



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109477146 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780042802.0

(22)申请日 2017.05.10

(30)优先权数据

2016-094931 2016.05.10 JP

2016-162120 2016.08.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/017640 2017.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/195809 JA 2017.11.16

(71)申请人 国立大学法人东京医科齿科大学

地址 日本东京都

申请人 日本脏器制药株式会社

(72)发明人 浅原弘嗣 千叶朋希 阿部健太郎

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页

序列表27页 附图18页

(54)发明名称

炎症促进因子表达抑制剂、其有效成分的筛选方法、对该方法有用的表达盒、诊断药和诊断方法

(57)摘要

本发明发现对炎症促进因子的表达量产生影响的新型因子,提供基于该发现的炎症促进因子表达抑制剂、其开发工具,以及提供免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的诊断药和诊断方法。含有选自由RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种的炎症促进因子表达抑制剂、以RBMS2的表达或功能为指标的筛选方法、和对该方法有用的表达盒、以及含有RBMS2基因表达产物检测剂的诊断药、和以RBMS2基因表达量为指标的疾病检测方法。

1. 一种炎症促进因子表达抑制剂的有效成分的筛选用试剂,其含有由包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因的表达式、包含该表达式的载体、以及包含该载体的细胞组成的组中的至少一种。

2. 一种炎症促进因子表达抑制剂的有效成分的筛选方法,其以在被检物质的存在下的选自由下述(i)~(iii)组成的组中的至少1种作为指标:

(i) 被RBMS2基因表达调控区控制表达的基因表达量、

(ii) RBMS2与包含AU富含元件的RNA的结合量、和

(iii) RBMS2过量表达细胞中的、在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA量或源自所述mRNA的蛋白质量。

3. 根据权利要求2所述的筛选方法,其包括:在被检物质的存在下的所述指标的值低于在没有被检物质的存在下的所述指标的值时,选择该被检物质作为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分。

4. 根据权利要求2或3所述的筛选方法,其中,所述AU富含元件为源自选自由IL-6 mRNA、COX-2 mRNA、IL-8 mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1 mRNA、IL-24 mRNA和c-Myc mRNA组成的组中的至少1种mRNA的AU富含元件。

5. 根据权利要求2~4中任一项所述的筛选方法,其包括下述工序(a1)~(c1):

(a1) 使含有表达式的表达系统与被检物质接触的工序,所述表达式包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因;

(b1) 测定接触了被检物质的表达系统中的所述基因的表达量作为被检表达量,将该被检表达量、与作为对照表达量的未接触被检物质的表达系统中的所述基因的表达量进行比较的工序;以及

(c1) 被检表达量低于对照表达量时,选择该被检物质作为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分的工序。

6. 根据权利要求5所述的筛选方法,其中,所述表达系统为细胞。

7. 根据权利要求5或6所述的筛选方法,其中,所述基因为报道基因。

8. 根据权利要求2~4中任一项所述的筛选方法,其包括下述工序(a2)~(c2):

(a2) 在被检物质的存在下使包含AU富含元件的RNA与RBMS2接触的工序;

(b2) 测定在被检物质的存在下接触时的所述RNA与所述RBMS2的结合量作为被检结合量,将该被检结合量与对照结合量进行比较的工序,所述对照结合量是在没有被检物质的存在下接触时的所述RNA与所述RBMS2的结合量;以及

(c2) 被检结合量低于对照结合量时,选择该被检物质作为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分的工序。

9. 根据权利要求2~4中任一项所述的筛选方法,其包括下述工序(a3)~(c3):

(a3) 使含有在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA且过量表达了RBMS2的细胞与被检物质接触的工序;

(b3) 测定与被检物质接触的细胞中的所述mRNA量或源自所述mRNA的蛋白质量作为被检量,将不与被检物质接触的细胞中的所述mRNA量或源自所述mRNA的蛋白质量作为对照量,对该被检量和该对照量进行比较的工序;以及

(c3) 被检量低于对照量时,选择该被检物质作为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分

的工序。

10. 根据权利要求9所述的筛选方法,其中,所述mRNA包含报道蛋白的ORF。

11. 一种炎症促进因子表达抑制剂,其含有选自由RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种。

12. 根据权利要求11所述的炎症促进因子表达抑制剂,其中,所述RBMS2表达抑制剂含有选自由RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA、RBMS2特异性反义核酸、它们的表达载体和IL-10组成的组中的至少1种RBMS2表达抑制剂。

13. 根据权利要求11或12所述的炎症促进因子表达抑制剂,其中,作为表达抑制对象的所述炎症促进因子为选自由IL-6、COX-2、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种。

14. 根据权利要求11~13中任一项所述的炎症促进因子表达抑制剂,其作为选自由免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病组成的组中的至少1种疾病的预防或治疗剂来使用。

15. 一种因炎症促进因子而发病或恶化的疾病的诊断药,其含有RBMS2基因表达产物检测剂。

16. 根据权利要求15所述的诊断药,其中,所述疾病为选自由免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病组成的组中的至少1种。

17. 根据权利要求15或16所述的诊断药,其中,炎症促进因子为选自由IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种。

18. 一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的检测方法,其具有如下工序:

(a1) 测定从被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序;

(b1) 将上述工序(a1)中测定的被检表达量、与从未患有免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病中任一种疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序;以及

(c1) 将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的指标。

19. 一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度的判定方法,其具有如下工序:

(a2) 测定从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序;

(b2) 将上述工序(a2)中测定的被检表达量、与从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序;以及

(c3) 将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有比对照被检体的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度高的指标。

20. 根据权利要求18或19所述的方法,其中,所述免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病是因选自由IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种而发病或恶化的疾病。

炎症促进因子表达抑制剂、其有效成分的筛选方法、对该方法有用的表达盒、诊断药和诊断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及：炎症促进因子表达抑制剂、其有效成分的筛选方法和对该方法有用的表达盒、以及免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的诊断药和诊断方法等。

背景技术

[0002] 因IL-6、COX-2等因炎症促进因子而出现其症状或者使症状恶化的疾病、例如免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等疾病的患者数量非常多。例如，对于作为代表性的免疫疾病的类风湿性关节炎，被认为在日本国内约有70万人、在全世界约有7000万人的患者。另外，作为炎症性疾病之一的关节炎仅在日本就有约1560万人的患者，还可称之为关节炎代表性的膝关节骨性关节炎(osteoarthritis of the knee)推测在日本有约1000万人的患者。进而，作为疼痛性疾病代表性的腰痛仅在日本国内就有2400万人的患者。此外，这些疾病的患者数量随着高龄化的发展有逐年增加的倾向。可认为：这样的现象不仅出现在高龄化率社会最高的日本，而且由于未来生活环境、饮食生活/营养状态的改善、医疗技术的进步等，在高龄化进展中的所有国家均同样会发生。通过更早期地发现这些疾病，开始进行适合的治疗，抑制疾病的加重，甚至能较高地保持患者的QOL。因此，有关这些疾病的治疗药、其开发工具的研究、进而开发出这些疾病的诊断药、诊断方法已成为社会上非常重要的需求。

[0003] 其中，近些年明确了炎症促进因子mRNA的转录后调节与上述疾病的相关性。启示出：炎症促进因子mRNA的降解控制成为确定炎症反应的持续时间的重要因素，与炎症促进因子的mRNA水平的降解、稳定化相关的因子被认为参与了免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病的发病、慢性化。例如，非专利文献1中记载了：三重四脯氨酸(Tristetraprolin:TTP)、Regnase-1有助于IL-6mRNA的降解。另外，非专利文献2中公开了：Arid5a控制IL-6mRNA的稳定性。已经阐明了这些因子的异常通过炎症的促进等而在上述疾病的发病或恶化机理中发挥着重要作用。因此，对炎症促进因子的表达量产生影响的因子是上述疾病治疗药的靶标，期望获得这样的因子的新发现。另外，通过测定对患者的细胞、血液等中的炎症促进因子的表达量产生影响的物质的量，而能够诊断上述疾病的有无、进展程度的诊断药、诊断方法是非常有用的，期望获得这样的因子的新发现。

[0004] RNA-结合基序(RNA-binding motif)，单链相互作用蛋白2(single-stranded-interacting protein 2:RBMS2)是被称为在N末端侧具有2个RNA结合结构域的蛋白质，但实际上尚没有对其功能进行解析这样的报道，其功能至今尚不明确。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:Inflammation and Regeneration,Vol.33,No.1,January 2013, pp54-65.

[0008] 非专利文献2:PNAS,June 4,2013,vol.110,no.23,pp9409-9414

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 本发明的课题在于：发现对炎症促进因子的表达量产生影响的新型因子，及提供基于该发现的炎症促进因子表达抑制剂、其开发工具，以及提供免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的诊断药和诊断方法。

[0011] 用于解决问题的方案

[0012] 本发明人等对上述课题进行了深入研究，结果发现RBMS2进行了各种炎症促进因子mRNA的转录后调节。进而，对于因炎症促进因子而出现其症状或使症状恶化的疾病，发现RBMS2的表达与炎症促进因子的表达正相关。基于这些见解，发现：可以通过抑制RBMS2的表达或功能来抑制炎症促进因子，甚至能够进行上述疾病的预防或治疗、以及可以通过将RBMS2的表达量作为指标来诊断这些疾病。基于以上内容进行了进一步研究，结果完成了本发明。即，本发明包括下述的方式：

[0013] 项1. 一种表达盒，其包含：RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因。

[0014] 项2. 根据项1所述的表达盒，其中，前述基因为报道基因。

[0015] 项3. 一种载体，其包含项1或2所述的表达盒。

[0016] 项4. 一种细胞，其包含项3所述的载体。

[0017] 项5. 一种炎症促进因子表达抑制剂的有效成分的筛选用试剂，其含有由以下组分组成的组中的至少一种：包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因的表达式盒；包含该表达式盒的载体；以及包含该载体的细胞。

[0018] 项6. 一种抑制RBMS2的表达或功能的物质的筛选方法，其以在被检物质的存在下的选自由下述(i)～(iii)组成的组中的至少1种作为指标：

[0019] (i) 被RBMS2基因表达调控区控制表达的基因表达量、

[0020] (ii) RBMS2与包含AU富含元件的RNA的结合量、和

[0021] (iii) RBMS2过量表达细胞中的、在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量。

[0022] 项7. 根据项6所述的筛选方法，其包括：在被检物质的存在下的前述指标的值低于在没有被检物质的存在下的前述指标的值时，选择该被检物质作为抑制RBMS2的表达或功能的物质。

[0023] 项8. 根据项6或7所述的筛选方法，其中，前述AU富含元件为源自选自由IL-6mRNA、COX-2mRNA、IL-8mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1mRNA、IL-24mRNA和c-Myc mRNA组成的组中的至少1种mRNA的AU富含元件。

[0024] 项9. 根据项6～8中任一项所述的筛选方法，其选择前述抑制RBMS2的表达或功能的物质作为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分或其候选物质。

[0025] 项10. 根据项6～9中任一项所述的筛选方法，其包括下述工序(a1)～(c1)：

[0026] (a1) 使含有表达式盒的表达系统与被检物质接触的工序，所述表达式盒包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因；

[0027] (b1) 测定将接触了被检物质的表达系统中的前述基因的表达量作为被检表达量，将该被检表达量、与作为对照表达量的未接触被检物质的表达系统中的前述基因的表达量

进行比较的工序;以及

[0028] (c1) 被检表达量低于对照表达量时,选择该被检物质作为抑制RBMS2的表达的物质的工序。

[0029] 项11.根据项10所述的筛选方法,其中,前述表达系统为细胞。

[0030] 项12.根据项10或11所述的筛选方法,其中,前述基因为报道基因。

[0031] 项13.根据项6~9中任一项所述的筛选方法,其包括下述工序(a2)~(c2):

[0032] (a2) 在被检物质的存在下使包含AU富含元件的RNA与RBMS2接触的工序;

[0033] (b2) 测定在被检物质的存在下接触时的前述RNA与前述RBMS2的结合量作为被检结合量,将该被检结合量与对照结合量进行比较的工序,所述对照结合量是在没有被检物质的存在下接触时的前述RNA与前述RBMS2的结合量;以及

[0034] (c2) 被检结合量低于对照结合量时,选择该被检物质作为抑制RBMS2功能的物质的工序。

[0035] 项14.根据项13所述的筛选方法,其中,前述结合量的测定方法为免疫沉淀法或凝胶迁移法。

[0036] 项15.根据项6~9中任一项所述的筛选方法,其包括下述工序(a3)~(c3):

[0037] (a3) 使含有在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA且过量表达了RBMS2的细胞与被检物质接触的工序;

[0038] (b3) 测定与被检物质接触的细胞中的前述mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量作为被检量,将不与被检物质接触的细胞中的前述mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量作为对照量,对该被检量和该对照量进行比较的工序;以及

[0039] (c3) 被检量低于对照量时,选择该被检物质作为抑制RBMS2功能的物质的工序。

[0040] 项16.根据项15所述的筛选方法,其中,前述mRNA包含报道蛋白的ORF。

[0041] 项17.一种炎症促进因子表达抑制剂,其含有选自由RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种。

[0042] 项18.根据项17所述的炎症促进因子表达抑制剂,其含有RBMS2表达抑制剂。

[0043] 项19.根据项18所述的炎症促进因子表达抑制剂,其中,前述RBMS2表达抑制剂含有选自由RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA、RBMS2特异性反义核酸和它们的表达载体组成的组中的至少1种的RBMS2表达抑制。

[0044] 项20.根据项18所述的炎症促进因子表达抑制剂,其中,前述RBMS2表达抑制剂为IL-10。

[0045] 项21.根据项17~20中任一项所述的炎症促进因子表达抑制剂,其中,作为表达抑制对象的前述炎症促进因子为选自由IL-6、COX-2、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种。

[0046] 项22.根据项17~21中任一项所述的炎症促进因子表达抑制剂,其作为选自由免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病组成的组中的至少1种疾病的预防或治疗剂来使用。

[0047] 项23.根据项17~22中任一项所述的炎症促进因子表达抑制剂,其作为选自由自身免疫疾病、风湿性疾病、类风湿性关节炎、退行性关节炎、关节炎、败血症、淋巴组织增生、中枢神经系统脱髓鞘疾病、脊柱关节病、炎性痛、术后疼痛和变应性疾病组成的组中的至少1种疾病的预防或治疗剂来使用。

[0048] 项24.一种因炎症促进因子而发病或恶化的疾病的诊断药,其含有RBMS2基因表达产物检测剂。

[0049] 项25.根据项24所述的诊断药,其中,前述疾病因炎症促进因子而发病或恶化。

[0050] 项26.根据项24或25所述的诊断药,其中,前述疾病为选自由免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病组成的组中的至少1种。

[0051] 项27.根据项25或26所述的诊断药,其中,炎症促进因子为选自由IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种。

[0052] 项28.根据项24~27中任一项所述的诊断药,其中,前述RBMS2基因表达产物检测剂是针对RBMS2mRNA或源自其的核酸的探针或引物、或者是识别RBMS2蛋白的抗体。

[0053] 项29.根据项24~28中任一项所述的诊断药,其中,作为诊断对象疾病的前述疾病是选自由自身免疫疾病、风湿性疾病、类风湿性关节炎、退行性关节炎、关节炎、败血症、淋巴组织增生病、中枢神经系统脱髓鞘疾病、脊柱关节病、炎性痛、术后疼痛和变应性疾病组成的组中的至少1种疾病。

[0054] 项30.根据项29所述的诊断药,其中,作为诊断对象疾病的前述疾病为类风湿性关节炎。

[0055] 项31.根据项24~30中任一项所述的诊断药,其中,诊断对象是前述疾病的有无。

[0056] 项32.根据项24~30中任一项所述的诊断药,其中,诊断对象是前述疾病的进展程度。

[0057] 项33.一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的检测方法,其具有如下工序:

[0058] (a1)测定从被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序;

[0059] (b1)将上述工序(a1)中测定的被检表达量、与从未患有免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病中任一种疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序;以及

[0060] (c1)将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的指标。

[0061] 项34.一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度的判定方法,其具有如下工序:

[0062] (a2)测定从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序;

[0063] (b2)将上述工序(a2)中测定的被检表达量、与从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序;以及

[0064] (c3)将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有比对照被检体的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度高的指标。

[0065] 项35.根据项33或34所述的方法,其中,前述工序(a1)和工序(a2)中的前述试样为血液试样。

[0066] 项36.根据项33~35中任一项所述的方法,其中,前述工序(a1)和工序(a2)中的前述试样为血液试样中的血细胞成分。

[0067] 项37.根据项33~36中任一项所述的方法,其中,前述免疫疾病、炎症性疾病和疼

痛性疾病是因选自由IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24和c-Myc组成的组中的至少1种而发病或恶化的疾病。

[0068] 项38.根据项33~37中任一项所述的方法,其中,RBMS2基因表达产物的被检表达量和对照表达量是使用针对RBMS2mRNA或源自其的核酸的探针或引物、或者使用识别RBMS2蛋白的抗体来测得的。

[0069] 发明的效果

[0070] 根据本发明,能够提供利用了对炎症促进因子的表达量产生影响的新型靶因子的、新型的炎症促进因子表达抑制剂、免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的新型的预防或治疗剂、进而它们的开发工具(例如有效成分的筛选方法、对该方法有用的表达盒等)。另外,根据本发明,可以提供基于新型机理的免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的诊断药和诊断方法。

附图说明

[0071] 图1A表示实施例1A的筛选的概要。

[0072] 图1B表示实施例1B的结果。在图左侧,上方的示意图示出所使用的对照报道载体(无IL-6的3' UTR)的部分结构,下方的示意图示出所使用的报道载体(有IL-6的3' UTR)的部分结构。白柱表示导入了空载体(pcDNA3.1)的情况,黑柱表示导入了RBMS2表达载体(pcDNA3.1FLAG-RBMS2)的情况。横轴表示所测得的荧光素酶活性的相对值。

[0073] 图1C表示实施例1C的结果。左侧的图的纵轴表示RBMS2mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值,右侧的图的纵轴表示IL-6mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值。横轴中,N.C.表示导入了对照siRNA的情况,RBMS2-1和RBMS2-2表示导入了针对RBMS2的不同区域的siRNA的情况。白柱表示未添加IL-1 β 的情况,黑柱表示添加了IL-1 β 的情况。

[0074] 图1D表示实施例1D的结果。纵轴表示上清液中的IL-6蛋白浓度。横轴中,N.C.表示导入了对照siRNA的情况,RBMS2-1和RBMS2-2表示导入了针对RBMS2的不同区域的siRNA的情况。白柱表示未添加IL-1 β 的情况,黑柱表示添加了IL-1 β 的情况。

[0075] 图1E表示实施例1E的结果。左侧的图的纵轴表示RBMS2mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值,右侧的图的纵轴表示IL-6mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值。横轴中,空白(Empty)表示感染了对照逆转录病毒的情况,RBMS2表示感染了表达RBMS2的逆转录病毒的情况。白柱表示未添加IL-1 β 的情况,黑柱表示添加了IL-1 β 的情况。

[0076] 图1F表示实施例1F的结果。纵轴表示所测得的荧光素酶活性的相对值。横轴中,空白表示导入了空载体的情况,RBMS2表示导入了RBMS2表达载体的情况。

[0077] 图2A表示实施例2A的结果。纵轴表示IL-6mRNA量相对于肌动蛋白 β (Actb)mRNA量的相对值。横轴中,-表示自表达载体导入起48小时后回收的细胞样品;LPS表示自添加LPS起5小时后回收的细胞样品;ActD表示自添加放线菌素D起3小时后回收的细胞样品。黑柱表示导入了空载体的情况,●表示导入了RBMS2表达载体的情况。

[0078] 图2B表示实施例2B的结果。横轴中,0表示自导入载体起24小时后(多西环素未添加时)回收的细胞样品;2表示自添加多西环素起2小时后回收的细胞样品。纵轴表示荧光素酶mRNA量的相对比例(0的情况为100%)。黑柱表示导入了空载体的情况,●表示导入了RBMS2表达载体的情况。

[0079] 图2C表示实施例2C的结果。图左侧中的示意图表示所使用的突变型3' UTR报道载体的部分结构。横轴表示荧光素酶活性的相对值。白柱表示导入了空载体的情况,黑柱表示导入了RBMS2表达载体的情况。*表示t-test的结果,p值表示为0.05以下的情况。

[0080] 图3A表示实施例3A的结果。纵轴表示将免疫沉淀前的细胞溶解液中的荧光素酶mRNA量设为100%时的、免疫沉淀物中的荧光素酶mRNA量的相对值。横轴中,ARE WT表示导入了在荧光素酶ORF的下游连接了IL-6的野生型3' UTR的报道载体(实施例1A)的情况;ARE Mut表示导入了突变型3' UTR报道载体(实施例2C:ARE突变体)的情况。黑柱表示通过抗FLAG抗体进行了免疫沉淀的情况,白柱表示通过非特异性IgG进行了免疫沉淀的情况。

[0081] 图3B表示实施例3B的结果。纵轴表示将免疫沉淀前的细胞溶解液中的荧光素酶mRNA量设为100%时的、免疫沉淀物中的荧光素酶mRNA量的相对值。横轴中,RBMS2WT表示导入了被FLAG标记的野生型RBMS2的表达载体的情况,RBMS2 Δ RRM1表示导入了被FLAG标记的RRM1结构域缺失型RBMS2的表达载体的情况。黑柱表示通过抗FLAG抗体进行了免疫沉淀的情况,白柱表示通过非特异性IgG进行了免疫沉淀的情况。

[0082] 图3C表示实施例3C的结果。图左侧中的示意图表示通过所使用的表达载体表达的RBMS2的结构。横轴表示荧光素酶活性的相对值。

[0083] 图4A表示实施例4A的结果。各图的纵轴表示各图的上部记载的基因的mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值。横轴中,N.C.表示导入了对照siRNA的情况,RBMS2表示导入了针对RBMS2的siRNA的情况。白柱表示未添加IL-1 β 的情况,黑柱表示添加了IL-1 β 的情况。

[0084] 图4B表示实施例4B的结果。上半部分表示使用了LPS的情况,中间部分表示使用了Pam3CSK4的情况,下半部分表示使用了IL-1 β 的情况。各图的纵轴表示各图的上部记载的基因的mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值。横轴中,N.C.表示导入了对照siRNA的情况,RBMS2表示导入了针对RBMS2的siRNA的情况。白柱表示均未添加LPS、Pam3CSK4和IL-1 β 的情况,黑柱表示添加了LPS、Pam3CSK4或IL-1 β 的情况。

[0085] 图4C表示实施例4C的结果。纵轴表示使用了在荧光素酶ORF的下游配置了各图的上部记载的基因的野生型3' UTR(或其ARE突变型3' UTR)而得到的报道载体时的、荧光素酶活性的相对值。横轴中,WT表示采用了野生型3' UTR的情况,Mut表示采用了ARE突变型3' UTR的情况。白柱表示导入了空载体的情况,黑柱表示导入了RBMS2表达载体的情况。

[0086] 图5A表示实施例5A中的RBMS2缺失小鼠制作方案。

[0087] 图5B表示实施例5B的结果。各图的纵轴表示将各图的上部记载的因子添加至培养基中时的IL-6的表达量(相对于GAPDH mRNA量的相对值)。横轴中,0表示各图的上部记载的因子添加前,1、3、5和9表示各图的上部记载的因子添加后经过的时间。白柱表示使用了源自野生型小鼠的细胞的情况,灰柱表示使用了源自RBMS2杂合缺失小鼠的细胞的情况,黑柱表示使用了源自RBMS2纯合缺失(homozygously deficient)小鼠的细胞的情况。

[0088] 图5C表示实施例5C的结果。各图的纵轴表示各图的上部记载的基因的mRNA表达量(相对于GAPDH mRNA量的相对值)。横轴中,0表示Pam3CSK4添加前,1、3、5和9表示Pam3CSK4添加后经过的时间。白柱表示使用了源自野生型小鼠的细胞的情况,灰柱表示使用了源自RBMS2杂合缺失小鼠的细胞的情况,黑柱表示使用了源自RBMS2纯合缺失小鼠的细胞的情况。

[0089] 图6A表示实施例6的生存时间的测量结果。纵轴表示存活率,横轴表示LPS给药后

的时间。WT表示野生型小鼠的存活率,KO表示RBMS2纯合缺失小鼠的存活率。

[0090] 图6B表示实施例6的IL-6浓度的测定结果。纵轴表示血清中的IL-6浓度,横轴中,WT表示野生型小鼠,KO表示RBMS2纯合缺失小鼠。图中,各图表表示各个体的血清中的IL-6浓度,尺条表示平均值。

[0091] 图7表示实施例7的结果。纵轴表示RBMS2表达量的相对值。横轴表示IL-6表达量的相对值。

[0092] 图8表示实施例8的结果。纵轴表示相对于HPRT mRNA表达量的RBMS2mRNA表达量的相对值。横轴表示IL-10蛋白或TGF β 蛋白添加后的经过时间。白柱表示添加了IL-10蛋白的情况,黑柱表示添加了TGF β 蛋白的情况。

[0093] 图9表示实施例9的结果。左侧的图的纵轴表示在荧光素酶ORF的下游连接了IL-6 3' UTR时的荧光素酶活性,右侧的图的纵轴表示在荧光素酶ORF的下游连接了PTGS2 (COX2) 3' UTR时的荧光素酶活性。横轴中,空白表示导入了空载体的情况,RBMS2表示导入了RBMS2表达载体的情况,HuR表示导入了HuR表达载体的情况。

[0094] 图10A表示实施例10A的结果。纵轴表示荧光素酶活性的相对值。横轴中,空白表示导入了空载体、FL表示导入了野生型RBMS2表达载体、dR1表示导入了RRM1结构域缺失体表达载体、F101A F104A表示导入了F101A和F104A的双突变体的表达载体的情况。**表示为P值<0.01。

[0095] 图10B表示实施例10B的结果。左侧的图表示IL-6mRNA量的测定结果,右侧的图表示IL-8mRNA量的测定结果。纵轴表示IL-6mRNA量或IL-8mRNA量相对于GAPDH mRNA量的相对值。横轴中,空白表示感染了对照慢病毒的情况,FL表示感染了表达野生型RBMS2的慢病毒的情况,RRM1表示感染了表达RRM1结构域缺失体的慢病毒的情况,FF表示感染了表达F101A和F104A的双突变体的慢病毒的情况。

[0096] 图10C表示实施例10C的结果。纵轴表示将免疫沉淀前的细胞溶解液中的荧光素酶mRNA量设为100%时的、免疫沉淀物中的荧光素酶mRNA量的相对值。横轴中,WT FL表示导入了被FLAG标记的野生型RBMS2的表达载体的情况,WT dR1表示导入了被FLAG标记的RRM1结构域缺失型RBMS2的表达载体的情况,WT F101/F104A表示导入了F101A和F104A的双突变体的表达载体的情况。黑柱表示通过抗FLAG抗体进行了免疫沉淀的情况,白柱表示通过非特异性IgG进行了免疫沉淀的情况。

[0097] 图11表示实施例11的结果。纵轴表示从试验后的耳廓的厚度减去试验前的耳廓的厚度而得到的值(表示耳廓肿胀的指标)。横轴中,Het表示RBMS2基因杂合缺失小鼠,KO表示RBMS2基因纯合缺失小鼠。

[0098] 图12表示实施例12的结果。纵轴表示转染了针对RBMS2的siRNA时的mRNA表达量,横轴表示转染了非特异性siRNA (阴性对照)时的mRNA表达量。各图表表示通过RBMS2敲低而使表达量增加至2倍以上或降低至2分之1以下的基因。

具体实施方式

[0099] 1. 定义

[0100] 在本说明书中,对于“含有”和“包含”的表述,包括“含有”、“包含”、“实质上由…构成”和“仅由…构成”这样的概念。

[0101] 氨基酸序列的“同一性”是指：可以进行对比的2个以上的氨基酸序列的、相对于彼此的氨基酸序列的一致程度。因此，某2个氨基酸序列的一致性越高，这些序列的同一性或类似性越高。氨基酸序列的同一性的水平例如可使用作为序列分析用工具的FASTA，使用默认参数来确定。或者，可以使用基于Karlin和Altschul的算法BLAST (KarlinS, Altschul SF. “Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoringschemes” Proc Natl Acad Sci USA. 87:2264-2268 (1990)、KarlinS, Altschul SF. “Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.” Proc Natl Acad Sci USA. 90:5873-7 (1993)) 来确定。开发出了基于这样的BLAST算法的被称为BLASTX的程序。这些解析方法的具体方法是公知的，参照National Center of Biotechnology Information (NCBI) 的网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 即可。另外，碱基序列的“同一性”也依据上述内容来定义。

[0102] 在本说明书中，“保守性置换”是指：氨基酸残基被具有类似的侧链的氨基酸残基置换。被例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸之类的具有碱性侧链的氨基酸残基彼此置换的情况包括在保守性置换中。此外，天冬氨酸、谷氨酸之类的具有酸性侧链的氨基酸残基；甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸之类的具有不带电荷的极性侧链的氨基酸残基；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸之类的具有非极性侧链的氨基酸残基；苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸之类的具有 β -支链侧链的氨基酸残基；酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸之类的具有芳香族侧链的氨基酸残基彼此的置换也同样包括在保守性置换中。

[0103] 在本说明书中，当简称为“RBMS2”时，表示RBMS2蛋白。

[0104] 在本说明书中，“核苷酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”与核酸含义相同，包括DNA和RNA这两者。另外，它们可以是双链或单链，称为具有某序列的“核苷酸”（或“寡核苷酸”、“多核苷酸”）时，只要没有特别声明，则是还包括具有与其互补的序列的“核苷酸”（或“寡核苷酸”和“多核苷酸”）的意思。进而，“核苷酸”（或“寡核苷酸”和“多核苷酸”）为RNA时，序列表中所示的碱基符号“T”可理解为“U”。

[0105] 2. 表达盒

[0106] 本发明涉及一种表达盒（在本说明书中，有时称为“本发明的表达盒”），其包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因。以下对其进行说明。

[0107] 在本发明中，“表达盒”是指：具有在细胞（例如真核细胞、优选为动物细胞、更优选为哺乳动物细胞）内表达该表达盒所包含的基因的功能的多核苷酸。

[0108] 在本发明中“RBMS2基因表达调控区”只要是在细胞内控制了内源性RBMS2基因的表达的DNA区域；或者、是与其具有同等表达调控能力的DNA区域就没有特别限制。作为该区域，例如可列举出：包含RBMS2基因的转录起始位点、其上游（5' 侧）的序列和根据需要其下游（3' 侧）的序列的启动子。作为该启动子的具体例，当将RBMS2基因的转录起始位点的碱基设为+1、其下游（3' 侧）为正值、其上游为0或负值时，例如可列举出：-10000~+2000、优选为-5000~+1000、更优选为-2000~+500、进一步优选为-1000~+200、更进一步优选为-500~+100、特别优选为-200~+50的DNA区域。该启动子只要具有与在细胞内控制了内源性RBMS2基因的表达的启动子同等程度的表达调控能力即可，还可以具有突变。在此情况下，

具有突变的启动子的碱基序列具有与在细胞内控制了内源性RBMS2基因的表达的启动子的碱基序列例如70%以上、优选为80%以上、更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、更进一步优选为97%以上、特别优选为99%以上的同一性。突变的部位理想的是例如为除公知的表达调控元件(例如基本转录因子结合区、各种激活因子结合区等)以外的部位。需要说明的是,表达调控元件的共有序列是已知的,可以在各种数据库上容易地检索。

[0109] 在本发明中“RBMS2基因”没有特别限制,可以是动物例如可列举出:人、猴、小鼠、大鼠、狗、猫、兔子、猪、马、牛、绵羊、山羊、鹿等各种哺乳类动物的。

[0110] 源自各种动物的RBMS2基因是公知的。作为其表达产物的RBMS2mRNA和RBMS2蛋白可以示例如下。具体而言,例如作为人RBMS2mRNA,可列举出由序列号3所示的碱基序列组成的mRNA(NCBI Reference Sequence:NM_002898.3),作为小鼠RBMS2mRNA,可列举出由序列号4所示的碱基序列组成的mRNA(NCBI Reference Sequence:NM_019711.2)。作为人RBMS2蛋白,可列举出由序列号2所示的氨基酸序列组成的蛋白质(NCBI Reference Sequence:NP_002889.1),作为小鼠RBMS2蛋白,可列举出由序列号5所示的氨基酸序列组成的蛋白质(NCBI Reference Sequence:NP_062685.2)。另外,RBMS2蛋白中还包括缺失N末端类型的蛋白质,作为这样的类型的蛋白质,例如若为小鼠的情况,可列举出由序列号6所示的氨基酸序列组成的蛋白质(NCBI Reference Sequence:NP_001034169.1)(mRNA由序列号7所示的碱基序列组成(NCBI Reference Sequence:NM_001039080.1))。

[0111] 作为RBMS2基因的表达产物的RBMS2蛋白只要具备促进具有源自炎症促进因子mRNA(例如,IL-6mRNA、COX-2mRNA、IL-8mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1mRNA、IL-24mRNA, c-Myc mRNA等)的3' UTR的mRNA或由该mRNA翻译的蛋白质的表达的活性(以下称为“炎症促进因子表达促进活性”),还可以具有置换、缺失、添加、插入等的氨基酸突变。作为突变,从更不易损害炎症促进因子表达促进活性这样的观点出发,可列举出优选为置换、更优选为保守性置换。

[0112] 另外,对于作为RBMS2基因的表达产物的RBMS2mRNA,还有从该mRNA翻译的蛋白质只要具有炎症促进因子表达促进活性,还可以具有置换、缺失、添加、插入等碱基突变。作为突变,优选:在从该mRNA翻译的蛋白质中未发生氨基酸置换的突变、发生氨基酸的保守性置换的突变。

[0113] 炎症促进因子表达促进活性的有无可以按照或依据公知的方法进行判定。例如,可以按照或依据实施例中记载的方法进行判定。作为具体例,在实施例1B中,使用被检蛋白质的表达载体作为表达载体的情况,与使用了空载体的情况相比,若荧光素酶活性高则能够判定该被检蛋白质具有炎症促进因子表达促进活性。

[0114] 作为RBMS2基因的表达产物的RBMS2蛋白的优选的具体例,可列举出选自由下述(a)中记载的蛋白质和下述(b)中记载的蛋白质组成的组中的至少1种:

[0115] (a) 序列号2、5、或6所示的氨基酸序列组成的蛋白质、和

[0116] (b) 由具有与序列号2、5、或6所示的氨基酸序列85%以上的同一性的氨基酸序列构成且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0117] 上述(b)中,同一性更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、更进一步优选为98%以上。

[0118] 作为上述(b)中记载的蛋白质的一个例子,例如可列举出:

[0119] (b') 由在序列号2、5、或6所示的氨基酸序列中置换、缺失、添加或插入了1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列组成且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0120] 上述(b')中,多个例如为2个~30个、优选为2个~10个、更优选为2个~5个、更进一步优选为2个或3个。

[0121] 作为RBMS2基因的表达产物的RBMS2mRNA的优选的具体例,可列举出选自下述(c)中记载的mRNA和下述(d)中记载的mRNA组成的组中的至少1种:

[0122] (c) 由序列号3、4或7所示的碱基序列组成的mRNA、和

[0123] (d) 由具有与序列号3、4或7所示的碱基序列85%以上的同一性的碱基序列组成、且编码具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质的mRNA。

[0124] 上述(d)中,同一性更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、更进一步优选为98%以上。

[0125] 作为上述(d)中记载的蛋白质的一个例子,例如可列举出:

[0126] (d') 由在序列号3、4、或7所示的碱基序列中置换、缺失、添加、或插入了1个或多个碱基的碱基序列组成、且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0127] 上述(d')中,多个是指例如2个~500个、优选为2个~100个、更优选为2个~50个、更进一步优选为2个~10个。

[0128] 在本发明中,以通过RBMS2基因表达调控区控制表达的方式配置的“基因”只要是能检测出其表达产物的基因就没有特别限制。需要说明的是,此处所谓的“基因”是指:包括作为该基因的表达产物的蛋白质的编码序列的基因,还可以是包括该基因的其它序列(例如内含子序列等)的基因,但不包括启动子的概念。作为该基因,例如可列举出:报道基因、抗性基因、酶基因、结构基因、转运基因、贮藏基因、收缩基因、防御基因、调节基因等这些基因的修饰基因等。作为修饰基因的例子,可列举出:如在作为其表达产物的一部分蛋白质中发生了置换、缺失、添加、插入等氨基酸突变那样发生了碱基突变的上述基因、表达多种上述基因的表达产物融合而成的蛋白质的基因等。其中,优选列举出报道基因、抗性基因等,更优选列举出报道基因。

[0129] 在本发明中“报道基因”只要是与例如特定的底物发生反应并发光(显色)的发光(显色)蛋白质、或者是编码由激发光发出荧光的荧光蛋白的基因就没有特别限定。作为发光(显色)蛋白,例如可列举出:荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、 β -葡萄糖苷酸酶等;作为荧光蛋白,例如可列举出:GFP、Azami-Green、ZsGreen、GFP2、HyPer、Sirius、BFP、CFP、Turquoise、Cyan、TFP1、YFP、Venus、ZsYellow、Banana、KusabiraOrange、RFP、DsRed、AsRed、Strawberry、Jred、KillerRed、Cherry、HcRed、mPlum等。

[0130] 在本发明中“抗性基因”只要是能够对表达该基因的细胞赋予针对抗菌药等药剂的耐性的基因就没有特别限定。具体而言,例如可列举出:氯霉素抗性基因、四环素类抗性基因、新霉素抗性基因、红霉素抗性基因、奇霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因等。

[0131] 对于上述“基因”,“以控制表达的方式配置”是指:以表达由该基因编码的蛋白质的方式配置了该基因的情况。具体而言,例如可列举出:从5'侧依次配置了该基因表达调控区、该基因的方式。

[0132] 本发明的表达盒根据需要还可以包含其它元件(例如,多克隆位点(MCS))。例如,

若为从5'侧依次配置了RBMS2基因表达调控区、上述“基因”的情况,可列举出:在RBMS2基因表达调控区的5'侧(优选为邻接)、在RBMS2基因表达调控区与上述“基因”之间(优选为与其中一者或者两者邻接)、在上述“基因”的3'侧(优选为邻接)位置配置了MCS的方式。MCS只要包含多个(例如2个~50个、优选为2个~20个、更优选为2个~10个)限制性酶切位点就没有特别限制。

[0133] 本发明的表达盒可以单独构成载体、或者与其它序列一起构成载体。这样的载体(以下称为“本发明的载体”)也包括在本发明中。作为其它序列,没有特别限制,可以采用可包含表达载体的公知的各种序列。作为这样的序列的一个例子,例如可列举出复制起点、抗性基因等。另外,抗性基因的种类可以示例出上述种类。载体的种类没有特别限制,例如可列举出:动物细胞表达质粒等质粒载体;逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、仙台病毒等病毒载体等。

[0134] 本发明的载体还可以包含在细胞内。这样的细胞(以下称为“本发明的细胞”)也包含在本发明中。本发明的细胞中,本发明的载体还可以存在于基因组外,或还可以以组入基因组内的状态存在。作为细胞的起源生物物种,没有特别限制,例如可列举出:人、猴、小鼠、大鼠、狗、猫、兔子、猪、马、牛、绵羊、山羊、鹿等各种哺乳类。另外,作为该细胞的种类也没有特别限制,可列举出:源自各种组织或具有各种性质的细胞、例如血液细胞、造血干细胞/前体细胞、配子(精子、卵子)、成纤维细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、神经细胞、肝细胞、角质形成细胞、肌细胞、表皮细胞、内分泌细胞、ES细胞、iPS细胞、组织干细胞、癌细胞等。

[0135] 选自由本发明的表达盒、本发明的载体和本发明的细胞组成的组中的至少1种可以适宜地用于后述的本发明的筛选方法。从该观点出发,本发明还涉及含有选自由本发明的表达盒、本发明的载体和本发明的细胞组成的组中的至少1种的、抑制RBMS2的表达或功能的物质(优选为炎症促进因子表达抑制剂的有效成分)的筛选用试剂(在本说明书中,有时称为“本发明的试剂”)。

[0136] 本发明的试剂只要含有选自由本发明的表达盒、本发明的载体、和本发明的细胞组成的组中的至少1种就没有特别限定,此外,还可以包含例如由本发明的表达盒检测表达产物所需的物质。作为这样的物质的具体例,可列举出:杂交用的试剂、探针的标记、标签体的检测剂、缓冲液、器具等。本发明的试剂还可以是包含了它们的筛选用试剂盒的形态。

[0137] 3. 筛选方法

[0138] 本发明涉及在被检物质的存在下的选自由下述(i)~(iii)组成的组中的至少1种作为指标的、抑制RBMS2的表达或功能的物质的筛选方法:

[0139] (i) 被RBMS2基因表达调控区控制表达的基因表达量、

[0140] (ii) RBMS2与包含AU富含元件的RNA的结合量、和

[0141] (iii) RBMS2过量表达细胞中的、在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量(在本说明书中,有时称为本发明的筛选方法”。

[0142] 以下对其进行说明。

[0143] 作为在本发明中的“被检物质”,无论是天然存在的化合物还是人工制作的化合物均可以广泛地使用。另外,不限于经纯化的化合物,还可以使用混合了多种化合物的组合物、动植物的提取液。化合物不限于低分子化合物,还可以包含蛋白质、核酸、多糖类等高分子化合物。

[0144] 本发明的筛选方法更具体而言,在被检物质的存在下的前述指标的值低于在没有被检物质的存在下的前述指标的值时,可以选择该被检物质作为抑制RBMS2的表达或功能的物质。

[0145] 经筛选的“抑制RBMS2的表达或功能的物质”可以选作炎症促进因子表达抑制剂的有效成分或其候选物质。

[0146] 以下按分别利用指标(i)~(iii)的方式对具体的筛选方法进行说明。

[0147] 3-1.利用指标(i)的筛选方法

[0148] 利用指标(i)的筛选方法包括下述工序(a1)~(c1):

[0149] (a1)使含有表达盒的表达系统与被检物质接触的工序,所述表达盒包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因;

[0150] (b1)测定将接触了被检物质的表达系统中的前述基因的表达量作为被检表达量,将该被检表达量、与作为对照表达量的未接触被检物质的表达系统中的前述基因的表达量进行比较的工序;以及

[0151] (c1)被检表达量低于对照表达量时,选择该被检物质作为抑制RBMS2的表达的物质的工序。

[0152] 工序(a1)中,对于“包含RBMS2基因表达调控区和以被该区域控制表达的方式配置的基因的表达盒”,与上述“2.表达盒”同样。但是,工序(a1)中的该表达盒在包括包含细胞的基因组内的内源性RBMS2基因表达调控区及其下游的RBMS2基因的表达盒这一方面,与上述“2.表达盒”中的表达盒不同。

[0153] 工序(a1)中,“表达系统”只要是包含由上述表达盒表达基因所需的成分的系统就没有特别限制。作为该表达系统,例如可列举出无细胞蛋白质表达系统、细胞。无细胞蛋白质表达系统通常由包含转录和翻译所需的因子(RNA聚合酶、核糖体、各种核糖核苷酸等)的溶液(细胞提取液等)构成,可以使用各种市售的物质。细胞只要是能由上述表达盒表达基因的细胞就没有特别限制,可列举出:“源自各种组织或各种性质的细胞、例如血液细胞、造血干细胞/前体细胞、配子(精子、卵子)、成纤维细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、神经细胞、肝细胞、角质形成细胞、肌细胞、表皮细胞、内分泌细胞、ES细胞、iPS细胞、组织干细胞、癌细胞等。表达系统从能够更简便地进行筛选这样的观点出发,优选细胞。

[0154] 工序(a1)中,包含上述表达盒的表达系统例如在表达系统为无细胞蛋白质表达系统的情况下,只要是在该系统的溶液内包含上述表达盒的状态即可。另外,在表达系统为细胞情况下,上述表达盒可列举出:组入细胞的基因组内的方式、存在于基因组外(例如以质粒的状态)的方式等。

[0155] 工序(a1)中,接触被检物质的方式没有特别限定。表达系统为无细胞蛋白质表达系统的情况下,例如只要在该系统的溶液中添加被检物质即可。另外,表达系统为细胞情况,例如只要在细胞培养基中添加被检物质即可。

[0156] 工序(a1)中,被检物质的接触时间没有特别限制,可根据被检物质的种类、表达系统的种类等进行适宜设定。该时间例如为5分钟~72小时。

[0157] 工序(b1)中,被检表达量和对照表达量的测定可以按照或依据公知的方法进行。可以优选使用上述本发明的诊断药来进行。若测定对象为核酸(RBMS2mRNA或源自其的核酸(cDNA等))的情况,例如,可以作为探针、引物来使用,并利用诺瑟杂交(northern

blotting)法、RT-PCR法、DNA芯片解析法、原位杂交解析法等进行测定。若测定对象为蛋白质的情况,例如可以使用特异性抗体并利用免疫印迹法、ELISA法等进行测定。测定对象为报道蛋白质的情况,可以利用能检测出该报道信号(荧光、显色、发光等)的方法(荧光显微镜观察、荧光素酶法等)进行测定。测定对象为耐药蛋白质的情况,可以通过在药剂的存在下测定存活的细胞数来间接地进行测定。

[0158] 利用诺瑟杂交法的情况,具体而言可以示例出如下方法:用放射性同位素(^{32}P 、 ^{33}P 等:RI)、荧光物质等标记探针,使其与依据常规方法转移至尼龙膜等上的源自上述表达系统的mRNA杂交后,对于所形成的诊断药和源自被检者的试样的mRNA的双链,通过辐射探测器BAS-1800II(FUJIFILM Corporation制)或荧光检测器等检测、测定源自探针的标记物(RI或荧光物质等标记物质)的信号。另外,还可以使用如下方法:使用AlkPhos Direct Labelling and Detection System(Amersham Pharmacia Biotech公司制)并依据该方案标记探针,与源自上述表达系统的mRNA杂交后,通过multibioimager STORM860(Amersham Pharmacia Biotech公司制)检测、测定源自探针标记物的信号。

[0159] 利用RT-PCR法的情况,具体而言可以示例出如下方法:由源自上述表达系统的RNA依据常规方法制备cDNA,使其与一对引物(与上述cDNA(-链)结合的正链、与+链结合的负链)杂交,依据常规方法进行PCR法以使将该cDNA作为模板的靶区域能够扩增,再对得到的扩增双链DNA进行检测。需要说明的是,经扩增的双链DNA的检测可以使用如下方法:通过使用预先用RI、荧光物质进行了标记的引物来进行上述PCR,从而对所产生的标记双链DNA进行检测的方法;依据常规方法使所产生的双链DNA转移至尼龙膜等上,并使用标记探针与其杂交并进行检测的方法等。需要说明的是,生成的标记双链DNA产物可以利用Agilent 2100Bioanalyzer(Yokogawa Analytical Systems Inc.制)等进行测定。另外,还可以利用SYBR Green RT-PCR Reagents(Applied Biosystems公司制)并依据该方案制备RT-PCR反应液,利用ABI PRISM 7700Sequence Detection System(Applied Biosystems公司制)使其反应来检测该反应物。

[0160] 利用DNA芯片解析的情况,可以列举出如下方法:准备粘贴有DNA探针(单链或双链)的DNA芯片,使其与由源自上述表达系统的RNA利用常规方法制备的cRNA杂交,使所形成的DNA与cRNA的双链与标记探针结合来检测的方法。

[0161] 免疫印迹法可示例出如下方法:使用第一抗体后,作为第二抗体使用用 ^{125}I 等放射性同位素、荧光物质、辣根过氧化物酶(HRP)等酶等进行了标记的标记抗体(与第一抗体结合的抗体),利用辐射探测器BAS-1800II(FUJIFILM Corporation制等)、荧光检测器等检测、测定得到的源自标记化合物的放射性同位素、荧光物质等标记物质的信号。另外,还可以使用第一抗体后,使用ECL Plus Western Blotting Detection System(Amersham Pharmacia Biotech公司制)并依据该方案进行检测,利用multibioimager STORM860(Amersham Pharmacia Biotech公司制)进行测定。

[0162] 工序(c1)中,例如被检表达量低于对照表达量时,例如,被检表达量为对照表达量的 $1/2$ 、 $1/5$ 、 $1/10$ 、 $1/20$ 、 $1/50$ 、或者 $1/100$ 时,可以选择被检物质作为抑制RBMS2的表达的物质。

[0163] 3-2.利用指标(ii)的筛选方法

[0164] 利用指标(ii)的筛选方法包括下述工序(a2)~(c2):

[0165] (a2) 在被检物质的存在下使包含AU富含元件的RNA与RBMS2接触的工序;

[0166] (b2) 测定在被检物质的存在下接触时的前述RNA与前述RBMS2的结合量作为被检结合量,将该被检结合量与对照结合量进行比较的工序,所述对照结合量是在没有被检物质的存在下接触时的前述RNA与前述RBMS2的结合量;以及

[0167] (c2) 被检结合量低于对照结合量时,选择被检物质作为抑制RBMS2的功能的物质的工序。

[0168] 工序(a2)中,AU富含元件是指:将AUUUA等所代表的、通式: $(U)_n W^1 (U)_m W^2 (U)_o$ 。[式中:U表示尿嘧啶。 W^1 和 W^2 相同或不同,表示腺嘌呤或尿嘧啶(其中, W^1 和 W^2 这两者均为尿嘧啶的情况除外)。n表示0~3的整数。o表示0~3的整数。m表示3~5的整数(优选为3)。]所示的碱基序列作为共有序列的元件。该AU富含元件优选为源自炎症促进因子的mRNA(例如,选自由IL-6mRNA、COX-2mRNA、IL-8mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1mRNA、IL-24mRNA和c-Myc mRNA组成的组中的至少1种mRNA)的AU富含元件。此处,“源自~的AU富含元件”换言之是指这些mRNA中所含的AU富含元件。

[0169] 工序(a2)中,包含AU富含元件的RNA只要是包含该AU富含元件的RNA就没有特别限制。该RNA中的AU富含元件的数量例如为1个~20个、优选为2个~15个、更优选为3个~12个、进一步优选为4个~10个、更进一步优选为6个~9个。该RNA中的AU富含元件的数量为多个时,AU富含元件期望的是存在于相对较窄的范围内(例如,20~400bp、优选为40~200bp、更优选为60~150bp、进一步优选为80~120bp)。另外,该范围优选富含U。作为U的富含程度,U的数量相对于该范围全部碱基数的比例例如为20%以上、优选为30%以上、更优选为50%以上。该比例的上限没有特别限制可以示例出90%、80%、70%等。

[0170] 工序(a2)中,对于RBMS2,与上述“2.表达盒”中的RBMS2蛋白同样。

[0171] 工序(a2)中,接触被检物质的方式只要是能够接触包含AU富含元件的RNA、RBMS2、和被检物质这3种成分的方式就没有特别限定。例如可列举出如下方式:在适当的溶剂中混合这3种成分的方式、在细胞内使这3种成分共存的方式等。

[0172] 工序(a2)中,被检物质的接触时间没有特别限制,可根据被检物质的种类、接触是否在试验管内进行或者在细胞内进行等进行适宜设定。该时间例如为5分钟~72小时。

[0173] 工序(b2)中,被检结合量和对照结合量的测定可以按照或依据公知的方法进行。例如可以利用免疫沉淀法、凝胶迁移法等进行测定。

[0174] 免疫沉淀法典型的是可以如下进行。制备含有包含AU富含元件的RNA与RBMS2的(与被检物质接触的、或者未接触的)细胞的细胞溶解液,用针对RBMS2的抗体或者对该RBMS2添加了标签时用针对该标签的抗体对该溶解液进行免疫沉淀,通过PCR测定沉淀物中所含的“包含AU富含元件的RNA”的量。该测定量越多则表示被检结合量或对照结合量越多。

[0175] 凝胶迁移法典型的是可以如下进行。使用适当的凝胶(丙烯酰胺凝胶等)等对含有包含AU富含元件的RNA与RBMS2的(进而包含被检物质的、或者不包含被检物质的)溶液进行电泳,测定表示包含AU富含元件的RNA与RBMS2结合而成的复合体的条带的信号。该测定量越多则表示被检结合量或对照结合量越多。

[0176] 工序(c2)中,例如被检结合量低于对照结合量时,例如,被检结合量为对照结合量的1/2、1/5、1/10、1/20、1/50、或者1/100时,可以选择被检物质作为抑制RBMS2的表达的物质。

[0177] 3-3.利用指标(iii)的筛选方法

[0178] 利用指标(iii)的筛选方法包括下述工序(a3)~(c3):

[0179] (a3)使含有在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA且过量表达了RBMS2的细胞与被检物质接触的工序;

[0180] (b3)测定与被检物质接触的细胞中的前述mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量作为被检量,将不与被检物质接触的细胞中的前述mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量作为对照量,对该被检量和该对照量进行比较的工序;以及

[0181] (c3)被检量低于对照量时,选择被检物质作为抑制RBMS2的功能的物质的工序。

[0182] 工序(a3)中,对于AU富含元件,与“3-2.利用指标(ii)的筛选方法”中的AU富含元件同样。

[0183] 工序(a3)中,在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA只要是在3'-UTR中包含该AU富含元件的mRNA就没有特别限制。该mRNA的3'-UTR中的AU富含元件的数量例如为1个~20个、优选为2个~15个、更优选为3个~12个、进一步优选为4个~10个、更进一步优选为6个~9个。该mRNA中的AU富含元件的数量为多个时,AU富含元件优选存在于相对较窄的范围内(例如,20个~400个、优选为40个~200个、更优选为60个~150个、进一步优选为80个~120个)。

[0184] 工序(a3)中,在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA可列举出:优选为炎症促进因子的mRNA、更优选为IL-6mRNA、COX-2mRNA、IL-8mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1mRNA、IL-24mRNA、c-Myc mRNA等、或者这些mRNA的突变型。作为该突变型,可列举出:优选为在除AU富含元件以外的序列、或在一部分的AU富含元件中,置换、缺失、添加、或插入了1个或多个(例如,2个~50个、优选为2个~20个、更优选为2个~10个、进一步优选为2个~5个、更进一步优选为2个或3个)碱基的mRNA。

[0185] 工序(a3)中,对于RBMS2,与上述“2.表达盒”中的RBMS2蛋白同样。

[0186] 工序(a3)中,对于细胞,与上述“3-1.利用指标(i)的筛选方法”中的细胞同样。

[0187] 工序(a3)中,接触被检物质的方式没有特别限定。例如可列举出向细胞培养基中添加被检物质的方式。

[0188] 工序(a3)中,被检物质的接触时间没有特别限制,可以根据被检物质的种类等适宜设定。该时间例如为5分钟~72小时。

[0189] 工序(b3)中,对于被检量和对照量的测定,与上述“3-1.利用指标(i)的筛选方法”中的被检表达量和对照表达量的测定同样。

[0190] 工序(c3)中,例如被检量低于对照量时,例如,被检量为对照量的1/2、1/5、1/10、1/20、1/50、或者1/100时,可以选择被检物质作为抑制RBMS2的表达的物质。

[0191] 4.炎症促进因子表达抑制剂

[0192] 本发明涉及含有选自RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种的、炎症促进因子表达抑制剂(在本说明书中,“本发明的制剂”有时称为。)。以下对其进行说明。

[0193] 对于作为表达抑制对象和功能抑制对象的RBMS2,与上述“2.表达盒”中的RBMS2蛋白同样。

[0194] 作为RBMS2表达抑制剂,只要是能够抑制RBMS2蛋白的表达量的物质就没有特别限制,例如可列举出:RBMS2特异性小干扰RNA(siRNA)、RBMS2特异性microRNA(miRNA)、RBMS2

特异性反义核酸、它们的表达载体等。另外,除这些以外在本实施例中示出IL-10蛋白可作为RBMS2表达抑制剂发挥作用的情况。

[0195] RBMS2特异性siRNA只要是特异性抑制编码RBMS2的基因的表的双链RNA分子就没有特别限制。在一个实施方式中,siRNA例如优选为18个碱基以上、19个碱基以上、20个碱基以上、或21个碱基以上的长度。另外,siRNA例如为优选为25个碱基以下、24个碱基以下、23个碱基以下、或22个碱基以下的长度。此处记载的siRNA的长度的上限值和下限值可设想任意地组合。例如可设想有如下组合:下限为18碱基、上限为25个碱基、24个碱基、23个碱基、或22个碱基的长度;下限为19个碱基、上限为25个碱基、24个碱基、23个碱基、或22个碱基的长度;下限为20个碱基、上限为25个碱基、24个碱基、23个碱基、或22个碱基的长度;下限为21个碱基、上限为25个碱基、24个碱基、23个碱基、或22个碱基的长度。

[0196] siRNA可以是短发夹状RNA(shRNA:small hairpin RNA)。shRNA可以设计成其一部分形成茎环结构。例如,将某区域的序列作为序列a,将相对于序列a的互补链作为序列b时,对于shRNA可以设计成:以依次为序列a、间隔子、序列b的方式使这些序列存在于一条RNA链上,整体为45~60碱基的长度。序列a是编码作为靶标的RBMS2的碱基序列的一部分区域的序列,靶区域没有特别限定,可以使用任意的区域作为候选。此外序列a的长度为19~25个碱基、优选为19~21个碱基。

[0197] RBMS2特异性siRNA还可以在5'或3'末端具有添加的碱基。该添加的碱基的长度通常为2~4个碱基左右。该添加的碱基可以是DNA或RNA,但是有DNA时,有时能够提高核酸的稳定性。作为这样的添加的碱基的序列,例如可列举出:ug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'等序列,但不限于这些。

[0198] siRNA还可以在3'末端具有突出部序列(overhang),具体而言可列举出:添加了dTdT(dT表示脱氧胸苷)的突出端。另外,可以是没有末端添加的平端(blunt end)。对于siRNA,正义链与反义链可以是不同的碱基数,例如可以列举出:反义链在3'末端和5'末端具有突出部序列(悬突)的“不对称干扰RNA(aiRNA)”。对于典型的aiRNA:反义链由21个碱基组成,正义链由15个碱基组成,在反义链的两端为各3个碱基的悬突结构。

[0199] RBMS2特异性siRNA的靶序列的位置没有特别限制,在一个实施方式中,期望的是:从5'-UTR和起始密码子起至约50个碱基为止、以及从除3'-UTR以外的区域选择靶序列。对于选择的靶序列的候选组,优选:使用BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)等的同源性搜索软件来调查在除靶序列以外的mRNA中连续的16-17个碱基序列是否具有同源性,确认所选择的靶序列的特异性。对于已确认了特异性的靶序列,还可以将由在AA(或NA)之后的19-21个碱基具有TT或UU的3'末端悬突的正义链、及具有与该19-21个碱基互补的序列和TT或UU的3'末端悬突的反义链组成的双链RNA设计为siRNA。另外,作为siRNA的前体的shRNA可以通过适宜选择可形成茎环结构的任意连接序列(例如,5-25个碱基左右),借助该连接序列连接上述正义链和反义链来设计。

[0200] siRNA和/或shRNA的序列可以使用各种网站上免费提供的检索软件进行检索。作为这样的网站,例如可以列举出以下。

[0201] Ambion所提供的siRNA Target Finder(http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) pSilencer(注册商标) Expression Vector用批设计工具(http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html) RNAi Codex所

提供的GeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>)。

[0202] siRNA还可以通过如下方式制备:利用DNA/RNA自动合成机分别合成mRNA上的靶序列的正义链和反义链,在适当的退火缓冲液中以约90℃~约95℃进行约1分钟左右变性后,以约30~约70℃进行约1~约8小时退火。另外,还可以通过如下方式制备:合成作为siRNA的前体的shRNA,使用RNA切断蛋白质dicer酶(dicer)将其切断。

[0203] RBMS2特异性miRNA只要抑制编码RBMS2的基因的翻译就为任意的。例如,miRNA可以与靶向的3'非翻译区域(UTR)配对并抑制靶mRNA的翻译,而不是像siRNA那样切断靶mRNA。miRNA可以是pri-miRNA(初级miRNA)、pre-miRNA(前体miRNA)和成熟miRNA中的任意者。miRNA的长度没有特别限制,pri-miRNA的长度通常为数百~数千个碱基;pre-miRNA的长度通常为50~80个碱基;成熟miRNA的长度通常为18~30个碱基。在一个实施方式中,RBMS2特异性miRNA优选为pre-miRNA或成熟miRNA、更优选为成熟miRNA。这样的RBMS2特异性miRNA可以利用公知的方法合成,还可以由提供合成RNA公司购入。

[0204] RBMS2特异性反义核酸是指:包含与编码RBMS2的基因的mRNA的碱基序列互补的或实质上互补的碱基序列或其一部分的核酸,是通过与该mRNA形成特异性且稳定的双链并与mRNA结合,从而具有抑制RBMS2蛋白合成的功能的核酸。反义核酸可以是DNA、RNA、DNA/RNA嵌合体中的任意者。反义核酸为DNA时,由靶RNA与反义DNA形成的RNA:DNA杂合体被内源性核糖核酸酶H(RNase H)识别并引起靶RNA选择性降解。因此,是针对由RNase H导致降解的反义DNA的情况下,靶序列不仅可以是mRNA中的序列,还可以是RBMS2基因的初始翻译产物中的内含子区域的序列。内含子序列可以通过使用BLAST、FASTA等同源性搜索程序对基因组序列和RBMS2基因的cDNA碱基序列进行比较来加以确定。

[0205] 对于RBMS2特异性反义核酸的靶区域,只要是通过使该反义核酸与之杂交而结果抑制翻译成RBMS2蛋白的物质,其长度就没有限制。RBMS2特异性反义核酸可以是编码RBMS2的mRNA的全部序列或部分序列。若考虑到合成的容易度、抗原性、细胞内转移性的问题等,优选由约10个~约40个碱基、特别优选由约15个~约30个碱基组成的寡核苷酸,但不仅限于这些。更具体而言,可以选择RBMS2基因的5'端发夹环、5'端非翻译区域、翻译起始密码子、蛋白质编码区域、ORF翻译终止密码子、3'端非翻译区域、3'端回文区域或3'端发夹环等作为反义核酸的优选靶区域,但不仅限于这些。

[0206] RBMS2特异性反义核酸不仅与RBMS2基因的mRNA、初始转录产物杂交而抑制翻译成蛋白质,而且还可以是与作为双链DNA的这些基因结合形成三股螺旋(Triplex)来抑制转录成RNA(反基因(antigene))。

[0207] 为了提高稳定性(化学的和/或对于酶的)、比活性(与RNA的亲合性),构成上述的RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA和RBMS2特异性反义核酸的核苷酸分子还可以包含各种化学修饰。例如,为了防止由核酸酶等水解酶导致的降解,可以将构成反义核酸的各核苷酸的磷酸残基(磷酸酯)置换为例如硫代磷酸酯(phosphorothioate;PS)、甲基磷酸酯(methylphosphonate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)等化学修饰磷酸残基。另外,可以将各核苷酸的糖(核糖)的2'位的羟基置换为-OR(R=CH₃(2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃(2'-O-MOE)、CH₂CH₂NHCH₃(NH)、CH₂CONHCH₃、或CH₂CH₂CN等)。进而,还可以对碱基部分(嘧啶、嘌呤)实施化学修饰,例如还可以实施向嘧啶碱基的5位导入甲基、阳离子性官能团;或者将2位的羰基置换为硫代羰基等。另外,构成siRNA、miRNA的核苷酸分子的一部分还可以置换为天然

型的DNA。

[0208] RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA和RBMS2特异性反义核酸等可以通过如下方式制备：基于RBMS2基因的cDNA序列或基因组DNA序列来确定mRNA或初始转录产物的靶序列，使用市售的DNA/RNA自动合成机，合成与其互补的序列。另外，包含上述的各种修饰的反义核酸也可以利用任意公知的方法进行化学合成。

[0209] 对于RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA或RBMS2特异性反义核酸的表达载体，只要在能表达的状态下组入了RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA或RBMS2特异性反义核酸就没有特别限定。典型的是，该表达载体包含：启动子序列；包含RBMS2特异性siRNA、RBMS2特异性miRNA或RBMS2特异性反义核酸的编码序列（根据需要进而包含转录终止信号序列）的多核苷酸；根据需要包含的其它序列。启动子没有特别限制，例如可列举出：CMV启动子、EF1启动子、SV40启动子、MSCV启动子、hTERT启动子、 β 肌动蛋白启动子、CAG启动子等RNA聚合酶II (polII) 系启动子；小鼠和人的U6-snrRNA启动子、人H1-RNase P RNA启动子、人缬氨酸-tRNA启动子等RNA聚合酶III (polIII) 系启动子等，其中，从能够准确地进行短RNA的转录这样的观点出发，优选polIII系启动子。作为其它序列，没有特别限制，可以采用各种表达载体所能包含的公知的序列。作为这样的序列的一个例子，例如可列举出复制起点、抗性基因等。另外，抗性基因的种类和载体的种类可以示例出上述物质。

[0210] 作为RBMS2表达抑制剂的其它例子，可列举出RBMS2特异性核酶等。“核酶”狭义上是指具有切断核酸的酶活性的RNA，在本发明中只要具有序列特异性的核酸切断活性就还包括DNA。作为核酶核酸常用性最高的物质有：类病毒、拟病毒等感染性RNA中发现的自我剪接RNA，已知有锤头型、发夹型等。锤头型为约40个碱基左右时发挥酶活性，并且可以仅通过将参与形成锤头结构的部分邻接的两端的各几个碱基（总计约10个碱基左右）转化为与mRNA的期望的切断部位互补的序列，就能够特异性仅切断靶mRNA。该类型的核酶核酸仅将RNA作为底物，因此具有不会攻击基因组DNA这样的优点。在RBMS2基因的mRNA本身具有双链结构的情况下，通过使用连接了能与RNA解旋酶特异性结合的源自病毒核酸的RNA基序的杂交核酶，从而能将靶序列变为单链[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,98(10):5572-5577(2001)]。进而，在包含编码核酶的DNA的表达载体的形态下使用该核酶的情况下，为了促进转录产物向细胞质的转移，还可以制成进一步连接了修饰有tRNA的序列的杂交核酶[Nucleic Acids Res.,29(13):2780-2788(2001)]。

[0211] RBMS2功能抑制剂只要能抑制RBMS2蛋白的功能就没有特别限制。此处，抑制RBMS2蛋白的功能是指：例如(x)减少RBMS2与包含AU富含元件的RNA的结合量、和/或(y)减少RBMS2过量表达细胞中的、在3'-UTR中包含AU富含元件的mRNA量或源自前述mRNA的蛋白质量。是否抑制RBMS2蛋白的功能例如可以利用上述“3-2.利用指标(ii)的筛选方法”、“3-3.利用指标(iii)的筛选方法”所述的方法进行判定。

[0212] 作为本发明的制剂的表达抑制对象的炎症促进因子只要是有助于引起生物体内的炎症反应或使其恶化的因子就没有特别限制。作为该因子，例如可列举出IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24、c-Myc等。

[0213] 本发明的制剂可以作为由炎症促进因子（例如IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24、c-Myc等）而发病或恶化的疾病的预防或治疗剂使用。作为该疾病，具体而言，例如可列举出免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等。作为诊断对象疾病，更具体而言，例如

可列举出自身免疫疾病、风湿性疾病、类风湿性关节炎、退行性关节炎、关节炎、败血症、淋巴组织增生病、中枢神经系统脱髓鞘疾病、脊柱关节病、炎性痛、术后疼痛、变应性疾病等，优选列举出自身免疫疾病、类风湿性关节炎、淋巴组织增生病、中枢神经系统脱髓鞘疾病、术后疼痛、变应性疾病等，更优选列举出类风湿性关节炎。

[0214] 在本发明中的自身免疫疾病包括以下的疾病，但不限于这些，格林-巴利综合征、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、格雷夫斯病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多肌炎、硬皮病、干燥综合征。

[0215] 在本发明中的风湿性疾病包括如下疾病，但不限于这些，类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、多肌炎、血管炎症候组、白塞病、干燥综合征、牛皮癣性关节炎。

[0216] 在本发明中的退行性关节炎包括如下疾病，但不限于这些，膝关节骨性关节炎、髋关节骨性关节炎、肘关节骨性关节炎、肩关节骨性关节炎、腕关节骨性关节炎、足关节骨性关节炎。

[0217] 在本发明中的淋巴组织增生病包括如下疾病，但不限于这些，淋巴水肿、淋巴腺炎、恶性淋巴瘤、卡斯尔门病。

[0218] 在本发明中的中枢神经系统脱髓鞘疾病包括如下疾病，但不限于这些，多发性硬化症、急性播散性脑脊髓炎、弥漫性硬化症。

[0219] 在本发明中的脊柱关节病包括如下疾病，但不限于这些，强直性脊柱炎、反应性关节炎、牛皮癣性关节炎。

[0220] 在本发明中的炎性痛包括如下疾病，但不限于这些，骨关节炎、腰痛、肩周炎、颈肩腕综合症、屈指肌腱鞘炎、牙髓炎疼痛。

[0221] 在本发明中的变应性疾病包括如下疾病，但不限于这些，接触性皮炎、湿疹、荨麻疹、昆克氏水肿、结节性红斑、特应性皮炎等变应性皮肤疾病、过敏性鼻炎、支气管哮喘、药物过敏、食物过敏。

[0222] 本发明的制剂只要是含有选自由RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种(在本说明书中，有时简称为“有效成分”。)就没有特别限制，根据需要还可以进一步包含其它成分。作为其它成分，只要是药学上可接受的成分就没有特别限定，例如可列举出基剂、载体、溶剂、分散剂、乳化剂、缓冲剂、稳定剂、赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、增稠剂、保湿剂、着色料、香料、螯合剂等。

[0223] 本发明的制剂的使用方式没有特别限制，可以根据其种类采用适宜的使用方式。本发明的制剂例如可以在体外使用(例如，添加至培养细胞的培养基中。)，还可以在体内使用(例如，投与至动物。)

[0224] 本发明的制剂的应用对象没有特别限定，例如可列举出：人、猴、小鼠、大鼠、狗、猫、兔子、猪、马、牛、绵羊、山羊、鹿等各种哺乳类动物；动物细胞等。细胞的种类也没有特别限制，例如可列举出血液细胞、造血干细胞/前体细胞、配子(精子、卵子)、成纤维细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、神经细胞、肝细胞、角质形成细胞、肌细胞、表皮细胞、内分泌细胞、ES细胞、iPS细胞、组织干细胞、癌细胞等。

[0225] 本发明的制剂的剂型没有特别限制，可以根据其使用方式采用适宜的剂型。例如，若为对动物给予的情况，例如可列举出：片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、细粒剂、糖浆剂、肠溶

剂、缓释胶囊剂、咀嚼片、滴剂、丸剂、内用液体制剂、糖果片剂、缓释剂、缓释颗粒剂等经口剂；点鼻剂、吸入剂、肛门栓剂、插入剂、灌肠剂、嗜喱剂等外用剂等。另外，本发明的制剂可以是固体制剂、半固体制剂、液体制剂中的任意者。

[0226] 本发明的制剂中的有效成分的含量取决于使用方式、应用对象、应用对象的状态等，没有限定，但例如可以是0.0001~100重量%、优选为0.001~50重量%。

[0227] 将本发明的制剂向动物给药时的给药量只要是显现出药效的有效量就没有特别限定，通常作为有效成分的重量，通常经口给药的情况，每天为0.1~1000mg/kg体重、优选为每天0.5~500mg/kg体重，非经口给药的情况，每天为0.01~100mg/kg体重、优选为0.05~50mg/kg体重。上述给药量优选1天1次或分成2~3次给药，还可以根据年龄、病情、症状进行适宜增减。

[0228] 5. 诊断药

[0229] 本发明涉及含有RBMS2基因表达产物检测剂的、动物疾病的诊断药（在本说明书中，有时还示为“本发明的诊断药”）。以下对其进行说明。

[0230] 作为RBMS2基因表达产物检测剂的检测对象的RBMS2基因表达产物只要是在诊断对象生物的生物体内表达的RBMS2基因表达产物就没有特别限定，例如可列举出RBMS2mRNA或源自其的核酸（cDNA等）、RBMS2蛋白等。

[0231] 诊断对象动物只要是能在生物体内表达RBMS2基因的动物就没有特别限制，例如可列举出人、猴、小鼠、大鼠、狗、猫、兔子等各种哺乳类。

[0232] 源自各种动物的RBMS2mRNA和RBMS2蛋白的序列是公知的。具体而言，例如作为人RBMS2mRNA，可列举出由序列号3所示的碱基序列组成的mRNA（NCBI Reference Sequence: NM_002898.3），作为小鼠RBMS2mRNA，可列举出由序列号4所示的碱基序列组成的mRNA（NCBI Reference Sequence: NM_019711.2）。作为人RBMS2蛋白，可列举出由序列号2所示的氨基酸序列组成的蛋白质（NCBI Reference Sequence: NP_002889.1），作为小鼠RBMS2蛋白，可列举出由序列号5所示的氨基酸序列组成的蛋白质（NCBI Reference Sequence: NP_062685.2）。另外，RBMS2蛋白中还包括缺失N末端类型的蛋白质，作为这种类型的蛋白质，例如若为小鼠的情况，可列举出由序列号6所示的氨基酸序列组成的蛋白质（NCBI Reference Sequence: NP_001034169.1）（mRNA由序列号7所示的碱基序列组成的mRNA（NCBI Reference Sequence: NM_001039080.1））。

[0233] 作为检测对象的RBMS2蛋白只要是具有能够促进源自炎症促进因子mRNA（例如，IL-6mRNA、COX-2mRNA、IL-8mRNA、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA、MMP1mRNA、IL-24mRNA、c-Myc mRNA等）的3' UTR的mRNA或从该mRNA翻译的蛋白质的表达的活性（炎症促进因子表达促进活性）就还可以具有置换、缺失、添加、插入等氨基酸突变。作为突变，从更不易损害炎症促进因子表达促进活性这样的观点出发，可列举出：优选为置换、更优选为保守性置换。

[0234] 另外，对于作为检测对象的RBMS2mRNA，还有从该mRNA翻译的蛋白质只要具有炎症促进因子表达促进活性，还可以具有置换、缺失、添加、插入等碱基突变。作为突变，优选从该mRNA翻译的蛋白质中不发生氨基酸置换的突变、或者发生氨基酸的保守性置换的突变。

[0235] 炎症促进因子表达促进活性的有无可以按照或依据公知的方法进行判定。例如，可以按照或依据实施例记载的方法进行判定。作为具体例，在实施例1B中，在使用被检蛋白质的表达载体作为表达载体的情况下，若与使用了空载体的情况相比荧光素酶活性高，

则能够判定该被检蛋白质具有炎症促进因子表达促进活性。

[0236] 作为检测对象的RBMS2蛋白的优选的具体例,可列举出选自由下述(a)中记载的蛋白质和下述(b)中记载的蛋白质组成的组中的至少1种:

[0237] (a)由序列号2、5、或6所示的氨基酸序列组成的蛋白质、和

[0238] (b)由具有与序列号2、5或6所示的氨基酸序列85%以上的同一性的氨基酸序列组成且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0239] 上述(b)中,同一性优选为90%以上、更优选为95%以上、进一步优选为98%以上。

[0240] 作为上述(b)中记载的蛋白质的一个例子,例如可列举出:

[0241] (b')由在序列号2、5、或6所示的氨基酸序列中置换、缺失、添加、或插入了1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列组成、且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0242] 上述(b')中,多个是指:例如2个~30个、优选为2个~10个、更优选为2个~5个、更进一步优选为2个或3个。

[0243] 作为检测对象的RBMS2mRNA的优选的具体例,可列举出选自由下述(c)中记载的蛋白质和下述(d)中记载的mRNA组成的组中的至少1种:

[0244] (c)由序列号3、4、或7所示的碱基序列组成的mRNA、和

[0245] (d)由具有与序列号3、4、或7所示的碱基序列85%以上的同一性的碱基序列组成、且编码具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质的mRNA。

[0246] 上述(d)中,同一性优选为90%以上、更优选为95%以上、进一步优选为98%以上。

[0247] 作为上述(d)中记载的蛋白质的一个例子,例如可列举出:

[0248] (d')由在序列号3、4、或7所示的碱基序列中置换、缺失、添加、或插入了1个或多个碱基的碱基序列组成、且具有炎症促进因子表达促进活性的蛋白质。

[0249] 上述(d')中,多个是指:例如2~500个、优选为2~100个、更优选为2~50个、更进一步优选为2~10个。

[0250] RBMS2基因表达产物检测剂只要是能够检测和定量上述的RBMS2基因表达产物的物质就没有特别限定。作为RBMS2基因表达产物检测剂,在RBMS2基因表达产物为核酸(例如,RBMS2mRNA、源自其的核酸(cDNA等)等)的情况下,例如可列举出引物、探针等,在RBMS2基因表达产物为蛋白质的情况下,例如可列举出抗体等。

[0251] 引物、探针等只要是选择性地(特异性)识别RBMS2mRNA、源自其的核酸等就没有特别限定。此处,“选择性地(特异性)识别”是指:例如诺瑟杂交法能够特异性检测出RBMS2mRNA的意思,另外是指RT-PCR法可使RBMS2mRNA或源自其的核酸(cDNA等)特异性扩增的意思,但不限于此,只要本领域技术人员能够判断出上述检测物或扩增物为源自RBMS2mRNA即可。

[0252] 作为引物、探针的具体例,可列举出选自由下述(e)中记载的多核苷酸以及下述(f)中记载的多核苷酸组成的组中的至少1种:

[0253] (e)在RBMS2mRNA的碱基序列中具有连续的至少15个碱基的多核苷酸和/或与该多核苷酸互补的多核苷酸;以及

[0254] (f)在严格的条件下与RBMS2mRNA的碱基序列或与其互补的碱基序列杂交的、具有至少15个碱基的多核苷酸。

[0255] 互补的多核苷酸或互补的碱基序列(互补链、负链)是指:基于A:T和G:C这样的碱

基对关系,与由RBMS2mRNA的碱基序列组成的多核苷酸的全长序列或者该碱基序列中具有至少连续的15个碱基长的碱基序列的其部分序列(此处为方便起见也将它们称为“正链”)是处于碱基互补的关系中的多核苷酸或碱基序列。其中,上述互补链不限于与作为对象的正链的碱基序列完全形成互补序列的情况,还可以是具有能够与作为对象的正链在严格的条件下杂交程度的互补关系的互补链。需要说明的是,此处严格的条件可以如Berger and Kimmel(1987,Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152,Academic Press,San Diego CA)中所教导的那样,基于结合复合体或者探针的核酸的熔解温度(T_m)来确定。例如作为杂交后的清洗条件,通常可以列举出:“ $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 37°C ”程度的条件。互补链优选即使在上述条件下进行清洗也能够维持与作为对象的正链杂交状态。没有特别限制,但作为更严格的杂交条件,可以列举出“ $0.5\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 42°C ”程度、作为进一步严格的杂交条件,可以列举出“ $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 65°C ”程度的清洗条件。具体而言,作为这样的互补链,可以示例出:由与对象的正链的碱基序列处于完全互补关系的碱基序列组成的链、以及由与该链具有至少90%、优选为95%、更优选为98%以上、进一步优选为99%以上的同一性的碱基序列组成的链。

[0256] 引物、探针等可以以例如序列号3、4、或7所示的RBMS2mRNA的碱基序列为基础,并利用例如载体NTI (Infomax公司制)来设计。具体而言还可以将前述RBMS2mRNA的碱基序列用于载体NTI的软件而得到的、引物或探针的候选序列、或至少包含一部分该序列的序列作为引物或探针使用。

[0257] 引物、探针等的碱基长度只要是如上所述具有连续的至少15个碱基长度的物质就没有特别限制,可以根据用途进行适宜设定。作为碱基长度,例如作为引物使用的情况,可以示例出例如15个碱基~100个碱基、优选为15个碱基~50个碱基、更优选为15个碱基~35个碱基,例如作为探针使用的情况,可以示例出例如15个碱基~全序列的碱基数、优选为15个碱基~1000个碱基、更优选为100个碱基~1000个碱基。

[0258] 引物、探针等只要不显著地损害其功能就还可以实施修饰。作为修饰,例如可列举出:例如荧光色素、酶、蛋白质、放射性同位素、化学发光物质、生物素等标记物的添加。

[0259] 作为在本发明中可使用的荧光色素,通常可以适宜地使用标记核苷酸并用于核酸的检测、定量的荧光色素,例如可以列举出:HEX (4,7,2',4',5',7'-六氯-6-羧基荧光素、绿色荧光色素)、荧光素 (fluorescein)、NED (商品名、Applied Biosystems公司制、黄色荧光色素)、或者,6-FAM (商品名、Applied Biosystems公司制、黄绿色荧光色素)、罗丹明 (rhodamin) 或其衍生物 (例如,四甲基罗丹明 (TMR)),但不限于这些。利用荧光色素标记核苷酸的方法可以使用公知的标记法中适当的方法 (参照Nature Biotechnology,14,303-308 (1996))。另外,还可以使用市售的荧光标记试剂盒 (例如,Amersham Pharmacia公司制、寡核苷酸ECL 3'-寡核苷酸标记系统等)。

[0260] 引物还可以固定化于任意的固相来使用。因此,本发明的诊断药可以将探针 (寡核苷酸或多核苷酸) 作为固定化探针 (例如固定了探针的DNA芯片、cDNA微阵列、寡核苷酸DNA阵列、薄膜滤器等。以下总称为“DNA芯片等”) 的形态来提供。

[0261] 用于固定化的固相只要是能够固定化寡核苷酸或多核苷酸的物质就没有特别限制,可以列举出例如玻璃板、尼龙膜、微珠、硅芯片、毛细管或其其它基板等。在固相上的寡核苷酸或多核苷酸的固定可以是如下方法:将预先合成的寡核苷酸或多核苷酸搭载于固相

上的方法;另外还可以是在固相上合成目标寡核苷酸或多核苷酸的方法。对于固定方法,例如为DNA微阵列时,利用市售的测位器(Amersham公司制等)等、根据固定化探针的种类在该技术领域是公知的(例如,基于光刻技术(Affymetrix公司)、喷墨技术(Rosetta Inpharmatics公司)进行的寡核苷酸的原位合成等)。

[0262] 抗体等只要是选择性地(特异性)识别RBMS2蛋白的物质就没有特别限定。此处,“选择性地(特异性)识别”是指:在例如免疫印迹法、ELISA法中,能够特异性检测出RBMS2蛋白的意思,但不限于此,只要是本领域技术人员能够判断出上述检测物为源自RBMS2蛋白的物质即可。

[0263] 抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合体抗体、单链抗体、或Fab片段、如通过Fab表达文库生成的片段等那样具有抗原结合性的上述抗体的一部分。与RBMS2蛋白的氨基酸序列中至少由连续的通常为8个氨基酸、优选为15个氨基酸、更优选为20个氨基酸组成的多肽具有抗原结合性的抗体也包含在本发明的抗体中。

[0264] 这些抗体的制造方法已经是公知的,本发明的抗体也可以依据它们的常规方法来制造(Current protocols in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13 (2000))。具体而言,本发明的抗体为多克隆抗体的情况,可以依据常规方法使用利用大肠杆菌等的表达、纯化的RBMS2蛋白、或者依据常规方法合成具有该RBMS2蛋白的部分氨基酸序列的寡核苷酸肽,使家兔等非人动物免疫,依据常规方法由该免疫动物的血清得到。另一方面,是单克隆抗体的情况下,可以依据常规方法使用利用大肠杆菌等的表达、纯化的RBMS2蛋白、或者使小鼠等非人动物免疫具有RBMS2蛋白的部分氨基酸序列的寡核苷酸肽,由使得到的脾脏细胞和骨髓瘤细胞进行细胞融合而制备的杂交瘤细胞中得到(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

[0265] 制作抗体时作为免疫抗原使用的RBMS2蛋白可以如下方式得到:基于公知的基因序列信息,进行DNA克隆、各质粒的构建、向宿主的转染、转化体的培养和从培养物中回收蛋白质的操作。这些操作可以通过本领域技术人员依据已知的方法、或者文献中记载的方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, D. M. Glover, IRL PRESS (1985))等来进行。

[0266] 具体而言,可以通过如下方式得到作为用于制造本发明抗体的免疫抗原的蛋白质:制作在期望的宿主细胞中能表达编码RBMS2的基因的重组DNA(表达载体),将其导入宿主细胞中并进行转化,培养该转化体,由得到的培养物回收目标蛋白质。另外RBMS2蛋白的部分肽还可以依据公知的基因序列信息,并利用通常的化学合成法(肽合成)来制造。

[0267] 另外本发明的抗体还可以使用具有RBMS2蛋白的部分氨基酸序列的寡核苷酸肽来制备。用于制造上述抗体所使用的寡(多)肽无需具有功能性的生物活性,但期望的是具有与RBMS2蛋白同样的免疫原特性。可以优选示例出:具有该免疫原特性,且由RBMS2蛋白的氨基酸序列中至少连续的8个氨基酸、优选为15个氨基酸、更优选为20个氨基酸组成的寡(多)肽。

[0268] 针对上述寡(多)肽的抗体的制造还可以通过根据宿主使用各种佐剂来提高免疫学反应。没有限定,这样的佐剂包括:弗氏佐剂、氢氧化铝之类的矿物凝胶、以及溶血卵磷脂、pluronic多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、血蓝素和二硝基苯酚之类的表面活性物质、卡

介苗 (BCG:BACILLE CALMETTE-GUERIN)、短小棒状杆菌等人佐剂。

[0269] 本发明的诊断药只要含有上述的RBMS2基因表达产物检测剂就没有特别限定,仅由该检测剂组成的物质、除了该检测剂之外,例如还可以包含检测RBMS2基因表达产物所需的物质。作为这样的物质的具体例,可列举出杂交用的试剂、探针的标记、标签体的检测剂、缓冲液、器具等。本发明的诊断药可以是包含这些的诊断药试剂盒的形态。

[0270] 本发明的诊断药的诊断对象疾病只要是由炎症促进因子(例如IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24、c-Myc等)导致发病或恶化的疾病就没有特别限制。作为诊断对象疾病,具体而言,例如可列举出免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等。作为诊断对象疾病,更具体而言,例如可列举出自身免疫疾病、风湿性疾病、类风湿性关节炎、退行性关节炎、关节炎、败血症、淋巴组织增生病、中枢神经系统脱髓鞘疾病、脊柱关节病、炎性痛、术后疼痛、变应性疾病等,优选列举出自身免疫疾病、类风湿性关节炎、淋巴组织增生病、中枢神经系统脱髓鞘疾病、术后疼痛、变应性疾病等,更优选列举出类风湿性关节炎。

[0271] 在本发明中的自身免疫疾病包括如下疾病,但不限于于这些,格林-巴利综合征、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、格雷夫斯病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多肌炎、硬皮病、干燥综合征。

[0272] 在本发明中的风湿性疾病包括如下疾病,但不限于于这些,类风湿性关节炎、若年性特发性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、多肌炎、血管炎症候组、白塞病、干燥综合征、牛皮癣性关节炎。

[0273] 在本发明中的退行性关节炎包括如下疾病,但不限于于这些,膝关节骨性关节炎、髋关节骨性关节炎、肘关节骨性关节炎、肩关节骨性关节炎、腕关节骨性关节炎、足关节骨性关节炎。

[0274] 在本发明中的淋巴组织增生病包括如下疾病,但不限于于这些,淋巴水肿、淋巴腺炎、恶性淋巴瘤、卡斯尔门病。

[0275] 在本发明中的中枢神经系统脱髓鞘疾病包括如下疾病,但不限于于这些,多发性硬化症、急性播散性脑脊髓炎、弥漫性硬化症。

[0276] 在本发明中的脊柱关节病包括如下疾病,但不限于于这些,强直性脊柱炎、反应性关节炎、牛皮癣性关节炎。

[0277] 在本发明中的炎性痛包括如下疾病,但不限于于这些,骨关节炎、腰痛、肩周炎、颈肩腕综合症、屈指肌腱鞘炎、牙髓炎疼痛。

[0278] 在本发明中的变应性疾病包括如下疾病,但不限于于这些,接触性皮炎、湿疹、荨麻疹、昆克氏水肿、结节性红斑、特应性皮炎等变应性皮肤疾病、过敏性鼻炎、支气管哮喘、药物过敏、食物过敏。

[0279] 本发明的诊断药如后述的“2.疾病的检测方法”和“3.疾病的进展程度的判定方法”中记载所述,能用于上述诊断对象疾病的有无(即,被检体是否患有疾病)的诊断、和上述诊断对象疾病的进展程度的诊断。

[0280] 2.疾病的检测方法

[0281] 本发明涉及以RBMS2表达量为指标的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的检测方法(在本说明书中,还示为“本发明的疾病检测方法”)。以下对其进行说明。

[0282] 作为本发明的疾病检测方法的具体方式,例如可列举出以下的方式:

[0283] 一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的检测方法,其具有如下工序:

[0284] (a1) 测定从被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序、和

[0285] (b1) 将上述工序(a1)中测定的被检表达量、与从未患有免疫疾病、炎症性疾病和疼痛性疾病中任一种疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序,

[0286] (c1) 将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的指标。

[0287] 被检体为本发明的疾病检测方法的对象,其生物物种没有特别限定。例如可列举出:人、猴、小鼠、大鼠、狗、猫、兔子等各种哺乳类。

[0288] 试样只要是包含RBMS2基因表达产物的试样就没有特别限制,可根据检测对象疾病的种类等进行适宜选择。作为试样,例如可列举出血液试样、尿试样、其它各种组织片等。作为试样,可以使用直接从生物体中收集的物质,但优选依据常规方法对检测对象的RBMS2基因表达产物进行了纯化/浓缩的物质。另外,在检测对象的RBMS2基因表达产物为核酸的情况下,还可以由RBMS2mRNA制备反映出该mRNA的序列信息的核酸(例如cDNA等),将其作为试样使用。

[0289] RBMS2基因表达产物的被检表达量和对照表达量的测定可以按照或依据公知的方法进行。可以适宜地使用上述的本发明的诊断药来进行。RBMS2基因表达产物为核酸(RBMS2mRNA或源自其的核酸(cDNA等))时,例如可以使用本发明的诊断药作为探针、引物,并利用诺瑟杂交法、RT-PCR法、DNA芯片解析法、原位杂交解析法等进行测定。RBMS2基因表达产物为蛋白质时,例如可以使用本发明的诊断药作为抗体,并利用免疫印迹法、ELISA法等进行测定。

[0290] 利用诺瑟杂交法的情况,通过使用本发明的诊断药作为探针,从而能够测定试样中的RBMS2mRNA或源自其的核酸的有无、及其量。具体而言,可以示例出如下方法:用放射性同位素(^{32}P 、 ^{33}P 等:RI)、荧光物质等标记本发明的诊断药(互补链),将其与依据常规方法转移至尼龙膜等上的源自被检者的试样的mRNA杂交后,对于所形成的诊断药与源自被检者的试样的mRNA的双链,通过辐射探测器BAS-1800II(FUJIFILM Corporation制)或荧光检测器等检测、测定源自诊断药的标记物(RI或荧光物质等标记物质)的信号。另外,还可以使用如下方法:使用AlkPhos Direct Labelling and Detection System(Amersham Pharmacia Biotech公司制)并依据该方案标记诊断药,与源自被检者的试样的mRNA杂交后,通过multibioimager STORM860(Amersham Pharmacia Biotech公司制)检测、测定源自诊断药的标记物的信号。

[0291] 利用RT-PCR法的情况,可以通过使用本发明的诊断药作为引物,从而能够测定试样中的RBMS2mRNA或源自其的核酸的有无、及其量。具体而言可以示例出如下方法:由源自被检者的生物体组织的RNA依据常规方法制备cDNA,使其与由本发明的诊断药制备的一对引物(与上述cDNA(-链)结合的正链、与+链结合的负链)杂交,依据常规方法进行PCR法以使将该cDNA作为模板的靶区域能够扩增,再对得到的扩增双链DNA进行检测。需要说明的是,经扩增的双链DNA的检测可以使用如下方法:通过使用预先用RI、荧光物质进行了标记的引物来进行上述PCR,再对所产生的标记双链DNA进行检测;依据常规方法使所产生的双链DNA转移至尼龙膜等上,使用标记的诊断药作为探针与其杂交并进行检测的方法等。需要

说明的是,生成的标记双链DNA产物可以利用Agilent 2100Bioanalyzer (Yokogawa Analytical Systems Inc.制) 等进行测定。另外,还可以利用SYBR Green RT-PCR Reagents(Applied Biosystems公司制) 并依据该方案制备RT-PCR反应液,利用ABI PRISM 7700Sequence Detection System(Applied Biosystems公司制) 使其反应来检测该反应物。

[0292] 利用DNA芯片解析的情况,可以列举出如下方法:将本发明的诊断药作为DNA探针(单链或双链)来准备粘贴有DNA芯片,使其与由源自被检者的生物体组织的RNA利用常规方法制备的cRNA杂交,使所形成的DNA与cRNA的双链与由本发明的诊断药制备的标记探针结合来进行检测。

[0293] 免疫印迹法可示例出如下方法:使用本发明的诊断药作为第一抗体后,作为第二抗体使用利用¹²⁵I等放射性同位素、荧光物质、辣根过氧化物酶(HRP)等酶等进行了标记的标记抗体(与第一抗体结合的抗体),通过辐射检测器BAS-1800II(FUJIFILM Corporation制等)、荧光检测器等检测、测定得到的源自标记化合物的放射性同位素、荧光物质等标记物质的信号。另外,还可以使用本发明的诊断药作为第一抗体后,使用ECL Plus Western Blotting Detection System(Amersham Pharmacia Biotech公司制) 并依据该方案进行检测,利用multibioimager STORM860(Amersham Pharmacia Biotech公司制) 进行测定。

[0294] 作为与被检表达量的对比对象的对照表达量可以是1个被检体的对照表达量,但优选多个被检体的对照表达量的平均值、中央值等。

[0295] 就被检体是否为免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的判断而言,以与对照表达量相比被检表达量高作为基准来判断。具体而言,例如可以以与对照表达量相比被检表达量上升50%以上、优选上升100%以上、更优选上升200%以上作为指标来进行。

[0296] 3.疾病的进展程度的判定方法

[0297] 本发明涉及以RBMS2表达量为指标的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度的判定方法(在本说明书中,还示为“本发明的进展程度判定方法”)。以下对其进行说明。

[0298] 作为本发明的进展程度判定方法的具体方式,例如可列举出以下的方式:

[0299] 一种免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度的判定方法,其具有如下工序:

[0300] (a2) 测定从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的被检表达量的工序;

[0301] (b2) 将上述工序(a2)中测定的被检表达量、与从患有免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的对照被检体收集的试样中的RBMS2基因表达产物的对照表达量进行对比的工序;和

[0302] (c3) 将被检表达量高于对照表达量的情况作为判断被检体具有比对照被检体的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度高的指标。

[0303] 对于作为被检体、试样、被检表达量和对照表达量的测定、作为与被检表达量的对比对象的对照表达量等,如上述“2.疾病的检测方法”所述。

[0304] 疾病的进展程度可以定义为与例如IL-6、COX-2、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、MMP1、IL-24、c-Myc等炎症促进因子的表达相关的症状的严重程度。

[0305] 就被检体是否比对照被检体的免疫疾病、炎症性疾病或疼痛性疾病的进展程度高的判断而言,以与对照表达量相比被检表达量高作为基准来判断。具体而言,例如可以以与对照表达量相比被检表达量上升50%以上、优选上升100%以上、更优选上升200%以上作为指标来进行。

[0306] 实施例

[0307] 以下基于实施例对本发明进行详细地说明,但本发明不限于这些实施例。

[0308] 实施例1:作为IL-6转录后调节因子的RBMS2的鉴定

[0309] 实施例1A

[0310] 为了发现IL-6转录后调节因子而进行了筛选。将概要示于图1A。具体而言,如下进行。首先,制作了报道载体,其在SV40启动子的下游从5'侧起配置了荧光素酶的ORF、IL-6的3' UTR(序列号1)。使用转染试剂(Fugene HD、Promega Corporation制)在384孔板上将该报道载体和各种基因的表达载体导入的HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后,测定了各孔中的荧光素酶活性。将得到的测定值与对照(作为表达载体导入了空载体的样品)的测定值进行比较,筛选了相对于对照发生变化的表达载体(1次筛选)。从选择的表达载体中抽取与RNA相关的约100个基因的表达载体,与上述同样地进行了筛选(2次筛选)。

[0311] 2次筛选的结果,鉴定出作为IL-6转录后调节因子的RBMS2(NP_002889.1、序列号2)。

[0312] 实施例1B

[0313] 将实施例1A中制作的报道载体、或从该报道载体中去除了人IL-6的3' UTR的对照报道载体与RBMS2表达载体或空载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后,测定了荧光素酶活性。将结果示于图1B。

[0314] 如图1B所示,RBMS2使荧光素酶活性以IL-6的3' UTR依赖性的方式上升。

[0315] 实施例1C

[0316] 将针对RBMS2的siRNA(人RBMS2-1(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s11867、序列号8)、或人RBMS2-2(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s11868、序列号9)、或对照siRNA(阴性对照(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 产品型号:4390843))导入MDA-MB-231细胞中。自导入起48小时后将IL-1 β 添加至培养基中(最终浓度:20ng/ml),自该添加起3小时后回收了细胞。需要说明的是,MDA-MB-231细胞恒久地产生IL-6,通过IL-1 β 刺激以更大的量表达IL-6。由细胞制备cDNA,通过定量PCR测定了RBMS2mRNA(PCR引物:正向序列号12、反向序列号13)和IL-6mRNA(PCR引物:正向序列号14、反向序列号15)的表达量。将结果示于图1C。

[0317] 如图1C所示,MDA-MB-231细胞中,通过RBMS2表达抑制而使IL-6mRNA的表达量显著降低。

[0318] 实施例1D

[0319] 自导入起36小时后添加IL-1 β ,且自该添加起16小时后回收培养上清液并通过ELISA测定该上清液中的IL-6蛋白表达量,除此以外与实施例1C同样地进行。将结果示于图1D。

[0320] 如图1D所示,MDA-MB-231细胞中,通过RBMS2表达抑制而使IL-6蛋白的表达量显著

降低。

[0321] 实施例1E

[0322] 使MDA-MB-231细胞感染表达RBMS2的逆转录病毒或对照逆转录病毒后,在嘌呤霉素的存在下培养1周,得到RBMS2的强制表达细胞。用IL-1 β 将该细胞刺激3小时后回收细胞,由细胞制备了cDNA。通过定量PCR测定了细胞中的IL-6mRNA的表达量。将结果示于图1E。

[0323] 如图1E所示,通过RBMS2的强制表达而使IL-6mRNA的表达量上升。

[0324] 实施例1F

[0325] 制作了IL-6基因的启动子(序列号36)的下游配置了荧光素酶基因的ORF的报道载体。将该报道载体与RBMS2表达载体或空载体一起导入MDA-MB-231细胞中。自导入起经过48小时后,测定了荧光素酶活性。将结果示于图1F。

[0326] 如图1F所示,RBMS2的表达未对由IL-6启动子诱导的荧光素酶活性产生影响。

[0327] 实施例1的结果

[0328] 由此强烈地表明:RBMS2通过转录后调节而并非IL-6mRNA的转录调节来正向控制IL-6的表达。

[0329] 实施例2:通过RBMS2的基于ARE的IL-6mRNA稳定化

[0330] 实施例2A

[0331] 将RBMS2表达载体或空载体导入THP-1细胞中。自导入起48小时后将LPS添加至培养基中(最终浓度:1 μ g/ml)从而诱导IL-6mRNA的表达,自该添加起5小时后将放线菌素D添加至培养基(最终浓度:5 μ g/ml)从而使mRNA合成停止。从表达载体导入起48小时后、自LPS添加起5小时后、和自放线菌素D添加起3小时后回收细胞,通过定量PCR测定了IL-6mRNA量。将结果示于图2A。

[0332] 如图2A所示,导入了空载体时,通过LPS来诱导IL-6mRNA的表达,但通过放线菌素D处理抑制转录时,IL-6mRNA被迅速降解,其量减少。相对于此,强制表达RBMS2时,通过放线菌素D处理后确认了大量的IL-6mRNA的残留。由该结果表明:通过RBMS2而使IL-6mRNA的半衰期延长。

[0333] 实施例2B

[0334] 制作了四环素类抗生素响应因子(TRE)和启动子的下游自5'侧起配置了荧光素酶的ORF、IL-6的3'UTR而成的四环素类抗生素响应表达载体。该四环素类抗生素响应表达载体与RBMS2表达载体或空载体一起导入预先组入了Tet-off调节质粒的HEK293T细胞中。自导入起24小时后将多西环素添加至培养基中(最终浓度:10 μ g/ml)。从载体导入起24小时后、和自添加多西环素起2小时后回收细胞,通过定量PCR测定了荧光素酶mRNA(PCR引物:正向序列号16、反向序列号17)的量。将结果示于图2B。

[0335] 如图2B所示,在导入了空载体的情况下,通过添加多西环素(mRNA合成停止)而使包含IL-6 3'UTR的荧光素酶mRNA量降低。相对于此,强制表达RBMS2时,通过添加多西环素后确认了大量包含IL-6 3'UTR的荧光素酶mRNA的残留。由该结果表明:通过RBMS2而使包含IL-6 3'UTR的荧光素酶mRNA的半衰期延长。

[0336] 实施例2C

[0337] 制作了启动子的下游自5'侧起配置了荧光素酶的ORF、IL-6的突变型3'UTR(97-267(碱基序列:序列号37)、122-193(碱基序列:序列号38)、 Δ ARE1(碱基序列:序列号39)、

Δ ARE2 (碱基序列: 序列号40)、或ARE突变体 (碱基序列: 序列号41)) 的突变型3' UTR报道载体。将该突变型3' UTR报道载体与RBMS2表达载体或空载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后, 测定了荧光素酶活性。将结果示于图2C。

[0338] IL-6mRNA的3' UTR中存在有与mRNA的稳定化相关的茎环结构及富含AU的AU富含元件 (ARE)。茎环结构是基于作为RNase的Regnase-1 (ZC3H12A) 进行的识别和随后进行的降解的重要元件。另外, 报道了ARID5a通过对抗Regnase-1的功能而有助于IL-6mRNA的稳定化。然而, 如图2C所示, RBMS2使在3' UTR中缺失了该茎环结构的报道基因 (97-267和122-193) 的活性上升。

[0339] 在IL-6mRNA中, 2个相邻的ARE以2部位邻接地存在。已知TTP等ARE结合蛋白通过该区域参与mRNA的降解。如图2C所示, 若缺失一者的ARE区域, 则未观察到由RBMS2带来的报道基因活性的上升 (Δ ARE1和 Δ ARE2)。另外, 即使使ARE的序列突变 (将U置换为G), 也未观察到由RBMS2带来的报道基因活性的上升 (ARE突变体)。由该结果表明: RBMS2通过ARE区域参与了mRNA的稳定化。

[0340] 实施例2的结果

[0341] 由此强烈地表明: RBMS2通过介由ARE区域的mRNA稳定化机制而以转录后水平控制IL-6的表达。

[0342] 实施例3: 通过ARE的RBMS2与IL-6mRNA的结合

[0343] 实施例3A

[0344] 将实施例1A中制作的报道载体 (在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR)、或实施例2C中制作的ARE突变型3' UTR报道载体 (ARE突变体) 与FLAG标记的RBMS2的表达载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起48小时后回收细胞, 制备了细胞溶解液。通过抗FLAG抗体或非特异性IgG对该细胞溶解液进行免疫沉淀, 通过定量PCR测定了免疫沉淀物中所含的荧光素酶mRNA量。将结果示于图3A。

[0345] 如图3A所示, 确认了通过抗FLAG抗体的免疫沉淀, 包含IL-6的野生型3' UTR的荧光素酶mRNA的强浓缩。相对于此, 包含ARE突变型3' UTR的荧光素酶mRNA未被浓缩。由此表明: RBMS2通过ARE而结合。

[0346] 实施例3B

[0347] 将实施例1A中制作的报道载体 (在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR) 与FLAG标记的野生型RBMS2或RRM1结构域缺失型RBMS2 (氨基酸序列: 序列号46) 的表达载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起48小时后回收细胞, 制备了细胞溶解液。对该细胞溶解液通过抗FLAG抗体或非特异性IgG进行免疫沉淀, 通过定量PCR测定了免疫沉淀物中所含的荧光素酶mRNA量。将结果示于图3B。

[0348] 如图3B所示, 即使过量表达RBMS2的RRM1结构域缺失突变体, 也未观察到RNA的浓缩, 因此表明RRM1结构域对于与ARE的结合是重要的。

[0349] 实施例3C

[0350] 将实施例1A中制作的报道载体 (在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR)、与FLAG标记的野生型RBMS2或RRM结构域缺失型RBMS2 (RBMS2 Δ RRM1 (氨基酸序列: 序列号46)、RBMS2 Δ RRM2 (氨基酸序列: 序列号47)、或RBMS2 Δ RRM1/2 (氨基酸序列: 序列号48)) 的表达载体、或者空载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后, 测定了荧光素酶活性。

将结果示于图3C。

[0351] 如图3C所示,在缺失RRM1结构域的RBMS2突变体中,未发现IL-6 3' UTR依赖性的荧光素酶活性的上升。

[0352] 实施例3的结果

[0353] 由此表明:RBMS2通过RRM1结构域与存在于IL-6 mRNA的3' UTR的ARE结合,从而使IL-6的表达增强。

[0354] 实施例4:通过RBMS2进行的包含ARE的基因的表达调控

[0355] 实施例4A

[0356] 将针对RBMS2的siRNA(人RBMS2-1(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s11867、序列号8)、或人RBMS2-2(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s11868、序列号9)、或对照siRNA(阴性对照(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 产品型号:4390843))导入MDA-MB-231细胞中。自导入起48小时后将IL-1 β 添加至培养基中(最终浓度:20 ng/ml),自该添加起3小时后回收了细胞。由细胞制备cDNA,通过定量PCR测定了RBMS2 mRNA(PCR引物:正向序列号12、反向序列号13)、IL-6 mRNA(PCR引物:正向序列号14、反向序列号15)、PTGS2(COX-2) mRNA(PCR引物:正向序列号20、反向序列号21)、IL-8 mRNA(PCR引物:正向序列号22、反向序列号23)、IL-1 β mRNA(PCR引物:正向序列号18、反向序列号19)、NFKBIA mRNA(PCR引物:正向序列号24、反向序列号25)、ZC3H12A mRNA(PCR引物:正向序列号26、反向序列号27)的表达量。将结果示于图4A。

[0357] 如图4A所示,在MDA-MB-231细胞中,通过RBMS2表达抑制而抑制了在3' UTR中具有ARE区域的IL-1 β 、IL-8、和COX-2的表达。另一方面,在3' UTR中不具有ARE区域的NFKBIA、ZC3H12A的表达不存在差异。

[0358] 实施例4B

[0359] 将针对RBMS2的siRNA(小鼠RBMS2-1(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s80716、序列号10)、或小鼠RBMS2-2(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select, siRNA ID No.s80717、序列号11)、或对照siRNA(阴性对照(Thermo Fisher Scientific(Ambion), Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 产品型号:4390843))导入MEF细胞中。自导入起48小时后将LPS、Pam3CSK4或IL-1 β 添加至培养基中(LPS最终浓度:1 μ g/ml、Pam3CSK4最终浓度:1 μ g/ml、或IL-1 β 最终浓度:20 ng/ml),自该添加起3小时后回收了细胞。由细胞制备cDNA,通过定量PCR测定了RBMS2 mRNA(PCR引物:正向序列号28、反向序列号29)、IL-6 mRNA(PCR引物:正向序列号30、反向序列号31)、IL-1 β mRNA(PCR引物:正向序列号32、反向序列号33)、TNF- α mRNA(PCR引物:正向序列号34、反向序列号35)的表达量。将结果示于图4B。

[0360] 如图4B所示,小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)中,由LPS、Pam3CSK4、或IL-1 β 的刺激导致的TNF- α 、IL-1 β 、和IL-6的表达上升通过RBMS2表达抑制而被抑制。

[0361] 实施例4C

[0362] 制作了启动子的下游自5'侧起配置了荧光素酶的ORF、3' UTR(IL-8的野生型3' UTR(碱基序列:序列号42)、IL-8的ARE突变型3' UTR(碱基序列:序列号43)、IL-1 β 的野生型3' UTR(碱基序列:序列号44)、IL-1 β 的ARE突变型3' UTR(碱基序列:序列号45))的报道载体。

将制作的报道载体、实施例1A中制作的报道载体(在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR)、或实施例2C中制作的IL-6的ARE突变型3' UTR报道载体(ARE突变体)与RBMS2表达载体或空载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后,测定了荧光素酶活性。将结果示于图4C。

[0363] 如图4C所示,在向IL-6、IL-8、IL-1 β 等3' UTR中所含的ARE添加突变时,未观察到由RBMS2带来的荧光素酶活性的上升。

[0364] 实施例4的结果

[0365] 由此明确了:RBMS2不仅控制IL-6mRNA,而且参与具有ARE的mRNA的控制。另外,明确了:通过抑制RBMS2,从而能够降低IL-6mRNA等炎症促进因子的表达量。

[0366] 实施例5:RBMS2缺失小鼠的炎症性细胞因子的表达降低

[0367] 实施例5A

[0368] 通过使用TALEN的基因组编辑,制作了RBMS2缺失小鼠。其结果,成功地得到了缺失了包含第2外显子的110个碱基的突变小鼠。将制作方案示于图5A。

[0369] 实施例5B

[0370] 将从RBMS2纯合缺失小鼠、RBMS2杂合缺失小鼠、或野生型小鼠的骨髓得到的细胞在M-CSF存在下培养7天,得到源自骨髓的巨噬细胞(BMDM)。在BMDM的培养基中添加LPS(最终浓度:100ng/ml)、Pam3CSK4(最终浓度:300ng/ml)、或poly I:C(最终浓度:10ug/ml)。添加前、或者自添加起经过1小时、3小时、5小时、或9小时后回收细胞,通过定量PCR测定了IL-6的表达量。将结果示于图5B。

[0371] 如图5B所示,通过Pam3CSK4刺激诱导的IL-6的表达在RBMS2缺失小鼠中显著减少。

[0372] 实施例5C

[0373] 在BMDM培养基中添加Pam3CSK4,且测定IL-1 β 、COX-2和TNF- α 的表达量,除此以外与实施例5B同样地进行。

[0374] 如图5C所示,对于IL-6以外的基因也得到了与实施例5B同样的结果。

[0375] 实施例6:RBMS2缺失小鼠的败血症抗性

[0376] 向RBMS2纯合缺失小鼠(n=7)或野生型小鼠(n=5)的腹腔内给予LPS(15mg/kg)。给药5小时后收集血清,进而测量了各小鼠的生存时间。另外,通过定量PCR测定了血清中的IL-6浓度。将生存时间的测量结果示于图6A,将IL-6浓度的测定结果示于图6B。

[0377] 如图6A和6B所示,野生型小鼠由于LPS的腹腔内给药而在81小时以内有60%以上的小鼠死亡,但RBMS2敲除小鼠抑制了作为炎症促进因子的IL-6的表达量,存活了80%以上。由以上的结果明确了:RBMS2参与体内炎症响应的恶化。

[0378] 实施例7:类风湿性关节炎患者的RBMS2表达量与IL-6表达量的相关性在通过源自类风湿性关节炎患者(n=12)的外周血单核细胞将RNA逆转录后,通过定量PCR测定了RBMS2和IL-6的表达量。将结果示于图7。

[0379] 如图7所示,源自类风湿性关节炎患者的外周血单核细胞中RBMS2的表达与IL-6的表达量显示出正相关。

[0380] 考虑到非类风湿性关节炎患者的IL-6的表达量比类风湿性关节炎患者低、及类风湿性关节炎患者的IL-6的表达量与疾病的进展程度相关这两点,根据上述结果表明:通过以RBMS2的表达量作为指标,能够诊断为类风湿性关节炎(其有无和进展程度)。

[0381] 实施例8:控制RBMS2的表达的因子的探索

[0382] 在作为人T细胞株的Jurkat细胞的培养基中添加IL-10蛋白或TGF β 蛋白(最终浓度:IL-10蛋白 $\rightarrow$ 20ng/mL、TGF β 蛋白 $\rightarrow$ 10ng/mL)。添加前、自添加起经过8小时和经过24小时后由细胞制备cDNA,通过定量PCR测定了RBMS2mRNA和HPRT(对照)mRNA的表达量。将结果示于图8。

[0383] 如图8所示,通过IL-10蛋白的添加而使RBMS2mRNA的表达量降低。由该结果可知,IL-10蛋白具有RBMS2表达抑制作用。

[0384] 实施例9:包含ARE的基因的表达调控活性的比较

[0385] 由实施例4C的结果明确了:RBMS2的活性依赖于AU富含元件(ARE)而非依赖于存在于IL-6 3' UTR中的茎环结构。另一方面,报道了HuR能够正向控制通过ARE的炎症性细胞因子的表达,可认为类似于RBMS2的作用。因此,利用荧光素酶法比较了RBMS2和HuR的活性。

[0386] 具体而言,首先,制作了启动子的下游自5'侧起配置了荧光素酶的ORF、IL-6的3' UTR或PTGS2(COX-2)的3' UTR而成的报道载体。将该报道载体与RBMS2表达载体、HuR表达载体、或空载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起经过48小时后,测定了荧光素酶活性。将结果示于图9。

[0387] 其结果,使用了IL-6 3' UTR的情况下,通过RBMS2使荧光素酶活性亢进,与此相对在HuR中未发现这样的亢进。另外明确了:使用了已报道HuR对其起作用的PTGS2(COX-2)的3' UTR的情况下,虽然观察到通过HuR使荧光素酶活性亢进,但RBMS2通过HuR使其活性进一步大力地亢进。由该结果强烈地表明:RBMS2以与HuR不同的mRNA作为靶标、且对于共同的靶mRNA也具有比HuR强的活性。

[0388] 实施例10:通过RRM1结构域的RBMS2与ARE的结合

[0389] 实施例10A

[0390] 迄今为止已经报道了:RRM结构域中的 β -折叠对于RNA结合活性是必须的,此外芳香族氨基酸对于 β -折叠的形成是必须的。因此,使用蛋白质二级结构的预测程序来推测RRM1结构域中的 β -折叠,制作了该 β -折叠内的氨基酸突变的突变体的表达载体。将这些表达载体、或者空载体与实施例1A中制作的报道载体(在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR)一起导入MDA-MB-231细胞中。自导入起经过48小时后,测定了荧光素酶活性。将结果示于图10A。

[0391] 其结果,明确了:RRM1结构域中的2个苯丙氨酸残基(F101和F104)对于通过RBMS2促进报道活性是必需的。

[0392] 实施例10B

[0393] 将表达F101/F104A突变体的慢病毒导入MDA-MB-231细胞中,5天后由细胞制备cDNA,通过定量PCR测定了IL-6mRNA和IL-8mRNA的表达量。将结果示于图10B。

[0394] 如图10B所示,即使过量表达F101/F104A突变体,也未能提高内源性IL-6和IL-8的表达水平。

[0395] 实施例10C

[0396] 将实施例1A中制作的报道载体(在荧光素酶ORF的下游IL-6的野生型3' UTR)与FLAG标记的F101/F104A突变体的表达载体一起导入HEK293T细胞中。自导入起48小时后回收细胞,制备了细胞溶解液。将该细胞溶解液通过抗FLAG抗体或非特异性IgG进行免疫沉

淀,通过定量PCR测定了免疫沉淀物中所含的荧光素酶mRNA量。将结果示于图10C。

[0397] 如图10C所示,通过F101A和F104A的双突变而与IL-6的3' UTR的结合显著减弱。

[0398] 实施例11

[0399] 将2,4-二硝基氟苯溶液(溶剂是丙酮与橄榄油的混合溶液(丙酮4:橄榄油1))涂布于RBMS2纯合缺失小鼠(n=15)的腹部。1周后,仅将2,4-二硝基氟苯溶液(溶剂是丙酮与橄榄油的混合溶液(丙酮4:橄榄油1))或该混合溶剂涂布于小鼠的耳部。6小时后测定耳廓的厚度,将由得到的测定值减去试验前的耳廓的厚度的值而得到的值作为表示耳廓肿胀的指标。将结果示于图11。

[0400] 如图11所示,RBMS2纯合缺失小鼠的耳廓肿胀程度低。由该结果表明:RBMS2与接触性皮肤炎等变应性疾病相关。

[0401] 实施例12

[0402] 将阴性对照或针对RBMS2的siRNA转染至MDA-MB-231细胞中(分别地n=3)。48小时后制备了RNA,并依据方案(Illumina, Inc.)制备RNA测序用的文库,通过Next-seq进行了RNA测序。将通过RBMS2敲低使表达量增加至2倍以上或降低至2分之1以下的基因示于图12。

[0403] 如图12所示,可知:IL-6、IL-8、MMP1、c-myc、IL-24mRNA等在3' UTR具有ARE的mRNA的表达量通过RBMS2的敲低而降低。

[0404] 另外,如上述实施例1~12所示,表明了:由于RBMS2不仅控制IL-6而且还控制其它炎症促进因子(IL-1 β 、IL-8、COX-2、TNF- α 、MMP1、IL-24、c-Myc等在3' UTR中具有ARE的基因)的表达,因此对于这些炎症促进因子的任一种与发病和加剧相关的疾病(免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等),通过将RBMS2的表达量作为指标而能够诊断疾病的有无和进展程度。

序列表

<110> 国立大学法人东京医科齿科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY)

日本脏器制药株式会社 (NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 炎症促进因子表达抑制剂

<130> P17-068W0

<150> JP 2016-094931

<151> 2016-05-10

<150> JP 2016-162120

<151> 2016-08-22

<160> 48

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 446

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
catgggcacc tcagattggt gttgttaatg ggcattcctt cttctggtca gaaacctgtc 60
cactgggcac agaacttatg ttgttctcta tggagaacta aaagtatgag cgtaggaca 120
ctatitttaat tatittttaat ttattaatat ttaaatatgt gaagctgagt taatttatgt 180
aagtcataatt tataatttta agaagtacca ctgaaacat tttatgtatt agttttgaaa 240
taataatgga aagtggctat gcagtttgaa taccctttgt ttcagagcca gatcatttct 300
tggaagtggt aggccttacct caaataaatg gctaacttat acatattttt aaagaaatat 360
ttatattgta ttatataaat gtataaatgg tttttatacc aataaatggc attttaaaaa 420
attcagcaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 446
```

<210> 2

<211> 407

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

```
Met Leu Leu Ser Val Thr Ser Arg Pro Gly Ile Ser Thr Phe Gly Tyr
1           5           10           15
Asn Arg Asn Asn Lys Lys Pro Tyr Val Ser Leu Ala Gln Gln Met Ala
           20           25           30
Pro Pro Ser Pro Ser Asn Ser Thr Pro Asn Ser Ser Ser Gly Ser Asn
           35           40           45
Gly Asn Asp Gln Leu Ser Lys Thr Asn Leu Tyr Ile Arg Gly Leu Gln
           50           55           60
```

Pro Gly Thr Thr Asp Gln Asp Leu Val Lys Leu Cys Gln Pro Tyr Gly			
65	70	75	80
Lys Ile Val Ser Thr Lys Ala Ile Leu Asp Lys Thr Thr Asn Lys Cys			
	85	90	95
Lys Gly Tyr Gly Phe Val Asp Phe Asp Ser Pro Ser Ala Ala Gln Lys			
	100	105	110
Ala Val Thr Ala Leu Lys Ala Ser Gly Val Gln Ala Gln Met Ala Lys			
	115	120	125
Gln Gln Glu Gln Asp Pro Thr Asn Leu Tyr Ile Ser Asn Leu Pro Leu			
	130	135	140
Ser Met Asp Glu Gln Glu Leu Glu Gly Met Leu Lys Pro Phe Gly Gln			
145	150	155	160
Val Ile Ser Thr Arg Ile Leu Arg Asp Thr Ser Gly Thr Ser Arg Gly			
	165	170	175
Val Gly Phe Ala Arg Met Glu Ser Thr Glu Lys Cys Glu Ala Ile Ile			
	180	185	190
Thr His Phe Asn Gly Lys Tyr Ile Lys Thr Pro Pro Gly Val Pro Ala			
	195	200	205
Pro Ser Asp Pro Leu Leu Cys Lys Phe Ala Asp Gly Gly Pro Lys Lys			
	210	215	220
Arg Gln Asn Gln Gly Lys Phe Val Gln Asn Gly Arg Ala Trp Pro Arg			
225	230	235	240
Asn Ala Asp Met Gly Val Met Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Thr Thr Ala			
	245	250	255
Leu Gln Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Pro Tyr Asn Ile Thr Pro Asn Arg			
	260	265	270
Met Leu Ala Gln Ser Ala Leu Ser Pro Tyr Leu Ser Ser Pro Val Ser			
	275	280	285
Ser Tyr Gln Arg Val Thr Gln Thr Ser Pro Leu Gln Val Pro Asn Pro			
	290	295	300
Ser Trp Met His His His Ser Tyr Leu Met Gln Pro Ser Gly Ser Val			
305	310	315	320
Leu Thr Pro Gly Met Asp His Pro Ile Ser Leu Gln Pro Ala Ser Met			
	325	330	335
Met Gly Pro Leu Thr Gln Gln Leu Gly His Leu Ser Leu Ser Ser Thr			
	340	345	350
Gly Thr Tyr Met Pro Thr Ala Ala Ala Met Gln Gly Ala Tyr Ile Ser			
	355	360	365
Gln Tyr Thr Pro Val Pro Ser Ser Ser Val Ser Val Glu Glu Ser Ser			

370	375	380
Gly Gln Gln Asn Gln Val Ala Val Asp Ala Pro Ser Glu His Gly Val		
385	390	395
Tyr Ser Phe Gln Phe Asn Lys		400
405		
<210> 3		
<211> 8504		
<212> DNA		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 3		
gagctcattc tctgcccgca gcccccttc atctctctcc tectgtctct tttctctctcc 60		
tttctctctcc ccctcccttt tttctctctcc cctctctccc ctttccctcg cteccctctct 120		
ccctccctcc ccgtctttct taccctctcc ctttctctct ctctctctct ctegtctgtt 180		
ccctaacatt aaagagaaaa tgctgtctatc cgtgacttcc aggcccggga tttcgacttt 240		
tggttacaat agaaacaaca agaagccata tgtgtcattg gctcagcaga tggcaccacc 300		
tagcccaagc aacagtacac ctaacagcag tagtggaagc aatggaaatg accagctgag 360		
caaaaccaac ctatacatcc gaggattgca accaggcact actgaccaag atcttgtcaa 420		
gctgtgtcag ccatatggca agattgtttc cactaaggcc atactggaca agaccacaaa 480		
caaatgtaaa ggctatggct ttgtagattt tgacagccct tcagcagcac agaaagctgt 540		
aacagcactg aaggccagcg gtgtacaggc acagatggca aagcaacagg aacaggaccc 600		
cacaaattta tacatctcaa acctcccact gtcaatggat gagcaggaac tggaggggat 660		
gctgaagccc tttggccagg ttatctccac ccgtatcctt cgagatacca gtgggaccag 720		
cagaggtgtt ggctttgcaa ggatggagtc cacagagaag tgtgaagcca tcatcaccca 780		
ctttaatgga aaatatatta agacaccccc tggagtacca gcccacccg atcccttgct 840		
ttgcaaatTT gctgatggcg ggccaaagaa acgacagaac caaggaaaat ttgtgcaaaa 900		
tggacgggct tggccaagga atgcagacat gggcgtcatg gccttgacct atgacccac 960		
cacagctctt cagaatgggt tttaccacgc cccctataac atcaccccca acaggatgct 1020		
tgtcagctct gcactctccc catacctttc ctctctgtg tcttcgtatc agagagtgc 1080		
tcagacatct cctctacaag tacctaacc atctggatg caccaccatt catacctcat 1140		
gcagccttca gggttcagttc tgacaccagg gatggacat cccatttctc tccagcctgc 1200		
ctccatgatg ggacccctta cccagcaact gggccatctc tccctcagca gcacaggcac 1260		
gtatatgccg acggctgcag ctatgcaagg agcttacatc tcccagtaca cccctgtgcc 1320		
ttcttccagt gtttcagtcg aggagagcag cggccaacag aaccaagtgg cagtggacgc 1380		
accctcagag catgggggtct attctttcca gttcaacaag taacagtggg attccctctc 1440		
ccatctttac tgaatagaaa tgaattcttg gagatactca tgctcccaga ttccagaggg 1500		
ttaaccagga atggagacca tccgtcggcc ctgctaagga ctaacactta gccatcgttt 1560		
ttcacaggcc tgggcctgga aaaagaaatc tctacgttcc tgccctttac tattgctgat 1620		
ggagcctggg ggaaccatca ctttttttgt gtgctacatt caaggagatc aaaaaaactt 1680		
ttcttctttt gcaaagaaaag ctttttgttt ttaactgcaa cgtacttttc ccctaccttg 1740		

```

aagagacatg gtggtcgcag cttctcatct atatgaaaaa gttttcgatg tattggaatt 1800
atttgggaat gcttttaaaa caatttgtaa ttatttcttt acaaaccaa acagaacaga 1860
aagggtgtgg gctggaacat cgatgaagga gccctactta ctgagcttag ttatggactt 1920
ttttgatgca tgtgtgtatg tgttttaaaa agtatgcagg ctctaaaaat gttattttgt 1980
aaagctctca gctcatgcac cccatctcct cttcacccat attatgcctt ctttctcttg 2040
tccagattct tctttttctc ttttctaaac agctgagcct gcctactttg cccttttaca 2100
gcttttaatt ttatggattt ttaaaaaatga aatttcatgt ggaatttggg gttggggggc 2160
aggctgggca aggaacaagg cagaacacta agtaggcat ggaagtggct gttctttccc 2220
ccaccctgcc acaccctggg agaaaaaact agactttggc ttcagaaagc acagatgtga 2280
cccaggctta ctaaagagac aactccacag ccctgggaac acacccttga gccaaacttg 2340
gttgaagact aggtcttccc tggcaagttc cggaagaatg gacttactga cttttatcaa 2400
ctcttctcac tgccaaggcc aacagcatct gaggtatagc tttttgggag tacctgcttt 2460
cttgccctct ggaggatatt ttctgtcttg ggcttcatgg cccctctctt ccctgttaca 2520
cattgctgtg ctcagagcct ttgcagctgc gacctagtgt aatccacata ggctccttcc 2580
acacgggtgga agatctgctg cttcactcac agaccaggag ttctcaatca gaggtggttt 2640
tgtccctcag gcctttggca acatctagag acagttttga ttgccacgcc tggaggtggg 2700
atgtgtgtgc tactggcatc tagtggtctg taaacatcct aactgcata ggatagtccc 2760
cactaccccc agccaagaat tatctgactc caggggtcaa tattgccaag actgggaaac 2820
actgatatag acagtgttgt ccctgcctcc tgggttaggg taaattttca cccaaccct 2880
ggacaaacag tgccttttga cactcatgca actgttgggg aaggactgga ctgggatcct 2940
tgaattctcc ccagactttg acttttgata actctgcata tagcaagagt gattcttgaa 3000
agagctgtgg ctccatgctg aatgcacaca tgtactcaga gggattcagg tgggcattgt 3060
tctggtgtgt gctgtgcaat ggtgggaaag gacaaagctc tctaaactgt ccagagcaac 3120
ctgccctgcc ccggtgtgct tggacccttt gcccagggaa ccaggacatc agaaataatg 3180
ttccttctgt ggaaggacaa cggggagcta gggtagcaaa gagcaataaa ttccaactct 3240
ttatgaggtc aggagtcctt taaaaaagcc tatgtcttgg tctttaactg tccccttctg 3300
caagatgtga ctctatacac atggagacag attgaagaaa gacttcaccc atcttctagg 3360
aaataaaatc ctgctcttgt cttctcccag tcactccctt atgcactgaa aggagaattt 3420
gactcccttg cacttcaagg ccaggtgcct ctccactaga cagtcagaca aaggcaaata 3480
atggaggata gagagacagg tgttcattag gctggccata gggagaggaa gggggtgaca 3540
gcaggggaaa agaaaactgta gtatcagttg tcacaagtag agctcggccc agctttccct 3600
cccttcccag ccaccctaga attgagagtc ccagtcccc tagtgtcgac tttctatgta 3660
catcctaggg gtgagggagt gcggggcaat gggtaggata taaagcgtaa aggacaaatt 3720
gccgcagtct tctaattgat gttccaaac tcaggaaggg cttatccagt gtaaaatagc 3780
cccaagccca gcaaccttct agagggtctt ggctgggcag atagcttttg tttttgagtc 3840
tccagccctc agtcaaggaa aatataccat agctgcttct ttgtcagtgg cttttgagag 3900
aaagagaaaa caaatctaga attctgttca tctgatagac cgggggagct ttgctatggt 3960
aggaggttta ggaaggcctt ttcacgcata gaaaccattg ttgatattgc cactcccctc 4020
tcctctgcct cacagaactc ctgattctgt cttctttctc tctctatata tatattttaa 4080

```

```

aatgtttaaa tggctctaata tttttgtttt gaattttgaa tttacctttt ggagttcttc 4140
tcatgtgaat ctacttgta gattgtatta atgagtgtt ctggtttggg catgggaagt 4200
gatgggggcc tgaagtatt ttgcagtggc taatggcact gaggaatttc ttttttggtg 4260
catttggttt acactcattt cctctcctaa ttgttagttc atttgtaaca gtgggtgagt 4320
gtttggagga aaggaggag aagaaaggag ggatactgtt tctcccatga aatagtctaa 4380
ttggttgggt tgatggcaga aggaaacata ggggagcctt ccagctcaca gccaaagggt 4440
gggctcttaa acactatgcc tagtgttttc tgaatgctgt cttcatggag ccagctctt 4500
actctctttg tactttacat ctcaccccca ctcattacag atgctcataa cattcttaaa 4560
atattttagt acttggcatt tttctgtttt cagtcagcta gaacacacta gactcctttc 4620
ctcagatggc ataatacctt ataggctctg agcctgccta gccatctcct atcgggtgta 4680
ttactcctca tctcaggtc tgagatgata ctcagacct aaactgattg gacttttttg 4740
aggagggtgc cagtagagag gtcaggaaga tgtggagatg atgatggaga gagatgtttt 4800
tattttatatt tattttttca gacagagtct tgctctgtcg cccaggctgg agtgcaatgg 4860
cacgatctcg gctcactgca acctccgcct cccaggttca agcaattctc ctgcctcagc 4920
ctcccatgta gctgggatta caggcaccca ccacatgcc cggctaattt tttattttt 4980
agtagagatg gggtttcacc atgttgcca ggctggtctc gaactcctga cctcaggtga 5040
tctgcccgcc ttagcctccc aaagtgtggt gattacaggc gtgagccacc gcgcccggcc 5100
tttattttat tttttagaga tggctttgct gtgtcaccca ggctggagtg cagtgatgca 5160
gtcgtagtct actacagtct tgaattcctg ggcccaagggt ttcttccac ctaagcctcc 5220
caagtagctg gaagtacagg cacatactac caagcccagt tcgttatttt aagtttttgt 5280
agagacaggg gtcttactat gttgcccaga ctggtcttga actcctgtca agtgagcctc 5340
ccacctcagc ctcccaaagt gctatgatta cagggtgtgag cctccatgct tggatgagat 5400
gttgttttta atgttttttg ttttttggtt ttgttgtttt gtttttttga gacagggtct 5460
cactctgtgg cccaggctgg agtgcagtgg caccataatg gctcactgca gcctcgacct 5520
cccaaggctc aggtgatcct cttgcctcag ccacccttc cccggccacc aagtagctgg 5580
gactatgggc ttgtgccacc atgcctggct aattttttta tttttagtag agatgggggt 5640
ttaccacgtt ggccaggcta gtgtccaact cctgacctcc aaacagctaa tttttgtatt 5700
tttaatagag acaggttttc gccatgttgc ccagcctcgt ctggaactcc tgggctcaaa 5760
tgatccaccc acctcgccct cccaaagtgc tgggattata ggcatgagcc accacacctg 5820
gccttttcag tttttttatt tttatttttt ctttgagacg gagtctcgct ctgtcgccca 5880
ggctggagtg cagtggcgtg atcttggctc actgaaacct ccactcctg ggttcaagca 5940
gttctcctgc ctcagcctcc tgagtagctg ggattacagg tgcttgcac catgcctggc 6000
taatttttgt atttttagta gagacagggt tttgccacat tgcccaggct ggtgttgaac 6060
tcctgggctc aaatgatcca cctgccttgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga 6120
gccactgcac ccggcccttt gtagtgtttt taactaaaga attttagtag ttgcccaggc 6180
caggaagcct ggtggctcta aagggttaata gacctgtca gtaacagata aggagtggta 6240
agaggacatt actcatattg aagatgaaga ccagactttg ctgcttcaca ggccatgcgc 6300
tgggttgggc cacttcagct ccactccatt cgttttcctt tcctaacttg acaatcagct 6360
cactcaccct cccttagtgc ctccagtgcc tactcctgtc actccaatgt caaccattg 6420

```

ggagttgagg cctgtcactc caatgtcaac ccgtgggctg ttactttgcg tcatatgatg 6480
 ctgtgagagg ccttgctgga atgtcctagg aatccctagt agcagtggct attagtcttc 6540
 tagaaaagaa ctattgctgc tgccttgtgc acatgcccc ctttctgggc aagtggcagc 6600
 attgcgctca tgaggggctt tgcattctta gccaaaggca ataaactggg tgggtgatct 6660
 ggcccaaact tgcccctagg ctctgctagc cctgaatcag caggcttcag agacgagggt 6720
 ggggtgttata aaagccagtc tgtaaagggt aaattccaaa tcttgtgcct tgttatacca 6780
 atccttcctg attcccgttt aaaccaacta ctctatttct gtgctgccta cattttcaat 6840
 cctccacagc attagcaaat tcctgaaatt tcttcatttg gtaggccttc cataggagtc 6900
 agctatggac ttccatagga gttggcagct aaaaccagac tgtgagcttc tgtctccgtt 6960
 ctgatttttg ctgcacctcc caggggacag tccccacatg attacaaaag ccagggtgcc 7020
 tcatcacccg ttaccctga cctgtccact tgttttgaat aaaccttcat tctccaagca 7080
 gatccccaaa cttccttgte cttgttacac gtctacctca caacctcaca attcaacaac 7140
 aggtaaatac ctggattcac tgatttcttt actgtccttc tctgagggtt gggaagggtg 7200
 gggctagaaa aggctcataa tttttaaaact cttgggaatt aaacttggga atttctattc 7260
 ctacagtgtt ttctctggga tttttagctc actgatcgcc ctagaatagt gtgaactctc 7320
 cagataggtc ctgctgtgat aggccagggg agtaggctgt gcagtgcagg cttagggtaa 7380
 taagtaatgg ttggaggaca ccagcatagg agcagagttt agaacttaag aggacaagaa 7440
 agctgctcag tggctggcgt atagctgtga aggtaaccaa acaccaaaga gggagtctgt 7500
 catttttata aggctggaag cgaatgttcc ttttctacct taacatacag tttaggggtt 7560
 tgcaccaaga caaagtttcc aggctggagg gtaatacata tccagcgcca gtgaagtccc 7620
 cactccaaca tatacccttt ttgggtgggt aaacacctct ttgcatgtgg acagaaaatg 7680
 tttatactta aacagacata ttttgcatat ttttatctgg agacttcttc tagttttata 7740
 ctcttccac atctatgcc atgccacct tctaaaactt acactccttt tctaccctg 7800
 gtcttttcct tgtccttccc tacaacttgg tagaggtcca ttttgtctta cttcacactt 7860
 tttttttttt aaataaaaca caaaagtcta cgtcttggtg tcttatccgt gagtgggaag 7920
 tggtaagctg gtgatggtcc catatttgct atgacaggaa cacagagtg gcagcttagg 7980
 aagctggggc cacatctcac aaggcaggac ctggatgcac tgaatcccc tttgctccag 8040
 caactcagcc agacatttag gcaggagcac taatgacct ttccatccac acagagggt 8100
 tggaacagga gcccctgttg ttcccttgcc tgtggtctct taagccagtc atacctatcc 8160
 caacgccgtc tccccctcag gtgtgtagaa gggaagatga atacacagag tcttttgaat 8220
 ctctatcaaa tgtggttttt ttatttcaac aactgacaag cacttttcta cagctgcact 8280
 tgtggaacat cacatggcaa aaacaggagt ttttctgcta gacttttttt ttctttttta 8340
 ccttattaaa aatgagattg gtcctaaaaa tatagaaaga aataaattta aattcacaaa 8400
 aaactgtaca ttatcaaaaa gtcactaaaa caccacattt gggttatata aaagtccttt 8460
 ttgctgtaaa aggaacacag aaacttaaaa aaaaaaaaaa aaaa 8504

<210> 4

<211> 5207

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 4

```

ctttctcctc cccctccctt ctcccttccc tccctctttc cctcccttcc tctctccctc 60
tcctttcccc ctccccctct cctccctctt ttctccctcc ctttccctca ctctcttctt 120
tctctctctc agctccgtaa cagtaaagaa aaaatgctgc tatcagtgc ttccaggcct 180
gggatttcga cttttggcta taacaagaac aacaagaagc tatatgtggc tcagcaaagt 240
gcacctccaa gtccaaggaa tagcaccccc aacagcagcg gcggaggcgg cggcgaggagt 300
ggtgggaacg accagctgag caaaaccaac ctgtatatcc gaggactgca gccaggcacc 360
actgaccagg accttgtcaa gctctgtcag ccgtatggca agattgtctc cactaaggcc 420
atcctggaca agaccacaaa caagtgc aaa ggctatggct ttgtggactt cgacagtccg 480
tcatcagcac agaaaagctgt aactgcaactg aaagccagtg gtgtgcaggc acaaattggca 540
aagcaacagg agcaagaccc tacaactta tacatctcaa acctccctct gtcaatggac 600
gagcaggaac tggaggggat gctgaagccc tttggccagg tcctctctac tcggatcctt 660
cgagacacta gtggggccag cagaggggtc ggctttgcaa ggatggagtc aacagagaag 720
tgtgaagcca tcatcaccca ctttaattga aagtatataa agacaccccc tggagtagca 780
gcaccttctg accttttctg ttgcaaattt gctgacggtg ggccaaagaa acgacagagc 840
caaggaagat acgtgcaaaa tggacgggcc tggccaagga acggagacat gggcggtatg 900
gccttgacct atgacccccc tgctgccctt cagaatgggt tctacgcagc tccttacagt 960
atgcccaca gcaggatgct tgctcaatct gcgctagccc cgtatcttcc atctcctgtg 1020
tcttcctatc agggctcagt tctgacacca gggatggacc acccctctc tctccagcct 1080
gcctccatga tgggacctct taccagcaa ctgggtcacc tgtcactcaa cagtctgggc 1140
acgttcatgc cggcagctgc tgctatgcat ggggcttaca tctcccagta cccagctgtg 1200
ccttcttcca gtgtttctgc tgaggagagc aatggccagc agaatcaact ggcagtggag 1260
ccccctcag accacggggt ctatcctttc cagttcagca aataatgagg tccagacctg 1320
gggagagaag cctatgcagt cctccttggg ctcttctctg tggctgatgg aacctgagga 1380
atcacgttgg tttttttttt tgaatgtgct acattcaaga tcaaaaagac ttttttttct 1440
tttgcaaaag aagtttcttg ctttgtatct aattgcagcg aacctttctc ctaccccaaa 1500
gacaccagtt gaggtgcttc tcctcttcca gaggtttggg tatgttgggc ttttaaaatg 1560
gtttaagaac aatcgagctg ctgtgaagtc agtgaagggg cgctgcttgc caggttcagt 1620
tagggactat tttcaatgtg tgtttttagat atgcaggctt aaaacttttg ttttgcaaag 1680
ctctcaacac aacttttga cacaccacc cactccctc ccacgcactg ttttaaggcag 1740
ggtctcacag tgcagtcctg gctggctgac aatgtagacc aggctggctt tgaactcagc 1800
gatccttccc actctgtctg agtgaccgc catgcctagc tagttgtttt tttttttttg 1860
gttttttttt tttcaagaca gggtttctct gtgtagccct ggctgtcctg gcgctcactt 1920
tgtagacca gctagcctcg aacttagaaa tccacctgcc tctgcctccc aagtgtgagg 1980
attaaaggcg tgcgccacca ccgcccggct agttgttttt taaaacttct ccacaatggt 2040
ctttttttct tttccattta gcttagcctg cctactttgc cttttttaca tttttaattt 2100
tatgaatttg atttaaatct catgtggaat tgggggaagg gagagcaacg cacaggtaga 2160
gaagtgtggc agtagagggt gctttccctc tgccctcctg gcctaggagg ggttagactt 2220
tgacttcagg aagcagacat gtgacaacca tgcagccttt ggaaaccacc ttcaaccaac 2280

```

tctggtggca agtgccactg agaagtggca tccagcttca gcatcctgga tacctgctct 2340
 gcctcctgga gggctcttggg tcttcctcct gccccaggtc tcacagcccc tgccccctgct 2400
 gagcaagttc tgccttccac tttaccagga ggttgttttg tccccgagag gctgctgtct 2460
 tgtccatcat catccttgat taccaagcct ggggagtatc atgtgtgctg gtcctgaaca 2520
 cctgacagaa cctggcccca ctccctccacc cttattccc tggcagttat ttggtgtaga 2580
 ctaaacccca gtccagcctt ggacatggag cctgttagtt catgtacttg gccagcagtg 2640
 acatctgtga ctttgcctcc tggaggatct tttctgcctg ggttctcaca gcctctcatc 2700
 ccagctgcac atggctgtac tcaagtggta cttggctgaa tcacttaatt cagcaggagc 2760
 catcttattt agcagggctc acccttggtt gtatgtacat gccaagtga cacagtttga 2820
 agggatgaaa gcaagaactg ttgtgtatac tgtgcatgct tgagaatgga ctgagctttc 2880
 tctatgcagc ataccagcc cagccctggt gtttggacce cttccccagg gaaccagacc 2940
 accagaaata attttccttc ttgtggaagg acgacgggt gctaggatag aaaaaggcaa 3000
 gactcacagc tccctggcca ctcaaaggtc aggagggact tgtaaacatg cctgccgtta 3060
 actattccct tctgcaagac tttcagcaca aaatgtgact tgttacatca catcccttca 3120
 cgtcataagt acacctccag tagacaaagc aatggagatg gggaagtgtg tccagaggtc 3180
 agtgtgaaag aggaaggga gggcatggtg atggtgagaa actggctcag cagctgtgca 3240
 cactacagaa ttgggaatcc tggcctgact gtgctgctgt gcgttctaga ctgaggaagg 3300
 ggctgaggac aatggacagc ataaagtaca aaatgaccag ttttctcatt ggtgcttcca 3360
 acatcaggaa ggtcataccc agttatcgac ctctagccct ctagcactca gtgacagact 3420
 cagagctctg tcctgtggaa accctgctga cagtcttctg gccactgctg ctccttcaact 3480
 gcctattaaa aattgttctt ttttctgtag ttctaaagca atttgaataa ctgacagttt 3540
 taaaatttga aattacctt ttaggttttt cttttgagta tactggttag ggttctagt 3600
 tttctgggtg aacagggtg agcatgggaa atgagggcaa cctgtaattt tgtttttata 3660
 gtggttaatg gcactcactg tgtaatttct gcttagtgat ttccatccac tcttttctc 3720
 attagctcat tactcagaaa ggtagcgact gaagacagga agtagtatgc aagccatgag 3780
 ggatgagttg taagcctcct ctccatcatc ctgccaagg ctcctaacag tctcctgagt 3840
 cctgtttgca tggaggccag atagatggct ctgcactcta tatctcacct gtactcattt 3900
 tagtacattg tggttttgct tccaatcaat cagagtggac tagagctcac acctgacctc 3960
 gtgtgactct tcactaggct ccaggcctat cccatctcat tgggtcagac tgtagatgga 4020
 ctggactttt ggagacaggt cctgctatta cttaggaata tgtgggaaca atgataggga 4080
 ccaagcttgt gaagcaaaac ggctttggaa agggcaagtg ctcaataata aaaaatgggg 4140
 tggaagtga gcgttatttg ctgagggtt cggaaggact agtttgtttt tgtccctggc 4200
 ccttccggtc aagtgggcac ctccatttt gtcgccaaga gcaatacagt tgagtaggtg 4260
 gtagacccaa actcaccag ccatttctag acctgaattc agaggataag gtgagtctag 4320
 aggtatatac aaccaatgct tgtagacca attcttacca attcggagca agccggtggc 4380
 tctacttctg ggtaacctgc ctcttaaaag tgcttttgat ccagtagta gattcagggt 4440
 ctacaggagc ctccctcag cagctaaaac caatttgtct cctctactct ttgctgcacc 4500
 tcccgagggt ggtctccatg tggcagtgat gccctcatca cccttgtag caccgctctg 4560
 aatgttcaaa ataagcattt cctgtccaag caaatcccta aactccctcg tctcattac 4620

tcaactacct cagtctgaca actcaaggca cacaagcacc tacttgccctc ccaccatcct 4680
 ttactgccct tgtctttgtg gggttggaac aaatgcaaac tcctcagttc cacaacccaa 4740
 aactgctctt tctggatcgt cttctccagt gacgttggtt ccctacaaga gcgaactctc 4800
 catatgggtc agtccctgta ggacaagcca gggactatgc tgtgcagtca aatgccaggt 4860
 ttggagcata gcttaagacc gcagagagta aggacttgag tggtggtggt gtgcagtttg 4920
 agagagctgg aatggacgtc tctgctcctg ccctctgggc gggtcgggtg atgacttcta 4980
 gatgcactcc ttaccctgga gggaagttaa tttatactta agatgcattt tgtacatttc 5040
 ccctttaccc agaaacctgt agtttcatac tcccatgtct atgccaacac tacctatcgc 5100
 tcactctccg tggctgactt ctggttccat ttccttctg tgacttgga gagctttact 5160
 tttgctcacg tgaacctttc ttttttaaataaaaacacaaa agcctcc 5207

<210> 5

<211> 383

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 5

Met	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ser	Arg	Pro	Gly	Ile	Ser	Thr	Phe	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Asn	Lys	Asn	Asn	Lys	Lys	Leu	Tyr	Val	Ala	Gln	Gln	Met	Ala	Pro	Pro
				20					25					30	
Ser	Pro	Arg	Asn	Ser	Thr	Pro	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
				35					40					45	
Ser	Gly	Gly	Asn	Asp	Gln	Leu	Ser	Lys	Thr	Asn	Leu	Tyr	Ile	Arg	Gly
				50					55					60	
Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Thr	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Cys	Gln	Pro
65							70				75				80
Tyr	Gly	Lys	Ile	Val	Ser	Thr	Lys	Ala	Ile	Leu	Asp	Lys	Thr	Thr	Asn
							85				90				95
Lys	Cys	Lys	Gly	Tyr	Gly	Phe	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala
							100				105				110
Gln	Lys	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Gly	Val	Gln	Ala	Gln	Met
							115								125
Ala	Lys	Gln	Gln	Glu	Gln	Asp	Pro	Thr	Asn	Leu	Tyr	Ile	Ser	Asn	Leu
							130								140
Pro	Leu	Ser	Met	Asp	Glu	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Met	Leu	Lys	Pro	Phe
145							150				155				160
Gly	Gln	Val	Ile	Ser	Thr	Arg	Ile	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Gly	Ala	Ser
							165								175
Arg	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Arg	Met	Glu	Ser	Thr	Glu	Lys	Cys	Glu	Ala
							180								190

Ile Ile Thr His Phe Asn Gly Lys Tyr Ile Lys Thr Pro Pro Gly Val															
195								200						205	
Ala Ala Pro Ser Asp Pro Leu Leu Cys Lys Phe Ala Asp Gly Gly Pro															
210								215						220	
Lys Lys Arg Gln Ser Gln Gly Arg Tyr Val Gln Asn Gly Arg Ala Trp															
225								230						235	240
Pro Arg Asn Gly Asp Met Gly Gly Met Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Thr															
								245						250	255
Ala Ala Leu Gln Asn Gly Phe Tyr Ala Ala Pro Tyr Ser Ile Ala His															
								260						265	270
Ser Arg Met Leu Ala Gln Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Pro															
								275						280	285
Val Ser Ser Tyr Gln Gly Ser Val Leu Thr Pro Gly Met Asp His Pro															
								290						295	300
Leu Ser Leu Gln Pro Ala Ser Met Met Gly Pro Leu Thr Gln Gln Leu															
305								310						315	320
Gly His Leu Ser Leu Asn Ser Leu Gly Thr Phe Met Pro Ala Ala Ala															
								325						330	335
Ala Met His Gly Ala Tyr Ile Ser Gln Tyr Pro Ala Val Pro Ser Ser															
								340						345	350
Ser Val Ser Ala Glu Glu Ser Asn Gly Gln Gln Asn Gln Leu Ala Val															
								355						360	365
Glu Pro Pro Ser Asp His Gly Val Tyr Pro Phe Gln Phe Ser Lys															
								370						375	380
<210> 6															
<211> 355															
<212> PRT															
<213> 小鼠 (Mus musculus)															
<400> 6															
Met Ala Pro Pro Ser Pro Arg Asn Ser Thr Pro Asn Ser Ser Gly Gly															
1								5						10	15
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asn Asp Gln Leu Ser Lys Thr Asn Leu															
								20						25	30
Tyr Ile Arg Gly Leu Gln Pro Gly Thr Thr Asp Gln Asp Leu Val Lys															
								35						40	45
Leu Cys Gln Pro Tyr Gly Lys Ile Val Ser Thr Lys Ala Ile Leu Asp															
								50						55	60
Lys Thr Thr Asn Lys Cys Lys Gly Tyr Gly Phe Val Asp Phe Asp Ser															
65								70						75	80

Pro	Ser	Ser	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Gly	Val
85				90				95							
Gln	Ala	Gln	Met	Ala	Lys	Gln	Gln	Glu	Gln	Asp	Pro	Thr	Asn	Leu	Tyr
100				105				110							
Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	Met	Asp	Glu	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Met
115				120				125							
Leu	Lys	Pro	Phe	Gly	Gln	Val	Ile	Ser	Thr	Arg	Ile	Leu	Arg	Asp	Thr
130				135				140							
Ser	Gly	Ala	Ser	Arg	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Arg	Met	Glu	Ser	Thr	Glu
145				150				155				160			
Lys	Cys	Glu	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ile	Lys	Thr
165				170				175							
Pro	Pro	Gly	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Cys	Lys	Phe	Ala
180				185				190							
Asp	Gly	Gly	Pro	Lys	Lys	Arg	Gln	Ser	Gln	Gly	Arg	Tyr	Val	Gln	Asn
195				200				205							
Gly	Arg	Ala	Trp	Pro	Arg	Asn	Gly	Asp	Met	Gly	Gly	Met	Ala	Leu	Thr
210				215				220							
Tyr	Asp	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Gly	Phe	Tyr	Ala	Ala	Pro	Tyr
225				230				235				240			
Ser	Ile	Ala	His	Ser	Arg	Met	Leu	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Ala	Pro	Tyr
245				250				255							
Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Ser	Val	Leu	Thr	Pro	Gly
260				265				270							
Met	Asp	His	Pro	Leu	Ser	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser	Met	Met	Gly	Pro	Leu
275				280				285							
Thr	Gln	Gln	Leu	Gly	His	Leu	Ser	Leu	Asn	Ser	Leu	Gly	Thr	Phe	Met
290				295				300							
Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	His	Gly	Ala	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Pro	Ala
305				310				315				320			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Glu	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Gln	Asn
325				330				335							
Gln	Leu	Ala	Val	Glu	Pro	Pro	Ser	Asp	His	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Gln
340				345				350							
Phe	Ser	Lys													
355															

<210> 7

<211> 5390

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

```

acttcctgtc ctgttggaag tgaaagttag gaattggggg tggtagccgt gcacgtatTT 60
attctgcagc atgccggcac tgtctgtttc gttatcacag caaagcagcc gcaggaaaaa 120
cagagagcag agctttgttt tagagagagt ctgggcttga ggtctgttgt gacaaagacg 180
gagttaattt acttctggag aatgtgtgtg gcagcagtgg gaggcctgag gaggggctct 240
gaaggcattc agtctccctc cctgttctag gtggatggat aggcttcttt ggtatcactt 300
gtaagttttc ttttctgtt ccaactcctc cttggagggc atattggagc tcagagagga 360
ctctgtgaac gtcatttggc ttggccataa attccacacc tgctatatgt ggctcagcaa 420
atggcacctc caagtccaag gaatagcacc cccaacagca gcggcggagg cggcggcggg 480
agtggtgga acgaccagct gagcaaaacc aacctgtata tccgaggact gcagccaggc 540
accactgacc aggacctgt caagctctgt cagccgtatg gcaagattgt ctccactaag 600
gccatcctgg acaagaccac aaacaagtgc aaaggctatg gctttgtgga cttcgacagt 660
ccgtcatcag cacagaaagc tgtaactgca ctgaaagcca gtggtgtgca ggcacaaatg 720
gcaaagcaac aggagcaaga ccctacaaac ttatacatct caaacctccc tctgtcaatg 780
gacgagcagg aactggaggg gatgctgaag ccctttggcc aggtcatctc tactcggatc 840
cttcgagaca ctagtggggc cagcagaggg gtccggctttg caaggatgga gtcaacagag 900
aagtgtgaag ccatcatcac ccactttaat ggaaagtata taaagacacc ccctggagta 960
gcagcacctt ctgacccttt gctttgcaaa tttgctgacg gtgggcaaaa gaaacgacag 1020
agccaaggaa gatactgca aaatggacgg gcctggccaa ggaacggaga catgggcggt 1080
atggccttga cctatgaccc cactgctgcc cttcagaatg ggttctacgc agctccttac 1140
agtatcgccc acagcaggat gcttgctcaa tctgcgctag ccccgatatct tccatctcct 1200
gtgtcttcct atcagggtc agttctgaca ccagggatgg accaccccct ctctctccag 1260
cctgcctcca tgatgggacc tcttaccag caactgggtc acctgtcact caacagtctg 1320
ggcacgttca tgccggcagc tgctgctatg catggggctt acatctccca gtaccagct 1380
gtgccttctt ccagtgtttc tgctgaggag agcaatggcc agcagaatca actggcagtg 1440
gagccccct cagaccacgg ggtctatcct ttccagttca gcaaataatg aggtccagac 1500
ctggggagag aagcctatgc agtctcctt gggtccttc ctgtggctga tggaacctga 1560
ggaatcacgt tggttttttt ttttgaatgt gctacattca agatcaaaaa gacttttttt 1620
tcttttgcaa aagaagtttc ttgctttgta ttttaattga gcgaaccttt ctctacccc 1680
aaagacacca gttgaggtgc ttctcatctt cgagaggttt gggtatgttg ggcttttaaa 1740
atggtttaag aacaatcgca gtgtgtgaa gtcagtgaag gggcgctgct tgccaggttc 1800
agttagggac tattttcaat gtgtgtttta gatatgcagg cttaaaactt ttgttttgca 1860
aagctctcaa cacacacttt gcacacacc accacctcc ctcccacgca ctgtttaagg 1920
cagggtctca cagtgcagtc ctggctggct gacaatgtag accaggctgg ctttgaactc 1980
agcgatcctt cccactctgt ctgagtgcac cgccatgcct agctagtgtt tttttttttt 2040
ttggtttttt ttttttcaag acagggtttc tctgtgtagc cctggctgtc ctggcgctca 2100
ctttgtagac caagctagcc tcgaacttag aaatccacct gcctctgcct cccaagtgtc 2160
gggattaaag gcgtgcgcca ccaccgccc gctagtgtgt ttttaaaact tctccacaat 2220

```

```

ggctctttttt tcttttccat ttagcttagc ctgcctactt tgccttttta caatttttaa 2280
ttttatgaat ttgatttaaa tttcatgtgg aattggggga agggagagca acgcacaggt 2340
agagaagtgt ggcagtagag gttgctttcc ctctgccctc ctggcctagg aggggttaga 2400
ctttgacttc aggaagcaga catgtgacaa ccatgcagcc tttggaaacc accttcaacc 2460
aactctgggtg gcaagtgcc a ctgagaagt gcatccagct tcagcatcct ggatacctgc 2520
tctgcctcct ggagggctct gggtcttcat cctgccccag gtctcacagc ccctgcccct 2580
gctgagcaag ttctgccttc cactttacca ggaggttggt ttgtccccga gaggctgctg 2640
tcttgtccat catcatcctt gattaccaag cctggggagt atcatgtgtg ctggctcctga 2700
acacctgaca gaacctggcc ccactcctcc accccttatt ccctggcagt tatttggtgt 2760
agactaaacc ccagtccagc cttggacatg gagcctgtta gttcatgtac ttggccagca 2820
gtgacatctg tgactttgcc tcctggagga tcttttctgc ctgggttctc acagcctctc 2880
atcccagctg cacatggtg tactcaagt gtacttggt gaatcactta attcagcagg 2940
agccatctta tttagcagg ctcacccttg gttgtatgta catgccaagt gcacacagtt 3000
tgaagggatg aaagcaagaa ctgttggtga tactgtgcat gcttgagaat ggactgagct 3060
ttctctatgc agcataccca gcccagccct ggtgtttgga ccccttcccc aggggaaccag 3120
accaccagaa ataattttcc ttcttggtga aggacgacgg ggtgctagga tagaaaaagg 3180
caagactcac agctccctgg ccactcaaag gtcaggaggg acttgtaaac atgcctgccg 3240
ttaactattc cttctgcaa gactttcagc acaaaatgtg acttgttaca tcacatccct 3300
tcacgtcata agtacacct cagtagacaa agcaatggag atggggaagt gtgtccagag 3360
gtcagtgtga aagaggaagg gcagggcctg gtgatggtga gaaactggct cagcagctgt 3420
gcacactaca gaattgggaa tcctggcctg actgtgctgc tgtgcgttct agactgagga 3480
aggggctgag gacaatggac agcataaagt acaaaatgac cagttttctc attggtgctt 3540
ccaacatcag gaaggtcata ccagttatc gacctctagc cctctagcac tcagtgcag 3600
actcagagct ctgtcctgtg gaaaccctgc tgacagtctt gctgccactg ctgctccttc 3660
actgcctatt aaaaattggt ctttttctg tagttctaaa gcaatttgaa taactgacag 3720
ttttaaaatt tgaaattacc tttttagggt tttcttttga gtatactggt tagggttcta 3780
gtgtttctgg ttgaacaggt gtgagcatgg gaaatgagg caacctgtaa tttgttttt 3840
atagtgggtta atggcactca ctgtgtaatt tctgcttagt gatttccatc cactcttttc 3900
ctcattagct cattactcag aaaggtagcg actgaagaca ggaagtagta tgcaagccat 3960
gagggatgag ttgtaagcct cctctccatc atcctgcca aggtcctaa cagtctcctg 4020
agtccgtgtt gcatggaggc cagatagatg gctctgcact ctatatctca cctgtactca 4080
ttttagtaca ttgtggtttt gcttccaatc aatcagagt gactagagct cacacctgac 4140
ctcgtgtgac tcttcaactag gctccaggcc tatcccatct cattgggtca gactgtagat 4200
ggactggact tttggagaca ggtcctgcta ttacttagga atatgtggga acaatgatag 4260
ggaccaagct tgtgaagcaa aacggctttg gaaagggcaa gtgctcaata ataaaaaatg 4320
gggtggaagt gaagcgttat ttgctgaggg tttcggaagg actagtttgt tttgtccct 4380
ggcccttccg gtcaagtggg cacctcccat tttgtcgcca agagcaatac agttgagtag 4440
gtggtagacc caaactcacc cagccatttc tagacctgaa ttcagaggat aaggtgagtc 4500
tagagggtata tacaaccaat gcttggttaga ccaattctta ccaattcgga gcaagccggt 4560

```

ggctctactt ctgggtaacc tgcctcttaa aagtgccttt gatcccagta gtagattcag 4620
 ggtctacagg agccttccct cagcagctaa aaccaatttg tctcctctac tctttgctgc 4680
 acctccccga ggtgggtctcc atgtggcagt gatgccctca tcacccttgt gaccaccgct 4740
 ctgaatgttc aaaataagca tttcctgtcc aagcaaatcc ctaaactccc tcgtcctcat 4800
 tactcaacta cctcagtctg acaactcaag gcacacaagc acctacttgc ctcccacat 4860
 cctttactgc ccttgtcttt gtgggggttg aacaaatgca aactcctcag ttccacaacc 4920
 caaaactgct ctttctggat cgtcttctcc agtgacgttg gctccctaca agagcgaact 4980
 ctccatatgg gtcagtccct gtaggacaag ccagggacta tgctgtgcag tcaaagcca 5040
 ggtttggagc atagcttaag accgcagaga gtaaggactt gagtggtggt ggtgtgcagt 5100
 ttgagagagc tggaatggac gtctctgctc ctgccctctg ggcggtcgg gtgatgactt 5160
 ctatagtcac tccttaccct ggagggaagt taatttatac ttaagatgca ttttgtacat 5220
 ttccccctta cccagaaacc tgtagtttca tactcccatg tctatgcaa cactacctat 5280
 cgctcactct ccgtggctga cttctggttc catttcttc ctgtgacttg gaagagcttt 5340
 acttttgctc acgtgaacct ttctttttta aataaaacac aaaagcctcc 5390

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_RNA

<223> 人 RBMS2-1 siRNA

<400> 8

uuugcacaaa uuuccuugg u 21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_RNA

<223> 人 RBMS2-2 siRNA

<400> 9

ugcucaucca uugacagugg g 21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> misc_RNA

<223> 小鼠 RBMS2-1 siRNA

<400> 10
uaaggagcug cguagaaccc a 21
<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_RNA
<223> 小鼠 RBMS2-2 siRNA
<400> 11
agauguauaa guuuguaggg u 21
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人 RBMS2 正向引物
<400> 12
catctctccc tcagcagcac 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人 RBMS2 反向引物
<400> 13
gctgctctcc tcgactgaaa 20
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人 IL-6 正向引物
<400> 14
ctccaggagc ccagctatga 20
<210> 15

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人IL-6反向引物
<400> 15
gaggtgagtg gctgtctgtg 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 荧光素酶正向引物
<400> 16
gaaatgtccg ttcggttggc 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> misc_RNA
<223> 荧光素酶反向引物
<400> 17
tccgataaat aacgcgccca 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人 IL1B 正向引物
<400> 18
cgaggcacao ggcacaacag 20
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> primer_bind
<223> 人IL1B反向引物
<400> 19
agaggtccag gtcctggaag 20
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人PTGS2正向引物
<400> 20
gttccacccg cagtacagaa 20
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人PTGS2反向引物
<400> 21
agggcttcag cataaagcgt 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人IL8正向引物
<400> 22
accggaagga accatctcac 20
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人IL8反向引物

<400> 23
ggcaaaactg caccttcaca c 21
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人NFKBIA正向引物
<400> 24
gggccagctg acactagaaa 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人NFKBIA反向引物
<400> 25
gtcatcatag ggcagctcgt 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人ZC3H12A正向引物
<400> 26
gtctgacggg atcgtggttt 20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 人ZC3H12A反向引物
<400> 27
cagggggcat aaacttgtca 20
<210> 28

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠RBMS2正向引物
<400> 28
tgctgctatc agtgacttcc a 21
<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠RBMS2反向引物
<400> 29
tgctgagcca catatagctt ct 22
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠IL6正向引物
<400> 30
aggcataacg cactaggttt 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠IL6反向引物
<400> 31
agctggagtc acagaaggag 20
<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠IL1b正向引物
<400> 32
caaccaacaa gtgatattct ccatg 25
<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠IL1b反向引物
<400> 33
gatccacact ctccagctgc a 21
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠TNFa正向引物
<400> 34
atggcctccc tctcatcagt 20
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> primer_bind
<223> 小鼠TNFa反向引物
<400> 35
cttgggtggtt tgctacgacg 20
<210> 36
<211> 1240
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> promoter
<223> IL-6启动子

<400> 36

```
cctactttca gcctggaatc attctgaatg ctagctagat atctggagac aggtggacag 60
aaaaccagga actagtctga aaaagaaact aaccaaaggg aagaagtctg ttttaagtttg 120
accagccta gaagacttga gcattggagg ggttattcag agtgagacgt accaccttca 180
gattcaaatc ctgtcatcca gtagaaggga gcttcaaaca caagctagct aagatacaat 240
gaggtccttc ttcgatatct ttatcttcca tataccatga atcaaagaaa cttcaacaac 300
atgaggactg caacagacct tcaagcctcc ttgcatgacc tggaaatgtt ttgggggtgtc 360
ctggcagcag tgggatcagc actaacagat aagggcaact ctcacagaga ctaaaggctct 420
taactaagaa gatagccaag agaccactgg ggagaatgca gagaataggc ttggacttgg 480
aagccaagat tgcttgacaa cagacagaag atatttctgt acttcacca ctttaccac 540
ctggcaactc ctggaaacaa ctgcacaaaa tttggagggtg aacaaacat tagaaacaac 600
tggtcctgac aagacacagg aaaaacaagc aatatgcaac attactgtct gttgtccagg 660
ttgggtgctg ggggtgggag agggagtgtg tgtctttgta tgatctgaaa aaactcaggt 720
cagaacatct gtagatcctt acagacatac aaaagaatcc tagcctctta ttcatgtgtg 780
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtgtgtg tcgtctgtca 840
tgcgcgcgtg cctgcgttta aataacatca gcttttagctt ctctttctcc ttataaaaca 900
tttgtaattt cagttttctt tcccatcaag acatgctcaa gtgctgagtc acttttaaag 960
aaaaaaaaaga agagtgtca tgcttcttag ggctagctc aaggatgact taagcacact 1020
ttccccttcc tagttgtgat tctttcgatg ctaaacgacg tcacattgtg caatcttaat 1080
aaggtttcca atcagcccca cccactctgg cccaccccc accctccaac aaagatTTTT 1140
atcaaagtgt ggattttccc atgagtctca aaattagaga gttgactcct aataaatatg 1200
agactgggga tgtctgtagc tcattctgct ctggagccca 1240
```

<210> 37

<211> 171

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> 3' UTR

<223> IL-6 3'UTR 97-267

<400> 37

```
ctaaaagtat gagcgtagg acactatTTT aattatTTTT aatttattaa tatttaaata 60
tgtgaagctg agttaattta tgtaagtcatttttatTTT ttaagaagta ccacttgaaa 120
catttttatgt attagttttg aaataataat ggaaagtggc tatgcagttt g 171
```

<210> 38

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> 3' UTR

<223> IL-6 3'UTR 122-193
<400> 38
tattttaatt attttaatt tattaatatt taaatatgtg aagctgagtt aatttatgta 60
agtcataat at 72
<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> 3' UTR
<223> IL-6 3'UTR δ ARE1
<400> 39
tattttaatt attttaatt tattaatatt taaatatgt 39
<210> 40
<211> 101
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> 3' UTR
<223> IL-6 3'UTR δ ARE2
<400> 40
agttaattta tgtaagtcatt atttatattt ttaagaagta ccacttgaaa cattttatgt 60
attagttttg aaataataat ggaaagtggc tatgcagttt g 101
<210> 41
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> 3' UTR
<223> IL-6 3' UTR ARE突变体
<400> 41
tattttaatt attttaagg gattaatagg gaaatatgtg aagctgagtt aagggatgta 60
agtcataagg a 71
<210> 42
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<221> 3' UTR

<223> IL-8 3' UTR野生型

<400> 42

```
ggatccacaa gtccttggtc cactgtgcct tggtttctcc tttatttcta agtggaaaaa 60
gtattagcca ccatcttacc tcacagtgat gttgtgagga catgtggaag cactttaagt 120
tttttcatca taacataaat tattttcaag tgtaacttat taacctatgt attatttatg 180
tattttattta agcatcaaat atttgtgcaa gaatttgga aaatagaaga tgaatcattg 240
attgaatagt tataaagatg ttatagtaaa tttattttat tttagatatt aaatgatgtt 300
ttattagata aatttcaatc agggttttta gattaaacaa acaaacaatt gggtacc 357
```

<210> 43

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> 3' UTR

<223> IL-8 3' UTR突变体

<400> 43

```
ggatccacaa gtccttggtc cactgtgcct tggtttctcc tttatttcta agtggaaaaa 60
gtattagcca ccatcttacc tcacagtgat gttgtgagga catgtggaag cactttaagt 120
tttttcatca taacataaat tattttcaag tgtaacttat taacctaggg attagggatg 180
tagggaggga agcatcaaat atttgtgcaa gaatttgga aaatagaaga tgaatcattg 240
attgaatagt tataaagatg ttatagtaaa tttattttat tttagatatt aaatgatgtt 300
ttattagata aatttcaatc agggttttta gattaaacaa acaaacaatt gggtacc 357
```

<210> 44

<211> 584

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> 3' UTR

<223> IL1B 3' UTR野生型

<400> 44

```
agagagctgt acccagagag tcctgtgctg aatgtggact caatccctag ggctggcaga 60
aagggaacag aaagggtttt gagtacggct atagcctgga ctttctgtt gtctacacca 120
atgcccact gcctgcctta gggtagtgct aagaggatct cctgtccatc agccaggaca 180
gtcagctctc tcctttcagg gccaatcccc agcccttttg ttgagccagg cctctctcac 240
ctctcctact cacttaaagc ccgcctgaca gaaaccacgg ccacatttgg ttctaagaaa 300
ccctctgtca ttgcctccca cattctgatg agcaaccgct tccctattta tttatttatt 360
tgtttggttg ttttattcat tggcttaatt tattcaaagg gggcaagaag tagcagtgtc 420
tgtaaaagag cctagttttt aatagctatg gaatcaattc aatttgact ggtgtgtctt 480
ctttaaatca agtcctttaa ttaagactga aaatatataa gctcagatta tttaaatggg 540
```

aatattttata aatgagcaaa tatcatactg ttcaatgggt ctga 584

<210> 45

<211> 584

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 3' UTR

<223> IL1B 3' UTR突变体

<400> 45

agagagctgt acccagagag tcctgtgctg aatgtggact caatccctag ggctggcaga 60
 aagggaacag aaaggttttt gactacggct atagcctgga ctttctgtgt gtctacacca 120
 atgcccact gcctgcctta gggtagtgtc aagaggatct cctgtccatc agccaggaca 180
 gtcagctctc tcctttcagg gccaatcccc agcccttttg ttgagccagg cctctctcac 240
 ctctcctact cacttaaagc ccgcctgaca gaaaccacgg ccacatttgg ttctaagaaa 300
 ccctctgtca ttcgctccca cattctgatg agcaaccgct tccctattta tttattttatt 360
 tgtttgtttg ttttattcat tggcttaatt tattcaaagg gggcaagaag tagcagtgtc 420
 tgtaaaagag cctagttttt aatagctatg gaatcaattc aatttggact ggtgtgctct 480
 ctttaaataca agtcctttaa ttaagactga aaatatataa gctcagatta tttaaatggg 540
 aatattttata aatgagcaaa tatcatactg ttcaatgggt ctga 584

<210> 46

<211> 304

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> DOMAIN

<223> 3xFLAG- RBMS2 δ RRM1结构域

<400> 46

Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile	Asp
1				5					10					15	
Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Asp	Pro	Thr
			20					25					30		
Asn	Leu	Tyr	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Leu	Ser	Met	Asp	Glu	Gln	Glu	Leu
		35					40					45			
Glu	Gly	Met	Leu	Lys	Pro	Phe	Gly	Gln	Val	Ile	Ser	Thr	Arg	Ile	Leu
	50					55				60					
Arg	Asp	Thr	Ser	Gly	Thr	Ser	Arg	Gly	Val	Gly	Phe	Ala	Arg	Met	Glu
65				70				75					80		
Ser	Thr	Glu	Lys	Cys	Glu	Ala	Ile	Ile	Thr	His	Phe	Asn	Gly	Lys	Tyr
				85				90					95		

Ile Lys Thr Pro Pro Gly Val Pro Ala Pro Ser Asp Pro Leu Leu Cys		
100	105	110
Lys Phe Ala Asp Gly Gly Pro Lys Lys Arg Gln Asn Gln Gly Lys Phe		
115	120	125
Val Gln Asn Gly Arg Ala Trp Pro Arg Asn Ala Asp Met Gly Val Met		
130	135	140
Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Thr Thr Ala Leu Gln Asn Gly Phe Tyr Pro		
145	150	155
Ala Pro Tyr Asn Ile Thr Pro Asn Arg Met Leu Ala Gln Ser Ala Leu		
165	170	175
Ser Pro Tyr Leu Ser Ser Pro Val Ser Ser Tyr Gln Arg Val Thr Gln		
180	185	190
Thr Ser Pro Leu Gln Val Pro Asn Pro Ser Trp Met His His His Ser		
195	200	205
Tyr Leu Met Gln Pro Ser Gly Ser Val Leu Thr Pro Gly Met Asp His		
210	215	220
Pro Ile Ser Leu Gln Pro Ala Ser Met Met Gly Pro Leu Thr Gln Gln		
225	230	235
Leu Gly His Leu Ser Leu Ser Ser Thr Gly Thr Tyr Met Pro Thr Ala		
245	250	255
Ala Ala Met Gln Gly Ala Tyr Ile Ser Gln Tyr Thr Pro Val Pro Ser		
260	265	270
Ser Ser Val Ser Val Glu Glu Ser Ser Gly Gln Gln Asn Gln Val Ala		
275	280	285
Val Asp Ala Pro Ser Glu His Gly Val Tyr Ser Phe Gln Phe Asn Lys		
290	295	300

<210> 47

<211> 321

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> DOMAIN

<223> 3xFLAG- RBMS2 δ RRM2结构域

<400> 47

Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp		
1	5	10
Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Leu Ala Pro Pro Ser Pro Ser Asn		
20	25	30
Ser Thr Pro Asn Ser Ser Ser Gly Ser Asn Gly Asn Asp Gln Leu Ser		

35	40	45
Lys Thr Asn Leu Tyr Ile Arg Gly Leu Gln Pro Gly Thr Thr Asp Gln		
50	55	60
Asp Leu Val Lys Leu Cys Gln Pro Tyr Gly Lys Ile Val Ser Thr Lys		
65	70	75
Ala Ile Leu Asp Lys Thr Thr Asn Lys Cys Lys Gly Tyr Gly Phe Val		
85	90	95
Asp Phe Asp Ser Pro Ser Ala Ala Gln Lys Ala Val Thr Ala Leu Lys		
100	105	110
Ala Ser Gly Val Gln Ala Gln Met Ala Lys Gln Gln Glu Gln Asp Pro		
115	120	125
Cys Lys Phe Ala Asp Gly Gly Pro Lys Lys Arg Gln Asn Gln Gly Lys		
130	135	140
Phe Val Gln Asn Gly Arg Ala Trp Pro Arg Asn Ala Asp Met Gly Val		
145	150	155
Met Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Thr Thr Ala Leu Gln Asn Gly Phe Tyr		
165	170	175
Pro Ala Pro Tyr Asn Ile Thr Pro Asn Arg Met Leu Ala Gln Ser Ala		
180	185	190
Leu Ser Pro Tyr Leu Ser Ser Pro Val Ser Ser Tyr Gln Arg Val Thr		
195	200	205
Gln Thr Ser Pro Leu Gln Val Pro Asn Pro Ser Trp Met His His His		
210	215	220
Ser Tyr Leu Met Gln Pro Ser Gly Ser Val Leu Thr Pro Gly Met Asp		
225	230	235
His Pro Ile Ser Leu Gln Pro Ala Ser Met Met Gly Pro Leu Thr Gln		
245	250	255
Gln Leu Gly His Leu Ser Leu Ser Ser Thr Gly Thr Tyr Met Pro Thr		
260	265	270
Ala Ala Ala Met Gln Gly Ala Tyr Ile Ser Gln Tyr Thr Pro Val Pro		
275	280	285
Ser Ser Ser Val Ser Val Glu Glu Ser Ser Gly Gln Gln Asn Gln Val		
290	295	300
Ala Val Asp Ala Pro Ser Glu His Gly Val Tyr Ser Phe Gln Phe Asn		
305	310	315
Lys		320
<210> 48		
<211> 216		
<212> PRT		

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> DOMAIN

<223> 3xFLAG- RBMS2 δ RRM1/2结构域

<400> 48

Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile	Asp
1				5					10					15	
Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Pro	Lys
			20					25					30		
Lys	Arg	Gln	Asn	Gln	Gly	Lys	Phe	Val	Gln	Asn	Gly	Arg	Ala	Trp	Pro
		35					40					45			
Arg	Asn	Ala	Asp	Met	Gly	Val	Met	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Thr	Thr
	50					55					60				
Ala	Leu	Gln	Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ala	Pro	Tyr	Asn	Ile	Thr	Pro	Asn
65				70					75					80	
Arg	Met	Leu	Ala	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				85					90					95	
Ser	Ser	Tyr	Gln	Arg	Val	Thr	Gln	Thr	Ser	Pro	Leu	Gln	Val	Pro	Asn
			100					105					110		
Pro	Ser	Trp	Met	His	His	His	Ser	Tyr	Leu	Met	Gln	Pro	Ser	Gly	Ser
		115						120					125		
Val	Leu	Thr	Pro	Gly	Met	Asp	His	Pro	Ile	Ser	Leu	Gln	Pro	Ala	Ser
		130					135					140			
Met	Met	Gly	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Gly	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser
145				150						155				160	
Thr	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Gln	Gly	Ala	Tyr	Ile
				165						170				175	
Ser	Gln	Tyr	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Ser
			180					185					190		
Ser	Gly	Gln	Gln	Asn	Gln	Val	Ala	Val	Asp	Ala	Pro	Ser	Glu	His	Gly
		195					200						205		
Val	Tyr	Ser	Phe	Gln	Phe	Asn	Lys								
	210						215								

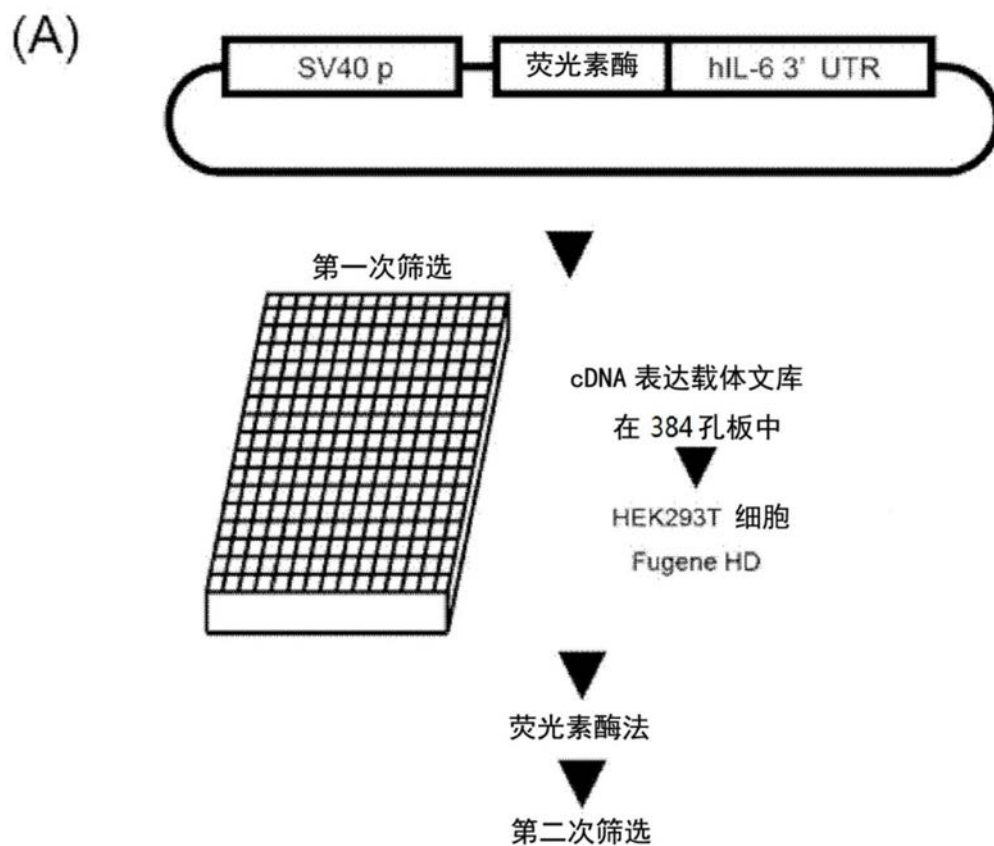


图1A

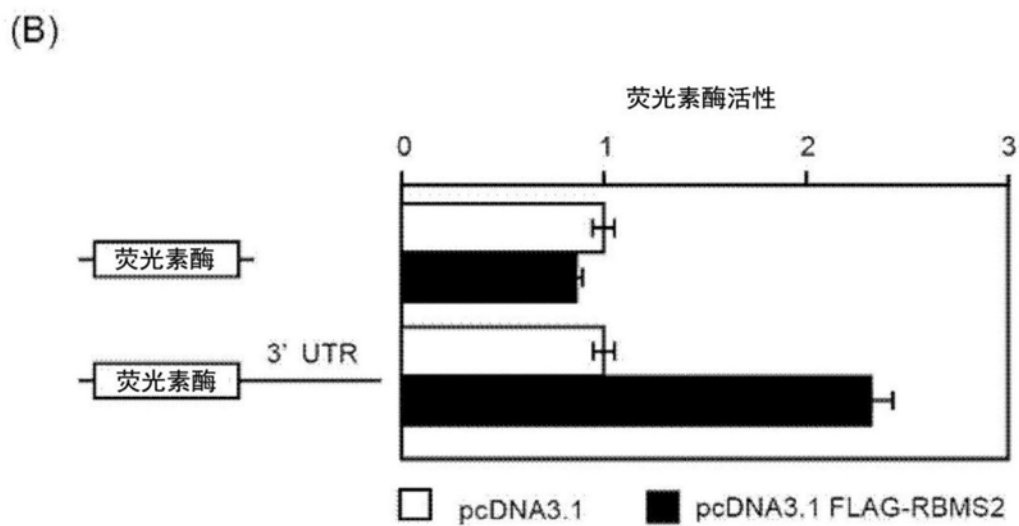


图1B

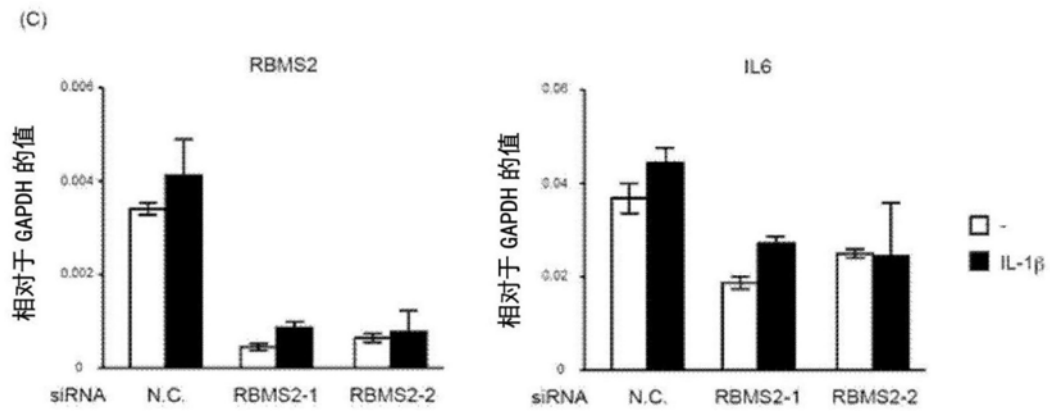


图1C

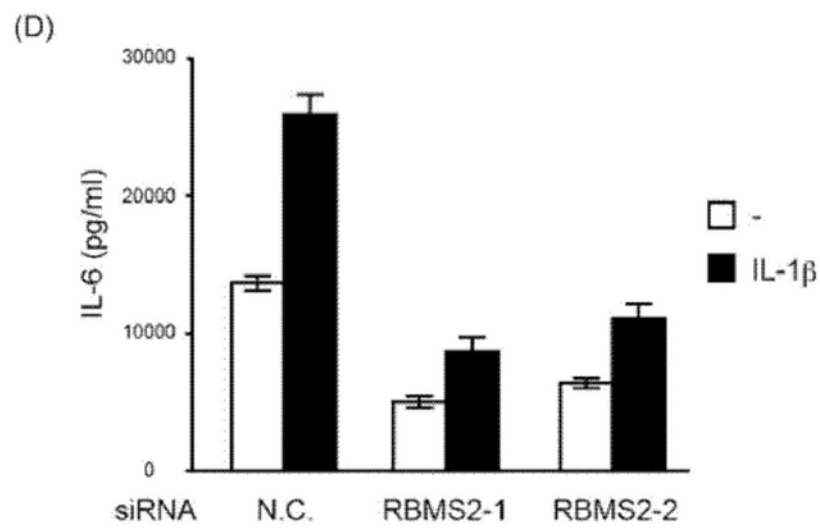


图1D

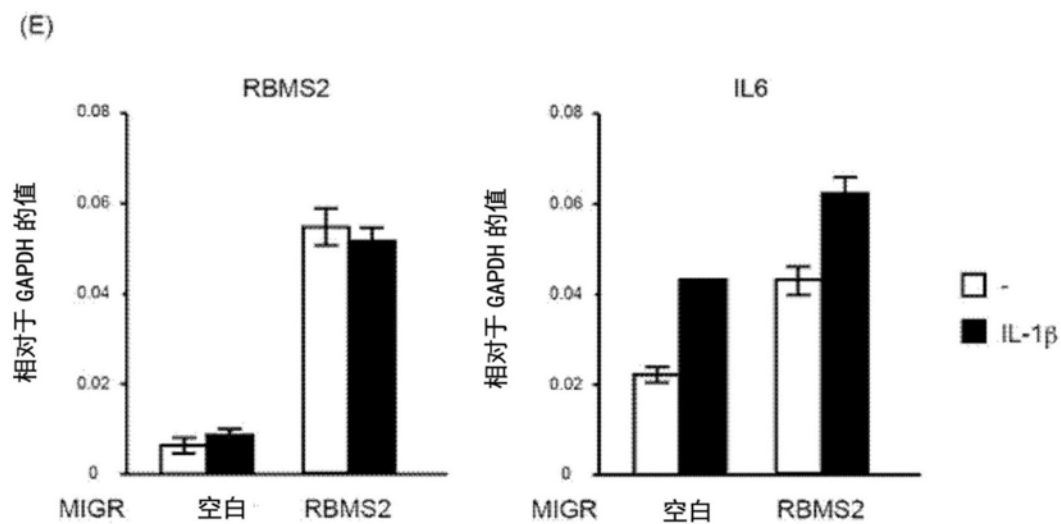


图1E

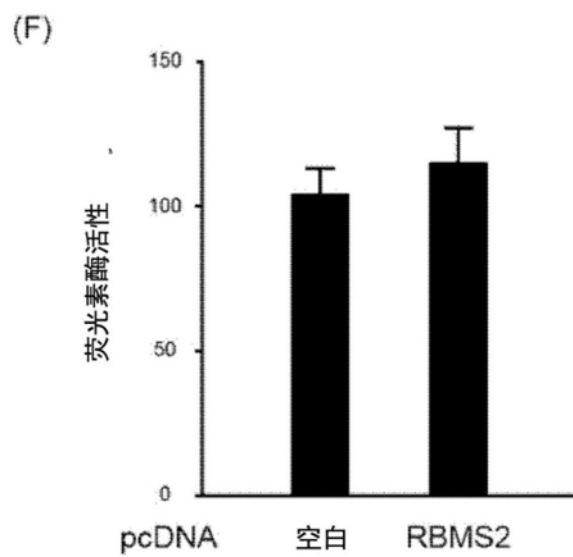


图1F

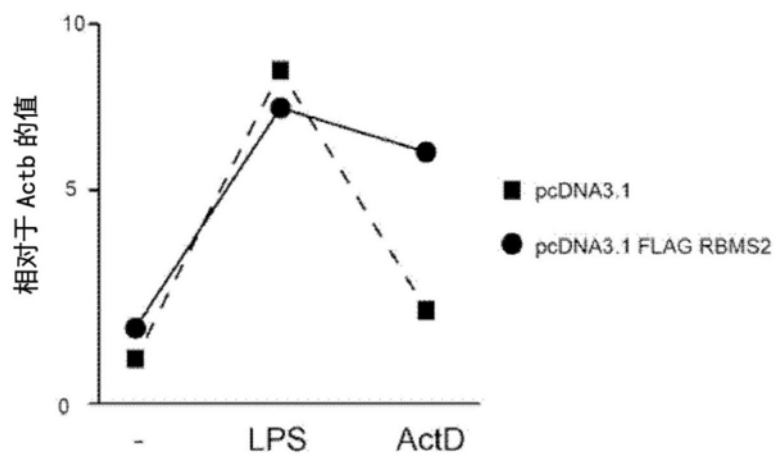


图2A

(B)

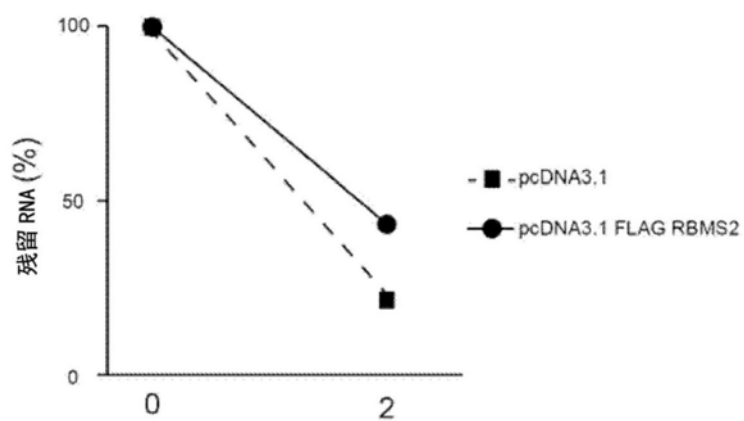


图2B

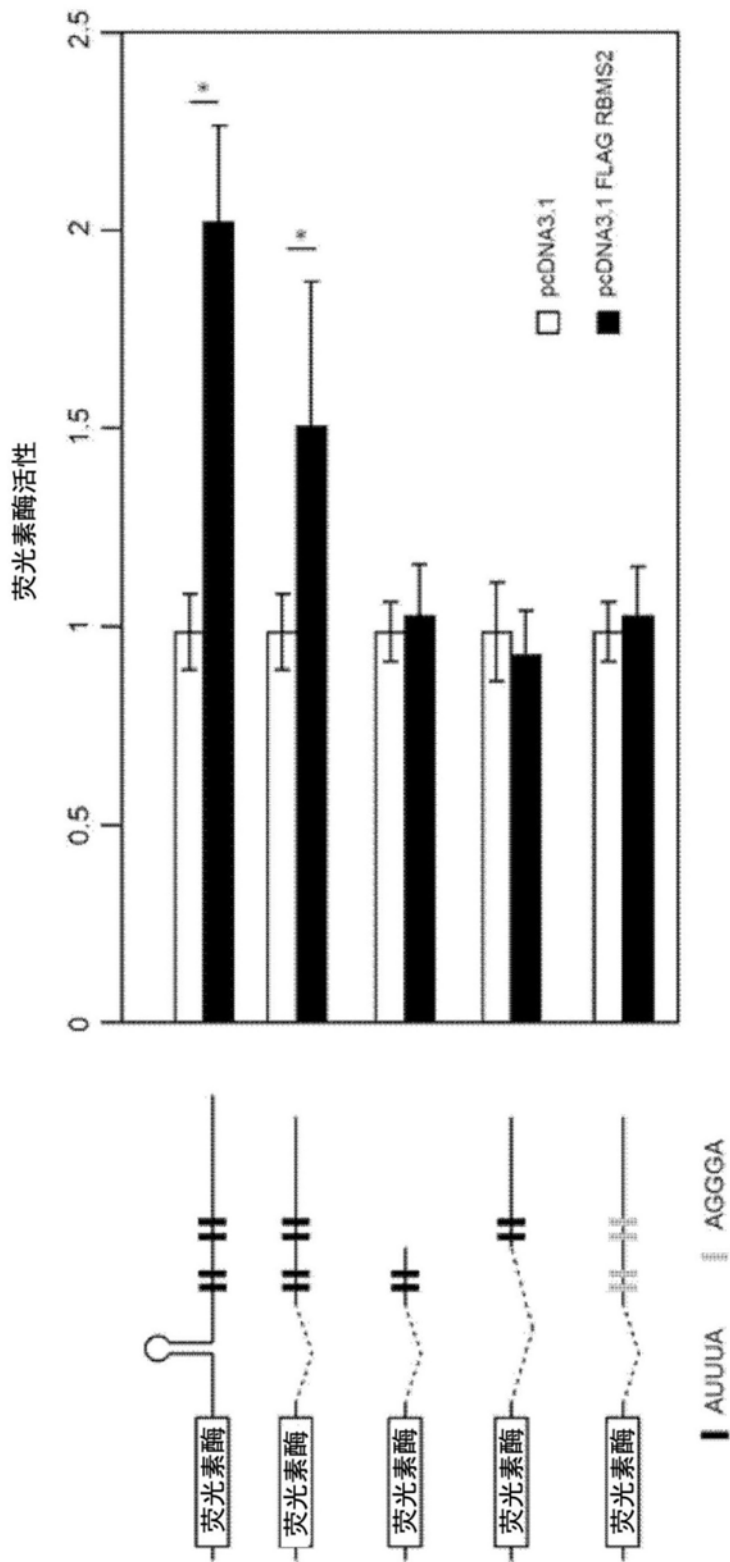


图2C

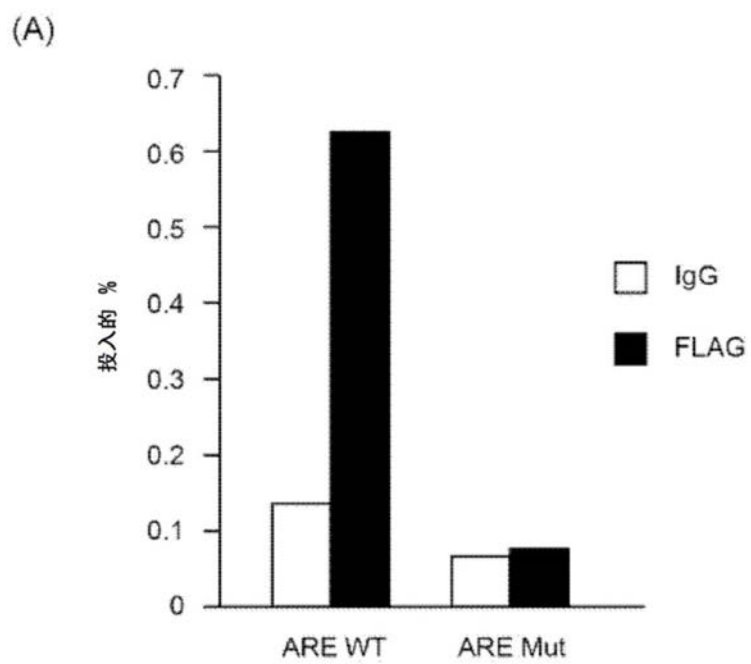


图3A

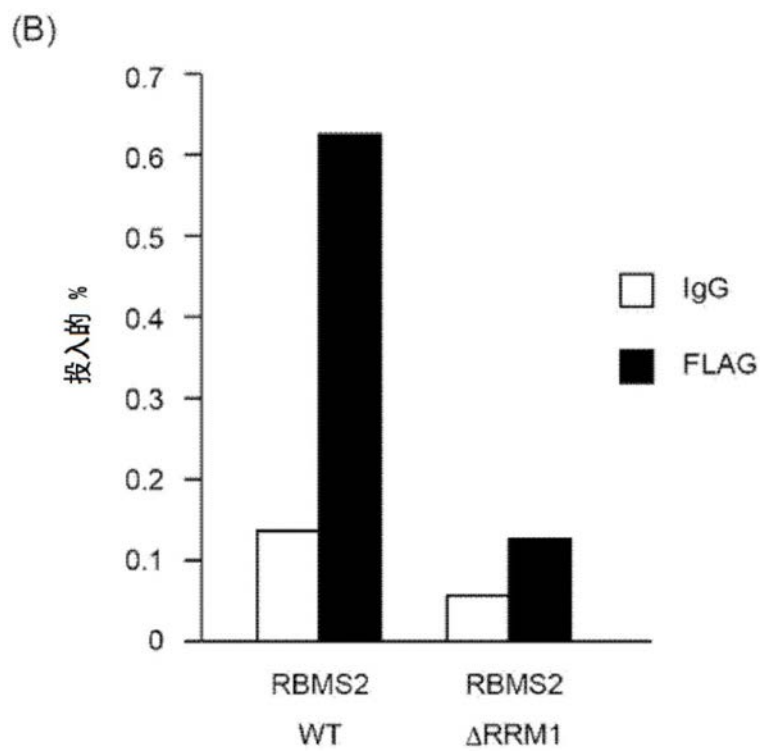


图3B

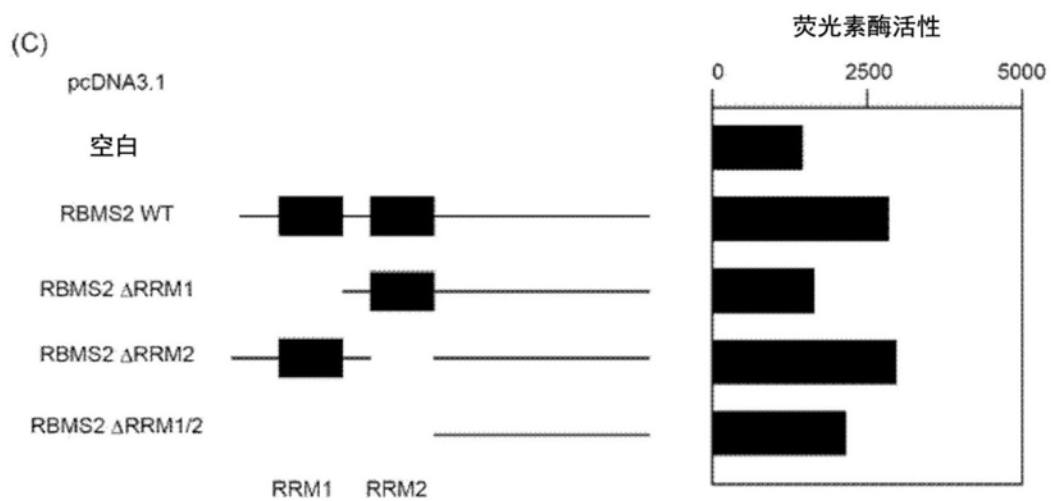


图3C

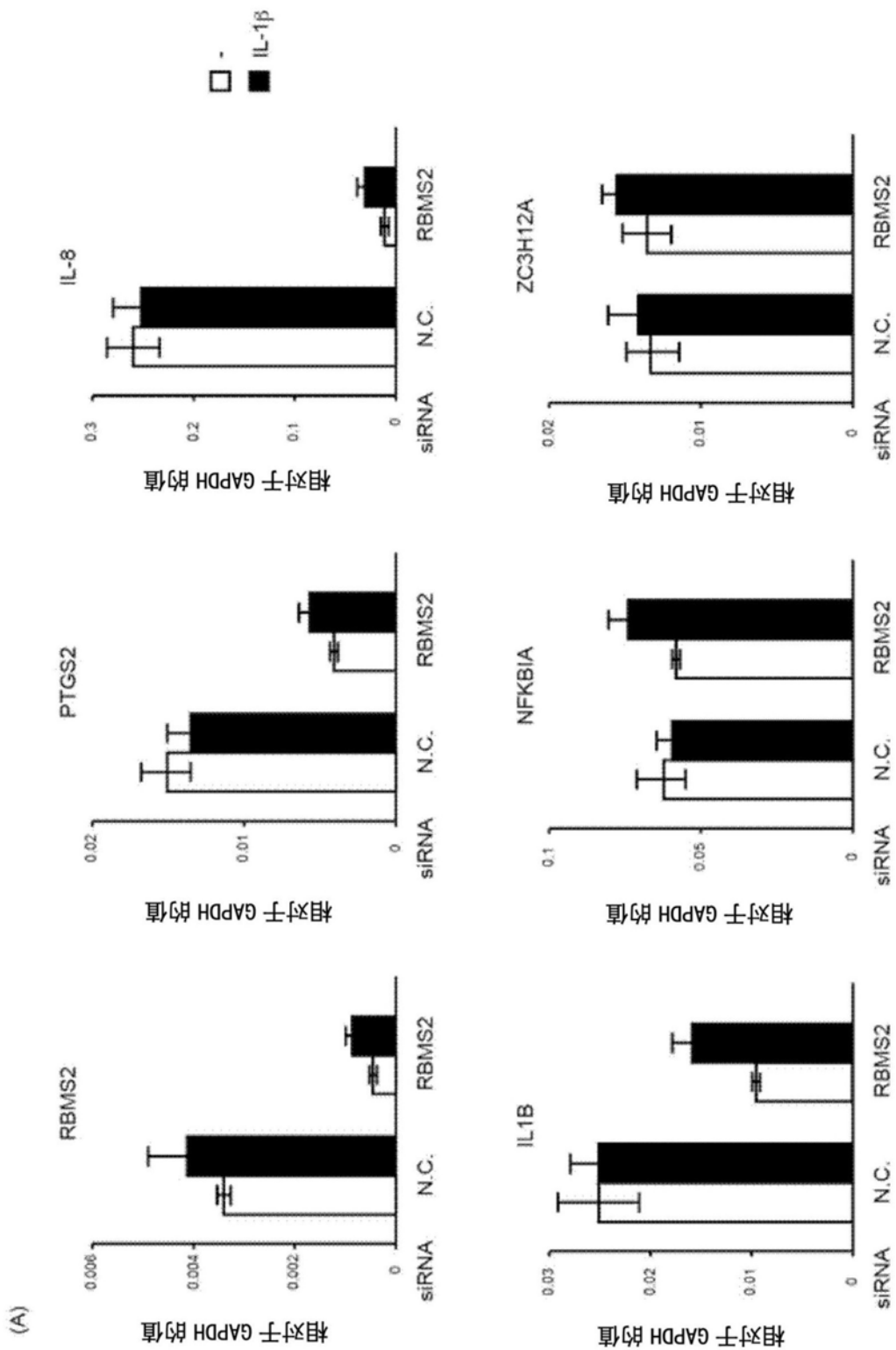
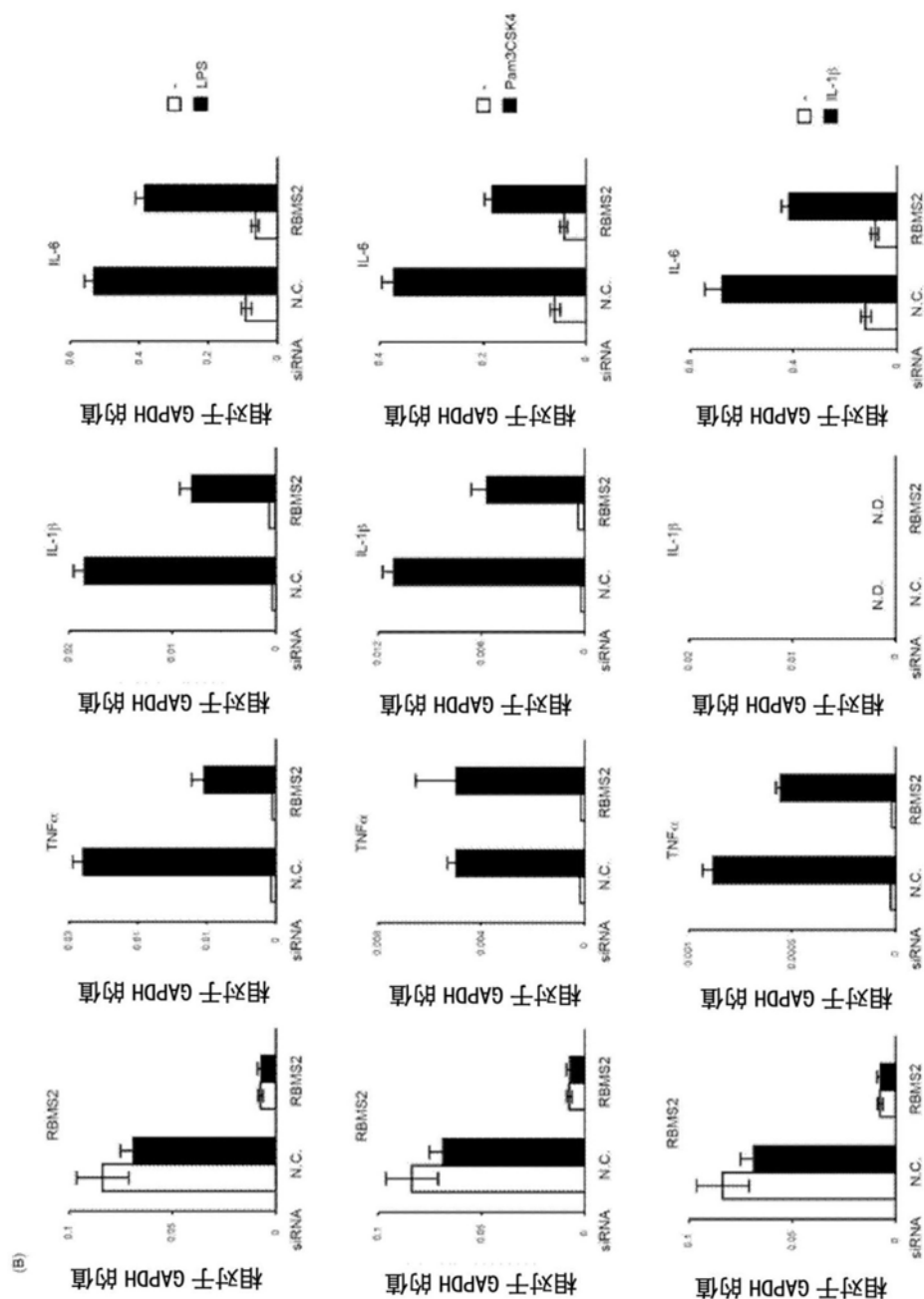


图4A



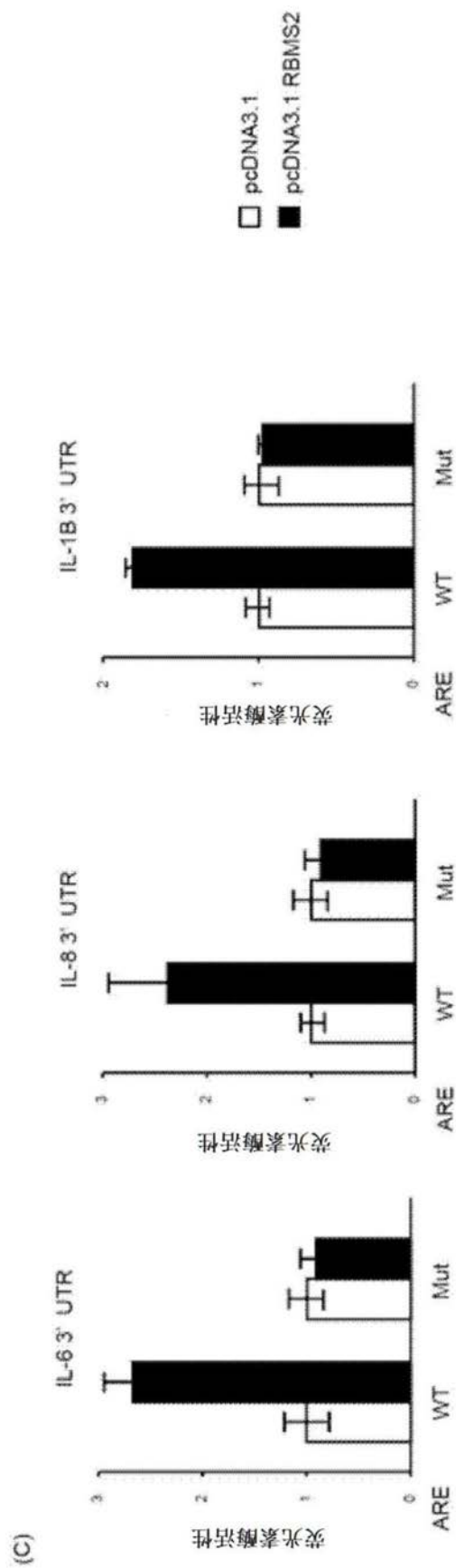


图4C

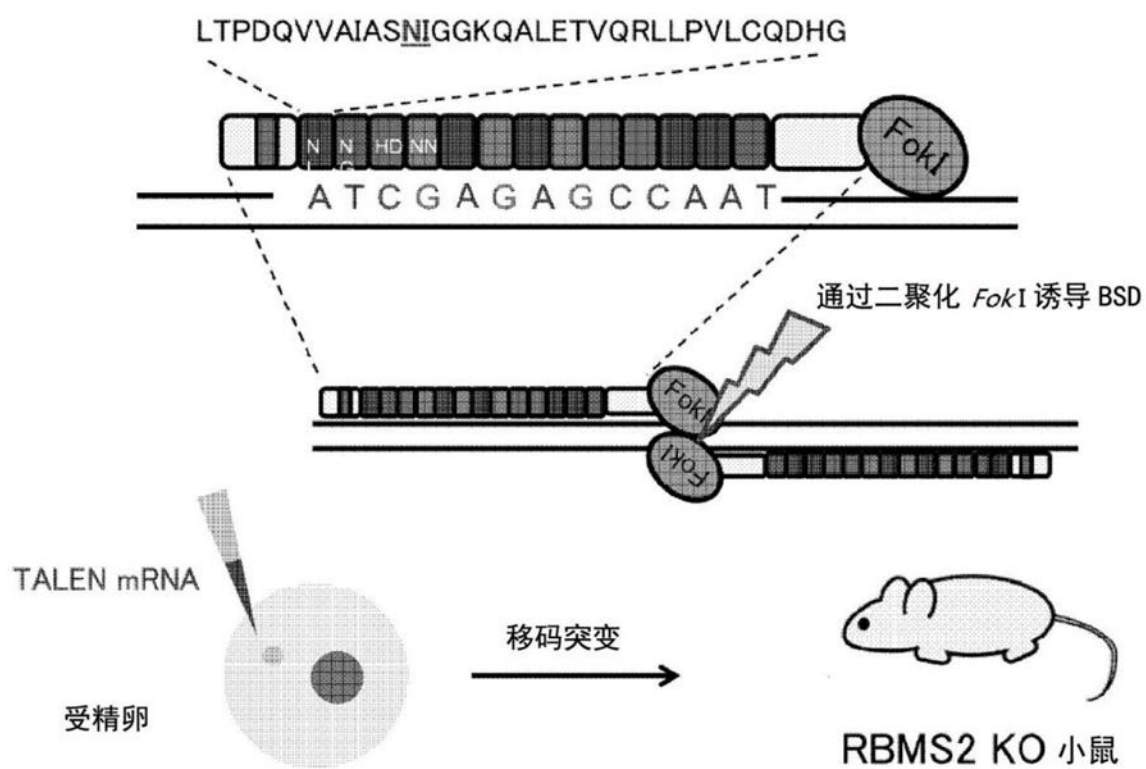


图5A

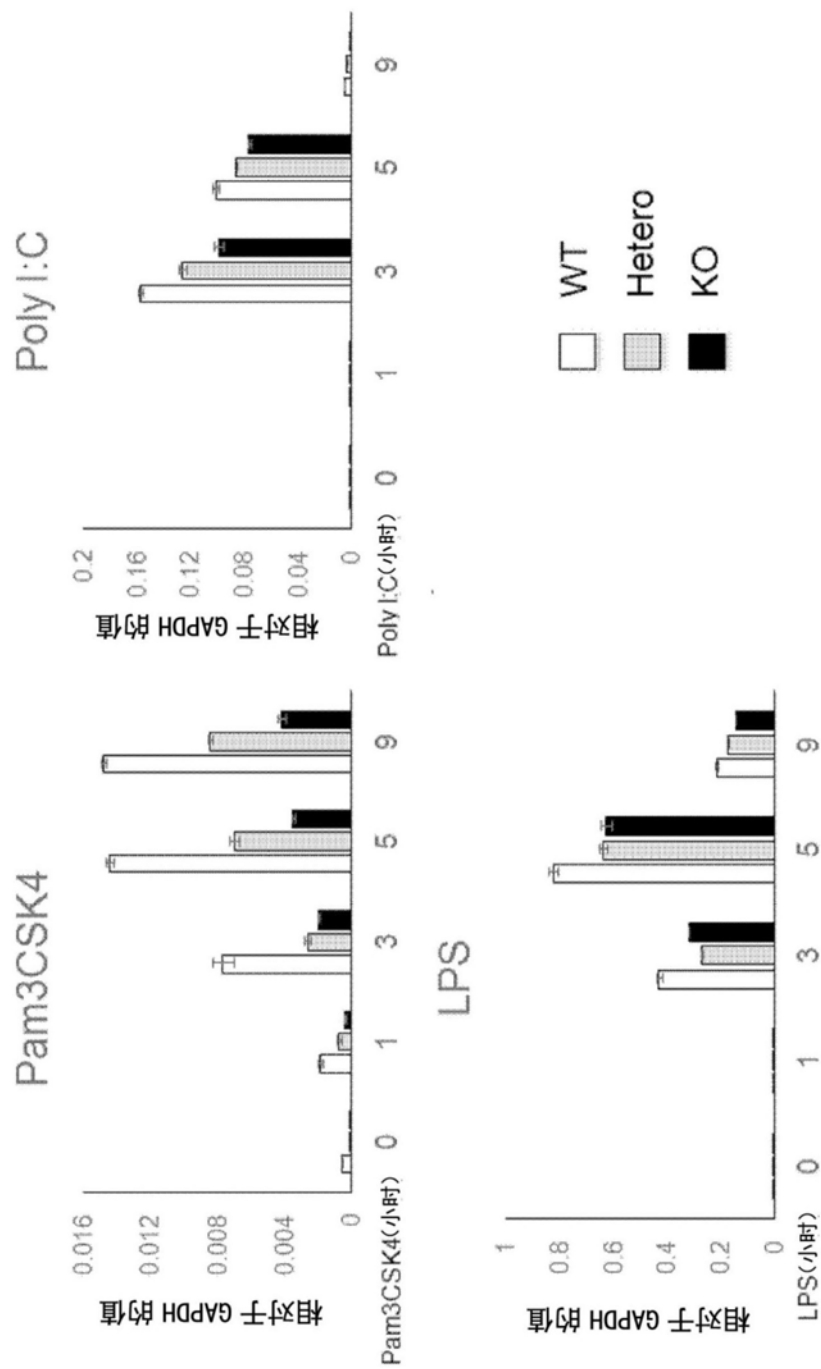


图5B

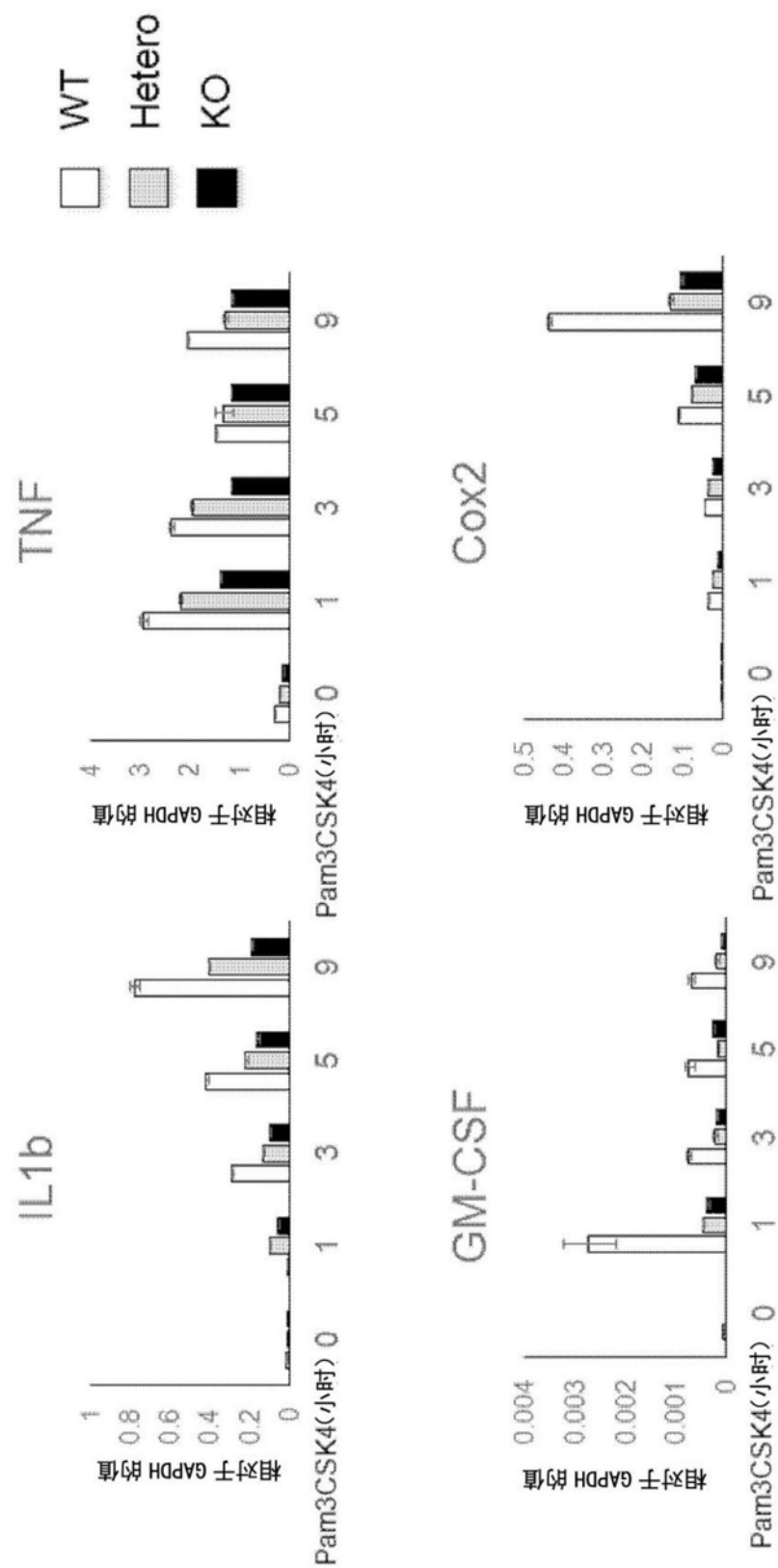


图5C

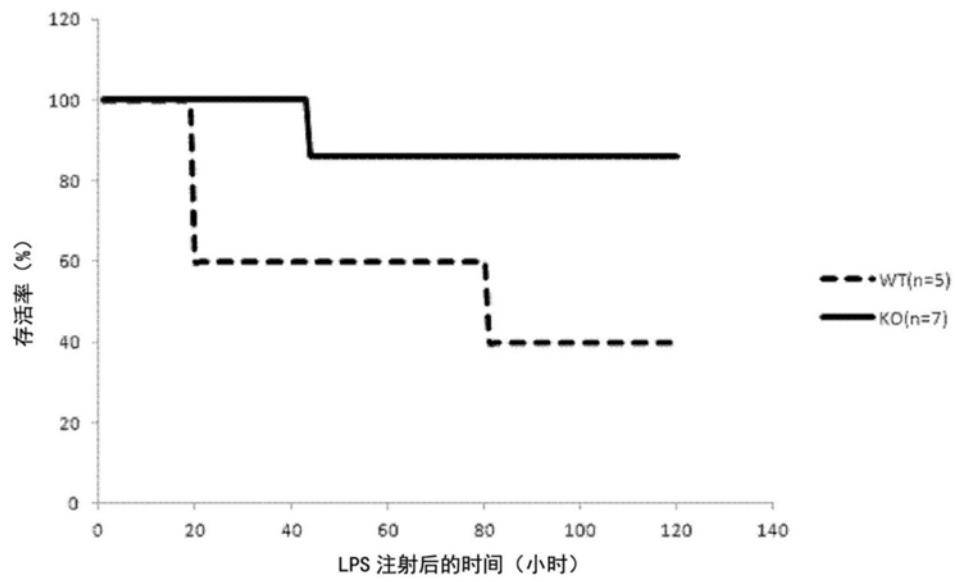


图6A

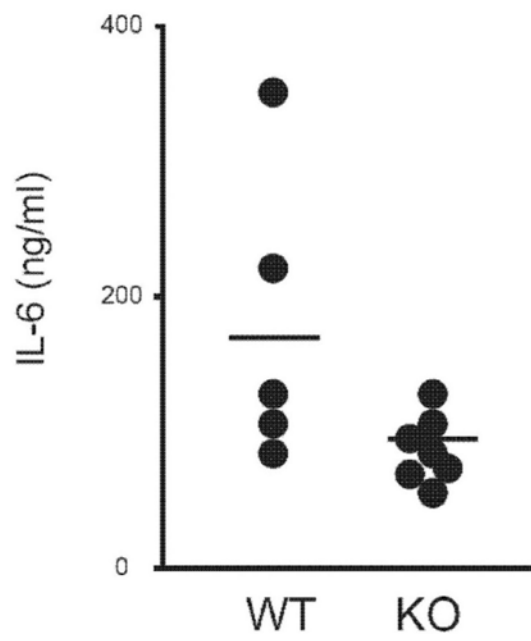


图6B

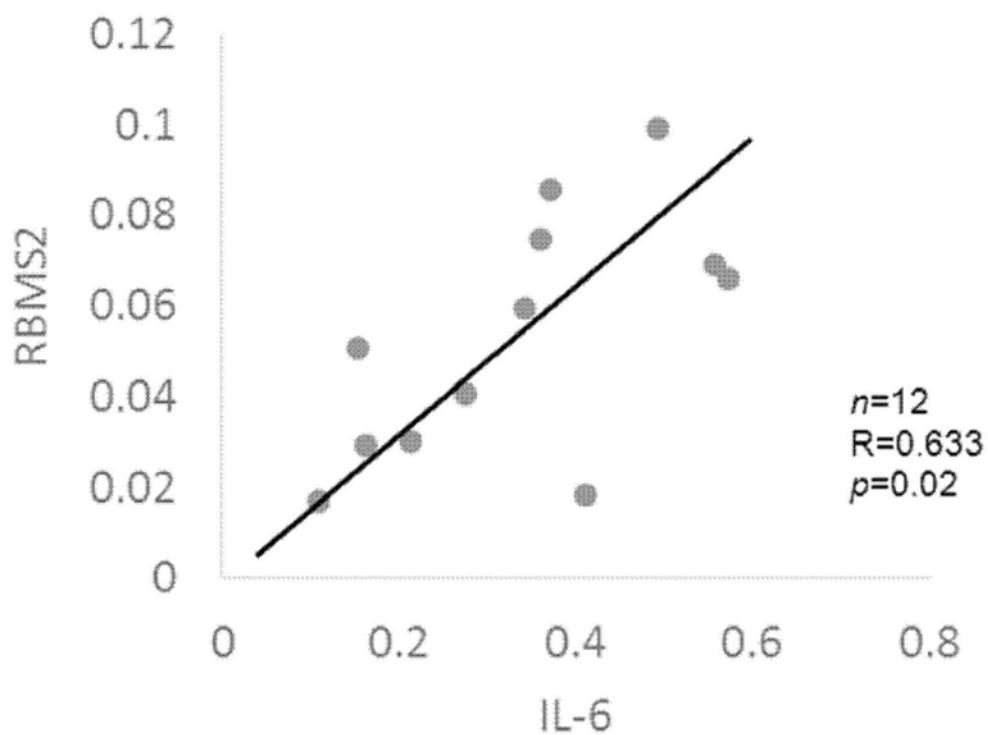


图7

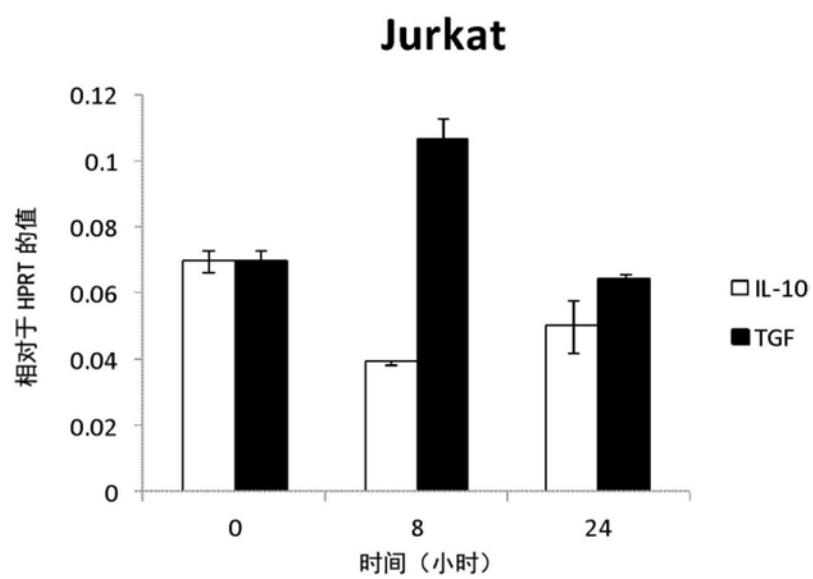


图8

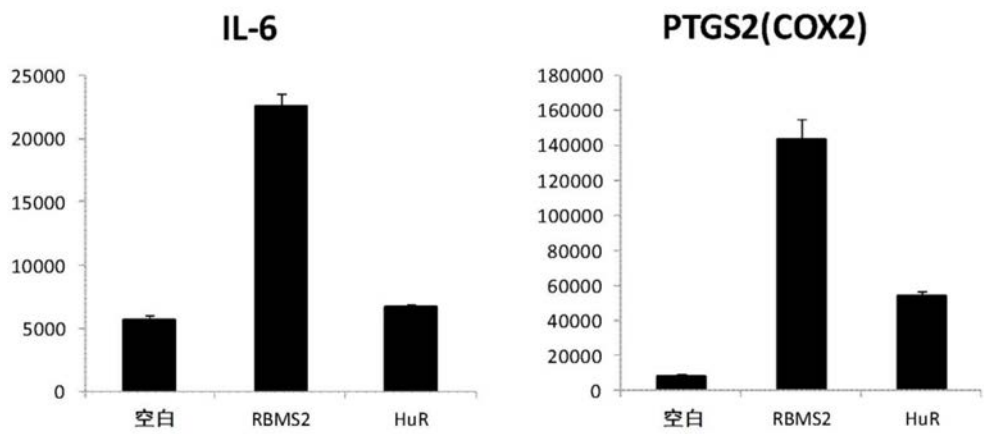


图9

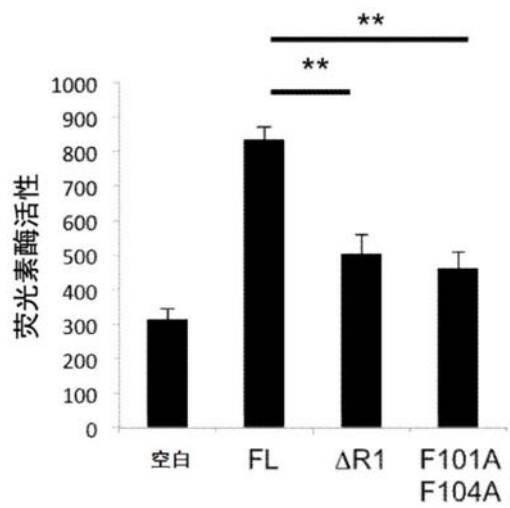


图10A

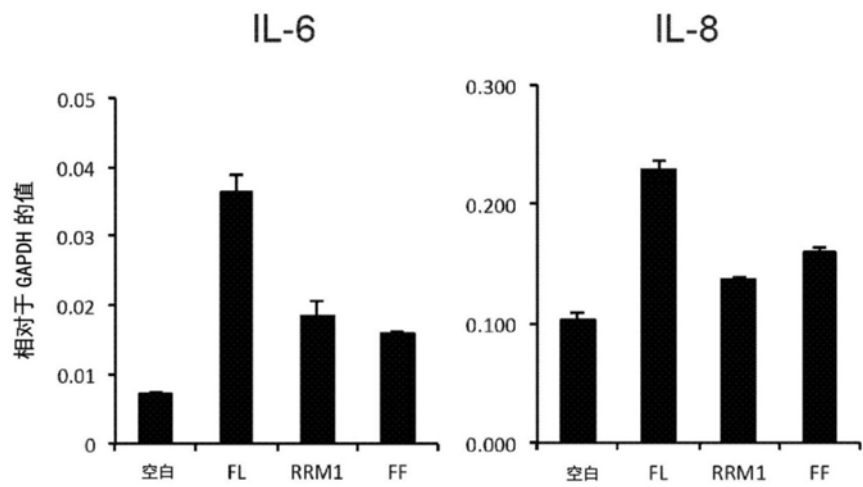


图10B

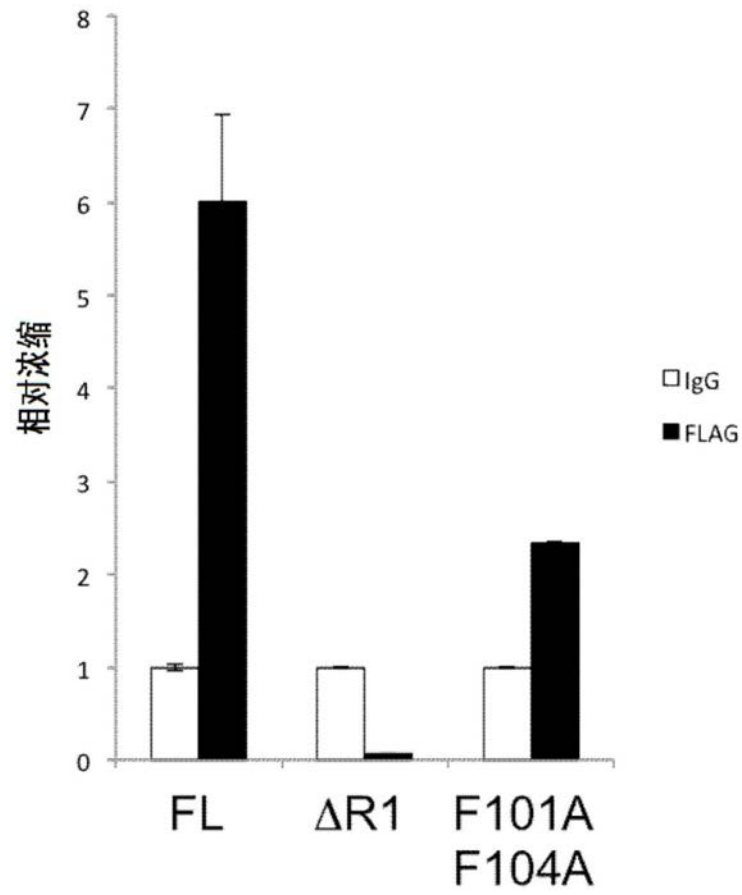


图10C

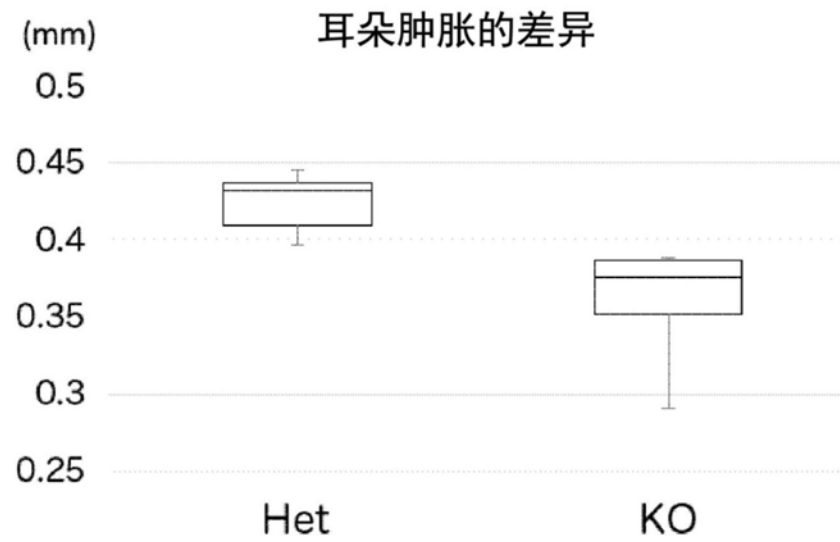


图11

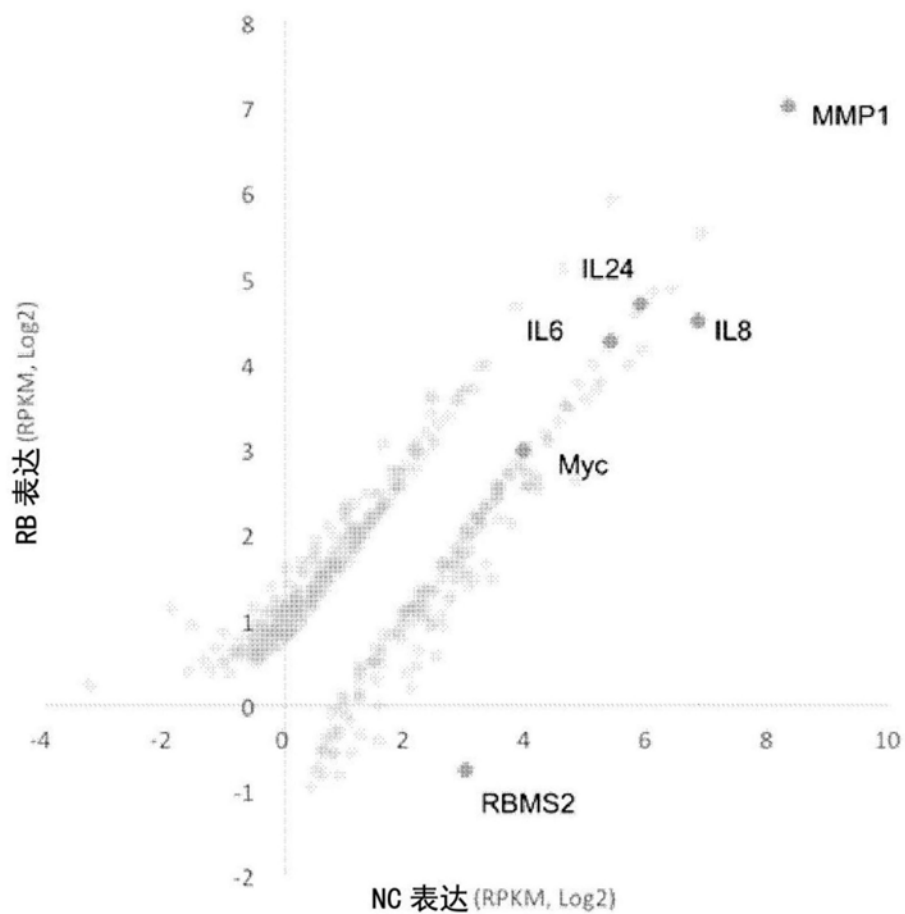


图12

专利名称(译)	炎症促进因子表达抑制剂、其有效成分的筛选方法、对该方法有用的表达盒、诊断药和诊断方法		
公开(公告)号	CN109477146A	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201780042802.0	申请日	2017-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	日本脏器制药株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学 日本脏器制药株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学 日本脏器制药株式会社		
[标]发明人	浅原弘嗣 千叶朋希 阿部健太郎		
发明人	浅原弘嗣 千叶朋希 阿部健太郎		
IPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2016094931 2016-05-10 JP 2016162120 2016-08-22 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明发现对炎症促进因子的表达量产生影响的新型因子，提供基于该发现的炎症促进因子表达抑制剂、其开发工具，以及提供免疫疾病、炎症性疾病、疼痛性疾病等的诊断药和诊断方法。含有选自由RBMS2表达抑制剂和RBMS2功能抑制剂组成的组中的至少1种的炎症促进因子表达抑制剂、以RBMS2的表达或功能为指标的筛选方法、和对该方法有用的表达盒、以及含有RBMS2基因表达产物检测剂的诊断药、和以RBMS2基因表达量为指标的疾病检测方法。

(A)

