

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02012/029855**

発行日 平成25年10月31日 (2013.10.31)

(43) 国際公開日 **平成24年3月8日 (2012.3.8)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B024
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/50 Z	4B063
<b>GO1N 33/15 (2006.01)</b>	GO1N 33/15 Z	4C084
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A61K 45/00	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 36 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2012-531917 (P2012-531917)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/069780	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(22) 国際出願日	平成23年8月31日 (2011.8.31)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	61/379, 124	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成22年9月1日 (2010.9.1)	(74) 代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	長田 重一 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学 法人京都大学大学院医学研究科内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固調節物質のスクリーニング方法

## (57) 【要約】

本発明は、T M E M 1 6 F (transmembrane protein 16 F) を標的とした、血液凝固調節物質のスクリーニング方法、血液凝固調節用組成物、および血液凝固調節方法に関する。さらに本発明は、S c o t t 症候群の診断方法および診断用組成物に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血液凝固調節物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 F 発現細胞と血液凝固調節物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞の表面におけるホスファチジルセリンの露出を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、ホスファチジルセリンの露出を増加させる候補物質が血液凝固促進物質として選択され、ホスファチジルセリンの露出を減少させる候補物質が血液凝固阻害物質として選択される。

10

## 【請求項 2】

工程(2)が、該細胞に対するアネキシン V または M F G - E 8 の結合を調べることにより行われる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

工程(2)が、血液凝固反応を調べることにより行われる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

血液凝固調節物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 F をコードする遺伝子を有する細胞と血液凝固調節物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞における T M E M 1 6 F の発現を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、T M E M 1 6 F の発現を増加させる候補物質が血液凝固促進物質として選択され、T M E M 1 6 F の発現を減少させる候補物質が血液凝固阻害物質として選択される。

20

## 【請求項 5】

T M E M 1 6 F の機能を亢進する物質を有効成分として含有する、血液凝固促進用組成物。

## 【請求項 6】

T M E M 1 6 F の機能を抑制する物質を有効成分として含有する、血液凝固阻害用組成物。

## 【請求項 7】

T M E M 1 6 F の機能を亢進する物質を対象に投与することを含む、血液凝固を促進する方法。

30

## 【請求項 8】

T M E M 1 6 F の機能を抑制する物質を対象に投与することを含む、血液凝固を阻害する方法。

## 【請求項 9】

T M E M 1 6 F の機能を調節する物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 F 発現細胞と T M E M 1 6 F の機能を調節する物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞の表面におけるホスファチジルセリンの露出を変化させる候補物質を選択する工程、

40

ここで、ホスファチジルセリンの露出を増加させる候補物質が T M E M 1 6 F の機能を亢進する物質として選択され、ホスファチジルセリンの露出を減少させる候補物質が T M E M 1 6 F の機能を抑制する物質として選択される。

## 【請求項 10】

T M E M 1 6 F の機能を調節する物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 F をコードする遺伝子を有する細胞と T M E M 1 6 F の機能を調節する物質の候補物質とを接触させる工程、

(2) 該細胞における T M E M 1 6 F の発現を変化させる候補物質を選択する工程、

50

ここで、T M E M 1 6 F の発現を増加させる候補物質が T M E M 1 6 F の機能を亢進する物質として選択され、T M E M 1 6 F の発現を減少させる候補物質が T M E M 1 6 F の機能を抑制する物質として選択される。

【請求項 1 1】

被験者の S c o t t 症候群の素因を調べる方法であって、該被験者が T M E M 1 6 F をコードする遺伝子に変異を有するかを調べることを含む方法。

【請求項 1 2】

被験者から採取された試料から調製されたゲノム D N A または m R N A における変異の存在を調べる、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

被験者から採取された試料における変異型 T M E M 1 6 F の発現を調べる、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

T M E M 1 6 F をコードする遺伝子の変異を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用される該遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む、S c o t t 症候群の診断用組成物。

【請求項 1 5】

配列番号 2 の配列に特異的にハイブリダイズし、かつ配列番号 2 の全体または一部を増幅するためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 4 記載の組成物。

【請求項 1 6】

オリゴヌクレオチドが配列番号 2 の配列の一部に相補的である、請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 7】

T M E M 1 6 F を特異的に認識する抗体を含む、S c o t t 症候群の診断用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T M E M 1 6 F (transmembrane protein 16 F) を標的とした、血液凝固調節物質のスクリーニング方法、血液凝固調節用組成物、および血液凝固調節方法に関する。さらに本発明は、S c o t t 症候群の診断方法および診断用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

脊椎動物および無脊椎動物のあらゆる正常な細胞において、リン脂質は細胞膜の外葉と内葉の間に非対称性に分布している(非特許文献 1)。コリン含有リン脂質(ホスファチジルコリン [PC] およびスフィンゴミエリン [SM]) は基本的に外葉に位置し、一方、陰イオン性リン脂質と第一級アミン含有リン脂質(ホスファチジルセリン [PS]、ホスファチジルエタノールアミン [PE]、ホスホイノシチド [PIP]、およびホスファチジン酸 [PA]) は細胞質内葉に限定される。

【0003】

リン脂質の非対称性は、多くの細胞機能において示唆されている(非特許文献 1)。例えば、リン脂質の非対称性分布によって、膜脂質の密な充填が可能となり、溶質に対する膜の透過性が減少するようである。非対称性のリン脂質分布の制御された破壊、特に細胞表面における PS の露出は、様々な系で重要である。例えば、血小板がコラーゲンまたはトロンピンにより活性化されると、血小板はその表面に PS を露出する。露出された PS は、テナーゼとプロトロンビナーゼの複合体に対する触媒表面を提供し、凝固因子の活性化を誘発する(非特許文献 2)。アポトーシス細胞死を起こしている細胞もまた PS を露出し、露出された PS は食細胞のための「eat me」シグナルとして機能する(非特許文献 3、4)。

【0004】

膜におけるリン脂質の非対称性分布は、フリッパーゼ、フロッパーゼ、およびスクラン

10

20

30

40

50

ブレースの、3つのタイプの脂質トランスポーターにより構築されると考えられている。フリッパーゼは、ATP依存的アミノリン脂質トランスロケースとも呼ばれ、細胞外葉から細胞内側へアミノリン脂質を輸送する（非特許文献1、3）。4型P型ATPアーゼ（P4-ATPアーゼ）は、P型ATPアーゼ多重スパン膜貫通タンパク質のサブファミリーであり、フリッパーゼの有力な候補である（非特許文献5、6）。フロッパーゼは、広範な脂質を細胞質から細胞外葉へATP依存的に移動させるトランスポーターである。ATP結合カセット（ABC）ATPエース、特にABCA1は、フロッパーゼとして示唆されている（非特許文献7）が、ABCA1欠損細胞は2層間のリン脂質移動に何ら欠陥を示さず（非特許文献8）、この役割は疑問視されている。

10

**【0005】**

リン脂質スクランブレースは、ATP依存的にリン脂質を二方向性に輸送し、膜における脂質の非対称性を減少させる（非特許文献1、3）。2つのタイプのスクランブレースが想定されている。一方は、小胞体内で構成的に機能し、新規に合成されたリン脂質を細胞質から内葉へ輸送する。他方は、細胞膜に位置し、細胞が静止状態のときは不活性であるが、細胞内Ca<sup>2+</sup>が増加すると活性化される。活性化された血小板上のPSの露出はCa<sup>2+</sup>を必要とすることから、Ca<sup>2+</sup>依存的スクランブレースが想定されている。この活性を有するタンパク質（リン脂質スクランブレース、PLSCR）のファミリーが単離され、特徴決定されている（非特許文献9、10）。しかしながら、PLSCRタンパク質が実際に内因性の細胞膜のリン脂質スクランブレース活性を提供するかについては議論があり、最近では異議をとなえられている（非特許文献11-14）。

20

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明者らは、8回膜貫通型タンパク質であるTMEM16F（Transmembrane protein 16F）（本明細書中、スクランブレース（SCR）とも称する）（非特許文献15）がリン脂質スクランブレースであることを見出した。さらに、リン脂質スクランブリング活性の異常に起因する出血性疾患であるScott症候群（非特許文献16、17、18）の患者がSCR遺伝子に変異を有することを見出した。以上より、血液凝固経路の制御を可能とする新規ターゲットとしてSCRを同定し、本発明を完成した。

30

**【課題を解決するための手段】****【0007】**

本発明は、以下を提供する：

血液凝固調節物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) TMEM16F発現細胞と血液凝固調節物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞の表面におけるホスファチジルセリンの露出を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、ホスファチジルセリンの露出を増加させる候補物質が血液凝固促進物質として選択され、ホスファチジルセリンの露出を減少させる候補物質が血液凝固阻害物質として選択される。

40

**【0008】**

本発明はまた、以下を提供する：

血液凝固調節物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) TMEM16Fをコードする遺伝子を有する細胞と血液凝固調節物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞におけるTMEM16Fの発現を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、TMEM16Fの発現を増加させる候補物質が血液凝固促進物質として選択され、TMEM16Fの発現を減少させる候補物質が血液凝固阻害物質として選択される。

**【0009】**

本発明はまた、TMEM16Fの機能を亢進する物質を有効成分として含有する、血液

50

凝固促進用組成物、およびT M E M 1 6 Fの機能を抑制する物質を有効成分として含有する、血液凝固阻害用組成物、を提供する。

【0010】

本発明はまた、T M E M 1 6 Fの機能を亢進する物質を対象に投与することを含む、血液凝固を促進する方法、およびT M E M 1 6 Fの機能を抑制する物質を対象に投与することを含む、血液凝固を阻害する方法、を提供する。

【0011】

本発明はまた、以下を提供する：

T M E M 1 6 Fの機能を調節する物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 F発現細胞とT M E M 1 6 Fの機能を調節する物質の候補物質とを接触させる工程、および

(2) 該細胞の表面におけるホスファチジルセリンの露出を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、ホスファチジルセリンの露出を増加させる候補物質がT M E M 1 6 Fの機能を亢進する物質として選択され、ホスファチジルセリンの露出を減少させる候補物質がT M E M 1 6 Fの機能を抑制する物質として選択される。

【0012】

本発明はまた、以下を提供する：

T M E M 1 6 Fの機能を調節する物質のスクリーニング方法であって、以下の工程を含む方法：

(1) T M E M 1 6 Fをコードする遺伝子を有する細胞とT M E M 1 6 Fの機能を調節する物質の候補物質とを接触させる工程、

(2) 該細胞におけるT M E M 1 6 Fの発現を変化させる候補物質を選択する工程、

ここで、T M E M 1 6 Fの発現を増加させる候補物質がT M E M 1 6 Fの機能を亢進する物質として選択され、T M E M 1 6 Fの発現を減少させる候補物質がT M E M 1 6 Fの機能を抑制する物質として選択される。

【0013】

本発明はまた、被験者のS c o t t症候群の素因を調べる方法であって、該被験者がT M E M 1 6 Fをコードする遺伝子に変異を有するかを調べることを含む方法、を提供する。

【0014】

本発明はまた、T M E M 1 6 Fをコードする遺伝子の変異を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用される該遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む、S c o t t症候群の診断用組成物を提供する。

【0015】

本発明はまた、T M E M 1 6 Fを特異的に認識する抗体を含む、S c o t t症候群の診断用組成物を提供する。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、T M E M 1 6 Fを標的とした血液凝固調節物質のスクリーニングが可能となった。本発明は、新規メカニズムに基づく血液凝固促進剤や血液凝固阻害剤の提供を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】SCR の分子クローニング。a, A23187 ± CaCl<sub>2</sub>で処理し、アネキシンVおよびPIにより染色したBa/F3。 b, BAPTA-AMとインキュベートし、A23187で処理したBa/F3。PI陰性集団におけるアネキシンV染色プロファイルを示す。白抜き部分は休止期の細胞を示す。 c, A23187で処理し、次いでBAPTA-AMで5分間処理し、アネキシンVで染色したBa/F3。 d, A23187で処理し、アネキシンVで染色した、Ba/F3および12サイクルのソーティング後の

10

20

30

40

50

細胞 (PS12)。e. PS0、PS19、およびPS0/19ハイブリッドのGFPおよびDsRedの発現プロファイル。右：A23187で処理し、アネキシンVで染色した前記細胞。f, Ba/F3-PS19 cDNAライブラリーにより形質転換し、A23187で処理し、アネキシンVで染色し、そしてソーティングした、Ba/F3 (LD-PS0)。第1 (LD-PS1)および第3 (LD-PS3)のソーティング後の細胞のアネキシンVとPIのプロファイル。右：ソーティング前(LD-PS0)および第4のソーティングの後(LD-PS4)の細胞のA23187非存在下でのアネキシンVプロファイル。

【図2】SCR 発現細胞上のPS露出。a, マウスSCR の模式図。D409G変異体(Mut)は、コドン409においてアスパラギン酸をグリシンに置換するAからGへの変異を有する。b, 抗Flagによるウェスタンブロッティングにより解析したFlag標識野生型 (WT) SCR および変異体SCR を発現するBa/F3。矢印はSCR の単量体および多量体を示す。c, 蛍光顕微鏡で観察したSCR -mRFPを発現するヒト293T細胞。スケールバー：10  $\mu$ m。d, 空のベクター、野生型SCR 発現ベクター、または変異体SCR 発現ベクターにより形質転換し、アネキシンVで染色したBa/F3 (BAPTA-AMによる前処理有り、または無し)。e, アネキシンVでプレインキュベートし、A23187と混合した、ベクターまたは野生型SCR で形質転換したBa/F3。蛍光をモニターした。f, ベクター、野生型SCR 発現ベクター、または変異体SCR 発現ベクターにより形質転換し、Fluo-4-AMをロードし、FACSにより解析したBa/F3。g, Fluo-4-AMでプレインキュベートした、ベクターまたは野生型SCR で形質転換したBa/F3。A23187を矢印で示した時点で添加し、蛍光をモニターした。d-gの実験はいずれも少なくとも3回実施した。

【図3】SCR 発現細胞におけるリン脂質のスクランプリング。a, ビオチン標識Ro09-0198とインキュベートし、次いでAPCストレプトアビジンにより染色した、ベクター、野生型SCR、またはD409G変異体SCR を発現するBa/F3 (BAPTA-AMによる前処理有り、または無し) b, ビオチン-Ro09-0198およびAPCストレプトアビジンとプレインキュベートした、ベクターまたはSCR により形質転換したBa/F3。A23187を添加し、蛍光をモニターした。c およびe,  $Ca^{2+}$ 含有HBSS中で0.5  $\mu$ MのNBD-PC (c)またはNBD-SM (e)と室温でインキュベートした、ベクターまたは変異体SCR を発現するBa/F3。表示した時点において、冷却した脂肪酸不含BSA含有バッファーでサンプルを希釈し、フローサイトメトリーにより解析した。dおよびf, 4 で0.1  $\mu$ M NBD-PC (d)またはNBD-SM (f)とプレインキュベートした、ベクターまたは野生型SCR 発現Ba/F3。A23187を添加し、取り込まれたNBDリン脂質を室温で前述のように解析した。b-fにおいて、y軸はFACS解析により観察された蛍光強度であり、任意単位 (arbitrary unit) で示す。実験は独立に少なくとも3回行った。c-fにおいて、表示した時点でBSAにより抽出できなかったNBDリン脂質の割合をトリプリケートで測定し、S.D.とともにプロットした。

【図4】 $Ca^{2+}$ 依存性リン脂質スクランプリングについてのSCR の必要性。a. SCR のためのshRNA (shSCR)、またはスクランブルなshRNA (shCon)を発現するBa/F3形質転換体を樹立した。SCR mRNAをリアルタイムPCRにより定量し、 $\beta$ -アクチン mRNAに対してノーマライズし、相対的な発現として示す。bおよびc, Cy5-アネキシンV (b) またはビオチン-Ro09-0198およびAPCストレプトアビジン (c)とアネキシンV結合バッファーにおいてプレインキュベートした、shSCRまたはスクランブルなshRNAを発現するBa/F3。0.5  $\mu$ MのA23187を添加後、細胞の蛍光をモニターした。dおよびe, 0.5  $\mu$ MのNBD-PC (d)またはNBD-SM (e)とHBSS (2 mM  $CaCl_2$ 含有)においてプレインキュベートした、shSCRまたはスクランブルなshRNAを発現するBa/F3。A23187を0.5  $\mu$ Mまで添加後、混合物を表示した時点で脂肪酸不含BSA含有バッファーにより希釈し、蛍光を測定した。b-eの実験は少なくとも3回実施した。

【図5】Scott症候群患者におけるSCR 遺伝子のスプライス変異。a, 対照、Scott症候群患者、および患者の両親由来の細胞をアネキシンVとプレインキュベートした。A23187を添加し、蛍光をモニターした。b, Scott患者および患者の両親の細胞由来のRNAを用いた、SCR mRNAのエクソン 1-12および11-20についてのRT-PCR。マーカーDNAのサイズを左に示す。c, 3'側から配列決定したSCR 遺伝子のエクソン13およびイントロン12のジャンクション。コンセンサススプライスアクセプターサイトの“AG”に相補的な“CT”に下線

10

20

30

40

50

を付す。矢印は変異を示す。d, SCR のエクソン12およびエクソン16上のプライマーを用いたRT-PCR。矢印は、野生型およびエクソン13欠損型のフラグメントを示す。eおよびf, 両親のSCR 遺伝子におけるスプライシング。イントロン12におけるスプライスアクセプターサイト (AG) のATへの変異は、エクソン13のスキッピングを生じさせ、結果として第3膜貫通領域において未成熟に終結するフレームシフト変異が起こる。

【図6】D409G変異体SCR を発現するBa/F3細胞へのMFG-E8の結合。空のレトロウイルスベクター、または野生型SCR もしくはD409G 変異体SCR を有するレトロウイルスを感染させたBa/F3細胞を0.4 μg/mlのマウスMFG-E8とインキュベートし、続けてハムスター抗マウスMFG-E8およびPE標識マウス抗ハムスターIgGとともにインキュベートした。この細胞をFACS Ariaを用いてフローサイトメトリーにより解析し、その染色プロファイルを示す(色付き部分)。染色操作をMFG-E8なしでも行い、その染色プロファイルを白抜き部分で示す。

【図7】細胞に取り込まれたNBD-PCの非分解。NBD-PCを、SCR のD409G変異体を発現するBa/F3に添加した。室温で8分間インキュベートした後、細胞に取り込まれたNBD-PCを細胞から抽出し、添加したNBD-PC(インプット)とともに薄層クロマトグラフィーにより解析した。参考用に、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、およびスフィンゴミエリン(SM)のNBD誘導体を並行してクロマトグラフィーにかけ、それらのクロマトグラム上の位置を右に示す。

【図8】Ca<sup>2+</sup>依存性PS露出に対するSCR のノックダウンの効果。SCR のためのpRS shRNAベクターをBa/F3細胞に導入した。SCR mRNAレベルが減少しているBa/F3安定形質転換クローンのうち、5クローン(shSCR 1-5)を選択し、検討した。対照として、スクランブルな無効な配列を有するpRS shRNAベクターにより樹立したBa/F3形質転換細胞(shCon)も解析した。a, Ba/F3 形質転換クローン(shSCR 1-5)におけるSCR mRNAレベルをリアルタイムPCRにより測定し、対照Ba/F3(shCon)におけるレベルに対する比として示す。b, Ba/F3 形質転換細胞(shConおよびshSCR 1-5)を1.0 μM A23187により37 °Cで15分間処理し、Cy5標識アネキシンVで染色し、フローサイトメトリーにより解析した。また、A23187処理なしで形質転換体をアネキシンVで染色し、その染色プロファイルを白抜き部分で示す。

【図9】ヒトT M E M 1 6 F 染色体遺伝子のエクソン12 - エクソン16の配列。

【図10】ヒトT M E M 1 6 F の c D N A 配列。開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA)、エクソン6(ヌクレオチド番号649 - 762)、11(ヌクレオチド番号1001 - 1323)、および13(ヌクレオチド番号1402 - 1627)は太字かつ下線で示した。

【図11】ヒトT M E M 1 6 F のアミノ酸配列。

【図12】S c o t t 症候群の患者で見出された変異型T M E M 1 6 F の c D N A 配列。エクソン13がスキップされることにより、ヌクレオチド1402番目よりエクソン14の配列が結合される。この配列では、43塩基下流(ヌクレオチド番号1444-1446)にTAG終止コドンがあり、翻訳は終了する。

【図13】S c o t t 症候群の患者で見出された変異型T M E M 1 6 F のアミノ酸配列。エクソン12からエクソン14にスプライスされたためにエクソン14で新たに付加されるアミノ酸を、太字かつ下線で示した。

【発明を実施するための形態】

【0018】

#### 1. 血液凝固調節物質のスクリーニング方法

本発明者らは、8回膜貫通型タンパク質であるT M E M 1 6 F (transmembrane protein 16 F)が血液凝固に関するリン脂質スクランブレース(scramblase)であることを同定した。よって、本発明は、T M E M 1 6 Fを標的とした、血液凝固調節物質のスクリーニング方法を提供する。

【0019】

本発明の「血液凝固調節物質」には、血液凝固促進物質と血液凝固阻害物質とが含まれる。本発明において「血液凝固」とは、血小板同士や血小板と血管内皮細胞が接着し、ま

10

20

30

40

50

たは血液細胞が血管壁に接着し、凝固因子とともに血餅を形成する一連の分子作用をいう。本発明において「血液凝固促進」とは、前記血液凝固を促進して止血を促進することを意味し、「血液凝固阻害」とは、前記血液凝固をいずれかの段階で阻害することを意味する。

**【0020】**

血液凝固調節物質の候補物質は、天然に存在する物質または合成された物質のいずれであってもよく、例えば微生物、植物もしくは動物の細胞抽出物または培養上清、合成低分子化合物、核酸、タンパク質、ペプチド、抗体などが挙げられる。候補物質は、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体ライブラリー等、ライブラリーの形態であってもよい。

10

**【0021】**

本発明における「T M E M 1 6 F 発現細胞」および「T M E M 1 6 F をコードする遺伝子を有する細胞」には、各種生物、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ等由来の、血小板、巨核球細胞や、巨核球由来細胞株を含む各種細胞株、T M E M 1 6 F をコードする遺伝子を導入し発現させた細胞が含まれる。ヒト N a m a l w a 細胞、マウス B a / F 3 細胞などの B 細胞株も利用可能である。

**【0022】**

ある態様において、本発明のスクリーニング方法は、T M E M 1 6 F の酵素活性の変化を調べることにより行われる。T M E M 1 6 F はホスファチジルセリン ( P S ) を細胞表面に露出させるスクランブレスとしての機能を有することから、T M E M 1 6 F の酵素活性の変化は、T M E M 1 6 F 発現細胞の表面における P S の露出の変化により調べることができる。血小板における P S の露出は血小板を活性化し、血液凝固を誘導することから、P S の露出を増加させる候補物質は血液凝固促進物質として選択され、P S の露出を減少させる候補物質は血液凝固阻害物質として選択される。

20

**【0023】**

P S の露出は、P S に結合する性質を有する物質、例えばアネキシン V ( AnnexinV ) や M F G - E 8 ( ラクトアドヘリンとも呼ばれる ) と細胞表面の P S との結合により調べることができる。具体的には、例えば、T M E M 1 6 F 発現細胞を候補物質で処理し、蛍光等で標識したアネキシン V とインキュベートして、細胞表面に結合するアネキシン V の量を調べればよい。この場合、対照と比較してアネキシン V の結合を増加させる候補物質は血液凝固促進物質として選択され、減少させる候補物質は血液凝固阻害物質として選択される。

30

**【0024】**

P S の露出は、また、血液凝固反応の誘導によっても調べることができる。血液凝固反応を調べる方法は周知である。例えば、T M E M 1 6 F 発現細胞を候補物質で処理し、さらに ( 候補物質の処理後またはその処理と同時に ) 細胞内に  $C a^{2+}$  を流入させるカルシウムイオノフォアで処理した細胞を、血液凝固に必要な因子 ( 例えば、ファクター X a 、ファクター V a 、プロトロンビン ) と混合し、トロンビンの生成の有無を調べる。あるいは、さらにフィブリノーゲンと混合して、フィブリンの生成を調べても良い。

**【0025】**

別の態様において、本発明のスクリーニング方法は、候補物質が T M E M 1 6 F の発現を変化させるか否かを調べることにより行われる。この場合、T M E M 1 6 F の発現を増加させる候補物質は血液凝固促進物質として選択され、T M E M 1 6 F の発現を減少させる候補物質は血液凝固阻害物質として選択される。

40

**【0026】**

かかる態様における血液凝固調節物質の候補物質の具体例としては、T M E M 1 6 F の発現を調節するプロモーターやエンハンサー等の調節配列に作用する物質、T M E M 1 6 F をコードする遺伝子の配列に基づき作製したアンチセンスオリゴヌクレオチド ( D N A または R N A ) 、 s i R N A 、 s h R N A や、m i R N A 、リボザイムが挙げられる。

**【0027】**

50

TMEM16Fの発現を調べる方法は特に限定されない。例えば、タンパク質の発現をウエスタンブロット法、ELISA法などにより調べてもよいし、mRNAの発現をノーザンブロット法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法などにより調べてもよい。

【0028】

## 2. 血液凝固調節用組成物および血液凝固調節方法

本発明はまた、TMEM16Fの機能を調節する物質を有効成分として含有する血液凝固調節用組成物、およびTMEM16Fの機能を調節する物質を対象に投与することを含む血液凝固を調節する方法を提供する。

【0029】

本発明における「TMEM16Fの機能を調節する物質」には、「TMEM16Fの機能を亢進する物質」と「TMEM16Fの機能を抑制する物質」が含まれる。「TMEM16Fの機能を亢進/抑制する」とは、細胞または生物におけるTMEM16Fのリン脂質スクランブレースとしての生化学的機能や生物学的機能を促進/抑制することを意味し、これにはTMEM16Fの酵素活性の促進/抑制やTMEM16Fの発現の増加/減少が含まれる。「TMEM16Fの発現の増加/減少」には、TMEM16Fをコードする遺伝子からのmRNAの発現の増加/減少、およびTMEM16Fタンパク質の発現の増加/減少が含まれる。

【0030】

具体的には、「TMEM16Fの機能を促進する物質」としては、例えば、野生型TMEM16Fタンパク質が挙げられる。また、「TMEM16Fの機能を抑制する物質」としては、例えば、TMEM16Fの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNAやTMEM16Fの機能を抑制する抗TMEM16F抗体が挙げられる。

【0031】

本発明の「血液凝固促進用組成物」は、血管損傷などによる出血を止めるために使用できる他、血友病、von willebrand病、播種性血管内凝固症候群等の血液凝固作用に対する異常疾患の治療にも使用することができる。一方、本発明の「血液凝固阻害用組成物」は、血栓が血管の損傷等を原因として形成された部位以外の部位に異動して血管を塞ぐ、血栓塞栓症（例えば、静脈血栓症、心筋梗塞症、脳塞栓症等）の治療に使用することができる。また、本発明の「血液凝固阻害用組成物」は、異常な血液凝固を阻害することにより、血液循環の促進やうっ血予防に使用することができる。さらに、過剰な血液凝固や血栓の形成は動脈硬化や梗塞を誘発することから、本発明の「血液凝固阻害用組成物」は動脈硬化や梗塞の予防にも使用することができる。

【0032】

本発明はまた、TMEM16Fの機能を調節する物質のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、前記「1.1.血液凝固調節物質のスクリーニング方法」に記載のように行えばよい。

【0033】

## 3. Scott症候群の診断方法および診断用組成物

本発明者らは、TMEM16Fが、血小板表面へのPSの移動障害を原因とする出血性疾患であるScott症候群の原因遺伝子であることを見出した。よって、本発明は、TMEM16Fをコードする遺伝子の変異を調べることによる、Scott症候群の診断方法を提供する。

【0034】

本明細書における「TMEM16Fをコードする遺伝子」には、TMEM16Fのコーディング配列のみならず、TMEM16Fの発現を調節するプロモーター等の調節配列も含まれる。また、「TMEM16Fをコードする遺伝子」には、エクソンおよびイントロンの両方が含まれる。「TMEM16Fをコードする遺伝子の変異」には、細胞または生物におけるTMEM16Fの酵素活性を失活させるあらゆる変異（例えば、1もしくは数個の塩基の欠失、置換、付加および/または挿入等による）が含まれる。かかる変異は、

10

20

30

40

50

例えば、1もしくは数個のアミノ酸残基の欠失、置換、付加および/または挿入、mRNAの異常スプライシングによるエクソンの欠失、mRNAの翻訳時のフレームシフト等、TMEM16Fのアミノ酸配列の変異をもたらす。そのような変異の例としては、本願明細書に記載される変異の他、Castoldi E et al., Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 117, 4399-4400 (2011) (非特許文献47)に記載の変異が挙げられる。なお、本明細書において数個とは、2、3、4、5、6、7、8、9または約10個を意味する。

#### 【0035】

本発明者らは、Scott症候群の患者が、TMEM16Fの2つの対立遺伝子の両方においてイントロン12におけるグアニン(G)(配列番号1の11423位)のチミン(T)への変異を有し、その両親が一方の対立遺伝子において当該変異を有することを見出した。よって、好ましくは、本発明の診断方法は、配列番号1の11423位のGからTへの変異を調べることを含む。

#### 【0036】

配列番号1(図9-1~9-9)は、ヒトTMEM16F染色体遺伝子のエクソン12-エクソン16の配列を示す。エクソン12-エクソン16の各配列はそれぞれイタリック体で示した。配列中の下線はPCRで用いたEx12-FWおよびEx16-RVの位置を示す。ヒトTMEM16FのmRNAの配列はGenBankにNM\_001025356として、ゲノム配列は、Entrez Geneに196527として(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=196527>)、またはHGNCに25240([http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=25240](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=25240))として開示されている。(これらの開示はいずれも引用により本願に含まれる)

#### 【0037】

変異は、被験者から採取された試料から公知の方法によって調製されたゲノムDNA、mRNA、タンパク質を用いて調べることができる。試料は、特に限定されず、例えば被験者の各種細胞、組織、臓器、血液、体液等が使用可能である。

#### 【0038】

変異は、被験者のゲノムDNAまたはmRNAの配列を直接調べることにより検出することができる。変異の検出には種々の方法を用いることができ、例えば以下が挙げられる：

- TaqMan PCR法 (Genet. Anal., 14, 143-149 (1999), J. Clin. Microbiol., 34, 2933-2936 (1996)) ;
- インベーター (Invader) 法 (Science, 5109, 778-783(1993), J. Biol. Chem., 30, 21387-21394 (1999), Nat. Biotechnol., 17, 292-296 (1999)) ;
- モレキュラー・ビーコン (Molecular Beacons) 法 (Nat. Biotechnol., 1, p49-53 (1998)、遺伝子医学、4, p46-48(2000)) ;
- DNAマイクロアレイまたはDNAチップ法 ;
- ダイレクトシークエンス法 (Biotechniques, 11, 246-249 (1991)) ;
- RFLP (制限酵素切断断片長多型) 法 ;
- PCR-SSCP法 (Biotechniques, 16,296-297 (1994), Biotechniques, 21, 510-514 (1996)) ;
- ASO (Allele Specific Oligonucleotide) ハイブリダイゼーション法 (Clin. Chim. Acta, 189, 153-157 (1990)) ;
- 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis、DGGE) 法 (Biotechniques, 27, 1016-1018 (1999)) ;
- RNaseA切断法 (DNA Cell. Biol., 14, 87-94 (1995)) ;
- MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption-time of Flight/Mass Spectrometry) 法 (Genome Res., 7, 378-388 (1997), Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 35, 545-548 (1997)) ;
- RCA法 (Nat. Genet., 19, 225-232(1998)) 。

10

20

30

40

50

(上記文献は引用により本明細書に含まれる。)

【0039】

本発明者らの同定したScott症候群の患者における変異は、TMEM16Fをコードする遺伝子のイントロン12のスプライスアクセプターサイトに位置するため、当該変異を有する被験者ではmRNAのスプライシングが正常に行われず、その結果エクソン13が欠損する。よって、変異の有無は、被験者のTMEM16FのmRNAにおけるエクソン13の欠損の有無を調べることによっても調べるができる。

【0040】

野生型TMEM16FのcDNA配列およびアミノ酸配列を、配列番号2および3に示す。また、本発明者らの同定したScott症候群の患者における変異型TMEM16FのcDNA配列およびアミノ酸配列を、配列番号4および5に示す。

10

【0041】

例えば、TMEM16Fをコードする遺伝子に特異的にハイブリダイズするプライマーを用いてRT-PCRを行ってエクソン13を含む領域を増幅し、被験者の試料から増幅されるDNAの長さを対照(健常人)と比較する。被験者が当該変異を有する場合、対照と比較して短いDNA断片の増幅が観察される。あるいは、TMEM16Fをコードする遺伝子のエクソン13に特異的にハイブリダイズするプライマーを用いてRT-PCRを行った場合、当該被験者の試料からはDNA断片が増幅されない。また、TMEM16Fをコードする遺伝子のエクソン13に特異的にハイブリダイズするプローブを作製し、被験者の試料から調製したmRNAとハイブリダイズさせた場合、当該変異を有する被験者の試料ではハイブリダイゼーションシグナルが観察されない。このようにして、被験者における当該変異を検出することができる。

20

【0042】

本発明者らの同定した変異以外のTMEM16Fをコードする遺伝子の変異も、同様に変異に応じたプライマーやプローブを作製することによって、検出することができる。

【0043】

また、本発明者らの同定した変異の存在により、エクソン13の欠損に加えてエクソン14におけるフレームシフトが起こり、その結果TMEM16Fの第3膜貫通ドメインをコードするエクソン14内においてタンパク質の翻訳が終了する。よって、被験者における未成熟な変異型TMEM16Fの発現を調べることによっても、当該変異の有無を調べることができる。

30

【0044】

変異型TMEM16Fの発現は、TMEM16Fを特異的に認識する抗体を用いて調べることができる。例えば、野生型TMEM16Fと変異型TMEM16Fの両方に共通するアミノ酸配列部分を抗原として、野生型TMEM16Fと変異型TMEM16Fの両方を認識する抗体を作製し、ウエスタンブロット法により被験者で発現するタンパク質のサイズを調べ、これを野生型TMEM16Fのサイズと比較すればよい。あるいは、変異型TMEM16Fに存在しない領域のアミノ酸配列部分を抗原として、野生型TMEM16Fを認識するが変異型TMEM16Fを認識しない抗体を作製し、被験者が当該抗体に認識されるタンパク質を有するか否かをウエスタンブロット法、ELISA法、ドットブロット法により調べてもよい。

40

【0045】

本発明者らの同定した変異以外のTMEM16Fをコードする遺伝子の変異も、変異が野生型TMEM16Fと異なるアミノ酸配列を有する変異型TMEM16Fをもたらす場合、同様にして検出することができる。

【0046】

本発明はまた、TMEM16Fをコードする遺伝子の変異を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用される前記遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む、Scott症候群の診断用組成物を提供する。本発明の診断用組成物は、上記診断方法に使用されるものである。

50

## 【0047】

ある態様において、本発明の診断用組成物は、以下のいずれかを含む：

- (1) 配列番号1の11423位を含む領域に特異的にハイブリダイズする、プローブとして使用されるオリゴヌクレオチド；
- (2) 配列番号1の11424～11649位の配列に特異的にハイブリダイズする、プローブとして使用されるオリゴヌクレオチド；および
- (3) 配列番号1の配列に特異的にハイブリダイズし、かつ配列番号1の11424～11649位の全体または一部を含む領域を増幅するためのプライマーとして使用される、オリゴヌクレオチド。

## 【0048】

10

別の態様において、本発明の診断用組成物は、配列番号2の配列に特異的にハイブリダイズし、かつ配列番号2の全体または一部を増幅するためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを含む。好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号2の1402-1627位の全体または一部を含む領域を増幅するものである。別の態様において、本発明の診断用組成物は、配列番号2の1402-1627位の配列に特異的にハイブリダイズする、プローブとして使用されるオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0049】

オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1または2の配列と特異的にハイブリダイズする限り前記配列に完全に相補的である必要はないが、好ましくは配列番号1または2の配列の一部に相補的である。本発明において「特異的にハイブリダイズする」とは、オリゴヌクレオチドの $T_m$ 値に基づきMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (2001)などの教示にしたがい決定されるストリンジェントな条件下（例えば、 $6\times$ SSC、0.5%SDS、50%ホルムアミド中）で目的の配列にハイブリダイズすることを意味する。

20

## 【0050】

プライマーとして使用される場合、オリゴヌクレオチドは、通常15～100塩基、好ましくは15～30塩基、より好ましくは18～24塩基である。プローブとして使用される場合、オリゴヌクレオチドは、通常10～100塩基、好ましくは10～50塩基、より好ましくは15～25塩基である。オリゴヌクレオチドは、それが使用される方法に応じて、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、酵素、ビオチン等によって修飾されていてもよい。また、プローブとして使用される場合、固相、例えばガラス板、ナイロンメンブラン、マイクロビーズ、キャピラリー等に固定されていてもよい。

30

## 【0051】

別の態様において、本発明の診断用組成物は、TMM16Fを特異的に認識する抗体を含む。本発明の抗体は、TMM16Fの全体または一部を抗原として作製すればよく、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、本発明の抗体には、Fab、 $F(ab')_2$ 、およびFvのような抗体断片も含まれる。抗体の作製方法は当業界にて周知である（例えば“Antibodies: A Laboratory Manual”, Lane, H. D. et al. ed s., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989を参照）。

## 【実施例】

## 【0052】

40

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。

## 【0053】

## 1. 方法

## (1) 細胞株、組換タンパク質、抗体、血清

マウスインターロイキン(IL-3)依存性Ba/F3細胞は、RPMI(10%ウシ胎児血清(FCS, Gibco)、45ユニット/ml組換マウスIL-3、および $50\mu\text{M}$  -メルカプトエタノール含有)中で維持した。Scott症候群患者およびその両親由来のEBV形質転換ヒト細胞株は、RPMI1640(10% FCS、および $50\mu\text{M}$  -メルカプトエタノール含有)中で増殖させた。ヒト293T細胞は、10% FCS含有DMEM中で培養した。Plat-Eパッケージング細胞(非特許文献42)は、10% FCS含有DMEM中で増殖させた。組換マウスIL-3は、既報のとおり(非特許文献43)、

50

マウスIL-3 cDNAを有するウシパピロームウイルス発現ベクターにより形質転換されたマウスC1271細胞により産生された。Flag標識マウスMFG-E8は、既報のとおり（非特許文献44）、ヒト293T細胞において産生され、分泌型MFG-E8は抗Flag M2ビーズ(Sigma-Aldrich)を用いて精製した。

#### 【0054】

Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>不含RPMI1640培地は、Cell Science & Technology Instituteより購入した。Ca<sup>2+</sup>不含RPMI培地は0.5 mM MgSO<sub>4</sub>を含有した。Ca<sup>2+</sup>不含FCSは、FCSを2日間PBSに対してバッファを4回交換して透析することで調製した。

#### 【0055】

(2) Ca<sup>2+</sup>イオノフォアによる処理、フローサイトメトリー、および細胞ソーティング  
ホスファチジルセリン(PS)を細胞表面に露出させるため、96ウェルマイクロタイタープレート中の細胞(2 × 10<sup>5</sup>細胞)をPBSで洗浄し、200 μlのHank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)に再懸濁し、A23187 (Sigma Aldrich)により37 °Cで15分間処理した。この細胞を氷上で15分間2500-5000倍に希釈したCy5標識アネキシンV (Biovision) (染色バッファ(10 mM HEPES-NaOHバッファ [pH7.4], 140 mM NaClおよび2.5 mM CaCl<sub>2</sub>含有)中)により5 μg/mlのヨウ化プロピジウム(PI)の存在下で染色した。フローサイトメトリーをFACSAria (BD Bioscience)またはFACSCalibur (BD Bioscience)で行い、データをFlowJoソフトウェア (True Star)で解析した。

10

#### 【0056】

Ca<sup>2+</sup>イオノフォア誘発PS露出に感受性のBa/F3細胞のサブラインは、FACSソーティングを繰り返すことで選択した。簡単に説明すると、2 × 10<sup>7</sup>個のBa/F3細胞(HBSS中)を37 °Cで15分間A23187により処理し、これを事前に4 °Cに冷却した1 mlのアネキシンV染色バッファに懸濁した。この細胞を前述のようにCy5-アネキシンVにより氷上で染色し、インジェクションチャンバーを4 °Cに維持したFACSAriaを用いてソーティングした。最も高いレベルのCy5蛍光シグナルを提供する細胞(上位0.5-5.0%)を回収し、1.0 × 10<sup>5</sup>細胞/mlよりも高い密度でCa<sup>2+</sup>不含RPMI(5%透析FCS、45 ユニット/ml IL-3、および50 μM β-メルカプトエタノール含有)に再懸濁した。24時間後、細胞を通常のCa<sup>2+</sup>含有RPMI培地に再懸濁し、次のソーティングのため増殖した。

20

#### 【0057】

#### (3) cDNAライブラリーの構築

全RNAをBa/F3 PS19細胞からRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて調製し、ポリ(A) RNAをmRNA Purification Kit (GE Healthcare)によりオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーを2サイクル行って精製した。二本鎖cDNAをランダムなヘキサマーをプライマーとして用いてcDNA合成キット (SuperScript<sup>TM</sup> Choice System for cDNA Synthesis, Invitrogen)により合成した。Bst XIアダプターを付加し、このフラグメントを1% アガロースゲル(SeakemR GTG agarose, Lonza)における電気泳動によってサイズに応じて分画した。2.5 kbよりも長いDNAフラグメントをゲルからDNA抽出キット (Wizard<sup>R</sup> SV Gel and PCR Clean-up System, Promega)により回収し、Bst XI消化pMXsベクター(非特許文献45)にライゲートした。大腸菌 DH10B細胞(ElectroMax DH10B; Invitrogen)をGene Pulser (Bio-Rad)を用いてエレクトロポレーションにより形質転換した。約9.3 × 10<sup>5</sup>個のクローンが産生され、プラスミドDNAをQIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen)により調製した。

30

40

#### 【0058】

#### (4) 細胞融合

Ba/F3-PS0細胞およびBa/F3-PS19細胞にpMXs-puro EGFPおよびpMXs-neo DsRedをそれぞれ導入し、1 μg/mlのピューロマイシンまたは1 mg/mlのG418の存在下で培養した。Ba/F3-PS0 EGFP細胞とBa/F3-PS19 DsRed細胞をPEG1500の存在下で融合し、1 μg/mlのピューロマイシンおよび1 mg/mlのG418の存在下で培養した。EGFP/DsRed二重陽性細胞をFACSAriaを用いてソーティングした。

#### 【0059】

#### (5) cDNAライブラリーのスクリーニング

50

cDNAライブラリー由来のプラスミドDNA (108 µg) を、FuGENE6 (Roche Diagnostics) を用いたりポフェクションにより、18枚の10 cmディッシュで増殖させた  $7.2 \times 10^7$  個のPLA T-E パッケージング細胞 (非特許文献 42) に導入した。トランスフェクションの2日後、培養上清中のウイルスを  $6,000 \times g$  で16時間遠心して4 で遠沈させ、RPMI1640培地 (10% FCS および45 ユニット/ml IL-3含有) に再懸濁し、これを使用して  $7.2 \times 10^6$  個のBa/F3細胞に8 µg/mlのポリブレン (Sigma-Aldrich) の存在下で感染させた。24時間培養した後、培地を新鮮培地と置き換え、細胞をさらに2時間培養した。イオノフォア誘発PS露出に感受性の細胞のソーティングは、前述のとおり行った。

#### 【 0 0 6 0 】

( 6 ) アネキシンV陽性Ba/F3細胞からのcDNAフラグメントの単離

10

レトロウイルスベクターに組み込まれたcDNAを単離するため、Ba/F3形質転換細胞から Wizard<sup>R</sup> Genomic DNA Purification System (Promega) を用いてゲノムDNAを抽出し、Expanded Long Template PCR System (Roche Diagnostics) を用いてPCRにかけた。PCR プライマー (5'-CCCGGGGGTGGACCATCCTCT-3' (配列番号 6) および5'-CCCCTTTTCTGAGACTAAAT-3' (配列番号 7)) はpMXsベクター由来の配列を有しており、PCRの条件は、96 10秒、58 30秒、および68 4分、35サイクルであった。PCRフラグメントをpGEM-T Easy vector (Promega) にクローニングし、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用してDNA配列解析を行った。

#### 【 0 0 6 1 】

( 7 ) SCR およびその変異体のための発現ベクター

20

Flag標識配列をレトロウイルスベクター-pMXs-puroのEco RI部位とXho I部位に組み込み、pMXs-puro c-Flagを得た。マウス(m)TMEM16Fの完全長コード配列 (GenBank NM\_175344) およびヒト(h)TMEM16Fの完全長コード配列 (GenBank NM\_001025356) を、(mTMEM16Fにつき) Ba/F3細胞または(hTMEM16Fにつき) Namalwa細胞由来のmRNAを用いてRT-PCRにより調製した。使用したプライマーは以下である(各プライマーにおいて、Eco RI認識部位を下線で示す。) :

mTMEM16F, 5'-ATATGAATTCGACATGCAGATGATGACTAGGAA-3' (配列番号 8) および5'-ATATGAA TTCGACATGCAGATGATGACTAGGAA-3' (配列番号 9) ;

hTMEM16F, 5'-ATATGAATTCGACATGAAAAAGATGAGCAGGAA-3' (配列番号 10) および5'-ATATG AATTCCTTCTGATTTTGGCCGTAAAT-3' (配列番号 11) 。

30

PCR フラグメントをpMXs-puro c-FlagのEco RI部位に挿入し、cDNAの信頼性をDNA配列決定により検証した。

発現プラスミドSCR -mRFPのため、pcDNA-mRFP (Invitrogen) 中のmRFPのコード配列をマウスTMEM16FのC末にフレームをあわせて結合し、pMXsベクターに導入した。

#### 【 0 0 6 2 】

( 8 ) マウスBa/F3細胞およびヒト293T細胞における発現

Flag標識SCR のためのpMXs-puroにおける発現ベクターをPlatE細胞に導入した。産生されたレトロウイルスを前述のように濃縮し、Ba/F3に感染させ安定な形質転換体を樹立するために使用した。ピューロマイシン (1.0 µg/ml) を含む培地中で細胞を培養することで形質転換体を選択した。SCR -mRFPを発現させるため、ヒト293T細胞にFuGENE6を用いたりポフェクションによりSCR -mRFP配列を有するpMXsベクターを導入した。一日後、導入細胞を蛍光顕微鏡 (BioRevo BZ-9000, Keyence) により観察した。

40

#### 【 0 0 6 3 】

( 9 ) ウェスタンブロッティング

細胞をRIPAバッファー (50 mM Hepes-NaOH バッファー [pH 8.0]、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl、および10% プロテアーゼインヒビターカクテル [Complete Mini, Roche Diagnostics] 含有) に溶解した。溶解物を5 x SDS サンプルバッファー [200 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、25% グリセロール、0.5% -メルカプトエタノール、および0.05% プロモフェノールブルー] と混合し、5分間煮沸し、10% ポリアクリルアミドゲル (Bio Craft) における電気泳動により分離した。タンパク質

50

をPVDFメンブレン (Millipore)に転写した後、メンブレンにHRP結合マウス抗FLAG M2 (Sigma)を結合させ、ペルオキシダーゼ活性をWestern Lightning<sup>R</sup>-ECL system (PerkinElmer)により検出した。

【 0 0 6 4 】

( 1 0 ) SCR cDNAのRT-PCRおよびScott症候群患者におけるSCR 染色体遺伝子の配列決定

Scott患者およびその両親、並びに健常人対照に由来するEBV形質転換細胞株から全RNAを調製した。このRNAをSuperscript III (Invitrogen)を用いて製造元のプロトコールにしたがい逆転写し、SCR cDNAを以下のプライマーセットを用いたPCRにより解析した (各プライマーにおいて、付加的な制限酵素部位を含む配列を下線で示す。) :

Ex1-FW (5'-ATATGAATTCGACATGAAAAAGATGAGCAGGAA-3') (配列番号 1 2 ) およびEx11/12-RV (5'-GCGTTCTTCTTCTCCTGAGTAA-3') (配列番号 1 3 ) ;

Ex11/12-FW (5'-TTACTCAGGAAGAAGAACGC -3') (配列番号 1 4 ) および

Ex20-RV (5'-ATATGAATTCCTTCTGATTTTGGCCGTAAAAT-3') (配列番号 1 5 ) ;

Ex12-FW (5'- TCTGTGCCAGTGCTGTCTTT-3') (配列番号 1 6 ) およびEx16-RV (5'- CTGCAGATGGTAGTCCTGTT-3') (配列番号 1 7 ) 。

【 0 0 6 5 】

ヒトSCR 染色体遺伝子の配列解析のため、ゲノムDNAをヒト細胞株から調製し、226-bpのエクソン13およびその5'-および3'-フランキング領域(各々約370-bp)を有する964-bpのDNAフラグメントを以下のプライマーを用いてPCRにより増幅した : 5'-CCAGAGTATGCTACTAGTTG-3' (配列番号 1 8 ) および5'-TCTCAGCAACCGAGGAACAT-3' (配列番号 1 9 ) 。PCR産物をWizard<sup>R</sup> SV PCRおよびGel Clean-up Systemにより精製した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitを用いてプライマー 5'-ACATATGTGGATGCGCCTTC-3' (配列番号 2 0 ) によりサイクルシーケンシングを行い、ABI PRIZM 3100 Genetic Analyzerにより解析した。

【 0 0 6 6 】

( 1 1 ) PSおよびPEの露出の解析

PSおよびPEの露出を解析するため、初期指数増殖期の細胞 ( $1.0 \times 10^5$ ) をPBSで洗浄し、1.0 mlの冷アネキシンV染色バッファーに2500-5000倍希釈のCy5標識アネキシンVまたは800倍希釈のビオチン-Ro09-0198 (非特許文献 2 6 ) とともに懸濁し、次いで1.0  $\mu$ g/ml APC標識ストレプトアビジン、および5  $\mu$ g/ml PIを加えた。サンプルを氷上で15分間インキュベートし、FACSAriaまたはFACSCaliburにより前述のとおりフローサイトメトリーを行った。MFG-E8の結合のため、細胞を10% FCS含有RPMI1640に懸濁し、氷上で20分間0.4  $\mu$ g/ml のFlag標識MFG-E8 D89E変異体 (非特許文献 4 4 ) とインキュベートした。細胞を上記培地で洗浄し、氷上で20分間1.0  $\mu$ g/mlのマウスMFG-E8に対するハムスターモノクローナル抗体 (mAb) (クローン2422)とインキュベートし、次いでPE標識マウス抗ハムスターIgG (BD Bioscience)とともにインキュベートし、FACSAriaを用いたフローサイトメトリーにより解析した。

【 0 0 6 7 】

細胞内Ca<sup>2+</sup>の必要性を調べるため、細胞 ( $1.0 \times 10^5$  細胞) を10  $\mu$ MのBAPTA-AM (10% FCS含有RPMI1640培地中) と37 °CでPS露出のため5分間またはPE露出のため60分間インキュベートした。この細胞をアネキシンV染色バッファーで洗浄し、Cy5-アネキシンVまたはビオチン-Ro09-0198で前述のとおり染色した。

【 0 0 6 8 】

Ca<sup>2+</sup>誘発PS露出および同PE露出の速度論研究のため、細胞 ( $1.0 \times 10^6$  細胞) をPBSで洗浄し、1.0 mlの冷アネキシンV染色バッファーに、Cy5標識アネキシンVまたはビオチン-Ro09-0198とAPC標識ストレプトアビジンの混合物、および5  $\mu$ g/ml PIともに懸濁した。細胞を氷上でA23187と最終濃度0.25または0.5  $\mu$ Mで混合し、20 (Ba/F3細胞)または37 (ヒト細胞株)に設定したFACSAriaのインジェクションチャンパーにアプライし、A23187反応を誘導した。データを表示の期間記録し、PI陽性細胞を解析から除いた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 9 】

## ( 1 2 ) NBD-PCおよびNBD-SMの取り込み

NBD脂質アナログの取り込みは、基本的にWilliamsonら（非特許文献17）が記載するようにフローサイトメトリーにより解析した。簡単に説明すると、細胞（ $10^6$ 細胞）をHBSSで洗浄し、0.5 mlのHBSS（2 mM  $\text{CaCl}_2$ 含有）に再懸濁した。等量のHBSS（2 mM  $\text{CaCl}_2$ および1  $\mu\text{M}$  1-オレオイル-2-{6-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-イル)アミノ]ヘキサノイル}-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（NBD-PC）、または1-オレオイル-2-{6-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-イル)アミノ]ヘキサノイル}-スフィンゴシン-1-ホスホコリン（NBD-SM）(Avanti Polar Lipids)含有）を細胞懸濁液に添加し、室温でインキュベートした。各時点で、150  $\mu\text{l}$ の細胞懸濁液を回収し、150  $\mu\text{l}$ の冷却済（4）HBSS（5 mg/ml 脂肪酸不含BSA (Sigma-Aldrich)（取り込まれなかった蛍光脂質を抽出するため）および500 nM Sytoxblue (Molecular Probes)含有）と混合した。全蛍光量を測定するため、サンプルをBSA非存在下でHBSSと混合した。10分間4 でインキュベートして脂質を抽出した後、細胞をFACSAriaにより、前方散乱、側方散乱、対数緑色蛍光（NBD）、およびSytoxblue蛍光について解析した。Sytoxblue陽性の死細胞は解析から除いた。データは、FlowJo Software (Tree Star)により解析した。BSA抽出に抵抗性のNBDリン脂質の蛍光を、細胞に取り込まれたものと評価した。

10

## 【 0 0 7 0 】

$\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアの効果を調べるため、細胞（ $5 \times 10^5$ 細胞）をHBSSで洗浄し、0.5 mlの冷HBSS（2 mM  $\text{CaCl}_2$ 含有）に再懸濁し、氷上で7分間インキュベートした。冷HBSS（0.5 ml）（0.2  $\mu\text{M}$  NBD-PCまたはNBD-SM含有）を細胞懸濁液に添加し、氷上でさらに3分間インキュベートした。この細胞を次いでA23187と混合し、室温でインキュベートして脂質取り込みを誘導した。150  $\mu\text{l}$ のアリコートを用いて、前述のように取り込まれた脂質の量を測定した。

20

## 【 0 0 7 1 】

## ( 1 3 ) 薄層クロマトグラフィー

細胞をNBD標識PCとインキュベートした後、クロロホルムとメタノールの混合物（2:1, v/v）により、リン脂質を細胞から抽出した。このリン脂質をシリカゲル60プレート（Merck）における薄層クロマトグラフィーにより、クロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水（体積比5:2:1:1:0.5）を溶媒として用いて分離した。プレート上の蛍光はLAS4000 イメージアナライザー（Fuji Film）により検出した。

30

## 【 0 0 7 2 】

( 1 4 ) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Ca}^{2+}$ 流入

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定するため、細胞（ $1.0 \times 10^6$ 細胞）をHBSSに懸濁し、37 で10分間、0.4  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM (Molecular Probes)とともにインキュベートし、HBSSで洗浄し、そしてFACSAriaにより解析した。

## 【 0 0 7 3 】

$\text{Ca}^{2+}$ 流入は、既報のとおり測定した（非特許文献46）。簡単に説明すると、細胞（ $1.0 \times 10^6$ ）をFluo-4-AM（1  $\mu\text{M}$ ）（10% FCS含有RPMI中）により30分間37 で標識した。アネキシンV染色バッファーで洗浄した後、細胞をアネキシンV染色バッファーに懸濁し、4 で維持した。この混合物に $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアA23187を最終濃度0.5  $\mu\text{M}$ で添加し、平均蛍光強度(MFI)における変化をFACSCalibur システムを用いて直接記録した。データはFlowJo Softwareにより解析した。

40

## 【 0 0 7 4 】

## ( 1 5 ) shRNA

ピューロマイシン耐性遺伝子を有するpRS shRNAベクターにおけるマウスSCR のためのshRNA発現プラスミドは、OriGeneから購入した。このSCR に対するshRNAの標的配列は5'-CATCTACTCTGTGAAGTTCTTCATTTCCCT-3'（配列番号21）であった。pRSにおけるスクランブルな無効のshRNAはOriGeneから購入した。Ba/F3細胞にshRNAを含むレトロウイルスを感染させ、1.0  $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンの存在下で培養した。ピューロマイシン耐性細胞を

50

限界希釈によるクローニングに供した。SCR mRNA をリアルタイムPCRにより定量し、SCR の発現減少を示したクローンを以降の実験に使用した。

#### 【0075】

### 2. 結果

#### (1) 構成的にPSを発現するマウスBa/F3細胞の樹立

Ca<sup>2+</sup>イオノフォアで細胞を処置すると、PS露出を起こさせることができる。本発明者らは、このプロセスがマウスB細胞株であるBa/F3において低Ca<sup>2+</sup>条件下で可逆的に生じることを見出した。すなわち、Ba/F3細胞をCa<sup>2+</sup>イオノフォアであるA23187 (1.0 μM) により15分間0.5 mM CaCl<sub>2</sub>の存在下で処理すると、細胞がネクロシスを起こすか、破裂するか、またはヨウ化プロピジウム (PI) 陽性となった。しかしながら、同じ処理をCa<sup>2+</sup>非存在条件下で行うと、大部分の細胞がPSを露出するかアネキシンV陽性となり、またPI陽性集団は少なかった (図1 a)。細胞内Ca<sup>2+</sup>をBAPTA-AM (0,0'-ビス(2-アミノフェニル)エチレンジグリコール-N,N,N',N'-四酢酸、テトラアセトキシメチルエステル)でキレートすると、PS露出が阻害され (図1 b)、このことはPS露出のプロセスが細胞内カルシウムの移動を必要とすることを示唆する。このPS露出は37 °Cで少なくとも5分間 (図1 c)、またはA23187の除去後4 時間で数時間 (データ非提示)、継続した。PS露出細胞をBAPTA-AMにより37 °Cで5分間処理する (図1 c) か、あるいはCa<sup>2+</sup>不含培地において37 °Cで12時間培養する (データ非提示) と、細胞表面からPSが除去された。これらの結果は、低Ca<sup>2+</sup>条件下において、A23187が細胞内Ca<sup>2+</sup>を移動させ、それによりリン脂質スクランブレースが活性化され、PSが露出されたことを示唆する。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が減少すると、リン脂質スクランブレースは活性を消失し、フリッパーゼによりPSが内葉に戻った。

10

20

#### 【0076】

PS露出プロセスを明らかにするため、本発明者らは、低Ca<sup>2+</sup>条件下のPS露出の可逆的性質を利用して、PSを過剰露出した細胞株を樹立した。マウスBa/F3細胞を1.0 μM A23187により添加カルシウム非存在下において処理し、PS露出に基づくFACSソーティングにかけた。強いアネキシンV染色を示す集団 (0.5-5%)を回収し、15時間Ca<sup>2+</sup>不含培地中で培養し、次いで通常培地に戻した。このソーティングと増殖のサイクルを12回繰り返した後、選択された細胞 (Ba/F3-PS12)は、より低い濃度(125 nM)のA23187による処理でも元のBa/F3細胞 (Ba/F3-PS0)より約100倍高いアネキシンVによる平均染色を示した (図1 d)。このソーティングと増殖をさらに7回繰り返して、得られた細胞株 (Ba/F3-PS19)を以下の実験に使用した。

30

#### 【0077】

Ba/F3-PS19における強いPS露出の原因には2つの可能性があった。1つはリン脂質スクランブレースの過剰発現または過活性化であり、もう1つはフリッパーゼの不活性化であった。いずれの可能性が正しいのか調べるため、DsRed発現Ba/F3-PS19をGFP標識親Ba/F3 (Ba/F3-PS0)細胞と融合した。このハイブリッド細胞の1.0 μM A23187に対するPS露出応答は、Ba/F3-PS19と同様か、あるいはわずかに低く (図1 e)、このことはBa/F3-PS19の表現型がBa/F3-PS0の表現型より優勢であること、およびリン脂質スクランブレースがBa/F3-PS19において過活性化されていることを示唆する。この明らかに増強されたリン脂質スクランブレース活性に関与する遺伝子 (「スクランブレース」(SCR)と称する)を同定するため、レトロウイルスベクターにおけるcDNAライブラリー (9.3 x 10<sup>5</sup> 個の独立クローンを)をBa/F3-PS19から調製し、親Ba/F3細胞に導入した。安定な形質細胞を125 nM A23187で処理し、アネキシンVにより強く染色された集団 (約0.6%)をソーティングし、増殖した (図1 f)。ソーティングと増殖の3回目のサイクル (ライブラリー由来 (LD)-PS3)において、約35%の細胞が構成的に (すなわち、A23187処理なしで) PSを露出し、この細胞集団 (LD-PS4)をさらなる特徴決定のため増殖した。

40

#### 【0078】

#### (2) SCR の分子クローニングおよびPS露出に対するその効果

LD-PS4細胞には2-3の異なるcDNAが組み込まれていたが、TMEM16F cDNAは2つの独立した実験 (独立したcDNAライブラリーによる形質転換およびFACSソーティング)において存在

50

し、このことからTMEM16FがSCR であることが示唆された。異なる実験で同定された2つのSCR cDNAは、異なる5'末端を有していたにも関わらず、第2の細胞内ループに位置するコドン409のアスパラギン酸をグリシンに置換するヌクレオチド1226のAからGへの移行変異をいずれも有していた(図2a)。

#### 【0079】

最近、TMEM16ファミリーの別のメンバーであるTMEM16AがCa<sup>2+</sup>依存的Cl<sup>-</sup>チャンネルであることが示された(非特許文献19-21)。しかしながら、TMEM16FのCl<sup>-</sup>チャンネル活性はTMEM16Aと比較して非常に低かった(非特許文献22)。SCR の機能を調べるため、SCR の野生型フォームおよび変異(D409G)型フォームのC末端にFlagまたはmRFPを付加し、Ba/F3細胞またはヒト293T細胞において発現させた。Ba/F3細胞由来の細胞溶解物の抗Flag抗体によるウェスタンブロッティングによって、SDS-PAGEにおいて125 kDaと500 kDaに幅の広いバンドが示され(図2b)、マウスSCR (計算分子量106,000)がグリコシル化されており、加えて/あるいは、凝集していることが示唆された。SCR -mRFPキメラタンパク質を発現する293T細胞の観察により、SCR が細胞膜に存在することが示唆された(図2c)。

10

#### 【0080】

アネキシンVは、D409G変異体を発現するBa/F3細胞には結合したが、野生型SCR を発現するBa/F3細胞には結合せず(図2d)、SCR 変異体を発現する細胞が構成的にPSを露出していることが示唆された。このことは、ホスファチジルセリンに特異的に結合するMFG-E8(ラクトアドヘリン)(非特許文献23、24)がD409G変異体発現細胞に結合したことにより確認された(図6)。細胞内Ca<sup>2+</sup>をBAPTA-AMによりキレートすると、SCR 変異体発現細胞における露出PSのレベルが減少した(図2d)。野生型SCR を発現する細胞をA23187で処理すると、PSが遅滞なく露出し、ベクターで形質転換したBa/F3よりも迅速に飽和レベルに到達した(図2e)。Fluo-4-AM染色により決定された細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は、ベクター、野生型SCR 、およびD409G変異体SCR 発現細胞の間で類似していた(図2f)。A23187処理後のCa<sup>2+</sup>流入速度は、ベクター導入細胞とSCR 導入細胞とで差がなかった(図2g)。これらの結果は、SCR がPSのためのCa<sup>2+</sup>依存的スクランブレース活性を仲介すること、および、そのD409G変異体が正常な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度にさえも反応しPS露出を起こさせることを示唆する。

20

#### 【0081】

30

(3) PE、PC、およびSMのスクランプリングに対するSCR の効果

リン脂質スクランブレースは、頭部基に関する特異性なく、あらゆるリン脂質の細胞膜葉間の2方向性の輸送を仲介する。SCR がこの性質を有するかを調べるため、D409G変異体SCR を発現する細胞を、Ca<sup>2+</sup>依存的にPEに特異的に結合する四環性ポリペプチドであるRo09-0198 (RO)(非特許文献25、26)で染色した。図3aに示すように、この変異体を発現する細胞はROにより染色され、PSのように通常は内葉に隔離されているリン脂質であるPEを構成的に露出していることが示唆された。Ba/F3のA23187による処理もまた、PS露出を起こさせた。このプロセスは、野生型SCR を過剰発現させることにより促進された(図3b)。

#### 【0082】

40

前述のとおり、リン脂質スクランブレースはリン脂質の2方向性の輸送を仲介するはずである。1-オレオイル-2-[6-[(7-ニトロ-2-1,3-ベンゾオキサジアゾール-4-イル)アミノ]ドデカノイル]-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (NBD-PC)を培養物に添加すると、D409G変異体発現細胞に迅速に取り込まれた(図3c)。すなわち、細胞に結合したNBD-PCのうち、40%を超えるNBD-PCが6分以内にBSA抽出に対して抵抗性となった。野生型SCR を過剰発現する細胞をA23187で処理すると、これら細胞は親細胞よりも速くNBD-PCを取り込み、細胞に結合したNBD-PCの約25%が4分以内に細胞内に観察された(図3d)。取り込まれたNBD-PCは細胞内で無傷であり(図7)、その取り込みが細胞内における迅速なNBD-PCの分解によるものでないことが示唆された。同様の結果、すなわち、変異体SCR 発現細胞による構成的取り込みと、野生型SCR 発現細胞による増強されたA23187誘発取り込みが、NBD-S

50

Mについて得られた(図3 e および 3 f)。これら結果から、SCR がCa<sup>2+</sup>依存的に様々なリン脂質の細胞膜外葉から内葉への内向きの輸送を仲介しうることが示唆された。

#### 【0083】

リン脂質のスクランプリングにおける内因性の細胞SCR の役割を確認するため、マウスSCR 特異的shRNA発現プラスミドを野生型Ba/F3細胞に導入することにより、内因性SCR の発現をノックダウンした。図4 a および図8 に示すように、リアルタイムPCRで評価した5つの形質転換体におけるSCR mRNAの発現レベルは、対照のshRNAを発現する細胞の発現レベルの20-35%に減少した。1.0 μMのA23187の15分間の処理により誘導されるこれら形質転換体のPS露出は、対照のshRNAにより形質転換されたBa/F3と比較してそれほど顕著ではなかった。アネキシンVとRo09-0198の結合により検出されるPSおよびPEのA23817誘導露出の割合は、SCR ノックダウン細胞において減少した(図4 b および 4 c)。同様に、NBD-PCとNBD-SMの取り込みは、shRNA形質転換細胞の方が低かった(図4 d および 4 e)。

10

#### 【0084】

(4) Scott症候群の患者におけるSCR のスプライスサイト変異

Scott症候群の患者から得た血小板および他の血液細胞は、Ca<sup>2+</sup>イオノフォアにตอบสนองしてPSを露出する能力に欠ける(非特許文献27)。Kojimaら(非特許文献28)は、Scott症候群患者および患者の両親から、EBV形質転換B細胞株を樹立した。先の報告(非特許文献17、28)と一致して、患者由来の細胞はCa<sup>2+</sup>イオノフォアにตอบสนองしてPSを露出しなかった(図5 a)。これに対して、患者の両親由来の細胞株では、A23187は無関係な健康ボランティア由来の細胞株と同じレベルでPS露出を誘導した。患者のSCR 遺伝子の欠損を調べるため、患者および両親からRNAを調製し、SCR mRNAを、5'側半分(エクソン1-12に相当)と3'側半分(エクソン11-20)の2つの部分においてPCRにより解析した。5'側半分の1320-bpのDNAフラグメントは患者と両親で同一であったが、患者由来の3'側半分のフラグメントは両親のフラグメントより短かった(図5 b)。DNA配列解析により、患者のcDNAはエクソン13に相当する226-bpの配列が欠けていることが示唆された。染色体DNAの直接配列決定により、患者のSCR 遺伝子はイントロン12におけるコンセンサススプライスアクセプターサイトにGからTへのホモ接合性の変異を有するが、両親はこの位置の変異がヘテロ接合性であることが示唆された(図5 c)。エクソン12および16に結合するように設計されたプライマーを用いたSCR mRNAのPCR解析により、対照の細胞株からは608-bpのバンドが、Scott症候群の患者の細胞株からは382-bpのバンドが示され(図5 d)、スプライスアクセプターサイトの変異によってエクソン13がスキップされたことが示唆された。このスキッピングは、フレームシフトを生じさせ、その結果ヒトSCR の第3の膜貫通部分(図5 f)をコードするはずのエクソン14においてタンパク質が未成熟に終結する(図5 e)。患者の両親においてエクソン13欠損型のSCR mRNAの濃度が低いこと(図5 d)は、ナンセンス変異によるmRNAの減衰(非特許文献29)により説明できる可能性がある。

20

30

#### 【0085】

以上のとおり、T M E M 1 6 F ( S C R ) が細胞膜におけるリン脂質の分布を制御するリン脂質スクランブレースであること、およびT M E M 1 6 F が血小板表面へのPSの移動障害を原因とする出血性疾患であるS c o t t 症候群の原因遺伝子であることが明らかとなった。よって、T M E M 1 6 F は血液凝固調節物質の新規ターゲットとして有用である。

40

#### 【0086】

以下の文献は引用により本明細書に含まれる。

[先行技術文献]

[非特許文献]

1. Leventis, P. A. & Grinstein, S., The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. Annu. Rev. Biophys. 39, 407-427 (2010)

50

2. Lentz, B., Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.* 42, 423-438 (2003).
3. Balasubramanian, K. & Schroit, A. J., Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 701-734 (2003).
4. Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K., Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619-630 (2010).
5. Daleke, D., Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* 282, 821-825 (2007).
6. Folmer, D., Elferink, R., & Paulusma, C., P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 628-635 (2009). 10
7. Oram, J. & Vaughan, A., ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol* 11, 253-260 (2000).
8. Williamson, P. et al., Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS ONE* 2, e729 (2007).
9. Zhao, J., Zhou, Q., Wiedmer, T., & Sims, P. J., Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273, 6603-6606. (1998).
10. Zhou, Q. et al., Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 272, 18240-18244 (1997). 20
11. Schlegel, R. & Williamson, P., P.S. to PS (phosphatidylserine)-pertinent proteins in apoptotic cell clearance. *Sci. STKE* 2007, pe57 (2007).
12. Sahu, S., Gummadi, S., Manoj, N., & Aradhyam, G., Phospholipid scramblases: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 103-114 (2007).
13. Wiedmer, T., Zhao, J., Nanjundan, M., & Sims, P., Palmitoylation of phospholipid scramblase 1 controls its distribution between nucleus and plasma membrane. *Biochemistry* 42, 1227-1233 (2003).
14. Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., & Sims, P. J., Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 99, 4030-4038 (2002). 30
15. Galletta, L., The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? *Biophys. J.* 97, 3047-3053 (2009).
16. Weiss, H. & Lages, B., Family studies in Scott syndrome. *Blood* 90, 475-476 (1997).
17. Williamson, P. et al., Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. *Biochemistry* 40, 8065-8072 (2001).
18. Wielders, S. J. et al., Absence of platelet-dependent fibrin formation in a patient with Scott syndrome. *Thromb. Haemost.* 102, 76-82 (2009).
19. Caputo, A. et al., TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-594 (2008). 40
20. Schroeder, B., Cheng, T., Jan, Y., & Jan, L., Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-1029 (2008).
21. Yang, Y. et al., TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215 (2008).
22. Schreiber, R. et al., Expression and function of epithelial anoctamins. *J. Biol. Chem.* 285, 7838-7845 (2010).
23. Shi, J. & Gilbert, G., Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood* 101, 2628-26 50

36 (2003).

24. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., & Nagata, S., Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *J. Immunol.* 172, 3876-3882 (2004).

25. Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., & Umeda, M., Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 232, 430-434 (1997).

26. Aoki, Y., Uenaka, T., Aoki, J., Umeda, M., & Inoue, K., A novel peptide probe for studying the transbilayer movement of phosphatidylethanolamine. *J. Biochem.* 116, 291-297 (1994).

27. Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D., & Freyssinet, J., Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 87, 1409-1415 (1996).

28. Kojima, H. et al., Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome. *J. Clin. Invest.* 94, 2237-2244 (1994).

29. Shyu, A., Wilkinson, M., & van Hoof, A., Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.* 27, 471-481 (2008).

30. Kavathas, P. & Herzenberg, L. A., Amplification of a gene coding for human T-cell differentiation antigen. *Nature* 306, 385-387 (1983).

31. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., & Nagata, S., Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178 (1993).

32. Berridge, M., Bootman, M., & Roderick, H., Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517-529 (2003).

33. Hartzell, H. C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L. T., & Qu, Z., Anoctamin/TMEM16 family members are Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J. Physiol.* 587, 2127-2139 (2009).

34. Ferrera, L. et al., Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 284, 33360-33368 (2009).

35. Zwaal, R., Comfurius, P., & Bevers, E., Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1636, 119-128 (2004).

36. Brooks, M. et al., A genome-wide linkage scan in German shepherd dogs localizes canine platelet procoagulant deficiency (Scott syndrome) to canine chromosome 27. *Gene* 450, 70-75 (2010).

37. Brooks, M., Catalfamo, J., Brown, H., Ivanova, P., & Lovaglio, J., A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood* 99, 2434-2441 (2002).

38. Schoenwaelder, S. M. et al., Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* 114, 663-666 (2009).

39. Miyanishi, M. et al., Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435-439 (2007).

40. Kagan, V. E. et al., A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 169, 487-499 (2002).

10

20

30

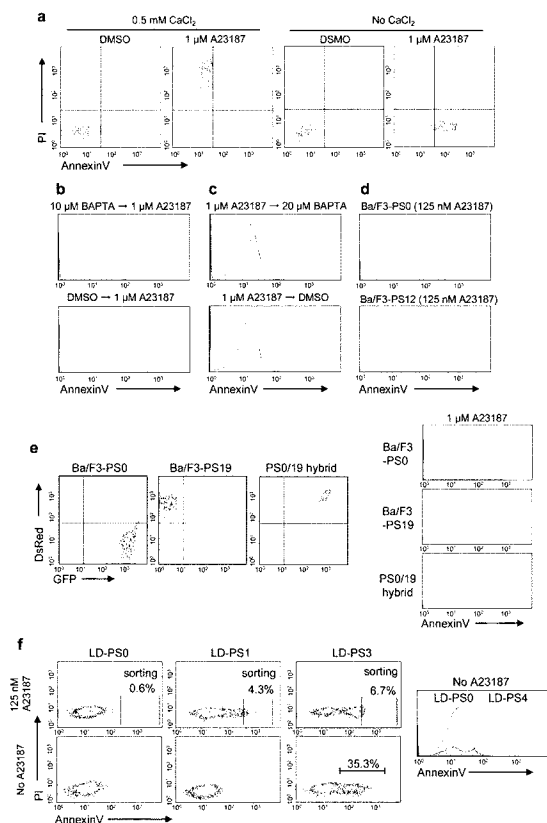
40

50

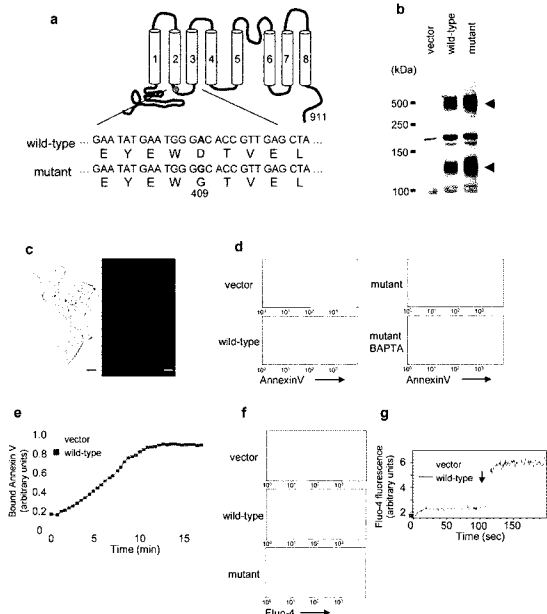
- 41. Tyurina, Y. Y. et al., Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation. *J. Biol. Chem.* 279, 6056-6064 (2004).
- 42. Morita, S., Kojima, T., & Kitamura, T., Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7, 1063-1066 (2000).
- 43. Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., & Nagata, S., Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 265, 14008-14015 (1990).
- 44. Hanayama, R. et al., Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187 (2002).
- 45. Kitamura, T. et al., Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* 31, 1007-1014 (2003).
- 46. Bernhagen, J. et al., MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* 13, 587-596 (2007).
- 47. Castoldi E et al., Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 117, 4399-4400 (2011).

10

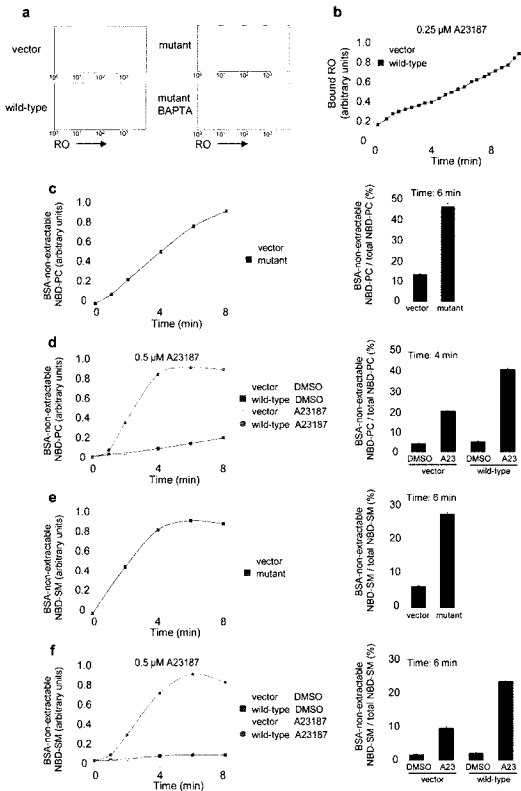
【 図 1 】



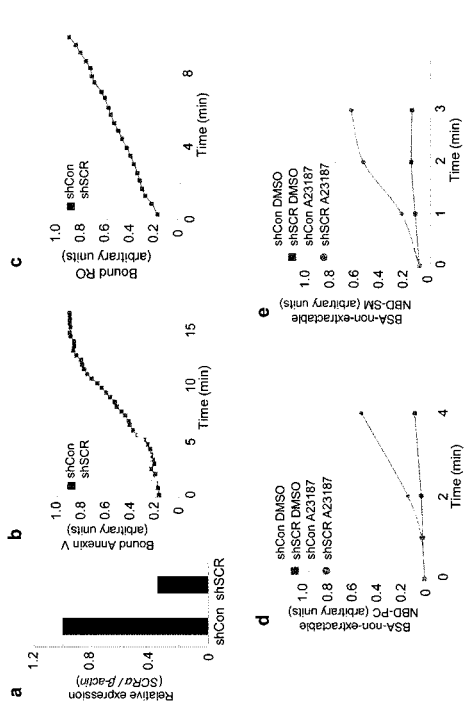
【 図 2 】



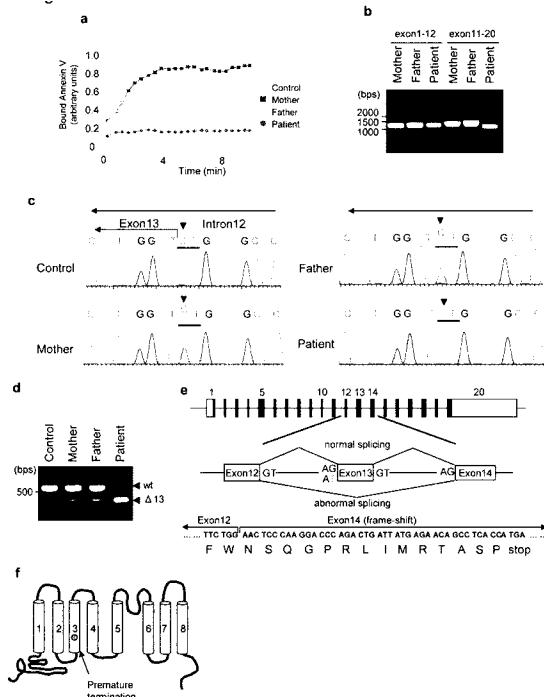
【 3 】



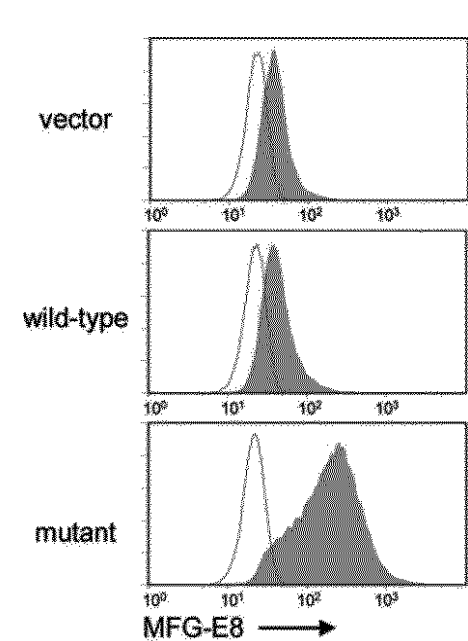
【 4 】



【 5 】



【 6 】









【 図 1 0 - 3 】

GGGAAAGCTATCATTTTAAATTTAAACCTAAACAGAGCCATCTTATAAAGTGTCCACAAA
GCTCCCTCCCTTTTATTCATGTGGCTGGGAAATTCATAAAACAAATTAATCGAATGGG
GGTCAGAGTACTCTGTTGAAACACTTCTGTACCAATTTATGTTCTATATATGTTTG
AGAGGGTAAAAATGTATGAGCAGCTTAAGTGAATAGACTTATCATGATGCTTTTCCACA
CATTTGGCTAAGAGTAAAGTTTGAATTAATGTTAATTTCTGGCATTTTAAATATTC
TTTTATAATTTAATGTTAATTTCTGGCATTTAATATTTCTTTATTAATTAATGAGCAT
TTTTATAATTCATTTTAAACAACTAAASAAAAAASAAAAAASAAAAA

【 図 1 1 】

配列番号3 ヒト TMEM16F アミノ酸配列

MKYMSENVLL QMEBERDDDD GDIVLENLQ TIVFDLGSLE SQHDFRTEPF
EEFNKPEDSL FNDGQRIRD FVLVYEDSR KETNKKGTNE KRRKRRQAYE
SNLICHGLQL EATRSVLDDK LVFVKVHAPV EVLCTYAEIM HIKLELKPND
LKRSESAFST LHMFTKVLVS DESIHKFPEZ FFTAFPKSR MNDFYIUDRD
AFFNFAFRSR IVFYILSRVK YQVINNVSKF GINRLVNSGI YKAAFFLHDC
KFRKRSDDPS CFNERYLLYR EWAHPRSIYK KQPLDLIRKY YGKIGIYFA
MLGYTQMLL LAAVVWVACF LVGYLNDNC TWSKEVCHPD IGGKILMCPQ
CDRLCFPKKL NITCESSKLL CIFDSFGLTV FAVFMGVWVT LFLFVKKRQ
AELEYEMDVT ELQEQEQARP EYEARCTHVV INEITQBEER IPTWAWGKI
RITLCSAVF FWILLIASV IGIIVYRLSV FIVPSAKLPK NINGTDPDQK
VLPQTATSI TASISFIII MLMTYEVK AIMINPELP RTQDYENSL
TKMFLQFV NYSSCFYIA FFKGFVGFV GDFVYMLGKY RNEBCDGGC
LLELTOLTII IMQKAIMNN IQEVLFPWM NLIGRHRVS GSEKITPRWE
QDYLQPMK LGLFVYLEM IIFGFVTLF VASFLAPLL ALVNNLEIK
VDAWKLTFP RRLVPEKQD IGAWQPMGQ IALLAVVTA MIAFTSDMI
ERLVMYVPS VPPYGDHYSY TMEGYNLTL SIPKVADEFN KSKGNPSYDL
GNHTTCRYED FRYPGHPQE YGNLYYWHV IAAKLAFLIV MEHVIYSVKF
FISYAPDVS KRKSKIQR EKYLTQKLLHE NMLKDMTKM GVIAERMIEA
VDNNLEKSE

【 図 1 2 - 1 】

配列番号4 Scott Syndrome の患者で発見された変異型 TMEM16F の DNA 配列

CCTTCTGAGGAGCAGTGAAGAAAGATGAGCAGGAAATGTTTCTACAATGGAGGAGGAG
GAGGAGCAGCAGCAGTGGGAAATCGTGTGGAAGAACTGGACAGACAAATGTCCCGAT
120
TTGGGATCACTGGAAAGTCAAGCATGATTTTGGACCCCGGAGGATTTGAGAGATTTAATGSA
AAACTGACTCCCTCTTTTATGATGTTGGCAGCAGAGATGGATTTGTTCTAGATAT
240
GAGGTGSAAGCAGAAAGAGACCAATAAAGAGGATCAAAATGAJAAACAAAGAGGAA
AGCAAGCATACGAATCAACCTTATCTGTGATGGCTGGCATAGAGGACAGAGATCA
360
GTATTGATGACAAGCTGTATTGTTGAAAGTACACCCACCATGGAGGATGTTATGTACG
TATGCTGAGATAATGCACATCAATGGCTCTGAAACCCCAATGATCTGAAAAACGGGTCC
480
TCCGCTTGGTACACTCACTGGTTACCAAGTCTTCCAGTATAGACGAAAGCATCATC
RAGCCAGAGAGAGGTTTCACTGCCCATTTGGAGAGACCGATGATGATTTTAC
600
ATGATGATGAGATSCCTTTCTCAATCCAGACCCAGAAAGCCGATGTTTACTCTATC
CTCTCTGGGTCAAGTCAAGTGAATACAAATGTGACAGATTTGGGTCAACAGACT
720
GTAAACTCTGGATCTACAAGGACCTTTCCACTCCATGATTCGAAATCCCGCCCTAG
TCAGAGATCCGACTGCCATAAGACGCTACTCTGTACAGAGATGGCTCATCT
840
CAGAGCATACAAAAGCAGCCCTTGGATCTTATCAGAAATCACTATGGAGAGAGATT
GSAATCACTTCTGTGGCTGGGATTAACATCAGATGCTCTCTCCGCCAGATGTA
960
GSAATGCTTCTCTCTATGSAATCTATATCAGAAATCTGACTGAGCAGAAAG
GTTTGTACTCTGATATGTTGGTGAAGATGATGCTGCTCAGTGGATAGGCTTGT
1080
CCATTCTGAAACTCAATTAATCTGGAGCTCCCAAAAGAAATGTGCATCTGACAGT
TTTGGAAACCTGGCTTTGGAGTATTTAGGAGATAGGGTACTCTGTTTGGAGTTT
1200
TGGAGCGAGCCAGCAGAACTTGGTATGATGATGGATGCTTGGTATGAGCAGGAA
GACAGCCAGCCAGCAGATACGAGCAGATGACTCAGTACTGATGAAATGSAATGACT
1320
GAGAGAGAGAGAGCAGTCCCTTACTGCTGGGAAAGATGATACGATAACCTCTGT
GCCAGTGGCTTTTTCTGGAACTCCAGAGCCAGCAGTATGATGGAGCAGCTCT
1440
CCATGAGATGTTCTTATTCCAGTTTGTCAACTACTCTTCACTGCTCTACATGATC
TCTTTAAGGCAAAATTTGAGGCTATCCAGGAGCCAGTCTTATGTTGGGAAATACA
1560
GAAATGAGAGTGTGACCCAGTGGCTGCTCTTCTTGAATCGAACCTCAGCTGACATTA
TCTGGGAGAGAGCAGATCTGSAATGACTCAGAGATATTTGGCTGGTCAATGA
1680
ATCTAATTTGGCTGTTCCAGAGTTCTGSAATCAGAAAGATTAACCCAGATGGAC
AGGACTACCTGAGCCTATGAGGAAAGTGGGATTTTATGATATCTTGAAGTGA
1800
TTATTGATTTGGGTTGCTCACTTATTTGGGCTCTTTCCACTGGCCCTCTGTTGG
CTCTGTAACAATATATTGAAATAAGAGTGGACCCATGGAACTGACCCACCGATTA
1920
GACGCTGTACACAGAAAGCCCAAGCATTTGGGATGGCAGCCATCATGCAAGGAA
TAGCATTTCTGGCTGGCAGATCCAGTCACTGATGCTTTCACTGGCAGCAGTCC
2040
CCGCGCTATGACTACTGGCTCTCTCCGCTCCCTCCAGGAGACCACTCTCTACA
CCATGGAAAGGTCATCAACCAACTCTCTCCACTTTCAAATGGCAGACTTCAAAAAC
2160
AAAGCAAGGAAACCCGATCTCTGACTGGGATACCATACCACTGGAGGATGATGAT
TCCGATACCCACTGGACCCCGAGGATTAACCAACCAACTACTATTGGCATGGA
2280
TTGGCCAGGCTGACTTTTATCTATTGTTCTGAGGAGCAGTCTACTCTGAGAAATTT
TCTTTGATGGATTTCCGCTGATCAAAAGCAGCAAGAGCAGATCCAGGAGAA
2400
AATACCAACCAAAAGCTTCTCATGAGATCCCTCAAGATATGACCAAAATATGG
GGTGTATGCTGAGCAGATGATGAGGAGCAGATCAAGATTAACGSCCAAAATCAGAT
2520
AAGGCTTATGCTCTGAGGAGCACTTAAAGATTTAAGCTTTGCAAAATATATAGGA
ATCAATTAAGGATTTGTAAGTTAATCACTTTGGCAATATGAGTCTCAACTATTC

【 図 1 2 - 2 】

ATTTCTCATGTATATTTTTCAGTTTCAGCTAGCAGATGCGAAGTGGAAAATGTAAAA
CTAAGTCTGAGGGCATAAACTTATCCACCCGAAACCTCGATGTTACTTTTCTG
ATAAATGAAATTTACAGAAAAGCCCTCACTGCTGCTTAAACCAACCCCTCTAAAG
TAGAATGGATCTTTTTTCTGTTGATTTAATTTTCACTTGTGATTTCTCAGGGAT
GATCCCTTATTTTTTAAAGCACTGTTTCACTTCTCACTGATGATCTGTCAGGGT
CATCTTTCCTACAGTACCATGATTAAGATTAATTAATAGCTTCACTGATTAATA
AATAGCTAATCACTCAGGATTCAGAAATTTAGGTGATTTTCAATGACTCCAGAAA
GGAAACCTGATTAATCAGGAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TCAAAAATAACTCTIATGAGTGGGATGAGATGAGCAGGTTTGAAGCATTTGTC
CTAATCCAGATGACATTTTATCTCCAGAGGACCTCTAGGAGGTCCTCCGCTAAT
CAATGTGACTGCTTTCAGATCTCAAGGAAATAAATGACAAAAGCAGGAAAGTACA
GATTCAAAAGCATTTAATCTATGATCTGGATAATTAATCTTTCTAAAGATGTT
AGTTTCTGGAAAACAGTATCAGATGATTAATAATTAATTAATTTTCAAGATATGTT
CTGGAAAGATGAGCCCTCATTTTCTACAGCTGCTTTTCTGATGATGAGAGAG
GTCCAGTATACACATCCAGCTGCTTTTGAATGGCTACTACAGCAATTTGGAT
ACAACTGTGCTAGTGGGAGAAACAGAGTCCCTCATGATGGGTCATTTGGGAT
GCCTTTTGCAAGGATCTGAGGAAATGGCTTATTTCTGATGCAAAATGATCAACAC
ACCAAGTCTCTGCCATAAAGATGCTGCTTCTGATCTCCACTCTGTTACTCTGG
CCGATTAATTTGATGATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATATGCAATGAGAGCTGAGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GGCAGTAAAGATATTAAGGAAAGGTTGCTGCAACACCTACACTTACTGAGAT
TACTCTGCTGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TAGCAGTACTCTCACTTATGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
GACAGGAGCCAGGCTCTCACTACTGATGAGGATGATGATGATGATGATGATGATG
GGAGTATTTGATCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GKSKGJACCTATCAGATCTCAGCAGGAGGAAATCAGATTTAGAGGCTTTT
ACAAAGATGAGTCACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TGAATTAATGATGAGTCCATCAAGAGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ATCCGGACCCATTTCACTGCTCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
ACAGCCCATGAGTCTGATGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AACTCTTCTCATGCGAGCAGAGGAGTGGCAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ATGCTTCTGAGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TGGACTATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AGGAAATGTTTACTGATCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GTTTCAAGCCCAAGGAGAAATCTCTCATAGATTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAGGGGAAAAACCTCTCATATTTGAAGGACCAATGATGATGATGATGATGATGATG
AGATGCCCAAAAGAGCAAGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CTGACAGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AACACTAGAGCAATCTCAGGAGTCTTCTCATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TATCTATGAAAGGAGGAGCTCATTTTATTTAATTTAATAAACAAGGCACTTTAT
AACTGTCACAAAGTCTTCTTCTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TAATCAATGAGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TCAATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG

【 図 1 2 - 3 】

```

TGATGCTTTTCACACATTTGGGCATAGAGTAAAGTTTGAATTAATGTTAATTTCTGT
GCATTTAATATCTTTTATAAATTAATAAGTAAATTTCTGIGCATTTAATATCTTTT
ATAATTATGAGCATTTTAATAAATTCATTTTCAAAACAATAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

```

【 図 1 3 】

配列番号5 Scott Syndrome の患者で見いだされた変異型TMEM16Fのアミノ酸配列

```

MKKNSRNVLQ QMEESEBDDD GDIVLEMLQQ TIVPDLSSLE SQHDFRTPPEF
EEFNKGFDSL FFNDGRRID PVLVYEDSER KETNKKGTNE KQREKQAYE
SNLICHQLQL EATRSVLDLQ LVPVKHHPW EVLCTYATIM HIKLPLKPNQ
LKNRSSAFGT LNWPTKVLVS DESIIKPEQE FFTAPFEKNR MMDFYIVDRD
AFFNPATRSR IYVFILSRVK YQVINNVSKF GINRLVNSGI YKAAFELHDC
RFRQSEEDS CPNERYLRYR EWAHPRSIYK KQPLDLIRKY YGEKIGLYPA
WLGYYTQMLL LAAVVGWACF LYGYNQDNC TWSKEVCHPD IGGKIIMCPQ
CDRLCPFWKL NITCESSEKL CIEDSPGTLV FAVFMGVWWT LFLFPWKRRO
AELEYENDTV ELQSEQARP EYEARCTHVV INEITQEER IPFTANGKCI
RITLCASAVP FWNSGGRLI MRTASP

```

【 配列表 】

2012029855000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/069780
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/50(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/50, G01N33/15  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2010-512842 A (Honeywell International Inc.), 30 April 2010 (30.04.2010), claim 1; paragraphs [0022] to [0025] & US 2008/0145455 A1 & EP 2101830 A & WO 2008/076598 A1 & KR 10-2009-0088935 A	1, 3 2 4, 9-10
X Y A	JP 8-73365 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 19 March 1996 (19.03.1996), paragraph [0031] (Family: none)	1, 3 2 4, 9-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 November, 2011 (16.11.11)		Date of mailing of the international search report 29 November, 2011 (29.11.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-509050 A (Neorx Corp.), 16 September 1997 (16.09.1997), claims 1 to 2; page 8, lines 17 to 24; page 9, lines 6 to 25 & US 5968477 A                      & EP 743861 A & WO 1995/019791 A1              & DE 69530375 D & CA 2180555 A                      & AT 237366 T	2
Y	WO 98/029453 A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 July 1998 (09.07.1998), claims; page 11, lines 7 to 19 & US 2003/0220490 A1              & EP 965597 A1 & CA 2276091 A	2
A	JP 2010-521421 A (Industry Academic Cooperation Foundation, Yonsei University), 24 June 2010 (24.06.2010), paragraphs [0032] to [0033] & US 2010/0105726 A1              & GB 2462715 A & WO 2008/105565 A1	2
A	Rock JR et al, Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca <sup>2+</sup> -regulated Cl <sup>-</sup> secretory channel in mouse airways, J Biol Chem, 2009. 04.10, 284(22), 14875-14880	1-4,9-10
P,X	Suzuki J et al, Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F, Nature, 2010.11.24, 468 (7325), 834-838	1-4,9-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069780

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(1) The inventions described in claims 1-4 and 9-10 relate to a method for screening for a blood coagulation regulator, which comprises a step of bringing a TMEM16F-expressing cell into contact with each of candidate substances for the blood coagulation regulator and a step of selecting a substance capable of increasing or decreasing the expression of phosphatidylserine or TMEM16F on the surface of the cell.

(2) The inventions described in claims 5 and 7 relate to a composition for promoting blood coagulation which contains a substance capable of enhancing the function of TMEM16F/a method for promoting blood coagulation.

(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-4, 9-10

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/069780

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(3) The inventions described in claims 6 and 8 relate to a composition for inhibiting blood coagulation which contains a substance capable of suppressing the function of TMEM16F/a method for inhibiting blood coagulation.

(4) The inventions described in claims 11-17 relate to a method for identifying a predisposition to Scott syndrome in a subject/a composition for diagnosing Scott syndrome.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/069780									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50, G01N33/15											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y A	JP 2010-512842 A (ハネウェル・インターナショナル・インコーポ レーテッド) 2010.04.30, 請求項1、段落【0022】 - 【0025】 & US 2008/0145455 A1 & EP 2101830 A & WO 2008/076598 A1 & KR 10-2009-0088935 A	1,3 2 4,9-10									
X Y A	JP 8-73365 A (工業技術院長) 1996.03.19, 段落【0031】 (ファミリーなし)	1,3 2 4,9-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 16.11.2011		国際調査報告の発送日 29.11.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹	2J 3316								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 9 7 8 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 9-509050 A (ネオルクス コーポレイション) 1997.09.16, 請求の範囲 1-2、8頁17-24行、9頁6-25行 & US 5968477 A & EP 743861 A & WO 1995/019791 A1 & DE 69530375 D & CA 2180555 A & AT 237366 T	2
Y	WO 98/029453 A1 (持田製薬株式会社) 1998.07.09, 特許請求の範囲、11頁7-19行 & US 2003/0220490 A1 & EP 965597 A1 & CA 2276091 A	2
A	JP 2010-521421 A (インダストリー-アカデミック コーポレーション ファウンデーション, ヨンセイ ユニバーシティ) 2010.06.24, 段落【0032】-【0033】 & US 2010/0105726 A1 & GB 2462715 A & WO 2008/105565 A1	2
A	Rock JR et al, Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca <sup>2+</sup> -regulated Cl <sup>-</sup> secretory channel in mouse airways, J Biol Chem, 2009.04.10, 284(22), 14875-14880	1-4, 9-10
P, X	Suzuki J et al, Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F, Nature, 2010.11.24, 468(7325), 834-838	1-4, 9-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 9 7 8 0

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

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

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

(1) 請求項 1-4,9-10 は、TMEM16F発現細胞と血液凝固調節物質の候補物質とを接触させる工程、および、細胞の表面におけるホスファチジルセリンまたはTMEM16Fの発現を増減させる物質を選択する、血液凝固調節物質のスクリーニング方法に関する発明である。

(2) 請求項 5,7 は、TMEM16Fの機能を亢進する物質からなる、血液凝固促進用組成物/血液凝固を促進する方法に関する発明である。

(3) 請求項 6,8 は、TMEM16Fの機能を抑制する物質からなる、血液凝固阻害用組成物/血液凝固を阻害する方法に関する発明である。

(4) 請求項 11-17は、被験者のScott症候群の素因を調べる方法/Scott症候群の診断用組成物に関する発明である。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1 - 4、9 - 10

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>7/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	7/02		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		A
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 鈴木 淳

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA40 BA13 BB20 CB01 CB02 DA14 DA36 FA37  
 FB01 FB03 FB06 FB08 FB12 GC11 GC15  
 4B024 AA11 BA63 CA01 HA12  
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ43 QQ79 QQ91 QQ96 QR08 QR48  
 QR55 QR62 QS15 QS25 QS33 QS34 QX01  
 4C084 AA17 NA14 ZA541 ZC411  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 EA50

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

专利名称(译)	筛选凝血调节剂的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2012029855A1</a>	公开(公告)日	2013-10-31
申请号	JP2012531917	申请日	2011-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
[标]发明人	長田重一 鈴木淳		
发明人	長田 重一 鈴木 淳		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 A61K45/00 A61P7/02 C12N15/09 C07K14/705		
CPC分类号	G01N33/86 G01N2500/00 G01N2800/222		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K45/00 A61P7/02 C12N15/00.A C07K14/705		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC11 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA541 4C084/ZC411 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	61/379124 2010-09-01 US		
其他公开文献	JP5855003B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

筛选凝血调节物质的方法，凝血调节组合物和凝血调节方法技术领域本发明涉及各自针对TMEM16F（跨膜蛋白16F）的凝血调节物质的筛选方法，凝血调节组合物和凝血调节方法。本发明还涉及用于诊断斯科特综合症的方法和组合物。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 NO2012/029855
発行日 平成25年10月31日(2013.10.31)	(43) 国際公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)	
(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)	FI C12Q 1/68 ZNAA G01N 33/53 D G01N 33/50 Z G01N 33/15 Z A61K 45/00	ターマコード(参考) 2G045 4B024 4B063 4C084 4H045
審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 36 頁) 最終頁に続く
出願番号 特願2012-531917(P2012-531917)	(71) 出願人 504132272	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/069780	国立大学法人京都大学	
(22) 国際出願日 平成23年8月31日(2011.8.31)	京都府京都市左京区吉田本町36番地1	
(31) 優先権主張番号 61/379,124	(74) 代理人 100062144	
(32) 優先日 平成22年9月1日(2010.9.1)	弁理士 青山 傑	
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100101454	
	弁理士 山田 卓二	
	(74) 代理人 100106518	
	弁理士 松谷 道子	
	(74) 代理人 100138911	
	弁理士 櫻井 陽子	
	(72) 発明者 長田 重一	
	京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学	
	法人京都大学大学院医学研究科内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】血液凝固調節物質のスクリーニング方法		