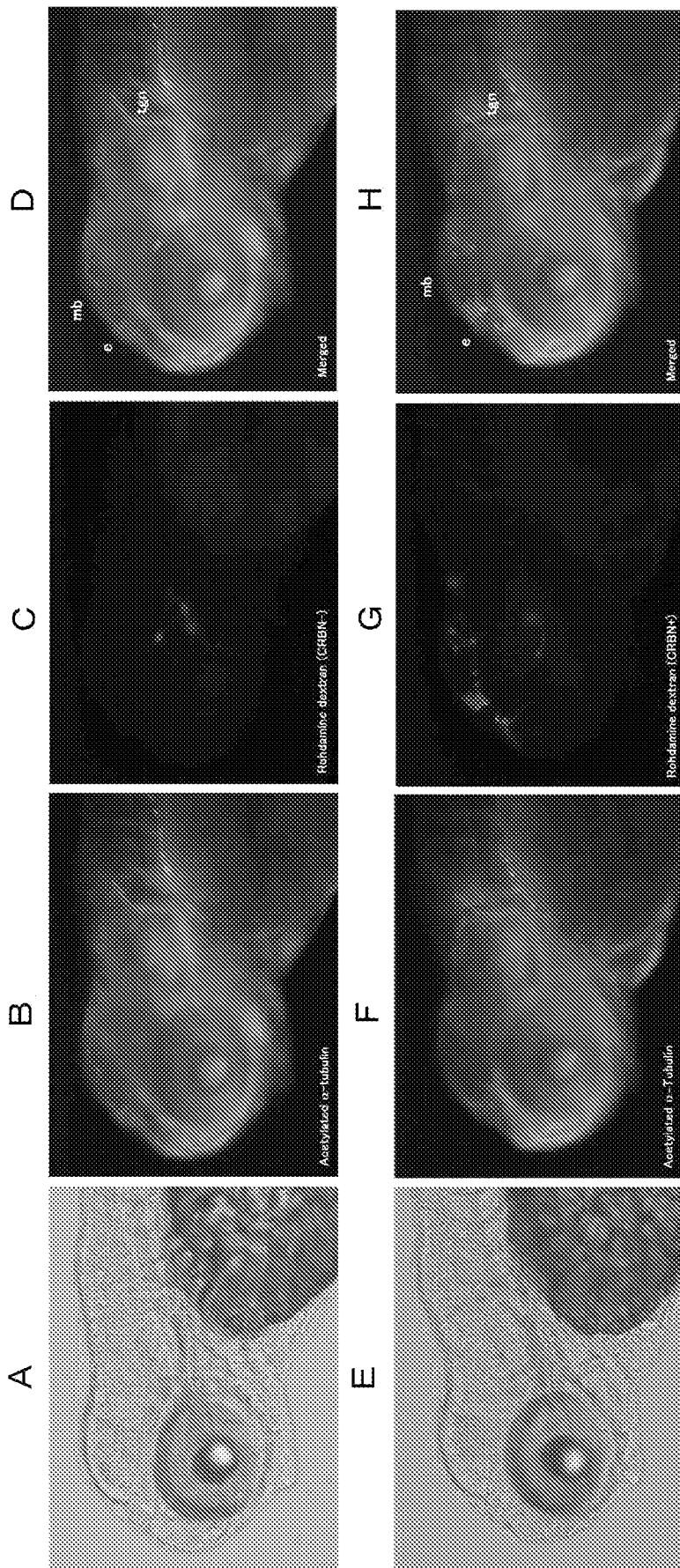
[圖6]



[図7]



[8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K35/12(2006.01)i, A61K35/30(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/45(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/25(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n, C12N9/00(2006.01)n, 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) A61K35/12, A61K35/30, A61K35/76, A61K38/45, A61K48/00, A61P25/28, C12Q1/02, C12Q1/25, C12N5/10, C12N9/00, C12N15/09		
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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JO, S. et al, Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain, J Neurochem, 2005, Vol.94, No.5, p.1212-24	1-7, 10, 11 8, 9
Y A	WO 2007/108968 A2 (MERCK & CO. INC.), 27 September 2007 (27.09.2007), page 14, 8th line from the bottom to page 16, line 11 & EP 2004193 A2 & US 2009/062280 A1 & JP 2009-533326 A	1-7, 10, 11 8, 9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 14 June, 2010 (14.06.10)		Date of mailing of the international search report 22 June, 2010 (22.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 11-504330 A (Allergan), 20 April 1999 (20.04.1999), claims; page 7, 13th to 11th lines from the bottom & WO 96/033719 A1 & US 5573758 A & EP 825863 A1 & EP 1243270 A1 & EP 825863 B1 & EP 1243270 B1 & JP 2007-217437 A & EP 1243270 B2	1-7, 10, 11 8, 9
Y A	Takumi ITO et al., "Seishin Chitai Kanren Inshi CRBN wa DDB1 to Tomoni Shinki E3 ubiquitin ligase Fukugotai o Keisei suru", Dai 80 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai, Dai 30 Kai The Molecular Biology Society of Japan Nenkai Godo Taikai Koen Yoshishu, 2007, page 4P-1011	3-7, 10, 11 8, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/058722

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)n

(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. A61K35/12(2006.01)i, A61K35/30(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/45(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/25(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)n, C12N9/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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. A61K35/12, A61K35/30, A61K35/76, A61K38/45, A61K48/00, A61P25/28, C12Q1/02, C12Q1/25, C12N5/10, C12N9/00, 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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
Y	JO, S. et al, Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain, J Neurochem, 2005, Vol.94, No.5, p.1212-24	1-7, 10, 11
A		8, 9
Y	WO 2007/108968 A2 (MERCK & CO INC) 2007.09.27, 第14頁下から第8行-第16頁第1行目 & EP 2004193 A2 & US 2009/062280 A1 & JP 2009-533326 A	1-7, 10, 11
A		8, 9

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

14.06.2010

国際調査報告の発送日

22.06.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 基章

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

4146

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
Y	JP 11-504330 A (アラーガン) 1999. 04. 20, 請求項、第7頁下から第13-11行目	1-7, 10, 11
A	& WO 96/033719 A1 & US 5573758 A & EP 825863 A1 & EP 1243270 A1 & EP 825863 B1 & EP 1243270 B1 & JP 2007-217437 A & EP 1243270 B2	8, 9
Y	伊藤拓水 他, 精神遅滞関連因子CRBNはDDB1と共に新規E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成する, 第80回日本生化学会大会	3-7, 10, 11
A	第30回日本分子生物学会年会合同大会講演要旨集, 2007, p. 4P-1011	8, 9