

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/031996

発行日 平成29年6月8日 (2017.6.8)

(43) 国際公開日 平成28年3月3日 (2016.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 62 頁) 最終頁に続く

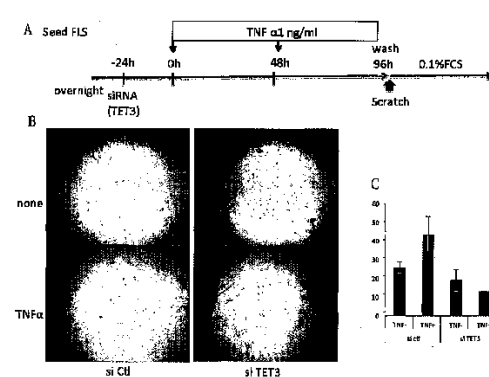
出願番号 特願2016-545659 (P2016-545659)	(71) 出願人 506087705
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/074556	学校法人産業医科大学
(22) 国際出願日 平成27年8月24日 (2015.8.24)	福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号
(31) 優先権主張番号 特願2014-174638 (P2014-174638)	(74) 代理人 100080791
(32) 優先日 平成26年8月28日 (2014.8.28)	弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100125070
	弁理士 士井 京子
	(74) 代理人 100136629
	弁理士 鎌田 光宜
	(74) 代理人 100121212
	弁理士 田村 弥栄子
	(74) 代理人 100163658
	弁理士 小池 順造
	(74) 代理人 100174296
	弁理士 當麻 博文
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 関節炎の予防・治療剤、検査キット、並びに関節炎予防・治療薬のスクリーニング方法

(57) 【要約】

本発明は T e t 3 の発現阻害物質を含有する、関節リウマチを含む関節炎の予防・治療剤、診断キット、並びに関節リウマチを含む関節炎の予防及び / 又は治療活性を有する新規な物質の探索手段を提供する。

図 1 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3) の発現阻害物質を含有する、関節炎の予防及び / 又は治療剤。

【請求項 2】

Tet 3 の発現阻害物質が、

- (a) Tet 3 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、
- (b) Tet 3 遺伝子の転写産物に対するリボザイム核酸、又は
- (c) Tet 3 遺伝子の転写産物に対して RNAi 活性を有する核酸もしくはその前駆体である、請求項 1 に記載の剤。

10

【請求項 3】

関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、請求項 1 または 2 に記載の剤。

【請求項 4】

以下の (1) ~ (3) の工程を含む、関節炎の予防及び / 又は治療薬のスクリーニング方法：

- (1) Tet 3 遺伝子もしくは該遺伝子の転写調節領域の制御下にあるレポータータンパク質をコードする核酸を含む細胞を、被検物質に接触させる工程、
- (2) 前記細胞における Tet 3 遺伝子もしくは Tet 3 タンパク質又はレポータータンパク質の発現量を測定する工程、
- (3) 被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、Tet 3 遺伝子もしくは Tet 3 タンパク質又はレポータータンパク質の発現量を低下させた被検物質を、関節炎の予防及び / 又は治療薬の候補として選択する工程。

20

【請求項 5】

Tet 3 と被検物質とを接触させ、Tet 3 と結合能を有する被検物質を関節炎の予防及び / 又は治療剤の候補として選択することを特徴とする、関節炎の予防及び / 又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 6】

関節炎の予防及び / 又は治療薬の候補として選択された被検物質を関節炎モデルに適用し、該モデルにおける炎症反応を抑制するか否かを検定することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

以下の (1) ~ (3) の工程を含む、関節炎の予防及び / 又は治療薬のスクリーニング方法：

- (1) 滑膜線維芽細胞を、被検物質に接触させる工程、
- (2) 前記細胞のゲノムの 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化または浸潤性の程度を測定する工程、
- (3) 被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、前記細胞のゲノムの 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化または浸潤性を抑制した被検物質を、関節炎の予防及び / 又は治療薬の候補として選択する工程。

40

【請求項 8】

関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

被験者由来の試料から、下記 (a) または (b) を用いて Tet 3 遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出または定量することを含む、関節炎の検査方法：

- (a) Tet 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー
- (b) Tet 3 遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体。

【請求項 10】

50

関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

下記 (a) および / または (b) :

(a) Tet 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー

(b) Tet 3 遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体を含有してなる、関節炎検査用キット。

【請求項 12】

関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、請求項 11 に記載のキット。 10

【請求項 13】

Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3) の発現阻害物質の有効量を対象に投与することを含む、関節炎の予防及び / 又は治療方法。

【請求項 14】

関節炎の予防及び / 又は治療に使用するための、Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3) の発現阻害物質。

【請求項 15】

関節炎の予防及び / 又は治療剤を製造するための、Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3) の発現阻害物質の使用。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関節炎、特に関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) の予防・治療剤、並びに関節炎、特に関節リウマチ予防・治療薬のスクリーニング方法に関する。より詳しくは、Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3) の機能を阻害する物質を含有する、関節炎、特に関節リウマチの予防剤及び / 又は治療剤、並びに Tet 3 の機能阻害を指標とする、関節炎、特に関節リウマチ予防・治療薬の候補物質をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチは、全身の関節に慢性炎症を生じる難治性の自己免疫疾患である。関節内の滑膜組織が増殖し、進行性に軟骨と骨が破壊される。関節リウマチの滑膜線維芽細胞 (FLS) はマクロファージやリンパ球により刺激 (TNF、IL - 1 などの炎症性サイトカイン) されて活性化され、活性化した滑膜線維芽細胞は、炎症性サイトカインやケモカイン産生、基質分解酵素分泌により関節破壊を起こす一方、増殖能・浸潤能の亢進、アポトーシス感受性低下などの癌細胞と似た性質も持つ。近年、GWAS (Genome - Wide Association Study) の結果より約 30 の遺伝子多型が関節リウマチの発症や重症度に関わることが知られるようになってきた。その一方で、エピジェネティクスの異常が関節リウマチの発症や重症度に深く関わることを示唆されるようになった。DNA のメチル化はエピジェネティクスの代表的な機構の一つであり、関節リウマチにおいてもゲノム全体、もしくは特定の遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化異常が存在することが報告されてきた。発明者は近年、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析により、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞には疾患に特有な DNA メチル化パターンが存在し、異常メチル化を示した遺伝子の多くが関節リウマチの病態に深く関わることを示した (非特許文献 1)。

生物学的製剤による炎症性サイトカインを標的とした関節リウマチ治療は、寛解導入を身近なものにしたが、関節リウマチ治療にはいわゆる「Window of Opportunity」が存在し、治療開始の遅れは治療効果を限定的なものとする。このことは、炎症環境の持続自体が、滑膜炎部位に存在する細胞をより攻撃的かつ治療抵抗性な 40 50

表現型に変質させている可能性を示唆するが、この詳細なメカニズムは不詳であった。発明者は、関節リウマチにおける滑膜炎・骨関節破壊の中心的役割を担うTNF やIL-1 が、FLSにおいてDNAメチル化酵素(DNMT)の発現を低下させ、受動的脱メチル化を促進することを示し、疾患特有のDNAメチル化パターン形成の分子機構の一端を明らかにした(非特許文献2)。

しかしながら、これまでは能動的なDNA脱メチル化の機構が不詳であったため、DNAメチル化・脱メチル化のダイナミズムの全貌は不明であった。近年、DNA脱メチル化酵素として機能するTet(Ten-Eleven translocation)タンパク質ファミリーが同定され、Tetタンパク質が5-メチルシトシン(5mC)を水酸化して5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)を合成することが報告され、ES細胞

10

などにおけるDNAメチル化のダイナミズムの研究は急速な進展を見せている。ただ、関節リウマチにおけるTetタンパク質の関与については未だ明らかにされておらず、Tetタンパク質が関節リウマチの治療標的となり得るか否かは全く不明のままであった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Nakano K et al., Ann Rheum Dis. 72 (1): 110-117, 2013.

【非特許文献2】Nakano K et al., J Immunol. 190(3): 1297-1303, 2013.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、本発明の目的は、関節炎、特に関節リウマチにおけるTetタンパク質、特にTet3タンパク質の機能を明らかにすることであり、当該機能に基づいてTet3を標的とする関節炎の予防・治療剤、検査キットを提供すること、並びにTet3の機能調節を指標として、関節炎の予防及び/又は治療活性を有する新規な物質を探索する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0005】

本発明者は、上記の目的を達成すべく、関節リウマチ患者由来の滑膜や炎症性サイトカインで刺激した、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞(FLS)におけるTetタンパク質ファミリーの発現レベルおよびDNAメチル化レベルを測定した。その結果、健常者や変形性関節症(OA)患者に比べて、関節リウマチ患者由来の滑膜表層細胞層や炎症性サイトカインで刺激した、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞(FLS)では、Tet3の発現レベルが高く、DNAメチル化レベルも低いことを見出した。また、関節リウマチ患者由来のFLSのTet3をノックダウンした場合、FLS自身の組織(軟骨、骨)浸潤に与するケモカインCCL2や接着分子ICAM1の発現が阻害され、また、該FLSの浸潤能も抑制された。これらの結果は、Tet3の選択的阻害が、DNA

40

メチル化レベルの維持を介してCCL2やICAM1の発現を阻害し、それに伴って浸潤性に代表される滑膜線維芽細胞の活性化を阻害することによって、関節炎、特に関節リウマチの新規治療につながることを示唆するものである。

本発明者は、これら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。

即ち、本発明は以下の通りである。

[1] Tet3(Ten-Eleven translocation 3)の発現阻害物質を含有する、関節炎の予防及び/又は治療剤。

[2] Tet3の発現阻害物質が、

(a) Tet3遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、

50

- (b) Tet 3 遺伝子の転写産物に対するリボザイム核酸、又は
- (c) Tet 3 遺伝子の転写産物に対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体である、[1]に記載の剤。
- [3] 関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、[1]または[2]に記載の剤。
- [4] 以下の(1) ~ (3)の工程を含む、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法：
- (1) Tet 3 遺伝子もしくは該遺伝子の転写調節領域の制御下にあるレポータータンパク質をコードする核酸を含む細胞を、被検物質に接触させる工程、
- (2) 前記細胞におけるTet 3 遺伝子もしくはTet 3 タンパク質又はレポータータンパク質の発現量を測定する工程、
- (3) 被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、Tet 3 遺伝子もしくはTet 3 タンパク質又はレポータータンパク質の発現量を低下させた被検物質を、関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択する工程。
- [5] Tet 3 と被検物質とを接触させ、Tet 3 と結合能を有する被検物質を関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択することを特徴とする、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法。
- [6] 関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択された被検物質を関節炎モデルに適用し、該モデルにおける炎症反応を抑制するか否かを検定することをさらに含む、[5]に記載の方法。
- [7] 以下の(1) ~ (3)の工程を含む、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法：
- (1) 滑膜線維芽細胞を、被検物質に接触させる工程、
- (2) 前記細胞のゲノムの5 - メチルシトシン(5 mC)の脱メチル化または浸潤性の程度を測定する工程、
- (3) 被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、前記細胞のゲノムの5 - メチルシトシン(5 mC)の脱メチル化または浸潤性を抑制した被検物質を、関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択する工程。
- [8] 関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、[4] ~ [7]のいずれか1つに記載の方法。
- [9] 被験者由来の試料から、下記(a)または(b)を用いてTet 3 遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出または定量することを含む、関節炎の検査方法：
- (a) Tet 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー
- (b) Tet 3 遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体。
- [10] 関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、[9]に記載の方法。
- [11] 下記(a)および/または(b)：
- (a) Tet 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー
- (b) Tet 3 遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体を含有してなる、関節炎検査用キット。
- [12] 関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、[11]に記載のキット。
- [13] Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3)の発現阻害物質の有効量を対象に投与することを含む、関節炎の予防及び/又は治療方法。
- [14] 関節炎の予防及び/又は治療に使用するための、Tet 3 (Ten - Eleven translocation 3)の発現阻害物質。
- [15] 関節炎の予防及び/又は治療剤を製造するための、Tet 3 (Ten - Ele

ven translocation 3) の発現阻害物質の使用。

【発明の効果】

【0006】

本発明により、Tet 3は関節リウマチの病態悪化に関与することが明らかとなったので、Tet 3の発現もしくは機能を阻害することにより、関節炎を治療又は予防することができる。また、Tet 3の発現もしくは機能阻害を指標として、関節炎の治療又は予防薬をスクリーニングすることができる。さらに、Tet 3の発現を指標として、関節炎を検査することができる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

図1は関節リウマチ(RA)患者由来の滑膜組織における、Tetタンパク質ファミリー(Tet1, 2, 3)の発現、DNAメチル化(5-メチルシトシン(5mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC))を示す免疫組織化学染色像である。

図2は変形性関節症(OA)患者由来の滑膜組織における、Tetタンパク質ファミリー(Tet1, 2, 3)の発現、DNAメチル化(5-メチルシトシン(5mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC))を示す免疫組織化学染色像である。

図3は関節リウマチ(RA)患者由来の滑膜組織における、Tet3タンパク質(青色)とCD55タンパク質(茶色)の二重染色、Tet3タンパク質(青色)とCD68タンパク質(茶色)の二重染色を示す免疫組織化学染色像である。

図4はサイトカイン未刺激のFLS(健常人、OA、RA)における、Tetファミリー(Tet1, Tet2, Tet3)の相対的mRNA発現レベルを示す図である。

図5はサイトカイン未刺激のFLS(OA、RA)における、Tetファミリー(緑色)(Tet1, Tet2, Tet3)の発現と核(青色)を示す免疫組織化学染色像である。

図6はTNF やIL-1 による刺激後における、FLS(n=4(RA 2, OA 2))におけるTetファミリー(Tet1, Tet2, Tet3)のmRNA発現レベルの経時変化を示す図である。

図7はTNF 刺激後における、FLSにおけるTet3タンパク質のN/C比の経時変化を示す図である。

図8AはTNF による刺激後における、OA由来または健常者由来FLS(OA, Nr)におけるTet3のタンパク質発現レベルを示す図である。図8BはTNF による刺激後における、AR由来FLSにおけるTet3のタンパク質発現レベルを示す図である。

図9Aは実施例4の試験過程を示す図である。図9BはTNF による刺激後における、AR由来FLSにおける5hmCレベルを示すドットプロット像である。図9CはAR由来FLSにおける5hmCレベルを示すグラフである。

図10Aは実施例5の試験過程を示す図である。図10BはTet3をロックダウンし、TNF による刺激後における、AR由来FLSにおける炎症性サイトカインの分泌レベルを示すグラフである。

図11Aは実施例6の試験過程を示す図である。図11BはTet3をロックダウンし、TNF による刺激後の、AR由来FLSのScratch assayを示す顕微鏡像である。図11CはTet3をロックダウンし、TNF によって刺激し、scratch後24時間における、AR由来FLSの単位面積当たりの浸潤細胞数を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明は、少なくとも部分的には、Tet3が関節リウマチの増悪に寄与していることの発見に基づく。当該知見は、Tet3が関節炎、特に関節リウマチマーカーとして利用できるだけでなく、関節炎、特に関節リウマチの創薬標的ともなり得ることを示すものである。即ち、Tet3の既知の阻害薬は関節炎の予防及び/又は治療に有用である

10

20

30

40

50

とともに、Tet 3 タンパク質やそれを発現する細胞・動物を用いて、新規な Tet 3 阻害薬、ひいては関節炎の予防・治療薬となる物質を探索することもできる。

I. Tet 3 又はこれをコードする核酸

本明細書において、Tet 3 は公知のタンパク質であり、Genbank Accession No. : 043151 として知られている、配列番号 : 2 で表されるヒト Tet 3 のアミノ酸配列、あるいはこれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。本明細書において、タンパク質およびペプチドは、ペプチド表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) で記載される。

本明細書において、Tet 3 はヒトや他の温血動物 (例えば、マウス、ラット、ウシ、サル、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ニワトリなど) の細胞 [例えば、滑膜線維芽細胞、滑膜表層細胞など] 又は組織 [例えば、滑膜 (特に滑膜表層細胞層) など] 等から、公知のタンパク質分離精製技術により単離・精製されるものであってよい。

「配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列またはこれと実質的に同一のアミノ酸配列」としては、以下の (a) ~ (e) が挙げられる :

(a) 配列番号 : 2 で示されるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 : 2 で示されるアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入もしくは置換され、かつ 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列 ;

(c) 配列番号 : 2 で示されるアミノ酸配列と 90 % 以上の相同性を有し、かつ 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列 ;

(d) 配列番号 1 で示される塩基配列を有する DNA によりコードされるアミノ酸配列 ;

(e) 配列番号 1 で示される塩基配列の相補鎖配列を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA によりコードされ、かつ 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列。

具体的には、配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒト Tet 3 タンパク質の他の哺乳動物におけるオルソログのアミノ酸配列、または配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列からなるヒト Tet 3 タンパク質もしくはそのオルソログのスプライズバリエーション、アレル変異体もしくは多型バリエーションにおけるアミノ酸配列が挙げられる。

ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて 2 つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント (好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである) における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合 (%) を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸 (Phe、Trp、Tyr)、脂肪族アミノ酸 (Ala、Leu、Ile、Val)、極性アミノ酸 (Gln、Asn)、塩基性アミノ酸 (Lys、Arg、His)、酸性アミノ酸 (Glu、Asp)、水酸基を有するアミノ酸 (Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸 (Gly、Ala、Ser、Thr、Met) などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない (即ち、保存的アミノ酸置換である) ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている (例えば、Bowling ら, Science, 247 : 1306 - 1310 (1990) を参照)。

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値 = 10 ; ギャップを許す ; マトリクス = BLOSUM 62 ; フィルタリング = OFF) にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlin ら, Proc. Natl

10

20

30

40

50

. Acad. Sci. USA, 90: 5873 - 5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは NBLAST および XBLAST プログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschul ら, Nucleic Acids Res., 25: 3389 - 3402 (1997))]、Needleman ら, J. Mol. Biol., 48: 444 - 453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェアパッケージ中の GAP プログラムに組み込まれている]、Myers および Miller, CABIOS, 4: 11 - 17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG 配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラム (version 2.0) に組み込まれている]、Pearson ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444 - 2448 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェアパッケージ中の FASTA プログラムに組み込まれている] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

10

上記 (e) におけるストリンジェントな条件とは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1 - 6.3.6, 1999 に記載される条件、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ (sodium chloride / sodium citrate) / 45 でのハイブリダイゼーション、次いで $0.2 \times \text{SSC}$ / 0.1% SDS / 50 ~ 65 での一回以上の洗浄等が挙げられるが、当業者であれば、これと同等のストリンジェンシーを与えるハイブリダイゼーションの条件を適宜選択することができる。

20

より好ましくは、「配列番号：2 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、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と、約 90% 以上、好ましくは約 95% 以上、より好ましくは約 96% 以上、いっそう好ましくは約 97% 以上、特に好ましくは約 98% 以上、最も好ましくは約 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

「配列番号：2 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むタンパク質」は、配列番号：2 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み、かつ配列番号：2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の機能を有するタンパク質である。

ここで「実質的に同質の機能」とは、例えば生理学的に、あるいは薬理的にみて、その性質が定性的に同じであることを意味し、機能の程度 (例、約 0.1 ~ 約 10 倍、好ましくは 0.5 ~ 2 倍) や、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。また、Tet3 の機能としては、5 - メチルシトシン (5mC) を 5 - ヒドロキシメチルシトシン (5hmC)、5 - フォルミルシトシン (5fC) または 5 - カルボキシルシトシン (5CaC) に変換する活性 (以下、「5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性」)、滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性等が挙げられ、上記の活性を有するタンパク質を、「実質的に同質の機能を有するタンパク質」とみなすことができる。

30

ここで、5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性および滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性は、例えば、後述する実施例に記載の通りに測定することができる。

本発明における Tet3 タンパク質として、例えば、(i) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 30 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 数 (5、4、3 もしくは 2) 個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に 1 ~ 30 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 数 (5、4、3 もしくは 2) 個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列に 1 ~ 30 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 数 (5、4、3 もしくは 2) 個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列中の 1 ~ 30 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 数 (5、4、3 もしくは 2) 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 (v) 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も含まれる。

40

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失、付加または置換されている場合、その挿入、

50

欠失、付加または置換の位置は、タンパク質が、5 - メチルシトシン (5 m C) の脱メチル化または滑膜線維芽細胞の浸潤を促進し得る限り、特に限定されない。

ここでアミノ酸の欠失、付加、挿入または置換を人為的に行う場合の手法としては、例えば、配列番号：2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAに対して慣用の部位特異的変異導入を施し、その後このDNAを常法により発現させる手法が挙げられる。ここで部位特異的変異導入法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法 (ギャップド・デュプレックス法、Nucleic Acids Res. , 12, 9441 - 9456 (1984))、変異導入用プライマーを用いたPCRによる方法等が挙げられる。

Tet 3の好ましい例としては、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるヒトタンパク質 (Genbank Accession No. 043151)、あるいは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、アレル変異体、多型バリエーション (例えば一塩基多型 (SNPs)) などがあげられる。

「Tet 3をコードする核酸」は、上記 (a) ~ (e) で示される、配列番号：2で表されるアミノ酸配列又はこれと実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を表す。具体的には、以下の (f) ~ (j) :

(f) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(g) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入もしくは置換され、かつ5 - メチルシトシン (5 m C) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(h) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有し、かつ5 - メチルシトシン (5 m C) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

(i) 配列番号1で示される塩基配列、

(j) 配列番号1で示される塩基配列の相補鎖配列を有するDNAと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であって、かつ5 - メチルシトシン (5 m C) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列、

を有する核酸が挙げられる。

尚、ここで遺伝子とは、cDNAもしくはゲノムDNA等のDNA、またはmRNA等のRNAのいずれでもよく、また一本鎖の核酸配列および二本鎖の核酸配列を共に含む概念である。また、本明細書において、配列番号：1等に示される核酸配列は、便宜的にDNA配列であるが、mRNAなどRNA配列を示す場合には、チミン (T) をウラシル (U) として解する。

Tet 3をコードする核酸の好ましい例としては、例えば、配列番号：1で表される塩基配列からなるヒトTet 3 cDNA (Genbank Accession No. NM_001287491)、あるいは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、アレル変異体、多型バリエーション (例えば一塩基多型 (SNPs)) などがあげられる。

本発明は、Tet 3の発現を阻害する物質を含有してなる、関節炎の予防及び/又は治療剤を提供する。

II. Tet 3の発現を阻害する物質

本発明において「Tet 3の発現を阻害する物質」とは、Tet 3をコードする核酸 (Tet 3 遺伝子) の転写レベル、転写後調節のレベル、Tet 3タンパク質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、Tet 3の発現を阻害する物質としては、例えば、Tet 3 遺伝子の転写を阻害する物質 (例、アンチジーン)、初期転写産物からmRNAへのプロセッシングを阻害する物質、mRNAの細胞質への輸送を阻害する物質、mRNAからTet 3の翻訳を阻害する物質 (例、アンチセンス核酸、miRNA) あるいはmRNAを分解する物質 (例、siRNA、リボザイム)、初期翻訳産物の翻訳後修飾を阻害する物質などが含まれる。いずれの段階で作用するものであっても好ましく用いることができるが、より好ましくは、以下の (1) ~ (3) からなる群より選択される物質が例示される。

- (1) Tet 3 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、
- (2) Tet 3 遺伝子の転写産物に対するリボザイム核酸、
- (3) Tet 3 遺伝子の転写産物に対して RNAi 活性を有する核酸もしくはその前駆体。

ここで転写産物の好ましい例としては、mRNA が挙げられる。

Tet 3 遺伝子の mRNA から Tet 3 への翻訳を特異的に阻害する（あるいは mRNA を分解する）物質として、好ましくは、これらの mRNA の塩基配列と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む核酸が挙げられる。

Tet 3 遺伝子の mRNA の塩基配列と実質的に相補的な塩基配列とは、投与対象となる哺乳動物における Tet 3 産生細胞（例、滑膜線維芽細胞、滑膜表層細胞）の生理的条件下において、該 mRNA の標的配列に結合してその翻訳を阻害し得る（あるいは該標的配列を切断する）程度の相補性を有する塩基配列を意味し、具体的には、例えば、該 mRNA の塩基配列と完全相補的な塩基配列（すなわち、mRNA の相補鎖の塩基配列）と、オーバーラップする領域に関して、約 90% 以上、好ましくは約 95% 以上、より好ましくは約 97% 以上の相同性を有する塩基配列である。

本発明における「塩基配列の相同性」は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値 = 10；ギャップを許す；フィルタリング = ON；マッチスコア = 1；ミスマッチスコア = -3）にて計算することができる。

より具体的には、Tet 3 遺伝子の mRNA の塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列としては、以下の (k) または (l)：

- (k) 配列番号：1 で表される塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列；
 - (l) 配列番号：1 で表される塩基配列の相補鎖配列と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であって、かつ 5 - メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を有するタンパク質をコードする配列と、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列；
- が挙げられる。

ストリンジェントな条件は、前述のとおりである。

Tet 3 遺伝子の mRNA の好ましい例としては、配列番号：1 で表される塩基配列 (Genbank Accession No. NM_001287491) を含むヒト Tet 3 の mRNA、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらのスプライスバリエント、アレル変異体、多型バリエント等が挙げられる。

Tet 3 遺伝子の mRNA の塩基配列と「相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列の一部」とは、Tet 3 遺伝子の mRNA に特異的に結合することができ、且つ該 mRNA からのタンパク質の翻訳を阻害（あるいは該 mRNA を分解）し得るものであれば、その長さや位置に特に制限はないが、配列特異性の面から、標的配列に相補的もしくは実質的に相補的な部分を少なくとも 10 塩基以上、好ましくは約 15 塩基以上を含むものである。

具体的には、Tet 3 遺伝子の mRNA の塩基配列と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む核酸として、以下の (1) ~ (3) のいずれかのものが好ましく例示される：

- (1) Tet 3 遺伝子の mRNA に対するアンチセンス核酸、
- (2) Tet 3 遺伝子の mRNA に対するリボザイム核酸、
- (3) Tet 3 遺伝子の mRNA に対して RNAi 活性を有する核酸もしくはその前駆体。

(1) Tet 3 遺伝子の mRNA に対するアンチセンス核酸

本発明における「Tet 3 遺伝子の mRNA に対するアンチセンス核酸」とは、該 mRNA の塩基配列と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む核酸であって、標的 mRNA と特異的かつ安定した二重鎖を形成して結合することにより、タン

10

20

30

40

50

パク質合成を抑制する機能を有するものである。

アンチセンス核酸は、2 - デオキシ - D - リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D - リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN - グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、DNA : RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホチオエート、ホスホジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていたりしてよい。

上記の通り、アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA : DNAハイブリッドは、内在性RNAase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNAase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、mRNA中の配列だけでなく、Tet 3 遺伝子の初期翻訳産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。イントロン配列は、ゲノム配列と、Tet 3 遺伝子のcDNA塩基配列とをBLAST、FASTA等のホモロジー検索プログラムを用いて比較することにより、決定することができる。

本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてタンパク質 : Tet 3 への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、Tet 3 をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約10 ~ 約40塩基、特に約15 ~ 約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいが、それに限定されない。具体的には、Tet 3 遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6 - ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域または3'端ヘアピンループなどが、アンチセンス核酸の好ましい標的領域として選択しうるが、それらに限定されない。

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、Tet 3 遺伝子のmRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得る

10

20

30

40

50

もの（アンチジーン）であってもよい。

アンチセンス核酸を構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNAもしくはRNAでもよいが、安定性（化学的および/または対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、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、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、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することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、 $-OR$ （ $R = CH_3$ （2'-O-Me）、 $CH_2CH_2OCH_3$ （2'-O-MOE）、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

RNAの糖部のコンフォメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA（LNA）（Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J. S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004）やENA（Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003）もまた、好ましく用いられ得る。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Tet 3遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。また、上記した各種修飾を含むアンチセンス核酸も、いずれも自体公知の手法により、化学的に合成することができる。

(2) Tet 3遺伝子のmRNAに対するリボザイム核酸

Tet 3遺伝子のmRNAの塩基配列と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む核酸の他の好ましい例としては、該mRNAをコード領域の内部で特異的に切断し得るリボザイム核酸が挙げられる。「リボザイム」とは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイム核酸として最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイム核酸は、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。Tet 3遺伝子のmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577(2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる[Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788(2001)]。

(3) Tet 3遺伝子のmRNAに対するsiRNA

本明細書においては、Tet 3 遺伝子の mRNA に相補的なオリゴ RNA とその相補鎖とからなる二本鎖 RNA、いわゆる siRNA もまた、Tet 3 遺伝子の mRNA の塩基配列と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む核酸に包含されるものとして定義される。短い二本鎖 RNA を細胞内に導入するとその RNA に相補的な mRNA が分解される、いわゆる RNA 干渉 (RNAi) と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が動物細胞でも広く起こることが確認されて以来 [Nature, 411 (6836): 494-498 (2001)]、上記のアンチセンス核酸やリボザイムの代替技術として汎用されている。

siRNA は、標的遺伝子の cDNA 配列情報に基づいて、例えば、Elbashir ら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001))、Teramoto ら (FEBS Lett. 579 (13): p2878-82 (2005)) の提唱する規則に従って設計することができる。siRNA の標的配列は、原則的には 15 ~ 50 塩基、好ましくは 19 ~ 49 塩基、更に好ましくは 19 ~ 27 塩基の長さを有しており、例えば AA + (N) 19 (AA に続く、19 塩基の塩基配列)、AA + (N) 21 (AA に続く、21 塩基の塩基配列) もしくは A + (N) 21 (A に続く、21 塩基の塩基配列) であってもよい。

本発明の核酸は、5' または 3' 末端に、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、通常 2 ~ 4 塩基程度であり、siRNA の全長として 19 塩基以上である。該付加的塩基は、DNA でも RNA でもよいが、DNA を用いると核酸の安定性を向上させることができる場合がある。このような付加的塩基の配列としては、例えば ug - 3'、uu - 3'、tg - 3'、tt - 3'、ggg - 3'、guuu - 3'、gttt - 3'、ttttt - 3'、uuuuu - 3' などの配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、siRNA は、3' 末端に突出部配列 (オーバーハング) を有していてもよく、具体的には、dTdT (dT はデオキシリボ核酸のデオキシチミジン残基を表わす) を付加したものが挙げられる。また、末端付加がない平滑末端 (プラントエンド) であってもよい。

また、siRNA は、センス鎖とアンチセンス鎖が異なる塩基数であってもよく、例えば、アンチセンス鎖が 3' 末端および 5' 末端に突出部配列 (オーバーハング) を有している「aiRNA」を挙げることができる。典型的な aiRNA は、アンチセンス鎖が 21 塩基からなり、センス鎖が 15 塩基からなり、アンチセンス鎖の両端で各々 3 塩基のオーバーハング構造をとる

(Sun, X. ら著、Nature Biotechnology Vol 26 No. 12 p1379、国際公開第 W02009/029688 号パンフレット)。

標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、5' - UTR および開始コドンから約 50 塩基まで、並びに 3' - UTR 以外の領域から標的配列を選択することが望ましい。上述の規則その他に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外の mRNA において 16 - 17 塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、AA (もしくは NA) 以降の 19 - 21 塩基に TT もしくは UU の 3' 末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該 19 - 21 塩基に相補的な配列および TT もしくは UU の 3' 末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる二本鎖 RNA を siRNA として設計してもよい。また、siRNA の前駆体であるショートヘアピン RNA (shRNA) は、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列 (例えば、5 - 25 塩基程度) を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

siRNA および / または shRNA の配列は、種々の web サイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Ambion が提供する siRNA Target Finder

10

20

30

40

50

(http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html)およびpSilencer(登録商標)Expression Vector用インサートデザインツール

(http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html)、RNAi Codexが提供するGeneSeer

(<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>)があるがこれらに限定されない。

siRNAを構成するリボヌクレオシド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のアンチセンス核酸の場合と同様の修飾を受けていてもよい。但し、siRNAの場合、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオシド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合があるので、RISC複合体が機能できる最小限の修飾ヌクレオシドの導入が必要である。

当該修飾として具体的には、siRNAを構成するヌクレオチド分子の一部を、天然型のDNAや、安定性(化学的および/または対酵素)や比活性(RNAとの親和性)を向上させるために、種々の化学修飾を施したRNAに置換することができる(Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照)。例えば、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、siRNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、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することができる。また、各ヌクレオチドの糖(リボース)の2'位の水酸基を、-OR(R=CH₃(2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE)、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等)、フッ素原子(-F)に置換してもよい。さらに、塩基部分(ピリミジン、プリン)に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。その他上記(1)に記載されたアンチセンス核酸における修飾方法を用いることができる。あるいは、siRNAにおけるRNAの一部をDNAに置換する化学修飾(2'-デオキシ化、2'-H)を施してもよい。また、糖(リボース)の2'位と4'位を-O-CH₂-で架橋しコンフォメーションをN型に固定した人工核酸(LNA: Locked Nucleic Acid)を用いてもよい。

また、siRNAを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖は、リンカーを介し、細胞表層に存在する受容体の特異的に認識するリガンド、ペプチド、糖鎖、抗体、脂質や正電荷や分子構造的に細胞膜表層に吸着し貫通するオリゴアルギニン、Tatペプチド、RevペプチドまたはAntペプチドなどと化学結合していてもよい。

siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90~約95で約1分程度変性させた後、約30~約70で約1~約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるショートヘアピンRNA(shRNA)を合成し、これを、ダイサー(dicer)を用いて切断することにより調製することもできる。

本明細書においては、生体内でTet3遺伝子のmRNAに対するsiRNAを生成し得るようにデザインされた核酸もまた、Tet3遺伝子のmRNAの塩基配列と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む核酸に包含されるものとして定義される。そのような核酸としては、上記したshRNAやsiRNAを発現するように構築された発現ベクターなどが挙げられる。shRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖を適当なループ構造を形成しうる長さ(例えば5~25塩基程度)のスペーサー配列を間に挿入して連結した塩基配列を含むオリゴRNAをデザインし、これをDNA/RNA自動合成機で合成することにより調製することができる。shR

10

20

30

40

50

NAを発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ（ヘアピン）タイプとがある。前者はsiRNAのセンス鎖の発現カセットとアンチセンス鎖の発現カセットをタンデムに連結したもので、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることにより2本鎖のsiRNA(dsRNA)を形成するというものである。一方、後者はshRNAの発現カセットをベクターに挿入したもので、細胞内でshRNAが発現しdicerによるプロセシングを受けてdsRNAを形成するというものである。プロモーターとしては、polII系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-snrRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

10

このようにして構築したsiRNAもしくはshRNA発現カセットを、次いでプラスミドベクターやウイルスベクターに挿入する。このようなベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターや、動物細胞発現プラスミドなどが用いられる。

上記siRNAは、ヌクレオチド配列の情報に基づいて、例えば394 Applied Biosystems, Inc. 合成機等のDNA/RNA自動合成機を用いて常法に従って化学的に合成することができる。例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19、Thompson et al., 国際公開99/54459、Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684、Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59、Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45、Usman et al., 1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845、Scarlinge et al., 1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433、および米国特許第6001311号に記載される方法等が挙げられる。具体的には、当業者に公知の核酸保護基（例えば5'末端にジメトキシトリチル基）およびカップリング基（例えば3'末端にホスホルアミダイト）を用いて合成できる。すなわち、5'末端の保護基を、TCA（トリクロ酢酸）等の酸で脱保護し、カップリング反応を行う。ついでアセチル基でカップリングを行った後、次の核酸の縮合反応を行う。修飾されたRNAやDNAを含むsiRNAの場合には、原料として修飾されたRNA（例えば、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド）を用いればよく、カップリング反応の条件は適宜調整できる。また、リン酸結合部分が修飾されたホスホロチオエート結合を導入する場合には、ボージェ試薬（3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキソド）を用いることができる。

20

30

あるいは、オリゴヌクレオチドは、別々に合成し、合成後に例えばライゲーションにより一緒につなげてよいし（Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al. 国際公開W093/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204）、または合成および/または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより、一緒につなげてよい。siRNA分子はまたタンデム合成法により合成することができる。すなわち、両方のsiRNA鎖を、切断可能なリンカーにより分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドとして合成し、次にこれを切断して別々のsiRNAフラグメントを生成し、これをハイブリダイズさせて精製する。リンカーはポリヌクレオチドリナーであっても非ヌクレオチドリナーであって

40

50

もよい。

合成した *siRNA* 分子は、当業者に公知の方法を用いて精製できる。例えばゲル電気泳動により精製する方法、または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製する方法が挙げられる。

本発明において、*Tet 3* 遺伝子に対する *siRNA* を構成する *Tet 3* 遺伝子の *mRNA* に相補的なオリゴRNAおよびその相補鎖としては、それぞれ配列番号：3を含む配列および配列番号：4を含む配列が挙げられ、好ましくは、それぞれ配列番号：3からなる配列および配列番号：4からなる配列が挙げられる。

Tet 3 遺伝子の *mRNA* の塩基配列と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む核酸の別の好ましい例として、該 *mRNA* を標的とする *microRNA* (*miRNA*) が挙げられる。ヒト *Tet 3 mRNA* を標的とするヒト *miRNA* としては、例えば、*hsa-miR-22*, *hsa-miR-26a*, *hsa-miR-301a*, *hsa-miR-301b*, *hsa-miR-372*, *hsa-miR-29c*, *hsa-miR-29a*, *hsa-miR-29b*, *hsa-miR-374b*, *hsa-miR-374a* 等が挙げられる。*miRNA* も、上述の *siRNA* について記載した方法に準じて調製することができる。

Tet 3 遺伝子の *mRNA* の塩基配列と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む核酸は、リポソーム、マイクロスフェアのような特殊な形態で提供されたり、他の分子が付加された形態で提供されうる。付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大させたりするような脂質 (例、ホスホリピド、コレステロールなど) などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体 (例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など) が挙げられる。こうしたものは、核酸の 3' 端または 5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の 3' 端または 5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、*RNase* などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

これらの核酸の *Tet 3* 発現阻害活性は、*Tet 3* をコードする核酸を導入した形質転換体、生体内や生体外の *Tet 3* 遺伝子発現系、または生体内や生体外の *Tet 3* タンパク質の翻訳系を用いて調べることができる。

本発明における *Tet 3* の発現を阻害する物質は、上記のような *Tet 3* 遺伝子の *mRNA* の塩基配列と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む核酸に限定されず、*Tet 3* の産生を直接的または間接的に阻害する限り、低分子化合物などの他の物質であってもよい。そのような物質は、例えば、後述する本発明のスクリーニング方法により取得することができる。

Tet 3 の発現を阻害する物質は、*Tet 3* の有する 5-メチルシトシン (5mC) の脱メチル化活性または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を抑制する活性を示すことから、関節炎の予防及び/又は治療に有用である。

従って、*Tet 3* の発現を阻害する物質を含有する医薬は、関節炎の予防及び/又は治療剤として使用することができる。

III. アンチセンス核酸、リボザイム核酸、*siRNA* およびその前駆体を含有する医薬

Tet 3 遺伝子の転写産物に相補的に結合し、該転写産物からのタンパク質の翻訳を抑制することができる本発明のアンチセンス核酸や、*Tet 3* 遺伝子の転写産物 (*mRNA*) と相同な (もしくは相補的な) 塩基配列を有し、当該転写産物を標的として該転写産物を切断し得る *siRNA* (もしくはリボザイム)、さらに該 *siRNA* の前駆体である *shRNA* など (以下、包括的に「本発明の核酸」という場合がある) は、生体内にお

10

20

30

40

50

ける T e t 3 の発現を抑制し、5 - メチルシトシン (5 m C) の脱メチル化または滑膜線維芽細胞の浸潤の促進活性を抑制するので、関節炎の予防及び / 又は治療剤として使用することができる。

本発明の核酸を含有する医薬は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤形の医薬組成物として、ヒトまたは非ヒト哺乳動物 (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、血管内投与、皮下投与など) に投与することができる。

本発明の核酸を上記の関節炎の予防及び / 又は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。即ち、本発明の核酸を、単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当な哺乳動物細胞用の発現ベクターに機能可能な態様で挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該核酸は、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、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することができる。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、前記核酸を単独またはリポソームなどの担体とともに製剤 (注射剤) 化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

本発明の核酸は、それ自体を投与してもよいし、または適当な医薬組成物として投与してもよい。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の核酸と薬理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ってよい。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記本発明の核酸を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。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等が用いられ、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 8 0、H C O - 5 0 (p o l y o x y e t h y l e n e (5 0 m o l) a d d u c t o f h y d r o g e n a t e d c a s t o r o i l)) 等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、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等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記核酸を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されてもよい。

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、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は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していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または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。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤 (アンプル)、坐剤が挙げられる。本発明の核酸は、例えば、投薬単位剤形当たり通常 5 ~ 5 0 0 m g、とりわけ注射剤では 5 ~ 1 0 0 m g、その他の剤形では 1 0 ~ 2 5 0 m g 含有されていることが好ましい。

本発明の核酸を含有する上記医薬の投与量は、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、関節リウマチの治療・予防のために使用する場合には、本発明の核酸を 1 回量として、通常 0 . 0 1 ~ 2 0 m g / k g 体重程度、好ましくは 0

10

20

30

40

50

・ 1 ~ 10 mg / kg 体重程度、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 5 mg / kg 体重程度を、1 日 1 ~ 5 回程度、好ましくは 1 日 1 ~ 3 回程度、静脈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。

なお前記した各組成物は、本発明の核酸との配合により好ましくない相互作用を生じない限り適宜他の活性成分を含有してもよい。

上述の T e t 3 に対するアンチセンス核酸、リボザイム核酸、s i R N A およびその前駆体を含有する医薬や、T e t 3 の発現を抑制する低分子化合物等を含有する医薬組成物は、関節炎の治療、予防、または進行防止に用いることができる。関節炎として、具体的には、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎（例えば、強直性脊椎炎など）などが挙げられ、好ましくは、関節リウマチが挙げられる。また、T e t 3 がその病態の増悪に関与しているいかなる疾患も、本発明の対象疾患に包含される。

10

上述の T e t 3 に対するアンチセンス核酸、リボザイム核酸、s i R N A およびその前駆体を含有する医薬や、T e t 3 の発現を抑制する低分子化合物等を含有する医薬組成物を関節炎の治療または予防に使用する場合には、単独で使用してもよいが、1 種または 2 種以上の抗炎症作用を有する薬剤と併用してもよい。

併用する薬剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、メサラジン、副腎皮質ステロイド（例、ベタメタゾン、プレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン等）、非ステロイド抗炎症薬（N S A I D s ; 例、サリチル酸系、アントラニル酸系、アリアル酸系、プロピオン酸系、オキシカム系、ピリン系）、抗 T N F 抗体（インフルキシマブ、アダリムマブ）、抗リウマチ薬（例、アクタリット等の免疫調節薬、メトトレキサート等の免疫抑制薬、抗 T N F 抗体やエタネルセプト等の生物学的製剤）などが挙げられる。

20

I V . 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

上述の通り、T e t 3 の発現及び / 又は機能を阻害すると、5 - メチルシトシン（5 m C ）の脱メチル化が抑制され、活性化された滑膜線維芽細胞の最も重要な攻撃的な表現型の一つである浸潤能が抑制される。このことは、T e t 3 の選択的阻害は、D N A メチル化レベルの維持を介して C C L 2 や I C A M 1 の発現を阻害し、それに伴って浸潤性に代表される滑膜線維芽細胞の活性化を阻害することによって、関節炎の治療につながることを意味する。従って、T e t 3 の発現及び / 又は機能を阻害する化合物は、関節炎の

30

予防及び / 又は治療剤として使用することができる。

したがって、T e t 3 を産生する細胞は、T e t 3 （又は T e t 3 遺伝子）の発現量及び / 又は機能を指標とすることにより、関節炎の予防及び / 又は治療薬のスクリーニングのためのツールとして用いることができる。

T e t 3 の発現又は機能を阻害する化合物をスクリーニングする場合、該スクリーニング方法は、T e t 3 を産生する能力を有する細胞を、被検物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における T e t 3 の発現量又は機能の程度を比較することを含む。また、T e t 3 の機能を阻害する化合物は、精製した T e t 3 タンパク質への結合能を試験することによっても、スクリーニングすることができる。

上記のスクリーニング方法において用いられる T e t 3 を産生する能力を有する細胞としては、それらを生来発現しているヒトもしくは他の哺乳動物細胞（例：滑膜線維芽細胞、滑膜表層細胞等）またはそれを含む生体試料（例：滑膜（特に滑膜表層細胞層）等）であれば特に制限はない。非ヒト動物由来の滑膜等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体自体に被検物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

40

また、T e t 3 を産生する能力を有する細胞としては、公知慣用の遺伝子工学的手法により作製された各種の形質転換体も使用することができる。宿主としては、例えば、H 4 I I E - C 3 細胞、H e p G 2 細胞、H E K 2 9 3 細胞、C O S 7 細胞、C H O 細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。

具体的には、T e t 3 をコードする D N A （即ち、配列番号：1 で表される塩基配列ま

50

たは該塩基配列に対し相補性を有する塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同質の機能を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA)を、適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結して宿主動物細胞に導入することにより調製することができる。

Tet 3をコードする遺伝子の調製方法について、以下に説明する。

Tet 3をコードする遺伝子は、通常の遺伝子工学的な方法(例えば、Sambrook J., Frisch E.F., Maniatis T. 著、モレキュラークローニング第2版(Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー発行(Cold Spring Harbor Laboratory press)等に記載されている方法)に準じて取得することができる。すなわち、Tet 3をコードするDNAは、例えば、配列番号：1で表される塩基配列に基づいて、適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして合成し、前記したTet 3を産生する細胞・組織由来のcDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法やPCR法を用いてクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(上記)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、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された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の塩基配列は、公知のキット、例えば、MutantTM-super Express Km(宝酒造(株))、MutantTM-K(宝酒造(株))等を用いて、OD A-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変換することができる。

クローン化された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するか、リンカーを付加した後に、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ができる。

次いで、得られたTet 3遺伝子を用いて、通常の遺伝子工学的な方法に準じてTet 3タンパク質を発現する細胞を製造・取得することができる。

例えば、Tet 3遺伝子が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、さらに形質転換された宿主細胞(形質転換体)を培養することでTet 3タンパク質を発現する細胞を取得すればよい。上記プラスミドとしては、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自律的に複製できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカーをもつ発現ベクターに、Tet 3をコードする遺伝子が導入されたものを好ましく挙げるができる。尚、発現ベクターとしては、各種のものが市販されている。

例えば、大腸菌での発現に使用される発現ベクターは、lac、trp、tacなどのプロモーターを含む発現ベクターであって、これらはファルマシア社、タカラバイオ等から市販されている。当該発現ベクターにTet 3をコードする遺伝子を導入するために用いられる制限酵素もタカラバイオ等から市販されている。さらなる高発現を導くことが必要な場合には、Tet 3をコードするDNAの上流にリボソーム結合領域を連結してもよい。用いられるリボソーム結合領域としては、Guarente L.ら(Cell 20, p543)や谷口ら(Genetics of Industrial Microorganisms, p202, 講談社)による報告に記載されたものを挙げるができる。

また、動物細胞発現プラスミド(例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo)；ファージなどのバクテリオファージ；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなどの動物ウイルスベクターなどを用いることもできる。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

10

20

30

40

50

モーターであればいかなるものでもよい。例えば、SR プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、MoMuLV (モロニー Maus 白血病ウイルス) LTR、HSV-TK (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーター、アクチン遺伝子プロモーター、aP2 遺伝子プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF-プロモーター、CAG プロモーター、CMV プロモーター、SR プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターとしては、上記の他に、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複製起点(以下、SV40 ori 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遺伝子(以下、dhfr と略称する場合がある、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、dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によって目的遺伝子を選択することもできる。

上記したTet³をコードするDNAを含む発現ベクターで宿主を形質転換することにより、Tet³発現細胞を製造することができる。

宿主細胞としては、原核生物もしくは真核生物である微生物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞等を挙げる事ができる。哺乳動物細胞としては、例えば、HepG2細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、ヒトFL細胞、サルCOS-7細胞、サルVerO細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(以下、CHO細胞と略記)、dhfr 遺伝子欠損CHO細胞(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットH4IIE-C3細胞、ラットGH3細胞などが用いられ得る。

前記のようにして得られたプラスミドは、通常の遺伝子工学的的方法により前記宿主細胞に導入することができる。形質転換体の培養は、微生物培養、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞の培養に使用される通常の方法によって行うことができる。例えば大腸菌の場合、適当な炭素源、窒素源およびビタミン等の微量栄養物を適宜含む培地中で培養を行う。培養方法としては、固体培養、液体培養のいずれの方法でもよく、好ましくは、通気攪拌培養法等の液体培養を挙げる事ができる。

形質転換は、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などにより行うことができる。例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ウイルス学(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法を用いることができる。

上記のようにして得られる形質転換細胞や生来Tet³を産生する能力を有する哺乳動物細胞または該細胞を含む組織・臓器は、例えば、約5~20%の胎仔牛血清を含む最小必須培地(MEM) [Science, 122巻, 501(1952)]、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) [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)]などの培地中で培養することができる。培地のpHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40で行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

Tet³タンパク質の取得は、一般のタンパク質の単離・精製に通常使用される方法を組み合わせて実施すればよい。例えば、前記の培養により得られた形質転換体を遠心分離などで除去し、培養上清からTet³を前記と同様にして精製してもよい。また、Tet³タンパク質が前記の培養により得られた形質転換体の細胞内に蓄積する場合には、

10

20

30

40

50

例えば、該形質転換体を遠心分離等で集めた後、細胞を破碎または溶解せしめ、必要であればタンパク質の可溶化を行い、イオン交換、疎水、ゲルろ過等の各種クロマトグラフィーを用いた工程を単独で、若しくは組み合わせることにより精製すればよい。精製されたタンパク質の高次構造を復元する操作をさらに行ってもよい。

本発明のスクリーニングを実施するに当たり、被検物質としては、例えばタンパク質、ペプチド、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挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

また、T e t 3もしくはT e t 3遺伝子の発現量を低下させる物質、またはT e t 3の機能を低下させる物質を選択する際に、被検物質を接触させない対照細胞を比較対照として用いることもできる。ここで「被検物質を接触させない」とは、被検物質の代わりに被検物質と同量の溶媒（ブランク）を添加する場合や、T e t 3もしくはT e t 3遺伝子の発現量またはT e t 3の機能に影響を与えないネガティブコントロール物質を添加する場合も含まれる。

被検物質の上記細胞との接触は、例えば、上記の培地や各種緩衝液（例えば、H E P E S緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など）の中に被検物質を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができる。添加される被検物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、約0.1 nM～約100 μMの範囲で適宜選択される。インキュベート時間としては、例えば、約10分～約24時間が挙げられる。

T e t 3を産生する細胞が、非ヒト哺乳動物個体の形態で提供される場合、該動物個体の状態は特に制限されないが、例えば、薬剤もしくは遺伝子改変により関節炎を誘起した関節炎モデル動物（例えば、コラーゲン誘導関節炎（C I A）マウス、S K Gマウス、P D - 1ノックアウトマウス、K / B x Nマウス、シノビオリンT gマウス等のR Aモデル動物など）であってもよい。使用される動物の飼育条件に特に制限はないが、S P Fグレード以上の環境下で飼育されたものであることが好ましい。被検物質の該細胞との接触は、該動物個体への被検物質の投与によって行われる。投与経路は特に制限されないが、例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、経口投与、気道内投与、直腸投与等が挙げられる。投与量も特に制限はないが、例えば、1回量として約0.5～20 mg / kgを、1日1～5回、好ましくは1日1～3回、1～14日間投与することができる。

あるいは、上記のスクリーニング方法は、T e t 3を産生する能力を有する細胞に代えて、該細胞の抽出液、あるいは該細胞から単離精製したT e t 3に、被検物質を接触させることにより行うこともできる。

（T e t 3遺伝子またはT e t 3の発現量の測定）

本発明は、T e t 3を産生する能力を有する細胞における該タンパク質（遺伝子）の発現を、被検物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法を提供する。本方法において用いられる細胞、被検物質の種類、被検物質と細胞との接触の態様などは、上記と同様である。

T e t 3の発現量は、前記したT e t 3をコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸、即ち、配列番号：1で表される塩基配列もしくはそれと相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸（DNA）（以下、「本発明の検出用核酸」という場合がある）を用いて、T e t 3遺伝子のmRNAを検出することにより、RNAレベルで測定することができる。あるいは、該発現量は、前記したT e t 3に対する抗体（以下、「本発明の検出用抗体」という場合がある）を用いて、これらのタンパク質を検出することにより、タンパク質レベルで測定することもできる。

従って、より具体的には、本発明は、

（a）T e t 3を産生する能力を有する細胞を被検物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該タンパク質をコードするmRNAの量を、本発明の検出用核酸を

10

20

30

40

50

用いて測定、比較することを特徴とする、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法、および

(b) Tet 3を産生する能力を有する細胞を被検物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における該タンパク質の量を、本発明の検出用抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法を提供する。

すなわち、Tet 3の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、以下のようにして行うことができる。

(i) 正常あるいは疾患モデル(例えば、RAモデル動物など)非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して被検物質を投与し、一定時間経過した後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後)に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、滑膜等)、あるいは臓器から単離した組織または細胞を得る。

Tet 3のmRNAは、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出して定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、Tet 3のタンパク質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種イムノアッセイ法を用いて定量することができる。

(ii) Tet 3遺伝子を発現する細胞(例えば、滑膜線維芽細胞、滑膜表層細胞、Tet 3を導入した形質転換体)を上記の方法に従って作製し、常法に従って培養する際に被検物質を培地もしくは緩衝液中に添加し、一定時間インキュベート後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは2日後~3日後)、該細胞中に含まれるTet 3あるいはそれをコードするmRNAを、上記(i)と同様にして定量、解析することができる。

Tet 3遺伝子(mRNA)の発現レベルの検出および定量は、前記細胞から調製したRNAまたはそれから転写された相補的なポリヌクレオチドを用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法など公知の方法で実施できる。具体的には、Tet 3遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/またはその相補的なポリヌクレオチドをプライマーまたはプローブとして用いることによって、RNA中のTet 3遺伝子の発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。そのようなプローブもしくはプライマーは、Tet 3遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3(<http://primer3.sourceforge.net/>)あるいはベクターNTI(Infomax社製)を利用して設計することができる。

ノーザンブロット法を利用する場合、前記プライマーもしくはプローブを放射性同位元素(^{32}P 、 ^{33}P など:RI)や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等に転写した細胞由来のRNAとハイブリダイズさせた後、形成された前記プライマーもしくはプローブ(DNAまたはRNA)とRNAとの二重鎖を、前記プライマーもしくはプローブの標識物(RI若しくは蛍光物質)に由来するシグナルとして放射線検出器(BAS-1800II、富士フィルム社製)または蛍光検出器で検出、測定する方法を例示することができる。また、Alk Phos Direct Labelling and Detection System(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、該プロトコールに従って前記プローブを標識し、細胞由来のRNAとハイブリダイズさせた後、前記プローブの標識物に由来するシグナルをマルチパイオイメージャーSTORM 860(Amersham Pharmacia Biotech社製)で検出、測定する方法を使用することもできる。

RT-PCR法を利用する場合は、細胞由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製して、これを鋳型として標的のTet 3遺伝子の領域が増幅できるように、Tet 3遺伝子の配列に基づき調製した一対のプライマー(上記cDNA(-鎖)に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖)をこれとハイブリダイズさせて、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する方法を例示することができる。なお、増幅された二本鎖DNAの検出は、上記PCRを予めRIや蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖D

10

20

30

40

50

NAを常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーさせて、標識した前記プライマーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖DNA産物はアジレント2100バイオアナライザ(横河アナリティカルシステムズ社製)などで測定することができる。また、SYBR Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems社製)で該プロトコールに従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRIME 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems社製)で反応させて、該反応物を検出することもできる。

また、Tet 3の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、Tet 3遺伝子の転写調節領域を用いたレポーター遺伝子アッセイで行うことも可能である。ここで、「転写調節領域」とは、通常、当該染色体遺伝子の上流数kbから数十kbの範囲を指し、例えば、(i)5'-レース法(5'-RACE法)(例えば、5'-full Race Core Kit(タカラバイオ社製)等を用いて実施されうる)、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により、5'末端を決定するステップ;(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ;を含む手法等により同定することが出来る。

Tet 3遺伝子の転写調節領域の下流に機能可能な形でレポータータンパク質をコードする核酸(以下、「レポーター遺伝子」という)を連結して、レポータータンパク質発現ベクターを構築する。該ベクターは当業者に公知の方法で調製すればよい。すなわち、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc.等に記載される通常の方法に従って切り出されたTet 3遺伝子の転写調節領域を、レポーター遺伝子を含むプラスミド上に組み込むことができる。

レポータータンパク質としては、 β -グルクロニダーゼ(GUS)、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコルトランスアセチラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(GAS)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、青色蛍光タンパク質(CFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)等が挙げられる。

調製したTet 3遺伝子の転写調節領域を機能可能な形で連結されてなるレポーター遺伝子を、通常の方法に従って、当該レポーター遺伝子を導入する細胞において使用可能なベクターに挿入し、プラスミドを作製し、適当な宿主細胞へ導入することができる。ベクターに搭載される選択マーカー遺伝子に応じた選抜条件の培地で培養することにより、安定な形質転換細胞を得ることができる。あるいは、Tet 3遺伝子の転写調節領域を機能可能な形で連結されてなるレポーター遺伝子は、宿主細胞内に一過的に発現させてもよい。

また、レポーター遺伝子の発現量を測定する方法としては、個々のレポーター遺伝子に応じた方法を利用すればよい。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いる場合には、前記形質転換細胞を数日間培養後、当該細胞の抽出物を得、次いで当該抽出物をルシフェリンおよびATPと反応させて化学発光させ、その発光強度を測定することによりプロモーター活性を検出することができる。この際、ピッカジーンデュアルキット(登録商標;東洋インキ製)等の市販のルシフェラーゼ反応検出キットを用いることができる。

Tet 3のタンパク質量の測定方法としては、具体的には、例えば、(i)本発明の検出用抗体と、試料液および標識化されたTet 3とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたタンパク質を検出することにより試料液中のTet 3を定量する方法や、

(ii)試料液と、担体上に不溶化した本発明の検出用抗体および標識化された別の本発明の検出用抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量(

10

20

30

40

50

活性)を測定することにより、試料液中のTet 3を定量する方法等が挙げられる。

Tet 3のタンパク質発現レベルの検出および定量は、Tet 3を認識する抗体を用いたウェスタンブロット法等の公知方法に従って定量できる。ウェスタンブロット法は、一次抗体としてTet 3を認識する抗体を用いた後、二次抗体として¹²⁵Iなどの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)等の酵素等で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器(BAI-1800II:富士フィルム社製など)、蛍光検出器などで測定することによって実施できる。また、一次抗体としてTet 3を認識する抗体を用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を利用して該プロトコールに従って検出し、マルチバイオメジャーSTORM 860(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)で測定することもできる。

10

上記の抗体は、その形態に特に制限はなく、Tet 3を免疫原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であってもよく、さらにはTet 3を構成するアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体を用いることもできる。

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publi sh. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13)。

20

上記(ii)の定量法においては、2種の抗体はTet 3の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体がTet 3のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体として該タンパク質のC端部と反応するものを用いることができる。

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、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C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、 α -ガラクトシダーゼ、 α -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-(ストレプト)アビジン系を用いることもできる。

30

本発明の検出用抗体を用いるTet 3の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、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。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

40

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てもよい。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あげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明の検出用抗体に試料液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した別の本発明の検出用抗体を反応させた(2次反応)後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中のTet 3を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。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、固相化抗体あるいは標識

50

化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。

本発明の検出用抗体は、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も用いることができる。

競合法では、試料液中のTet 3と標識したTet 3とを抗体に対して競合的に反応させた後、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することにより、試料液中のTet 3を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、ポリエチレングリコールや前記抗体(1次抗体)に対する2次抗体などを用いてB/F分離を行う液相法、および、1次抗体として固相化抗体を用いるか(直接法)、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相化抗体を用いる(間接法)固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中のTet 3と固相化したTet 3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、あるいは試料液中のTet 3と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化したTet 3を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、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試料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。試料液中のTet 3の量がわずかであり、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方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えてTet 3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、本発明の検出用抗体を用いることによって、細胞におけるTet 3の量を感度よく定量することができる。

例えば、上記スクリーニング法において、被検物質の存在下におけるTet 3の発現量(mRNA量またはタンパク質量)が、被検物質の非存在下における場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上阻害された場合、該被検物質を、Tet 3の発現阻害物質、従って、関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択することができる。

あるいは、上記スクリーニング法において、Tet 3遺伝子を発現する細胞に代えて、Tet 3遺伝子の内在の転写調節領域の制御下にあるレポーター遺伝子を含む細胞を用いることができる。このような細胞は、Tet 3遺伝子の転写調節領域の制御下にある

10

20

30

40

50

レポーター遺伝子（例、ルシフェラーゼ、GFPなど）を導入したトランスジェニック動物の細胞、組織、臓器もしくは個体であってもよい。かかる細胞を用いる場合には、Tet 3の発現量は、レポーター遺伝子の発現レベルを、常法を用いて測定することにより評価することができる。

（Tet 3の機能の測定）

本発明のスクリーニング方法は、被検物質がTet 3の機能を阻害するか否かを指標として行うこともできる。

Tet 3は脱メチル化タンパク質であるので、Tet 3タンパク質に結合能を有する物質は、脱メチル化活性を抑制することにより、Tet 3の機能を阻害し得ると考えられる。従って、Tet 3への結合能を指標として、Tet 3の機能阻害物質の候補をスクリーニングすることができる。

例えば、被検物質をウェルプレートの各ウェルに吸着させ、適当な標識剤で標識したTet 3溶液を各ウェルに添加してインキュベートした後液相を除き、洗浄後に固相に結合した標識量を測定することにより、Tet 3との結合能を有する被検物質を検出することができる。Tet 3を直接標識する代わりに、標識した抗Tet 3抗体を用いて固相に結合したTet 3を検出することもできる。あるいは、Tet 3を固定化した担体（例、アフィニティーカラム）に被検物質の溶液を通し、該担体に保持された被検物質を、Tet 3との結合能を有する物質、即ち関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択することもできる。

このようにして得られた候補物質が実際に抗炎症作用を有するか否かは、該候補物質を関節炎モデルに適用し、該モデルにおける炎症反応を抑制するか否かを検定することにより確認することができる。そのような関節炎モデルとしては、*in vivo*及び*in vitro*のモデルを用いることができる。*in vivo*モデルとしては、例えばCIAモデル（完全フロイントアジュバントとエマルジョン化したII型コラーゲンで非ヒト動物を免疫することにより調製することができる）、CAIAモデル（II型コラーゲンのCB11内のエピトープを認識するモノクローナル抗体カクテルを非ヒト動物に注射することにより調製することができる）等のRAモデル等を用いることができるが、これらに限定されない。一方、*in vitro*モデルとしては、関節炎における標的細胞（例えば、RAにおける滑膜細胞等）の培養系（例えば、RA患者の滑膜組織由来の滑膜線維芽細胞の培養系等）などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの*in vitro*モデルは、必要に応じてTNF等の炎症性サイトカイン等による刺激、あるいは単球、マクロファージ、好中球等の炎症性サイトカイン産生細胞との複合培養（例えば、トランスウェル^{T M}培養システム等を用い、上部コンパートメントに標的細胞（例、滑膜線維芽細胞）、下部コンパートメントに炎症性サイトカイン産生細胞（マクロファージ様のTHP-1細胞、RAW264.7細胞）をそれぞれ単層培養する培養系）などにより、炎症反応を惹起することができる。

候補物質が抗炎症作用を有するか否かは、上記の関節炎モデルにおける炎症反応が候補物質の添加により抑制されたか否かにより判定することができる。例えば、上記のRAモデル動物であれば、滑膜炎、炎症細胞浸潤の程度、リウマトイド因子の有無などを指標にして、関節炎治療効果の有無及び/又はその程度を判定することができる。一方、*in vitro*関節炎モデルである滑膜線維芽細胞の単層培養系を用いた場合、後述の実施例の通り、ゲノムの5-メチルシトシン（5mC）の脱メチル化の程度またはscratc h a s s a yの結果を指標にして炎症反応の程度を評価することができる。

本発明のさらに別の実施態様においては、上記*in vitro*関節炎モデルを用いて、Tet 3の機能を阻害して関節炎の予防及び/又は治療効果を示す物質を、ワンステップでスクリーニングすることもできる。当該方法は以下の（1）～（3）の工程を含む。

（1）滑膜線維芽細胞を、被検物質に接触させる工程、

（2）前記細胞のゲノムの5-メチルシトシン（5mC）の脱メチル化または浸潤性の程度を測定する工程、

10

20

30

40

50

(3) 被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、前記細胞のゲノムの5-メチルシトシン(5mC)の脱メチル化または浸潤性を抑制した被検物質を、関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択する工程。

当該方法は、必要に応じて、上記工程(1)と同時もしくはその前後において、炎症を惹起する工程をさらに含み得る。炎症を惹起する方法としては、例えば、TNF等の炎症性サイトカイン等による刺激、あるいは単球、マクロファージ、好中球等の炎症性サイトカイン産生細胞との複合培養等が挙げられる。好ましい実施態様においては、例えば、トランスウェル^{T M}培養システム等を用い、上部コンパートメントに標的細胞(例、滑膜線維芽細胞)、下部コンパートメントに炎症性サイトカイン産生細胞(マクロファージ様のTHP-1細胞、RAW264.7細胞)をそれぞれ単層培養する方法が挙げられる。被検物質は通常、下部コンパートメントの培地に添加されるが、例えば、腸管吸収されてTet³の機能を阻害し得る食品中に含有される成分や、経口投与可能なTet³機能阻害薬をスクリーニングすることを目的とする場合等においては、上部コンパートメントの培地に被検物質が添加され得る。

細胞のゲノムの5-メチルシトシン(5mC)の脱メチル化の程度の測定は、前記細胞から調製したゲノムDNAを用いて、5hmCや5mCを認識する抗体を用いたウェスタンブロット法等の公知方法に従って定量できる。本スクリーニング方法に用いるウェスタンブロット法は、前記のTet³タンパク質の測定方法に記載のウェスタンブロット法と同様であってよい。5hmCや5mCを認識する抗体は、その形態に特に制限はなく、5hmCや5mCを免疫原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であってもよい。

また、細胞の浸潤性の程度の測定は、例えば、後述する実施例に記載の方法に従って測定することができる。具体的には、被検物質に接触させた細胞または接触させていない細胞を培地(10%FCS含有DMEM(必要に応じて炎症性サイトカイン(例えば、TNF)を含有してもよい))で培養(例えば96時間)後、細胞が接着した培養皿の表面を擦過し、再度培養しながら、細胞が擦過表面に浸潤する細胞数を測定することによって、細胞の浸潤性の程度の測定・比較することができる。

本発明の上記いずれかのスクリーニング方法を用いて得られる、Tet³の発現または機能を阻害する物質は、炎症性疾患の予防及び/又は治療用の医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物を上述の予防・治療剤として使用する場合、上記Tet³の発現または機能を阻害する低分子化合物と同様に製剤化することができ、同様の投与経路および投与量で、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、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。

V. 疾病に対する検査方法

上述の通り、関節リウマチ患者由来の滑膜表層細胞層や炎症性サイトカインで刺激した、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞では、Tet³の発現レベルが高いことを見出した。

したがって、被験者由来の試料のTet³(又はTet³遺伝子)の発現量を指標とすることにより、関節炎を検査することができる。

本発明は、被験者由来の試料から、Tet³の検出物質を用いてTet³遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出または定量することを含む、関節炎の検査方法を提供する。Tet³の検出物質としては、具体的には、以下の(a)または(b)が挙げられる:

(a) Tet³遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー

(b) Tet³遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体。

関節炎としては、具体的には、関節リウマチ、乾癬性関節炎、脊椎関節炎(例えば、強直性脊椎炎など)などが挙げられ、好ましくは、関節リウマチが挙げられる。

本発明の検査方法に用いられる試料としては、検査対象である被験者から分離されるものであって、検出または定量する対象であるTet³遺伝子産物(例、RNA、タンパク

10

20

30

40

50

質、その分解産物など)を含有し得る組織または細胞等であれば特に制限されない。例えば、滑膜、滑膜線維芽細胞、滑膜表層細胞などが挙げられる。

被験者から分離した試料における T e t 3 の検出または定量は、該被験者から R N A (例：全 R N A、m R N A)画分を調製し、該画分中に含まれる T e t 3 遺伝子の転写産物を検出または定量することにより調べることができる。

従って、一実施態様において、本発明の検査方法は、T e t 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマーを用いて測定することを特徴とする。

R N A 画分の調製は、グアニジン - C s C l 超遠心法、A G P C 法など公知の手法を用いて行うことができるが、市販の R N A 抽出用キット (例：R N e a s y M i n i K i t ; Q I A G E N 製等)を用いて、微量検体から迅速且つ簡便に高純度の全 R N A を調製することができる。R N A 画分中の T e t 3 遺伝子の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション (ノーザンプロット、ドットプロット、D N A チップ解析等)を用いる方法、あるいは P C R (R T - P C R、競合 P C R、リアルタイム P C R 等)を用いる方法などが挙げられる。微量検体から迅速且つ簡便に定量性よく T e t 3 遺伝子の発現変動を検出できる点で競合 P C R やリアルタイム P C R などの定量的 P C R 法が好ましい。

T e t 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマーおよび該核酸プローブまたは核酸プライマーを用いたハイブリダイゼーション方法は、前記の本発明の関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法において記載した本発明の検出用核酸およびハイブリダイゼーション方法と同様であってよい。

あるいは、被験者から分離した試料における T e t 3 の検出または定量は、該検体からタンパク質画分を調製し、該画分中に含まれる該遺伝子の翻訳産物 (即ち、T e t 3 タンパク質)を検出または定量することにより調べることができる。T e t 3 の検出または定量は、T e t 3 タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、免疫学的測定法 (例：E L I S A、F I A、R I A、ウェスタンプロット等)によって行うこともできる。

従って、一実施態様において、本発明の検査方法は、T e t 3 の翻訳産物を特異的に検出し得る抗体を用いて測定することを特徴とする。

T e t 3 の翻訳産物を特異的に認識する抗体および該抗体を用いた免疫学的測定方法は、前記の本発明の関節炎の予防及び/又は治療薬のスクリーニング方法において記載した本発明の検出用抗体および免疫学的測定方法と同様であってよい。

本発明の関節炎の検査方法において、T e t 3 の検出又は定量により、関節炎の検査を行うことができる。具体的には、以下の工程を含む方法であってよい。

(1) 対照群および被験者から分離した試料について T e t 3 を検出または定量する工程、

(2) 対照群で検出または定量された T e t 3 と被験者で検出または定量された T e t 3 を比較する工程。

後述の実施例に示されるように、変形性関節症患者 (対照群)と比較して関節リウマチを発症した患者において滑膜中の T e t 3 濃度が高い。関節炎の検査は、T e t 3 の濃度と関節炎への罹患率との間のこのような正の相関に基づき行われる。

例えば、関節炎を発症していない対照群及び被験者からの試料における T e t 3 の濃度を定量し、被験者からの試料における T e t 3 の濃度を、対照群からの試料における T e t 3 の濃度と比較する。あるいは、T e t 3 の濃度と関節炎の発症の有無との相関図をあらかじめ作成しておき、被験者における T e t 3 濃度をその相関図と比較してもよい。濃度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

そして、被験者において T e t 3 が、対照群に比べて高値で検出若しくは定量された場合には、上記のような関節炎を発症している可能性が高いと判断することができる。従って、本発明の検査方法は、上記 (1)、(2)の工程に加えて、(3)被験者において T e t 3 が、対照群に比べて高値で検出若しくは定量された場合には、関節炎を発症していると判断する工程を含んでもよい。

10

20

30

40

50

さらに、本発明は、関節炎検査用のキット（診断剤）にも及ぶ。本発明の関節炎検査用キットは、上述の本発明の検査方法を簡便に実施するためのキットであればよく、特に限定されない。該検査するためのキットは、

(a) T e t 3 遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブまたは核酸プライマー、および/または

(b) T e t 3 遺伝子の翻訳産物を特異的に認識する抗体を含有してなる。該判定するためのキットが2以上の上記核酸および/または抗体を含む場合、各核酸または抗体は互いに T e t 3 遺伝子の塩基配列上の異なる部分を特異的に認識、または T e t 3 遺伝子の翻訳産物の異なるエピトープを特異的に認識し得るものである。

本発明のキットが前記(a)の核酸を含有する試薬を構成として含む場合、該核酸としては、本発明の検査方法において前記したプローブ用核酸もしくはプライマー用オリゴヌクレオチドが挙げられる。

T e t 3 遺伝子の発現を検出し得る核酸は、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態、固体として提供することもできるし、水もしくは適当な緩衝液（例：T E 緩衝液等）中に溶解した状態で提供することもできる。標識プローブとして用いられる場合、該核酸は予め上記のいずれかの標識物質で標識した状態で提供することもできるし、標識物質とそれぞれ別個に提供され、用時標識して用いることもできる。

あるいは、該核酸は、適当な固相に固定化された状態で提供することもできる。固相としては、例えば、ガラス、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等が挙げられるが、これらに限定されない。また、固定化手段としては、予め核酸にアミノ基、アルデヒド基、S H 基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、固相上にも該核酸と反応し得る官能基（例：アルデヒド基、アミノ基、S H 基、ストレプトアビジンなど）を導入し、両官能基間の共有結合で固相と核酸を架橋したり、ポリアニオン性の核酸に対して、固相をポリカチオンコーティングして静電結合を利用して核酸を固定化するなどの方法が挙げられるが、これらに限定されない。

該検査するためのキットに含有される核酸は、同一の方法（例：ノーザンプロット、ドットプロット、DNAアレイ技術、定量R T - P C R等）により T e t 3 遺伝子の発現を検出し得るように構築されていることが特に好ましい。

本発明のキットが前記(b)の抗体を含有する試薬を構成として含む場合、該抗体としては、本発明の検査方法において前記した抗体が挙げられる。

本発明のキットを構成する試薬は、T e t 3 遺伝子の発現を検出し得る核酸や抗体に加えて、該遺伝子の発現を検出するための反応において必要な他の物質であって、共存状態で保存することにより反応に悪影響を及ぼさない物質をさらに含有することができる。あるいは、該試薬は、T e t 3 遺伝子の発現を検出するための反応において必要な他の物質を含有する別個の試薬とともに提供されてもよい。例えば、T e t 3 遺伝子の発現を検出するための反応がP C Rの場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、d N T P s、耐熱性D N Aポリメラーゼ等が挙げられる。競合P C RやリアルタイムP C Rを用いる場合は、c o m p e t i t o r 核酸や蛍光試薬（上記インターカレーターや蛍光プローブ等）などをさらに含むことができる。また、T e t 3 遺伝子の発現を検出するための反応が抗原抗体反応の場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、c o m p e t i t o r 抗体、標識された二次抗体（例えば、一次抗体がウサギ抗ヒトT e t 3 抗体の場合、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等で標識されたマウス抗ウサギI g Gなど）、ブロッキング液等が挙げられる。

以下の実施例は、単に本発明をより具体的に例示するためのものであって、本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0009】

(実施例1) 滑膜におけるT e t タンパク質ファミリーの発現レベル

T e t タンパク質ファミリーとしてはT e t 1, T e t 2, T e t 3 の3種類の

10

20

30

40

50

サブタイプが存在し、細胞ごとに発現レベルが異なること、またそれぞれが標的にする遺伝子座が異なることが知られる。そのため、まずは関節リウマチ（RA）患者、対照となる変形性関節症（OA）患者由来の滑膜における、Tetタンパク質ファミリーの発現レベルを免疫組織化学染色法によって調べた。滑膜は関節手術の際に得られた滑膜組織の一部を凍結保存して後に組織切片を作成した。抗体はGoat-anti-human TET1 Ab (Santa Cruz biotech, sc-1634443), mouse anti-human TET2 Ab (sc-136926), rabbit anti-human TET3 Ab (sc-139186), rabbit anti-5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) polyclonal Ab (Active Motif), rabbit anti-5-methylcytosine (5-mC) polyclonal Ab (Active Motif) を用い、二重染色にはmouse monoclonal anti-CD55 Ab (ab89190)、mouse monoclonal anti-CD68 Ab (ab74704)、2次抗体としてはMACH 2 double stain 2 (mouse-HRP + rabbit-AP) を使用した。観察にはBIOREVO (keyence, Japan) を使用した。

その結果、OA、RAともにTet 1、Tet 2の発現レベルには差が認められず、Tet 3は滑膜表層細胞層において、OAよりもRAで強い発現が認められた（図1～3）。

また、RA、OA由来の滑膜におけるDNAメチル化レベルおよびTetタンパク質ファミリーによる脱メチル化レベルを調べるために、5-メチルシトシン（5mC）および5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）を免疫組織化学染色した。

その結果、RA、OA共に、5mCのレベルは低く、5hmCのレベルは中等度で滑膜表層でより強い印象であった（図1、2）。

（実施例2）滑膜線維芽細胞（FLS）におけるTetタンパク質ファミリーの発現レベル

継代培養したFLSではすでに炎症性サイトカインの直接的な影響はないが、RA特有のDNAメチル化プロファイルは保たれている（Nakano K et al. Ann Rheum Dis 2013）。そこで、炎症性サイトカイン非存在下で培養した場合のTetファミリーの発現レベル（mRNA、タンパク質）を、RA、OA、健常人由来FLSと比較した。FLSとしては、実施例1の滑膜組織にコラゲナーゼ処理を加えて抽出した滑膜細胞を4-6継代して、99%以上の純度が確認されたFLSを用いた。mRNAの発現はStepOne PlusTMを使用してリアルタイムPCRで解析した。primer/probeはTaqMan Gene Expression AssaysのTET1 (Hs00286756_m1), TET2 (Hs00325999_m1), TET3 (00379125_m1) を用い、発現レベルをGAPDH (Hs99999905_m1) で補正した。蛍光染色には一次抗体としてGoat-anti-human TET1 Ab (Santa Cruz biotech, sc-1634443), mouse anti-human TET2 Ab (sc-136926), rabbit anti-human TET3 Ab (sc-139186)、二次抗体としてFITC-conjugated anti-goat IgG, FITC-conjugated anti-mouse IgG, FITC-conjugated anti-rabbit IgGをそれぞれ使用した。観察にはBIOREVO (keyence, Japan) を、画像解析にはBZ-III Viewer software (keyence) を使用した。

その結果、炎症性サイトカインによる刺激がないFLSにおけるTetタンパク質ファミリーのmRNA発現レベルは、RA、OA、健常人の間で差を認めなかった（図4）。一方、タンパク質発現レベルでは、Tet 1、Tet 2の発現レベルは非常に低く、Tet 3はTet 1、Tet 2に比べて強い発現がOA、RA由来FLSで認められた（図5）。

(実施例3) 炎症性サイトカイン刺激後のFLSにおけるTetタンパク質ファミリーの発現レベル

実施例2のFLSにRAの病態に中心的に関与するとされる炎症性サイトカインTNFやIL-1を加えて培養した場合の、Tetタンパク質ファミリーの発現レベルの変化(mRNA、タンパク質)を調べた。TNFはrecombinant human TNF-alpha(R&D), IL-1はrecombinant human IL-1(RELIATech GmbH)を使用して、それぞれ50ng/ml, 1ng/mlで刺激した。また、蛍光染色を行い、ランダムに20個の細胞の核内と細胞質の蛍光強度を解析し、蛍光強度の比をN/C比とした。核タンパクの抽出にはNuclear Extraction Kit(Affymetrix, Fremont, CA)を使用して、Western blot法でタンパク質の発現を解析した。

その結果、TNFやIL-1によってFLSを刺激すると、OA、RAに関わらず、mRNA発現レベルに関しては、Tet1が刺激後2時間で顕著に低下したことに對して、Tet3は刺激後2時間で有意に発現が増加した。Tet2の発現の変化は認めなかった(図6)。タンパク質発現レベルに関しては、健常者、OA、RAに関わらず、TNF刺激後24時間からFLSの核内のTet3発現レベルは有意に増加し、刺激後96時間で顕著となった(図7、8)。

(実施例4) 炎症性サイトカイン刺激後のFLSにおけるDNAメチル化レベル

RA由来FLSにTNFによる刺激を加え、DNAの脱メチル化レベルを調べるために5hmCのレベル(genomic DNA)の変化を調べた。gDNAの抽出にはSpinClean genomic DNA purification kit(m. biotech)を用い、Dot Blot法でgDNA中の5hmCの発現レベルを解析した。一次抗体にはrabbit anti-5-methylcytosine(5-mC) polyclonal Ab(Active Motif)、二次抗体にはECLTM Anti-Rabbit IgG, HRP linked whole antibody(GE healthcare, UK)、検出にはECLTM Prime Western blotting detection reagent(GE healthcare, UK)を用いた。コントロールとしては5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA Standard Setを使用した。画像撮影にはLight-capture(AE-6972, Atto, Tokyo, Japan)を使用し、画像解析にはCS Analyzer, version 3.0(Atto)を用いて定量化を行った。

その結果、TNFによって刺激したFLSは刺激後96時間で有意に5hmCのレベルが増加した(図9)。

(実施例5) Tet3発現抑制後のFLSにおける炎症性サイトカインの分泌レベル

Tet3 siRNAを用いてTet3発現を阻害した上で、TNFによって刺激を加え、RA由来FLSが分泌する炎症性サイトカインレベルを評価した。具体的には、配列番号:3および配列番号4の塩基配列からなるsiRNAでTet3をノックダウンしたFLSをTNF(1ng/ml)を含む培地(10%FCS含有DMEM)で96時間培養後、洗浄して、さらにTNFを含まない0.1%FCS含有DMEMで48時間の培養を行った。コントロールとしてTet1のsiRNAを使用した。予備的検討で使用したsiRNA(いずれもLife technologies社のPrimer Set Human)はそれぞれの遺伝子について2種類ずつ、すなわち、siRNA ID:HSS129586, HSS129587 for TET1, HSS123253, HSS123254 for TET2, HSS153381, HSS176459 for TET3を使用した。コントロールとしてはStealthTM RNAi Negative Control DuplexesよりLow GC Duplex(Invitrogen)を使用した。Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent(Life technologies)を用いてリポフェクション法でsiRNA遺伝子を導入した。遺伝子導入効率の予備

的検討の結果より、TET3のsiRNAとしてはHSS153381、TET1のsiRNAとしてはHSS129587を使用することとした。IL-6、IL-8、VEGF、CCL2などのタンパク分泌量についてはBDTMCytometric Bead Array (CBA, BD, Japan)で、MMP3の分泌量はSRLに測定を依頼した(検査方法はLRIA法)。またICAM-1やVCAM-1の接着分子の発現はflow-cytometry法(FACSVerseTM, BD)で測定し、FlowJo (Miltenyi Biotec)で解析した。CCL2のmRNAの発現解析にはTaqMan (R) Gene Express Assays CCL2 (Hs00234140_m1)を用いた。

その結果、RAの病態への関連が示唆されてきた多数のサイトカイン、ケモカイン、MMPsの中で、IL-6、IL-8、VEGF、CCL2、MMP3などはTNF依存性の発現誘導が認められたが、これらの中でCCL2のみはTet3ノックダウンによりTNF依存性の発現誘導が阻害された(図10)。この現象はmRNAと分泌タンパクレベルでも確認された。また、接着分子の中でICAM1も同様にTet3ノックダウンによりTNF依存性の発現誘導が阻害された。CCL2やICAM-1はFLSの骨・軟骨組織への浸潤に関わり、RAの病態形成に深く関与することが知られている。従って、Tet3ノックダウンは、DNAのメチル化レベルの維持を介して、CCL2やICAM-1の発現を抑制することによって、RAの予防および治療に有効であることが示唆された。なお、IL-1、TNF、IL-17についても検出を試みたが、値が検出感度以下であったため、検出することができなかった。

(実施例6) Tet3発現抑制後のFLSの浸潤能

Tet3 siRNAを用いてTet3発現を阻害した上で、TNFによって刺激を加え、RA由来FLSの浸潤能をScratch assayで評価した。具体的には、siRNAでTet3をノックダウンしたFLSをTNF (1ng/ml)を含む培地(10% FCS含有DMEM)で96時間培養後、洗浄して、FLSが接着したdish表面にscratchを施行し、TNFを含まない0.1% FCS含有DMEMで培養しながら、最長48時間の観察を行った。コントロールとしてTet1のsiRNAを使用した。

その結果、Tet3ノックダウンによりTNF依存性のFLS浸潤誘導が完全に阻害された(図11)。Tet3の選択的阻害が関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞において見られる最も重要な攻撃的な表現型の一つである浸潤性を阻害することで、RAの予防および治療につながることを示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0010】

本発明により、これまでの治療剤の標的とは異なる因子であるTet3を標的とした、関節炎の予防及び/又は治療剤あるいは診断キットが提供される。新たな作用機序を有する治療薬が提供されることにより、既存の治療法では病状回復効果が認められない、又は病状回復効果が十分でない関節炎患者、及び既存の治療薬を継続使用することで該治療薬について耐性を獲得した関節炎患者に対してもより良い治療を提供し得る。さらに本発明は、関節炎を未然に防ぐ予防目的、及び関節炎が一時寛解した患者が病気の再発を予防する目的にも使用され得る。また、本発明によれば、Tet3の発現又は機能を阻害することで関節炎の予防及び/又は治療効果を発揮する、関節炎の新規予防・治療薬の候補物質をスクリーニングすることが可能である。

本出願は、日本で出願された特願2014-174638(出願日:平成26年8月28日)を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> University of Occupational and Environmental Health, Japan

<120> prophylactic or therapeutic agent for arthritis, diagnostic kit for arthritis, and screening method for prophylactic or therapeutic agent for arthritis

<130> 092357

<150> JP 2014-174638 10
 <151> 2014-08-28

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 5388
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220> 20
 <221> CDS
 <222> (1)..(5388)

<400> 1
 atg agc cag ttt cag gtg ccc ctg gcc gtc cag ccg gac ctg cca ggc 48
 Met Ser Gln Phe Gln Val Pro Leu Ala Val Gln Pro Asp Leu Pro Gly
 1 5 10 15

ctt tat gac ttc cct cag cgc cag gtg atg gta ggg agc ttc ccg ggg 96
 Leu Tyr Asp Phe Pro Gln Arg Gln Val Met Val Gly Ser Phe Pro Gly
 20 25 30 30

tct ggg ctc tcc atg gct ggg agt gag tcc caa ctc cga ggg ggt gga 144
 Ser Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Glu Ser Gln Leu Arg Gly Gly Gly
 35 40 45

gat ggt cga aag aaa cgg aaa cgg tgt ggt act tgt gag ccc tgc cgg 192
 Asp Gly Arg Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Thr Cys Glu Pro Cys Arg
 50 55 60

cgg ctg gaa aac tgt ggc gct tgc act agc tgt acc aac cgc cgc acg 240
 Arg Leu Glu Asn Cys Gly Ala Cys Thr Ser Cys Thr Asn Arg Arg Thr
 65 70 75 80 40

cac cag atc tgc aaa ctg cga aaa tgt gag gtg ctg aag aaa aaa gta 288
 His Gln Ile Cys Lys Leu Arg Lys Cys Glu Val Leu Lys Lys Lys Val
 85 90 95

ggg ctt ctc aag gag gtg gaa ata aag gct ggt gaa gga gcc ggg ccg 336
 Gly Leu Leu Lys Glu Val Glu Ile Lys Ala Gly Glu Gly Ala Gly Pro
 100 105 110

tgg gga caa gga gcg gct gtc aag aca ggc tca gag ctc agc cca gtt 384

Trp Gly Gln Gly Ala Ala Val Lys Thr Gly Ser Glu Leu Ser Pro Val		
115	120	125
gat gga cct gtt cca ggt cag atg gac tca ggg cca gtg tac cat ggg	432	
Asp Gly Pro Val Pro Gly Gln Met Asp Ser Gly Pro Val Tyr His Gly		
130	135	140
gac tca cgg cag cta agc gcc tca ggg gtg ccg gtc aat ggt gct aga	480	
Asp Ser Arg Gln Leu Ser Ala Ser Gly Val Pro Val Asn Gly Ala Arg		
145	150	155
		160
gag ccc gct gga ccc agt ctg ctg ggg act ggg ggt cct tgg cgg gta	528	
Glu Pro Ala Gly Pro Ser Leu Leu Gly Thr Gly Gly Pro Trp Arg Val		
165	170	175
gac caa aag ccc gac tgg gag gct gcc cca ggc cca gct cat act gct	576	
Asp Gln Lys Pro Asp Trp Glu Ala Ala Pro Gly Pro Ala His Thr Ala		
180	185	190
cgc ctg gaa gat gcc cac gat ctg gtg gcc ttt tcg gct gtg gcc gaa	624	
Arg Leu Glu Asp Ala His Asp Leu Val Ala Phe Ser Ala Val Ala Glu		
195	200	205
gct gtg tcc tct tat ggg gcc ctt agc acc cgg ctc tat gaa acc ttc	672	
Ala Val Ser Ser Tyr Gly Ala Leu Ser Thr Arg Leu Tyr Glu Thr Phe		
210	215	220
aac cgt gag atg agt cgt gag gct ggg aac aac agc agg gga ccc cgg	720	
Asn Arg Glu Met Ser Arg Glu Ala Gly Asn Asn Ser Arg Gly Pro Arg		
225	230	235
		240
cca ggg cct gag ggc tgc tct gct ggc agc gaa gac ctt gac aca ctg	768	
Pro Gly Pro Glu Gly Cys Ser Ala Gly Ser Glu Asp Leu Asp Thr Leu		
245	250	255
cag acg gcc ctg gcc ctc gcg cgg cat ggt atg aaa cca ccc aac tgc	816	
Gln Thr Ala Leu Ala Leu Ala Arg His Gly Met Lys Pro Pro Asn Cys		
260	265	270
aac tgc gat ggc cca gaa tgc cct gac tac ctc gag tgg ctg gag ggg	864	
Asn Cys Asp Gly Pro Glu Cys Pro Asp Tyr Leu Glu Trp Leu Glu Gly		
275	280	285
aag atc aag tct gtg gtc atg gaa gga ggg gag gag cgg ccc agg ctc	912	
Lys Ile Lys Ser Val Val Met Glu Gly Gly Glu Glu Arg Pro Arg Leu		
290	295	300
cca ggg cct ctg cct cct ggt gag gcc ggc ctc cca gca cca agc acc	960	
Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Glu Ala Gly Leu Pro Ala Pro Ser Thr		
305	310	315
		320
agg cca ctc ctc agc tca gag gtg ccc cag atc tct ccc caa gag ggc	1008	
Arg Pro Leu Leu Ser Ser Glu Val Pro Gln Ile Ser Pro Gln Glu Gly		
325	330	335
ctg ccc ctg tcc cag agt gcc ctg agc att gcc aag gaa aaa aac atc	1056	
Leu Pro Leu Ser Gln Ser Ala Leu Ser Ile Ala Lys Glu Lys Asn Ile		

340	345	350		
agc ttg cag acc gcc att gcc att gag gcc ctc aca cag ctc tcc tct	1104			
Ser Leu Gln Thr Ala Ile Ala Ile Glu Ala Leu Thr Gln Leu Ser Ser				
355	360	365		
gcc ctc ccg cag cct tct cat tcc acc ccc cag gct tct tgc ccc ctt	1152			
Ala Leu Pro Gln Pro Ser His Ser Thr Pro Gln Ala Ser Cys Pro Leu				
370	375	380		
cct gag gcc ttg tca cct cct gcc cct ttc aga tct ccc cag tct tac	1200		10	
Pro Glu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Pro Phe Arg Ser Pro Gln Ser Tyr				
385	390	395	400	
ctc cgg gct ccc tca tgg cct gtg gtt cct cct gaa gag cac tca tct	1248			
Leu Arg Ala Pro Ser Trp Pro Val Val Pro Pro Glu Glu His Ser Ser				
405	410	415		
ttt gct cct gat agc tct gcc ttc cct cca gca act cct aga act gag	1296			
Phe Ala Pro Asp Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Thr Pro Arg Thr Glu				
420	425	430		
ttc cct gaa gcc tgg ggc act gac acc cct cca gca acg ccc cgg agc	1344		20	
Phe Pro Glu Ala Trp Gly Thr Asp Thr Pro Pro Ala Thr Pro Arg Ser				
435	440	445		
tcc tgg ccc atg cct cgc cca agc ccc gat ccc atg gct gaa ctg gag	1392			
Ser Trp Pro Met Pro Arg Pro Ser Pro Asp Pro Met Ala Glu Leu Glu				
450	455	460		
cag ttg ttg ggc agc gcc agt gat tac atc cag tca gta ttc aag cgg	1440			
Gln Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp Tyr Ile Gln Ser Val Phe Lys Arg				
465	470	475	480	
cct gag gcc ctg cct acc aag ccc aag gtc aag gtg gag gca ccc tct	1488		30	
Pro Glu Ala Leu Pro Thr Lys Pro Lys Val Lys Val Glu Ala Pro Ser				
485	490	495		
tcc tcc ccg gcc ccg gcc cca tcc cct gta ctt cag agg gag gct ccc	1536			
Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Val Leu Gln Arg Glu Ala Pro				
500	505	510		
acg cca tcc tog gag ccc gac acc cac cag aag gcc cag acc gcc ctg	1584			
Thr Pro Ser Ser Glu Pro Asp Thr His Gln Lys Ala Gln Thr Ala Leu				
515	520	525		
cag cag cac ctc cac cac aag cgc agc ctc ttc cta gaa cag gtg cac	1632		40	
Gln Gln His Leu His His Lys Arg Ser Leu Phe Leu Glu Gln Val His				
530	535	540		
gac acc tcc ttc cct gct cct tca gag cct tct gct cct ggc tgg tgg	1680			
Asp Thr Ser Phe Pro Ala Pro Ser Glu Pro Ser Ala Pro Gly Trp Trp				
545	550	555	560	
ccc cca cca agt tca cct gtc cca cgg ctt cca gac aga cca ccc aag	1728			
Pro Pro Pro Ser Ser Pro Val Pro Arg Leu Pro Asp Arg Pro Pro Lys				
565	570	575		

gag aag aag aag aag ctc cca aca cca gct gga ggt ccc gtg gga acg Glu Lys Lys Lys Lys Leu Pro Thr Pro Ala Gly Gly Pro Val Gly Thr 580 585 590	1776	
gag aaa gct gcc cct ggg atc aag ccc agt gtc cga aag ccc att cag Glu Lys Ala Ala Pro Gly Ile Lys Pro Ser Val Arg Lys Pro Ile Gln 595 600 605	1824	
atc aag aag tcc agg ccc cgg gaa gca cag ccc ctc ttc cca cct gtc Ile Lys Lys Ser Arg Pro Arg Glu Ala Gln Pro Leu Phe Pro Pro Val 610 615 620	1872	10
cga cag att gtc ctg gaa ggg ctt agg tcc cca gcc tcc cag gaa gtg Arg Gln Ile Val Leu Glu Gly Leu Arg Ser Pro Ala Ser Gln Glu Val 625 630 635 640	1920	
cag gct cat cca ccg gcc cct ctg cct gcc tca cag ggc tct gct gtg Gln Ala His Pro Pro Ala Pro Leu Pro Ala Ser Gln Gly Ser Ala Val 645 650 655	1968	
ccc ctg ccc cca gaa cct tct ctt gcg cta ttt gca cct agt ccc tcc Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ser Leu Ala Leu Phe Ala Pro Ser Pro Ser 660 665 670	2016	20
agg gac agc ctg ctg ccc cct act cag gaa atg agg tcc ccc agc ccc Arg Asp Ser Leu Leu Pro Pro Thr Gln Glu Met Arg Ser Pro Ser Pro 675 680 685	2064	
atg aca gcc ttg cag cca ggc tcc act ggc cct ctt ccc cct gcc gat Met Thr Ala Leu Gln Pro Gly Ser Thr Gly Pro Leu Pro Pro Ala Asp 690 695 700	2112	
gac aag ctg gaa gag ctc atc cgg cag ttt gag gct gaa ttt gga gat Asp Lys Leu Glu Glu Leu Ile Arg Gln Phe Glu Ala Glu Phe Gly Asp 705 710 715 720	2160	30
agc ttt ggg ctt ccc ggc ccc cct tct gtg ccc att cag gac ccc gag Ser Phe Gly Leu Pro Gly Pro Pro Ser Val Pro Ile Gln Asp Pro Glu 725 730 735	2208	
aac cag caa aca tgt ctc cca gcc cct gag agc ccc ttt gct acc cgt Asn Gln Gln Thr Cys Leu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Phe Ala Thr Arg 740 745 750	2256	
tcc ccc aag caa atc aag att gag tct tog ggg gct gtg act gtg ctc Ser Pro Lys Gln Ile Lys Ile Glu Ser Ser Gly Ala Val Thr Val Leu 755 760 765	2304	40
tca acc acc tgc ttc cat tca gag gag gga gga cag gag gcc aca ccc Ser Thr Thr Cys Phe His Ser Glu Glu Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro 770 775 780	2352	
acc aag gct gag aac cca ctc aca ccc acc ctc agt ggc ttc ttg gag Thr Lys Ala Glu Asn Pro Leu Thr Pro Thr Leu Ser Gly Phe Leu Glu 785 790 795 800	2400	

tca cct ctt aag tac ctg gac aca ccc acc aag agt ctg ctg gac aca	2448	
Ser Pro Leu Lys Tyr Leu Asp Thr Pro Thr Lys Ser Leu Leu Asp Thr		
805 810 815		
cct gcc aag aga gcc cag gcc gag ttc ccc acc tgc gat tgc gtc gaa	2496	
Pro Ala Lys Arg Ala Gln Ala Glu Phe Pro Thr Cys Asp Cys Val Glu		
820 825 830		
caa ata gtg gag aaa gat gaa ggt cca tat tat act cac ttg gga tct	2544	
Gln Ile Val Glu Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Tyr Thr His Leu Gly Ser		10
835 840 845		
ggc ccc acg gtc gcc tct atc cgg gaa ctc atg gag gag cgg tat gga	2592	
Gly Pro Thr Val Ala Ser Ile Arg Glu Leu Met Glu Glu Arg Tyr Gly		
850 855 860		
gag aag ggg aaa gcc atc cgg atc gag aag gtc atc tac acg ggg aag	2640	
Glu Lys Gly Lys Ala Ile Arg Ile Glu Lys Val Ile Tyr Thr Gly Lys		
865 870 875 880		
gag gga aag agc tcc cgc ggt tgc ccc att gca aag tgg gtg atc cgc	2688	
Glu Gly Lys Ser Ser Arg Gly Cys Pro Ile Ala Lys Trp Val Ile Arg		20
885 890 895		
agg cac acg ctg gag gag aag cta ctc tgc ctg gtg cgg cac cgg gca	2736	
Arg His Thr Leu Glu Glu Lys Leu Leu Cys Leu Val Arg His Arg Ala		
900 905 910		
ggc cac cac tgc cag aac gct gtg atc gtc atc ctc atc ctg gcc tgg	2784	
Gly His His Cys Gln Asn Ala Val Ile Val Ile Leu Ile Leu Ala Trp		
915 920 925		
gag ggc att ccc cgt agc ctc gga gac acc ctc tac cag gag ctc acc	2832	
Glu Gly Ile Pro Arg Ser Leu Gly Asp Thr Leu Tyr Gln Glu Leu Thr		30
930 935 940		
gac acc ctc cgg aag tat ggg aac ccc acc agc cgg aga tgc gcc ctc	2880	
Asp Thr Leu Arg Lys Tyr Gly Asn Pro Thr Ser Arg Arg Cys Gly Leu		
945 950 955 960		
aac gat gac cgg acc tgc gct tgc caa ggc aaa gac ccc aac acc tgt	2928	
Asn Asp Asp Arg Thr Cys Ala Cys Gln Gly Lys Asp Pro Asn Thr Cys		
965 970 975		
ggt gcc tcc ttc tcc ttt ggt tgt tcc tgg agc atg tac ttc aac ggc	2976	
Gly Ala Ser Phe Ser Phe Gly Cys Ser Trp Ser Met Tyr Phe Asn Gly		40
980 985 990		
tgc aag tat gct cgg agc aag aca cct cgc aag ttc cgc ctc gca ggg	3024	
Cys Lys Tyr Ala Arg Ser Lys Thr Pro Arg Lys Phe Arg Leu Ala Gly		
995 1000 1005		
gac aat ccc aaa gag gaa gaa gtg ctc cgg aag agt ttc cag gac	3069	
Asp Asn Pro Lys Glu Glu Glu Val Leu Arg Lys Ser Phe Gln Asp		
1010 1015 1020		
ctg gcc acc gaa gtc gct ccc ctg tac aag cga ctg gcc cct cag	3114	

Leu Ala Thr Glu Val Ala Pro Leu Tyr Lys Arg Leu Ala Pro Gln 1025 1030 1035	
gcc tat cag aac cag gtg acc aac gag gaa ata gcg att gac tgc Ala Tyr Gln Asn Gln Val Thr Asn Glu Glu Ile Ala Ile Asp Cys 1040 1045 1050	3159
cgt ctg ggg ctg aag gaa gga cgg ccc ttc gcg ggg gtc acg gcc Arg Leu Gly Leu Lys Glu Gly Arg Pro Phe Ala Gly Val Thr Ala 1055 1060 1065	3204
tgc atg gac ttc tgt gcc cac gcc cac aag gac cag cat aac ctc Cys Met Asp Phe Cys Ala His Ala His Lys Asp Gln His Asn Leu 1070 1075 1080	3249
tac aat ggg tgc acc gtg gtc tgc acc ctg acc aag gaa gac aat Tyr Asn Gly Cys Thr Val Val Cys Thr Leu Thr Lys Glu Asp Asn 1085 1090 1095	3294
cgc tgc gtg ggc aag att ccc gag gat gag cag ctg cat gtt ctc Arg Cys Val Gly Lys Ile Pro Glu Asp Glu Gln Leu His Val Leu 1100 1105 1110	3339
ccc ctg tac aag atg gcc aac acg gat gag ttt ggt agc gag gag Pro Leu Tyr Lys Met Ala Asn Thr Asp Glu Phe Gly Ser Glu Glu 1115 1120 1125	3384
aac cag aat gca aag gtg ggc agc gga gcc atc cag gtg ctc acc Asn Gln Asn Ala Lys Val Gly Ser Gly Ala Ile Gln Val Leu Thr 1130 1135 1140	3429
gcc ttc ccc cgc gag gtc cga cgc ctg ccc gag cct gcc aag tcc Ala Phe Pro Arg Glu Val Arg Arg Leu Pro Glu Pro Ala Lys Ser 1145 1150 1155	3474
tgc cgc cag cgg cag ctg gaa gcc aga aag gca gca gcc gag aag Cys Arg Gln Arg Gln Leu Glu Ala Arg Lys Ala Ala Ala Glu Lys 1160 1165 1170	3519
aag aag att cag aag gag aag ctg agc act ccg gag aag atc aag Lys Lys Ile Gln Lys Glu Lys Leu Ser Thr Pro Glu Lys Ile Lys 1175 1180 1185	3564
cag gag gcc ctg gag ctg gcg ggc att acg tcg gac cca ggc ctg Gln Glu Ala Leu Glu Leu Ala Gly Ile Thr Ser Asp Pro Gly Leu 1190 1195 1200	3609
tct ctg aag ggt gga ttg tcc cag caa ggc ctg aag ccc tcc ctc Ser Leu Lys Gly Gly Leu Ser Gln Gln Gly Leu Lys Pro Ser Leu 1205 1210 1215	3654
aag gtg gag ccg cag aac cac ttc agc tcc ttc aag tac agc ggc Lys Val Glu Pro Gln Asn His Phe Ser Ser Phe Lys Tyr Ser Gly 1220 1225 1230	3699
aac gcg gtg gtg gag agc tac tcg gtg ctg ggc aac tgc cgg ccc Asn Ala Val Val Glu Ser Tyr Ser Val Leu Gly Asn Cys Arg Pro 1235 1240 1245	3744

1235	1240	1245		
tcc gac	cct tac agc atg aac	agc gtg tac tcc tac	cac tcc tac	3789
Ser Asp	Pro Tyr Ser Met Asn	Ser Val Tyr Ser Tyr	His Ser Tyr	
1250	1255	1260		
tat gca	cag ccc agc ctg acc	tcc gtc aat ggc ttc	cac tcc aag	3834
Tyr Ala	Gln Pro Ser Leu Thr	Ser Val Asn Gly Phe	His Ser Lys	
1265	1270	1275		
tac gct	ctc ccg tct ttt agc	tac tat ggc ttt cca	tcc agc aac	3879
Tyr Ala	Leu Pro Ser Phe Ser	Tyr Tyr Gly Phe Pro	Ser Ser Asn	10
1280	1285	1290		
ccc gtc	ttc ccc tct cag ttc	ctg ggt cct ggt gcc	tgg ggg cac	3924
Pro Val	Phe Pro Ser Gln Phe	Leu Gly Pro Gly Ala	Trp Gly His	
1295	1300	1305		
agt ggc	agc agt ggc agt ttt	gag aag aag cca gac	ctc cac gct	3969
Ser Gly	Ser Ser Gly Ser Phe	Glu Lys Lys Pro Asp	Leu His Ala	
1310	1315	1320		
ctg cac	aac agc ctg agc ccg	gcc tac ggt ggt gct	gag ttt gcc	4014
Leu His	Asn Ser Leu Ser Pro	Ala Tyr Gly Gly Ala	Glu Phe Ala	20
1325	1330	1335		
gag ctg	ccc agc cag gct gtt	ccc aca gac gcc cac	cac ccc act	4059
Glu Leu	Pro Ser Gln Ala Val	Pro Thr Asp Ala His	His Pro Thr	
1340	1345	1350		
cct cac	cac cag cag cct gcg	tac cca ggc ccc aag	gag tat ctg	4104
Pro His	His Gln Gln Pro Ala	Tyr Pro Gly Pro Lys	Glu Tyr Leu	
1355	1360	1365		
ctt ccc	aag gcc ccc cta ctc	cac tca gtg tcc agg	gac ccc tcc	4149
Leu Pro	Lys Ala Pro Leu Leu	His Ser Val Ser Arg	Asp Pro Ser	30
1370	1375	1380		
ccc ttt	gcc cag agc tcc aac	tgc tac aac aga tcc	atc aag caa	4194
Pro Phe	Ala Gln Ser Ser Asn	Cys Tyr Asn Arg Ser	Ile Lys Gln	
1385	1390	1395		
gag cca	gta gac ccg ctg acc	cag gct gag cct gtg	ccc aga gac	4239
Glu Pro	Val Asp Pro Leu Thr	Gln Ala Glu Pro Val	Pro Arg Asp	
1400	1405	1410		
gct ggc	aag atg ggc aag aca	cct ctg tcc gag gtg	tct cag aat	4284
Ala Gly	Lys Met Gly Lys Thr	Pro Leu Ser Glu Val	Ser Gln Asn	40
1415	1420	1425		
gga gga	ccc agt cac ctt tgg	gga cag tac tca gga	ggc cca agc	4329
Gly Gly	Pro Ser His Leu Trp	Gly Gln Tyr Ser Gly	Gly Pro Ser	
1430	1435	1440		
atg tcc	ccc aag agg act aac	ggt gtg ggt ggc agc	tgg ggt gtg	4374
Met Ser	Pro Lys Arg Thr Asn	Gly Val Gly Gly Ser	Trp Gly Val	
1445	1450	1455		

ttc tcg tct ggg gag agt cct gcc atc gtc cct gac aag ctc agt	4419	
Phe Ser Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ile Val Pro Asp Lys Leu Ser		
1460 1465 1470		
tcc ttt ggg gcc agc tgc ctg gcc cct tcc cac ttc aca gat ggc	4464	
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Leu Ala Pro Ser His Phe Thr Asp Gly		
1475 1480 1485		
cag tgg ggg ctg ttc ccc ggt gag ggg cag cag gca gct tcc cac	4509	
Gln Trp Gly Leu Phe Pro Gly Glu Gly Gln Gln Ala Ala Ser His		10
1490 1495 1500		
tct gga gga cgg ctg cga ggc aaa cgg tgg agc ccc tgc aag ttt	4554	
Ser Gly Gly Arg Leu Arg Gly Lys Pro Trp Ser Pro Cys Lys Phe		
1505 1510 1515		
ggg aac agc acc tgc gcc ttg gct ggg ccc agc ctg act gag aag	4599	
Gly Asn Ser Thr Ser Ala Leu Ala Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys		
1520 1525 1530		
cgg tgg gcg ctg ggg gca ggg gat ttc aac tgc gcc ctg aaa ggt	4644	
Pro Trp Ala Leu Gly Ala Gly Asp Phe Asn Ser Ala Leu Lys Gly		20
1535 1540 1545		
agt cct ggg ttc caa gac aag ctg tgg aac ccc atg aaa gga gag	4689	
Ser Pro Gly Phe Gln Asp Lys Leu Trp Asn Pro Met Lys Gly Glu		
1550 1555 1560		
gag ggc agg att cca gcc gca ggg gcc agc cag ctg gac agg gcc	4734	
Glu Gly Arg Ile Pro Ala Ala Gly Ala Ser Gln Leu Asp Arg Ala		
1565 1570 1575		
tgg cag tcc ttt ggt ctg ccc ctg gga tcc agc gag aag ctg ttt	4779	
Trp Gln Ser Phe Gly Leu Pro Leu Gly Ser Ser Glu Lys Leu Phe		30
1580 1585 1590		
ggg gct ctg aag tca gag gag aag ctg tgg gac ccc ttc agc ctg	4824	
Gly Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Leu Trp Asp Pro Phe Ser Leu		
1595 1600 1605		
gag gag ggg ccg gct gag gag ccc ccc agc aag gga gcg gtg aag	4869	
Glu Glu Gly Pro Ala Glu Glu Pro Pro Ser Lys Gly Ala Val Lys		
1610 1615 1620		
gag gag aag ggc ggt ggt ggt gcg gag gag gaa gag gag gag ctg	4914	
Glu Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Leu		40
1625 1630 1635		
tgg tgc gac agt gaa cac aac ttc ctg gac gag aac atc ggc ggc	4959	
Trp Ser Asp Ser Glu His Asn Phe Leu Asp Glu Asn Ile Gly Gly		
1640 1645 1650		
gtg gcc gtg gcc cca gcc cac ggc tcc atc ctc atc gag tgt gcc	5004	
Val Ala Val Ala Pro Ala His Gly Ser Ile Leu Ile Glu Cys Ala		
1655 1660 1665		

cgg cgg gag ctg cac gcc acc acg ccg ctt aag aag ccc aac cgc 5049
 Arg Arg Glu Leu His Ala Thr Thr Pro Leu Lys Lys Pro Asn Arg
 1670 1675 1680

tgc cac ccc acc cgc atc tcg ctg gtc ttc tac cag cac aag aac 5094
 Cys His Pro Thr Arg Ile Ser Leu Val Phe Tyr Gln His Lys Asn
 1685 1690 1695

ctc aac cag ccc aac cac ggg ctg gcc ctc tgg gaa gcc aag atg 5139
 Leu Asn Gln Pro Asn His Gly Leu Ala Leu Trp Glu Ala Lys Met
 1700 1705 1710

10

aag cag ctg gcg gag agg gca cgg gca cgg cag gag gag gct gcc 5184
 Lys Gln Leu Ala Glu Arg Ala Arg Ala Arg Gln Glu Glu Ala Ala
 1715 1720 1725

cgg ctg ggc ctg ggc cag cag gag gcc aag ctc tac ggg aag aag 5229
 Arg Leu Gly Leu Gly Gln Gln Glu Ala Lys Leu Tyr Gly Lys Lys
 1730 1735 1740

cgc aag tgg ggg ggc act gtg gtt gct gag ccc cag cag aaa gag 5274
 Arg Lys Trp Gly Gly Thr Val Val Ala Glu Pro Gln Gln Lys Glu
 1745 1750 1755

20

aag aag ggg gtc gtc ccc acc cgg cag gca ctg gct gtg ccc aca 5319
 Lys Lys Gly Val Val Pro Thr Arg Gln Ala Leu Ala Val Pro Thr
 1760 1765 1770

gac tcg gcg gtc acc gtg tcc tcc tat gcc tac acg aag gtc act 5364
 Asp Ser Ala Val Thr Val Ser Ser Tyr Ala Tyr Thr Lys Val Thr
 1775 1780 1785

ggc ccc tac agc cgc tgg atc tag 5388
 Gly Pro Tyr Ser Arg Trp Ile
 1790 1795

30

<210> 2
 <211> 1795
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gln Phe Gln Val Pro Leu Ala Val Gln Pro Asp Leu Pro Gly
 1 5 10 15

40

Leu Tyr Asp Phe Pro Gln Arg Gln Val Met Val Gly Ser Phe Pro Gly
 20 25 30

Ser Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Glu Ser Gln Leu Arg Gly Gly Gly
 35 40 45

Asp Gly Arg Lys Lys Arg Lys Arg Cys Gly Thr Cys Glu Pro Cys Arg

50 55 60

Arg Leu Glu Asn Cys Gly Ala Cys Thr Ser Cys Thr Asn Arg Arg Thr
65 70 75 80

His Gln Ile Cys Lys Leu Arg Lys Cys Glu Val Leu Lys Lys Lys Val
85 90 95

Gly Leu Leu Lys Glu Val Glu Ile Lys Ala Gly Glu Gly Ala Gly Pro
100 105 110

10

Trp Gly Gln Gly Ala Ala Val Lys Thr Gly Ser Glu Leu Ser Pro Val
115 120 125

Asp Gly Pro Val Pro Gly Gln Met Asp Ser Gly Pro Val Tyr His Gly
130 135 140

20

Asp Ser Arg Gln Leu Ser Ala Ser Gly Val Pro Val Asn Gly Ala Arg
145 150 155 160

Glu Pro Ala Gly Pro Ser Leu Leu Gly Thr Gly Gly Pro Trp Arg Val
165 170 175

Asp Gln Lys Pro Asp Trp Glu Ala Ala Pro Gly Pro Ala His Thr Ala
180 185 190

30

Arg Leu Glu Asp Ala His Asp Leu Val Ala Phe Ser Ala Val Ala Glu
195 200 205

Ala Val Ser Ser Tyr Gly Ala Leu Ser Thr Arg Leu Tyr Glu Thr Phe
210 215 220

Asn Arg Glu Met Ser Arg Glu Ala Gly Asn Asn Ser Arg Gly Pro Arg
225 230 235 240

40

Pro Gly Pro Glu Gly Cys Ser Ala Gly Ser Glu Asp Leu Asp Thr Leu
245 250 255

Gln Thr Ala Leu Ala Leu Ala Arg His Gly Met Lys Pro Pro Asn Cys
260 265 270

Asn Cys Asp Gly Pro Glu Cys Pro Asp Tyr Leu Glu Trp Leu Glu Gly
275 280 285

Lys Ile Lys Ser Val Val Met Glu Gly Gly Glu Glu Arg Pro Arg Leu
 290 295 300

Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Glu Ala Gly Leu Pro Ala Pro Ser Thr
 305 310 315 320

Arg Pro Leu Leu Ser Ser Glu Val Pro Gln Ile Ser Pro Gln Glu Gly
 325 330 335

10

Leu Pro Leu Ser Gln Ser Ala Leu Ser Ile Ala Lys Glu Lys Asn Ile
 340 345 350

Ser Leu Gln Thr Ala Ile Ala Ile Glu Ala Leu Thr Gln Leu Ser Ser
 355 360 365

Ala Leu Pro Gln Pro Ser His Ser Thr Pro Gln Ala Ser Cys Pro Leu
 370 375 380

20

Pro Glu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Pro Phe Arg Ser Pro Gln Ser Tyr
 385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Ser Trp Pro Val Val Pro Pro Glu Glu His Ser Ser
 405 410 415

Phe Ala Pro Asp Ser Ser Ala Phe Pro Pro Ala Thr Pro Arg Thr Glu
 420 425 430

30

Phe Pro Glu Ala Trp Gly Thr Asp Thr Pro Pro Ala Thr Pro Arg Ser
 435 440 445

Ser Trp Pro Met Pro Arg Pro Ser Pro Asp Pro Met Ala Glu Leu Glu
 450 455 460

Gln Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp Tyr Ile Gln Ser Val Phe Lys Arg
 465 470 475 480

40

Pro Glu Ala Leu Pro Thr Lys Pro Lys Val Lys Val Glu Ala Pro Ser
 485 490 495

Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Val Leu Gln Arg Glu Ala Pro
 500 505 510

Thr Pro Ser Ser Glu Pro Asp Thr His Gln Lys Ala Gln Thr Ala Leu
515 520 525

Gln Gln His Leu His His Lys Arg Ser Leu Phe Leu Glu Gln Val His
530 535 540

Asp Thr Ser Phe Pro Ala Pro Ser Glu Pro Ser Ala Pro Gly Trp Trp
545 550 555 560

10

Pro Pro Pro Ser Ser Pro Val Pro Arg Leu Pro Asp Arg Pro Pro Lys
565 570 575

Glu Lys Lys Lys Lys Leu Pro Thr Pro Ala Gly Gly Pro Val Gly Thr
580 585 590

Glu Lys Ala Ala Pro Gly Ile Lys Pro Ser Val Arg Lys Pro Ile Gln
595 600 605

20

Ile Lys Lys Ser Arg Pro Arg Glu Ala Gln Pro Leu Phe Pro Pro Val
610 615 620

Arg Gln Ile Val Leu Glu Gly Leu Arg Ser Pro Ala Ser Gln Glu Val
625 630 635 640

Gln Ala His Pro Pro Ala Pro Leu Pro Ala Ser Gln Gly Ser Ala Val
645 650 655

30

Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ser Leu Ala Leu Phe Ala Pro Ser Pro Ser
660 665 670

Arg Asp Ser Leu Leu Pro Pro Thr Gln Glu Met Arg Ser Pro Ser Pro
675 680 685

Met Thr Ala Leu Gln Pro Gly Ser Thr Gly Pro Leu Pro Pro Ala Asp
690 695 700

40

Asp Lys Leu Glu Glu Leu Ile Arg Gln Phe Glu Ala Glu Phe Gly Asp
705 710 715 720

Ser Phe Gly Leu Pro Gly Pro Pro Ser Val Pro Ile Gln Asp Pro Glu
725 730 735

Asn Gln Gln Thr Cys Leu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Phe Ala Thr Arg
740 745 750

Ser Pro Lys Gln Ile Lys Ile Glu Ser Ser Gly Ala Val Thr Val Leu
755 760 765

Ser Thr Thr Cys Phe His Ser Glu Glu Gly Gly Gln Glu Ala Thr Pro
770 775 780

10

Thr Lys Ala Glu Asn Pro Leu Thr Pro Thr Leu Ser Gly Phe Leu Glu
785 790 795 800

Ser Pro Leu Lys Tyr Leu Asp Thr Pro Thr Lys Ser Leu Leu Asp Thr
805 810 815

Pro Ala Lys Arg Ala Gln Ala Glu Phe Pro Thr Cys Asp Cys Val Glu
820 825 830

20

Gln Ile Val Glu Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Tyr Thr His Leu Gly Ser
835 840 845

Gly Pro Thr Val Ala Ser Ile Arg Glu Leu Met Glu Glu Arg Tyr Gly
850 855 860

Glu Lys Gly Lys Ala Ile Arg Ile Glu Lys Val Ile Tyr Thr Gly Lys
865 870 875 880

30

Glu Gly Lys Ser Ser Arg Gly Cys Pro Ile Ala Lys Trp Val Ile Arg
885 890 895

Arg His Thr Leu Glu Glu Lys Leu Leu Cys Leu Val Arg His Arg Ala
900 905 910

Gly His His Cys Gln Asn Ala Val Ile Val Ile Leu Ile Leu Ala Trp
915 920 925

40

Glu Gly Ile Pro Arg Ser Leu Gly Asp Thr Leu Tyr Gln Glu Leu Thr
930 935 940

Asp Thr Leu Arg Lys Tyr Gly Asn Pro Thr Ser Arg Arg Cys Gly Leu
945 950 955 960

Asn Asp Asp Arg Thr Cys Ala Cys Gln Gly Lys Asp Pro Asn Thr Cys

965

970

975

Gly Ala Ser Phe Ser Phe Gly Cys Ser Trp Ser Met Tyr Phe Asn Gly
980 985 990

Cys Lys Tyr Ala Arg Ser Lys Thr Pro Arg Lys Phe Arg Leu Ala Gly
995 1000 1005

Asp Asn Pro Lys Glu Glu Glu Val Leu Arg Lys Ser Phe Gln Asp
1010 1015 1020

Leu Ala Thr Glu Val Ala Pro Leu Tyr Lys Arg Leu Ala Pro Gln
1025 1030 1035

Ala Tyr Gln Asn Gln Val Thr Asn Glu Glu Ile Ala Ile Asp Cys
1040 1045 1050

Arg Leu Gly Leu Lys Glu Gly Arg Pro Phe Ala Gly Val Thr Ala
1055 1060 1065

Cys Met Asp Phe Cys Ala His Ala His Lys Asp Gln His Asn Leu
1070 1075 1080

Tyr Asn Gly Cys Thr Val Val Cys Thr Leu Thr Lys Glu Asp Asn
1085 1090 1095

Arg Cys Val Gly Lys Ile Pro Glu Asp Glu Gln Leu His Val Leu
1100 1105 1110

Pro Leu Tyr Lys Met Ala Asn Thr Asp Glu Phe Gly Ser Glu Glu
1115 1120 1125

Asn Gln Asn Ala Lys Val Gly Ser Gly Ala Ile Gln Val Leu Thr
1130 1135 1140

Ala Phe Pro Arg Glu Val Arg Arg Leu Pro Glu Pro Ala Lys Ser
1145 1150 1155

Cys Arg Gln Arg Gln Leu Glu Ala Arg Lys Ala Ala Ala Glu Lys
1160 1165 1170

Lys Lys Ile Gln Lys Glu Lys Leu Ser Thr Pro Glu Lys Ile Lys
1175 1180 1185

10

20

30

40

Gln Glu Ala Leu Glu Leu Ala Gly Ile Thr Ser Asp Pro Gly Leu
 1190 1195 1200

Ser Leu Lys Gly Gly Leu Ser Gln Gln Gly Leu Lys Pro Ser Leu
 1205 1210 1215

Lys Val Glu Pro Gln Asn His Phe Ser Ser Phe Lys Tyr Ser Gly
 1220 1225 1230

10

Asn Ala Val Val Glu Ser Tyr Ser Val Leu Gly Asn Cys Arg Pro
 1235 1240 1245

Ser Asp Pro Tyr Ser Met Asn Ser Val Tyr Ser Tyr His Ser Tyr
 1250 1255 1260

Tyr Ala Gln Pro Ser Leu Thr Ser Val Asn Gly Phe His Ser Lys
 1265 1270 1275

20

Tyr Ala Leu Pro Ser Phe Ser Tyr Tyr Gly Phe Pro Ser Ser Asn
 1280 1285 1290

Pro Val Phe Pro Ser Gln Phe Leu Gly Pro Gly Ala Trp Gly His
 1295 1300 1305

Ser Gly Ser Ser Gly Ser Phe Glu Lys Lys Pro Asp Leu His Ala
 1310 1315 1320

30

Leu His Asn Ser Leu Ser Pro Ala Tyr Gly Gly Ala Glu Phe Ala
 1325 1330 1335

Glu Leu Pro Ser Gln Ala Val Pro Thr Asp Ala His His Pro Thr
 1340 1345 1350

Pro His His Gln Gln Pro Ala Tyr Pro Gly Pro Lys Glu Tyr Leu
 1355 1360 1365

40

Leu Pro Lys Ala Pro Leu Leu His Ser Val Ser Arg Asp Pro Ser
 1370 1375 1380

Pro Phe Ala Gln Ser Ser Asn Cys Tyr Asn Arg Ser Ile Lys Gln
 1385 1390 1395

Glu Pro Val Asp Pro Leu Thr Gln Ala Glu Pro Val Pro Arg Asp
 1400 1405 1410

Ala Gly Lys Met Gly Lys Thr Pro Leu Ser Glu Val Ser Gln Asn
 1415 1420 1425

Gly Gly Pro Ser His Leu Trp Gly Gln Tyr Ser Gly Gly Pro Ser
 1430 1435 1440

10

Met Ser Pro Lys Arg Thr Asn Gly Val Gly Gly Ser Trp Gly Val
 1445 1450 1455

Phe Ser Ser Gly Glu Ser Pro Ala Ile Val Pro Asp Lys Leu Ser
 1460 1465 1470

Ser Phe Gly Ala Ser Cys Leu Ala Pro Ser His Phe Thr Asp Gly
 1475 1480 1485

20

Gln Trp Gly Leu Phe Pro Gly Glu Gly Gln Gln Ala Ala Ser His
 1490 1495 1500

Ser Gly Gly Arg Leu Arg Gly Lys Pro Trp Ser Pro Cys Lys Phe
 1505 1510 1515

Gly Asn Ser Thr Ser Ala Leu Ala Gly Pro Ser Leu Thr Glu Lys
 1520 1525 1530

30

Pro Trp Ala Leu Gly Ala Gly Asp Phe Asn Ser Ala Leu Lys Gly
 1535 1540 1545

Ser Pro Gly Phe Gln Asp Lys Leu Trp Asn Pro Met Lys Gly Glu
 1550 1555 1560

Glu Gly Arg Ile Pro Ala Ala Gly Ala Ser Gln Leu Asp Arg Ala
 1565 1570 1575

40

Trp Gln Ser Phe Gly Leu Pro Leu Gly Ser Ser Glu Lys Leu Phe
 1580 1585 1590

Gly Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Leu Trp Asp Pro Phe Ser Leu
 1595 1600 1605

Glu Glu Gly Pro Ala Glu Glu Pro Pro Ser Lys Gly Ala Val Lys
 1610 1615 1620

Glu Glu Lys Gly Gly Gly Gly Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Leu
 1625 1630 1635

Trp Ser Asp Ser Glu His Asn Phe Leu Asp Glu Asn Ile Gly Gly
 1640 1645 1650

10

Val Ala Val Ala Pro Ala His Gly Ser Ile Leu Ile Glu Cys Ala
 1655 1660 1665

Arg Arg Glu Leu His Ala Thr Thr Pro Leu Lys Lys Pro Asn Arg
 1670 1675 1680

Cys His Pro Thr Arg Ile Ser Leu Val Phe Tyr Gln His Lys Asn
 1685 1690 1695

20

Leu Asn Gln Pro Asn His Gly Leu Ala Leu Trp Glu Ala Lys Met
 1700 1705 1710

Lys Gln Leu Ala Glu Arg Ala Arg Ala Arg Gln Glu Glu Ala Ala
 1715 1720 1725

Arg Leu Gly Leu Gly Gln Gln Glu Ala Lys Leu Tyr Gly Lys Lys
 1730 1735 1740

30

Arg Lys Trp Gly Gly Thr Val Val Ala Glu Pro Gln Gln Lys Glu
 1745 1750 1755

Lys Lys Gly Val Val Pro Thr Arg Gln Ala Leu Ala Val Pro Thr
 1760 1765 1770

Asp Ser Ala Val Thr Val Ser Ser Tyr Ala Tyr Thr Lys Val Thr
 1775 1780 1785

40

Gly Pro Tyr Ser Arg Trp Ile
 1790 1795

<210> 3

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tet3 antisense

<400> 3

caauacugac uggauguaau cacugg

26

<210> 4

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> tet3 sense

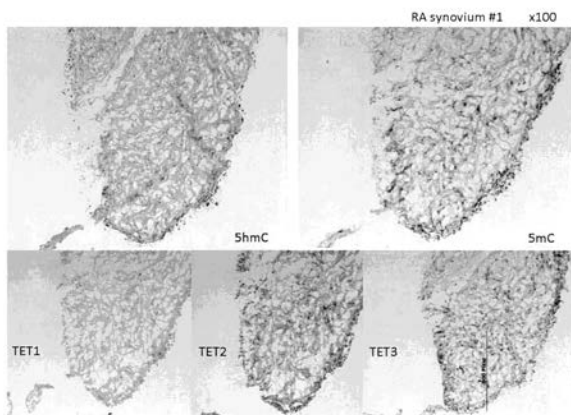
<400> 4

ccagugauua cauccaguca guauu

25

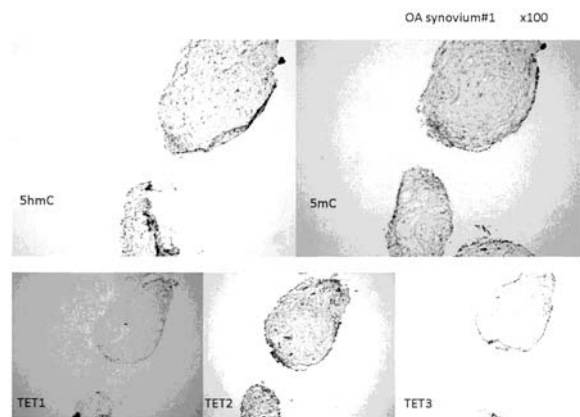
【 図 1 】

図 1



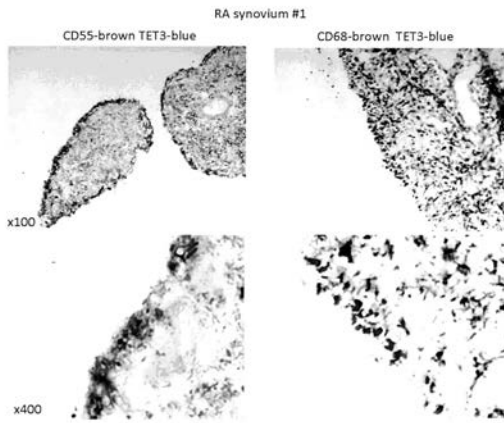
【 図 2 】

図 2



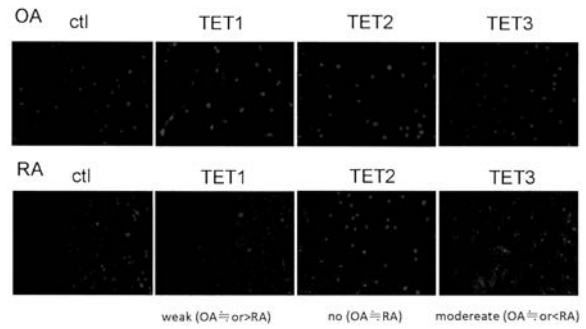
【 3 】

3



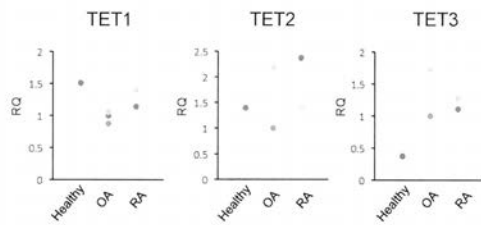
【 5 】

5



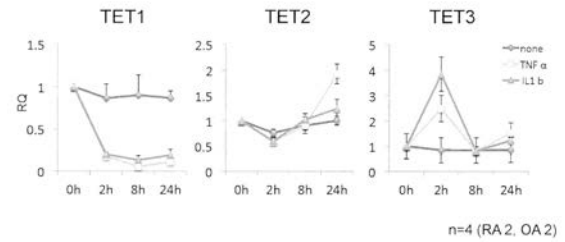
【 4 】

4



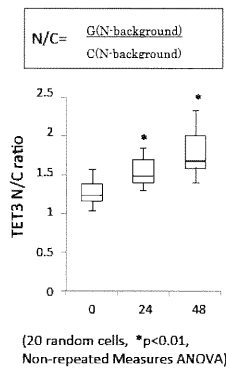
【 6 】

6



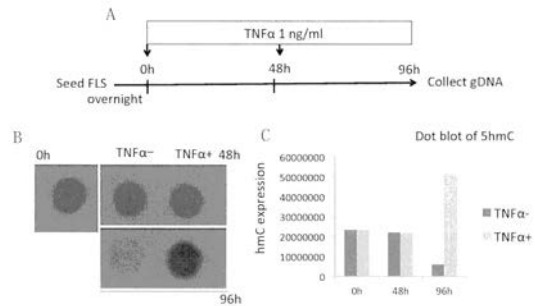
【 7 】

7



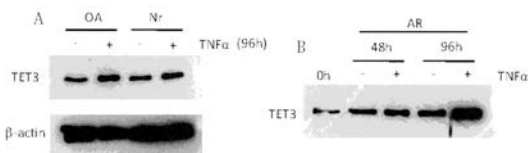
【 9 】

9



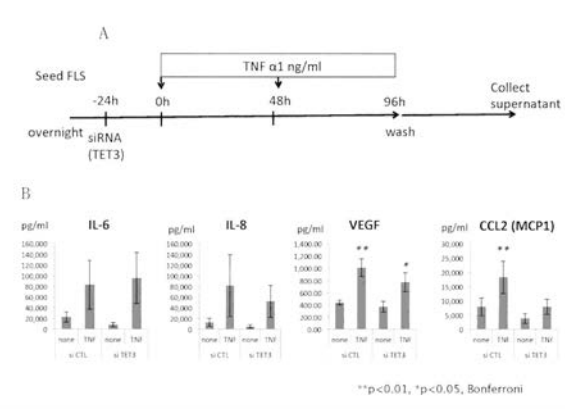
【 8 】

8



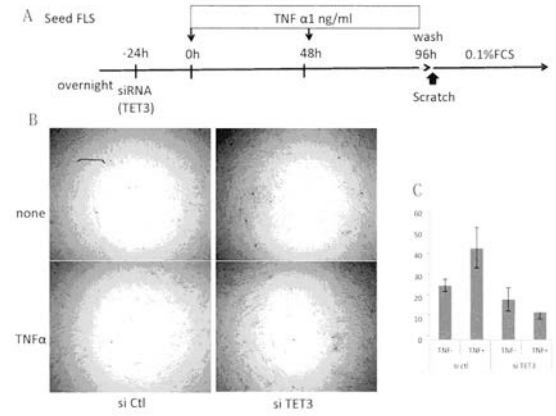
【 図 1 0 】

図 1 0



【 図 1 1 】

図 1 1



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成28年2月9日 (2016.2.9)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

(削除)

【 請求項 2 】

(削除)

【 請求項 3 】

(削除)

【 請求項 4 】

(削除)

【 請求項 5 】

(削除)

【 請求項 6 】

(削除)

【 請求項 7 】

以下の (1) ~ (3) の工程を含む、関節炎の予防及び / 又は治療薬のスクリーニング方法 :

(1) 滑膜線維芽細胞を、被検物質に接触させる工程、

(2) 前記細胞の C C L 2 遺伝子または I C A M 1 遺伝子の 5 - メチルシトシン (5 m C

)の脱メチル化または浸潤性の程度を測定する工程、

(3)被検物質の非存在下において測定した場合と比較して、前記細胞のCCCL2遺伝子またはICAM1遺伝子の5-メチルシトシン(5mC)の脱メチル化または浸潤性を抑制した被検物質を、関節炎の予防及び/又は治療薬の候補として選択する工程。

【請求項8】

関節炎が関節リウマチ、乾癬性関節炎または脊椎関節炎である、請求項7に記載の方法

。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074556

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, A61K48/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P29/00, C12N15/09, C12N15/113, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53		
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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed, CiNii, Ichushi WEB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuhisa NAKANO et al., "Sagyo Kanrensei Kinkokkakukei Shikkan ni Okeru Epigenetic Biomarker no Tansaku", Journal of UOEH, 01 March 2014 (01.03.2014), vol.36, no.1, page 77, ISSN 0387-821X	1, 3, 5, 7, 8, 13-15
Y	Hiroshi MAKINO, Ryuichi MORISHITA, "Kakusan Iyaku Application of nucleic acid medicine for arthritis", Japanese Journal of Clinical Medicine (special extra) Kansetsu Rheumatoid (2nd version), 2010, vol.68, special extra issue 5, pages 633 to 638, ISSN 0047-1852	1-3, 13-15
Y	Kazuko SHIOZAWA et al., "Idenshi Chiryo Total na Kansetsu Rheumatoid no Chiryo wa Kano ka", Pharma Medica, 1999, vol.17, no.10, pages 101 to 113, ISSN 0289-5803	1-3, 13-15
<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:	"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	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"&" document member of the same patent family	
"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		
Date of the actual completion of the international search 27 October 2015 (27.10.15)	Date of mailing of the international search report 10 November 2015 (10.11.15)	
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/JP2015/074556

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shun'ichi KUBO, Yuji ARAI, "Kansetsuen Model Rat ni Taisuru siRNA Chiryo no Koka", Inflammation & Immunology, 2010, vol.18, no.2, pages 125 to 129, ISSN 0918-8371	1-3, 6, 8, 13-15
Y	Yoshihiro KITAMURA, "Jikken Koza Reporter Assay", Surgery Frontier, 2006, vol.13, no.4, pages 426 to 430, ISSN 1340-5594	4, 8
Y	Isao MATSUMOTO, "Kansetsuen Model", The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine, 10 October 2012 (10.10.2012), vol.101, no.10, pages 2839 to 2843, ISSN 0021-5384	6, 8
X	Merck Manual 18th edition Japanese language Edition, ISBN 978-4-8222-0398-6, Nikkei Business Publications, Inc., 25 April 2007 (25.04.2007), page 299	7, 8
Y	JP 2013-21932 A (National University Corporation Chiba University), 04 February 2013 (04.02.2013), paragraphs [0042], [0043] (Family: none)	9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074556

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,
A61K48/00(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i,
A61P29/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074556

In claim 1, a prophylactic and/or therapeutic agent for arthritis, which comprises a Tet 3 (Ten-Eleven translocation 3) expression inhibitor, is described. However, only an antisense nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene, a ribozyme nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene and a nucleic acid having an RNAi activity against a transcript of Tet 3 gene are described in the description as specific examples of the Tet 3 expression inhibitor. With regards to other Tet 3 expression inhibitors, the chemical structures or production methods are not described in the description.

According to the common technical knowledge at the time of filing the present application, it is difficult to know specific examples of a compound that is specified only by a property thereof. In addition, there is not found a basis on which the contents disclosed in the description can be expanded or generalized to the scope of the invention as in claim 1 which is defined only by a Tet 3 expression-inhibiting activity.

Consequently, the invention of claim 1 exceeds the range set forth in the description, and therefore does not comply with the requirement of the support prescribed under PCT Article 6.

In addition, even though the above-mentioned statements in the description and the common technical knowledge at the time of filing the present application are taken into consideration, it is impossible to understand as to what types of substances can be mentioned as specific examples of a Tet 3 expression inhibitor other than an antisense nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene, a ribozyme nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene and a nucleic acid having an RNAi activity against a transcript of Tet 3 gene. Therefore, it is considered that, in the practice of the invention described in claim 1, it is required to carry out try-and-error procedures of producing an infinite number of compounds and then confirming the compounds by screening, which exceed the extent that a person skilled in the art can expect.

Consequently, the description is not clearly and fully set forth to such a degree that a person skilled in the art can perform the invention of claim 1, and therefore does not comply with the requirement prescribed under PCT Article 5.

Furthermore, even though the above-mentioned common technical knowledge is taken into consideration, the chemical structure and the like required for exerting a Tet 3 expression inhibition activity are not defined in any way, and it is obvious that substances defined only by the activity are not specified satisfactorily from a technical viewpoint. Therefore, even though the statements in the description and drawings are reviewed, it is impossible to understand the invention clearly from the statements in claim 1.

Therefore, claim 1 does not also comply with the requirement of clarity prescribed under PCT Article 6.

Further, also claims 3 and 13-15 do not comply with the requirements prescribed under PCT Article 5 and Article 6 for the same reason.

Such being the case, with regards to a prophylactic and/or therapeutic agent for arthritis other than that which comprises an antisense nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene, a ribozyme nucleic acid for a transcript of Tet 3 gene or a nucleic acid having an RNAi activity against a transcript of Tet 3 gene, it is impossible to carry out a meaningful search on the agent, and therefore the search was not carried out on the agent.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 7 4 5 5 6	
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, A61K48/00, A61P17/06, A61P19/02, A61P29/00, C12N15/09, C12N15/113, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, CiNii, 医中誌WEB (Ichushi WEB)			
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	中野 和久 外4名, 作業関連性筋骨格系疾患におけるエピジェネティックバイオマーカーの探索, 産業医科大学雑誌, 2014.03.01, 第36巻, 第1号, p. 77, ISSN 0387-821X	1, 3, 5, 7, 8, 13 -15	
Y		1-4, 6, 8-15	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 27.10.2015		国際調査報告の発送日 10.11.2015	
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) 春田 由香	4U 4147
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/074556
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	牧野 寛史, 森下 竜一, 核酸医薬 Application of nucleic acid medicine for arthritis, 日本臨床 (増刊) 関節リウマチ (第2版), 2010, 第68巻, 増刊号5, p. 633-638, ISSN 0047-1852	1-3, 13-15
Y	塩沢 和子 外3名, 遺伝子治療 トータルな関節リウマチの治療は可能か, Pharma Medica, 1999, 第17巻, 第10号, p. 101-113, ISSN 0289-5803	1-3, 13-15
Y	久保 俊一, 新井 祐志, 関節炎モデルラットに対する siRNA 治療の効果, 炎症と免疫, 2010, 第18巻, 第2号, p. 125-129, ISSN 0918-8371	1-3, 6, 8, 13-15
Y	北村 義浩, 実験講座 レポーターアッセイ, Surgery Frontier, 2006, 第13巻, 第4号, p. 426-430, ISSN 1340-5594	4, 8
Y	松本 功, 関節炎モデル, 日本内科学会雑誌, 2012.10.10, 第101巻, 第10号, p. 2839-2843, ISSN 0021-5384	6, 8
X	メルクマニュアル 第18版 日本語版, ISBN 978-4-8222-0398-6, 日経BP社, 2007.04.25, p. 299	7, 8
Y	JP 2013-21932 A (国立大学法人 千葉大学) 2013.02.04, 段落【0042】、【0043】 (ファミリーなし)	9-12

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/074556

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,
A61K48/00(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

請求項1には、Tet 3 (Ten-Eleven translocation 3) の発現阻害物質を含有する、関節炎の予防及び/又は治療剤が記載されているが、明細書には、Tet 3 の発現阻害物質の具体例として、Tet 3 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、リボザイム核酸、RNAi 活性を有する核酸が記載されているのみであり、それ以外の Tet 3 の発現阻害物質については、化学構造も製造方法も記載されていない。そして、作用のみで特定される化合物が具体的にどのようなものであるかを理解することは困難であるということが出願時の技術常識であり、Tet 3 発現阻害作用のみにより規定された請求項 1 に係る発明の範囲まで、明細書に開示された内容を拡張ないし一般化するための根拠も見いだせない。

したがって、請求項1に係る発明は、明細書に記載した範囲を超えるものであり、PCT 第6条に規定される裏付けに関する要件を満たしていない。

また、上記のような明細書の記載、及び、出願時の技術常識を考慮すると、Tet 3 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、リボザイム核酸、RNAi 活性を有する核酸以外の Tet 3 の発現阻害物質が具体的にどのようなものであるかを理解することができないから、請求項1に係る発明の実施に当たり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を行う必要があると認められる。

したがって、明細書は、請求項1に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されておらず、PCT 第5条に規定される要件を満たしていない。

さらに、上記の技術常識を考慮すると、Tet 3 発現阻害作用を有するために必要な化学構造等が何ら規定されず、上記作用のみで規定された物質は、技術的に十分に特定されていないことが明らかであり、明細書及び図面の記載を考慮しても、請求項1の記載から発明を明確に把握することができない。

したがって、請求項1は、PCT 第6条に規定される明確性に関する要件も満たしていない。また、請求項3、13-15についても、同様の理由により、PCT 第5条及び第6条に規定される要件を満たしていない。

よって、Tet 3 遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、リボザイム核酸、RNAi 活性を有する核酸を含有する、関節炎の予防及び/又は治療剤以外については、有意義な調査を行うことができないため、調査を行わなかった。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(74) 代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74) 代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72) 発明者 中野 和久
福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 学校法人産業医科大学内

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA24 AA25 AA29 AA40 CA14 CA20 CA25 CB01 CB17
CB26 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03 FB08 FB12 FB14 GC15
4B063 QA07 QA19 QQ42 QQ52 QR56 QR62 QS34 QX02
4C084 AA13 AA17 NA14 ZA892 ZA962 ZB152
4C086 AA01 AA10 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA89 ZA96 ZB15
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。