

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/083637

発行日 平成25年5月13日(2013.5.13)

(43) 国際公開日 平成23年7月14日(2011.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2011-548929 (P2011-548929)	(71) 出願人	591063394
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/071186		公益財団法人東京都医学総合研究所
(22) 国際出願日	平成22年11月19日(2010.11.19)		東京都世田谷区上北沢2-1-6
(31) 優先権主張番号	特願2010-1892 (P2010-1892)	(71) 出願人	502019933
(32) 優先日	平成22年1月7日(2010.1.7)		リンク・ジェノミクス株式会社
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号
			神野ビル4階
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肝疾患治療薬

(57) 【要約】

本発明は、ユビキチン陽性封入体形成を制御する p 6 2 と K e a p 1 の相互作用の制御方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

K e a p 1 と p 6 2 との結合の阻害または抑制剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の剤であって、

i) p 6 2 に特異的に結合する分子、または

i i) p 6 2 の発現阻害物質

を含有する剤。

【請求項 3】

i) ユビキチン陽性封入体形成の阻害又は抑制剤、

i i) 肝疾患の治療剤、または

i i i) 抗がん剤

として使用される、請求項 1 または 2 に記載の剤。

【請求項 4】

前記 p 6 2 に特異的に結合する分子が、

i) p 6 2 の K e a p 1 相互作用領域に特異的に結合する物質、

i i) マウス p 6 2 のアミノ酸配列（配列番号 3）中の 3 4 9 位のアスパラギン酸、3 5 0 位のプロリン、3 5 2 位のスレオニン、3 5 3 位のグリシン、もしくは 3 5 4 位のグルタミン酸に特異的に結合する物質、または

i i i) 前記 p 6 2 の発現阻害物質が、p 6 2 をコードするヌクレオチド配列に対するアンチセンス核酸もしくは s i R N A

である、請求項 2 または 3 に記載の剤。

【請求項 5】

前記 p 6 2 に特異的に結合する分子が、L C 3 または抗 p 6 2 抗体である、請求項 2 に記載の剤。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の肝疾患の治療剤の適用患者を判定する方法であって、

i) 被験者の肝生検による p 6 2 もしくは N r f 2 の発現量を測定する工程、または

i i) 被験者の肝生検による N r f 2 の活性を測定する工程、

を含む、方法。

【請求項 7】

被験者の血液中の A S T , A L T , A L P , または γ - G T P の酵素活性を測定することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法に使用する診断キットまたは診断剤であって、

抗 p 6 2 抗体または抗 N r f 2 抗体を含み、

前記キットはさらに使用説明書

を含む、キットまたは剤。

【請求項 9】

K e a p 1 と p 6 2 との相互作用を阻害または抑制する物質（a g e n t）のスクリーニング方法であって、

i) 試験物質の存在下および非存在下で K e a p 1 と p 6 2 との結合量を測定する工程、および

i i) 前記試験物質の存在下と非存在下との間で K e a p 1 と p 6 2 との前記結合量を比較し、前記試験物質の存在下での前記結合量が前記試験物質の非存在下での前記結合量よりも低い場合に、当該試験物質を K e a p 1 と p 6 2 との相互作用を阻害または抑制する物質として選択する工程

を含む、方法。

【請求項 10】

前記結合量を測定する工程において、プルダウン法、質量分析法、タンパク質間相互作用

10

20

30

40

50

を蛍光シグナルとして検出する方法、または蛍光標識を用いたイメージングのいずれかが用いられる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ユビキチン陽性封入体形成を阻害または抑制する物質のスクリーニングのために使用する、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

肝疾患の治療剤のスクリーニングのために使用する、請求項 9 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記結合量を測定する工程が、

i) p 6 2 の K e a p 1 相互作用領域、または

i i) マウス p 6 2 のアミノ酸配列（配列番号：3）中の 3 4 5 番から 3 5 9 番目のアミノ酸配列：S K E V D P S T G E L Q S L Q（配列番号：5）

に対する K e a p 1 の結合量を測定することを含む、請求項 9 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記物質が、マウス p 6 2 のアミノ酸配列（配列番号：3）中の 3 4 9 位のアスパラギン酸、3 5 0 位のプロリン、3 5 2 位のスレオニン、3 5 3 位のグリシン、または 3 5 4 位のグルタミン酸に特異的に結合する、請求項 9 ～ 13 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内のユビキチン陽性封入体の形成を制御する p 6 2 と K e a p 1 のタンパク質相互作用、前記相互作用を阻害又は抑制する物質を有する肝疾患治療薬および抗がん剤、前記相互作用を用いたスクリーニング方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

肝臓はヒトにおける最大の代謝器官であり、生命維持に必須の臓器である。この臓器は、高カロリー・高脂肪の飲食、ストレスなどにより肝肥大、脂肪肝などを引き起こし、機能低下を招く。またウイルス感染やアルコール摂取などにより、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎を引き起こし、これらの障害が長期にわたると肝硬変や肝がんに至る。

しかしながら、これらの肝疾患に対する有効な薬剤が開発されていないのが現状である。そのため、様々な肝疾患に対して有効な薬剤の開発が望まれている。その中で、本発明者らのオートファジーの研究から有望な肝疾患治療薬および抗がん剤を提供する。

オートファジーは細胞成分の代謝回転、無用なオルガネラの除去、凝集易発性の変異タンパク質の除去などに関与する細胞内大規模分解経路である。オートファジーはまず、隔離膜が伸長し、細胞質構成成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）を形成する。このオートファゴソームがリソソームと融合し、リソソームの加水分解酵素により囲い込まれた細胞質成分を分解する。酵母遺伝学の研究により、数多くの A T G 遺伝子がオートファジーに必須の役割を担っていることが知られるようになった。オートファゴソームに局在する L C 3 は酵母 A t g 8 のヒトホモログとして同定され、隔離膜の伸長に必須の役割を担っている。その L C 3 との結合因子として p 6 2 が取得された（非特許文献 1：K o m a t s u e t a l. 2007 C e l l）。

p 6 2 はシグナル伝達を担う多彩な分子群と相互作用する。また C 末端にユビキチン会合ドメインを有しており、ユビキチン化タンパク質のプロテアソームへのシャトル分子として知られている（非特許文献 2：S e i b e n h e n e r e t a l. 2004 M C B）。また p 6 2 は L C 3 との相互作用を介してオートファジー・リソソーム系で分解されることから、オートファジーに対する選択的基質とされている（非特許文献 3：B j o k o y e t a l. 2005 J C B, 非特許文献 4：P a n k i v e t a l. 2007 J B C, 非特許文献 5：I c h i m u r a e t a l. 2008 J B C）

10

20

30

40

50

。実際に p 6 2 のノックアウトマウスにおいて正常なオートファゴソーム形成およびリソソームによるタンパク質分解が確認されている。また p 6 2 ノックアウトマウスは 2 型糖尿病を発症するが、オートファジー欠損マウスにおいて観察される肝障害や神経変性は確認されていない（非特許文献 6：Rodriguez A 2006 Cell Metab）。

肝臓もしくは脳特異的 Atg 7 欠損マウスの肝臓もしくは脳において、p 6 2 が蓄積、不溶化し、最終的に p 6 2 陽性の封入体（inclusion bodies）が確認される。また Atg 7 欠損肝臓、脳において、ユビキチン化タンパク質と p 6 2 は比例的に蓄積し、ほぼ全ての封入体がユビキチン・p 6 2 陽性である（非特許文献 7：Komatsu et al. 2005 JCB, 非特許文献 1：Komatsu et al. 2007 Cell）。封入体の形成過程は、変異タンパク質の折りたたみ異常、可溶性オリゴマー形成、そして可溶性オリゴマーの不溶化・封入体として蓄積の 3 段階よりなる。この封入体の形成は、様々な病態（アルコール性肝炎やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ALS などの神経変性疾患）において観察されており、オートファジー欠損マウスでは、細胞内封入体形成を伴った肝細胞肥大、肝肥大を引き起こし、肝障害を発症する。Atg 7 と p 6 2 を同時に欠損させると、封入体の形成はほぼ完全に抑制され、またオートファジー不全で確認される肝肥大・肝障害を強く抑制した。このことは過度な p 6 2 の蓄積が肝障害の主原因であることを示している（非特許文献 1：Komatsu et al. 2007 Cell）。重要なことに、ユビキチン・p 6 2 陽性封入体の蓄積は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、星状細胞腫などの神経性疾患や、アルコール性肝炎、脂肪肝、肝がん患者の肝臓組織においても同定されている（非特許文献 8：Stumpner et al., 2007 Hepatology, 非特許文献 9：Zatloukal K et al. AM J Pathol 2002）。

さらにオートファジー欠損肝臓においては、グルタチオン S トランスフェラーゼ（GST）、NAD（P）H Dehydrogenase, NQO1（quinine 1）など一連の解毒酵素群の転写が著しく誘導されている。これらの解毒酵素群の転写のほとんどは転写因子 Nrf2（NF-E2-related factor 2）によって制御されることが知られている。通常、Nrf2 はユビキチンリガーゼ Keap1（Kelch-like ECH-associated protein 1）に捕獲され、ユビキチン化を受けることによりプロテアソームによって分解されている。一方酸化ストレスのない親電子性物質に暴露されると、Keap1 の特定のシステイン残基が酸化され Nrf2 との結合を失う。その結果、分解を免れた Nrf2 は核内に移動し、GST や NQO1 などの解毒酵素群の転写を活性化することが明らかにされている（非特許文献 10：Tong KI et al. Mol Cell Biol 2007）。またオートファジー欠損肝臓では、Nrf2 が核内に蓄積し、その蓄積は p 6 2 の同時欠損で抑制される。これらの結果は、p 6 2 依存的な Nrf2 制御機構の存在を示唆する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】Cell 131, 1149-63, 2007

【非特許文献 2】Mol. Cell Biol. 24, 8055-68, 2004

【非特許文献 3】J. Cell Biol. 171, 603-14, 2005

【非特許文献 4】J. Biol. Chem. 282, 24131-45, 2007

【非特許文献 5】J. Biol. Chem. 283, 22847-57, 2008

【非特許文献 6】Cell Metab. 3, 211-22, 2006

【非特許文献 7】J. Cell Biol. 169, 425-34, 2005

【非特許文献 8】Hepatology 46, 851-60, 2007

【非特許文献 9】Am J Pathol. 160, 255-63, 2002

【非特許文献 10】Mol. Cell Biol. 27, 7511-21, 2007

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記の各知見により、過度のユビキチン陽性封入体形成が肝疾患（肝細胞がんや肝障害など）を引き起こし、また p 6 2 が封入体の形成に深く関与することが示唆されている。そこで本発明は、p 6 2 の封入体形成の制御メカニズムを同定し、そのメカニズムに基づく新規な肝疾患治療薬および抗がん剤、あるいは診断薬を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、p 6 2 が K e a p 1 と結合することを初めて見出した。また K e a p 1 における p 6 2 の結合部位は、N r f 2 の結合と同じポケットを使用していることも明らかにした。オートファジー欠損によって p 6 2 が蓄積すると、K e a p 1 と p 6 2 の結合が増加し、それに伴いフリーの N r f 2 が増加する。そして蓄積した N r f 2 が核内へ移行し、解毒酵素群の転写を上昇させている。

また、本発明者らの実験によれば、オートファジー欠損の肝臓で N r f 2 も同時欠損させると、細胞内封入体の形成やそれに伴う肝肥大、肝障害を抑圧できた。これは K e a p 1 と p 6 2 の結合増加が、直接 N r f 2 の活性化、そして肝肥大や肝障害、そして肝臓がんを導くことを示す。したがって、p 6 2 と K e a p 1 の結合を阻害することでユビキチン-p 6 2 陽性封入体の形成を防ぎ、肝肥大、肝障害、肝臓がん治療あるいは、ユビキチン-p 6 2 陽性封入体形成が確認されている星状細胞腫の治療に繋がることを示唆される。

したがって、本発明は、以下の剤、診断方法、診断キット、診断剤、およびスクリーニング方法を提供する。

(1) K e a p 1 と p 6 2 との結合の阻害または抑制剤。

(2) 上記 (1) に記載の剤であって、

i) p 6 2 に特異的に結合する分子、または

i i) p 6 2 の発現阻害物質

を含有する剤。

(3) i) ユビキチン陽性封入体形成の阻害又は抑制剤、

i i) 肝疾患の治療剤、または

i i i) 抗がん剤

として使用される、上記 (1) または (2) に記載の剤。

(4) 上記 p 6 2 に特異的に結合する分子が、

i) p 6 2 の K e a p 1 相互作用領域に特異的に結合する物質、

i i) マウス p 6 2 のアミノ酸配列（配列番号 3）中の 3 4 9 位のアスパラギン酸、3 5 0 位のプロリン、3 5 2 位のスレオニン、3 5 3 位のグリシン、もしくは 3 5 4 位のグルタミン酸に特異的に結合する物質、または

i i i) 上記 p 6 2 の発現阻害物質が、p 6 2 をコードするヌクレオチド配列に対するアンチセンス核酸もしくは s i R N A

である、上記 (2) または (3) に記載の剤。

(5) 上記 p 6 2 に特異的に結合する分子が、L C 3 または抗 p 6 2 抗体である、上記 (2) に記載の剤。

(6) 上記 (3) に記載の肝疾患の治療剤の適用患者を判定する方法であって、

i) 被験者の肝生検による p 6 2 もしくは N r f 2 の発現量を測定する工程、または

i i) 被験者の肝生検による N r f 2 の活性を測定する工程、

を含む、方法。

(7) 被験者の血液中の A S T, A L T, A L P, または γ -G T P の酵素活性を測定することをさらに含む、上記 (6) に記載の方法。

(8) 上記 (6) に記載の方法に使用する診断キットまたは診断剤であって、

抗 p 6 2 抗体または抗 N r f 2 抗体を含み、

上記キットはさらに使用説明書を含む、キットまたは剤。

(9) K e a p 1 と p 6 2 との相互作用を阻害または抑制する物質 (a g e n t) のスクリーニング方法であって、

i) 試験物質の存在下および非存在下で K e a p 1 と p 6 2 との結合量を測定する工程、および

i i) 上記試験物質の存在下と非存在下との間で K e a p 1 と p 6 2 との上記結合量を比較し、上記試験物質の存在下での上記結合量が上記試験物質の非存在下での上記結合量よりも低い場合に、当該試験物質を K e a p 1 と p 6 2 との相互作用を阻害または抑制する物質として選択する工程

を含む、方法。

(10) 上記結合量を測定する工程において、プルダウン法、質量分析法、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出する方法、または蛍光標識を用いたイメージングのいずれかが用いられる、上記 (9) に記載の方法。

(11) ユビキチン陽性封入体形成を阻害または抑制する物質のスクリーニングのために使用する、上記 (9) または (10) に記載の方法。

(12) 肝疾患の治療剤のスクリーニングのために使用する、上記 (9) ~ (11) のいずれかに記載の方法。

(13) 上記結合量を測定する工程が、

i) p 6 2 の K e a p 1 相互作用領域、または

i i) マウス p 6 2 のアミノ酸配列 (配列番号: 3) 中の 3 4 5 番から 3 5 9 番目のアミノ酸配列: S K E V D P S T G E L Q S L Q (配列番号: 5) に対する K e a p 1 の結合量を測定することを含む、上記 (9) ~ (12) のいずれかに記載の方法。

(14) 上記物質が、マウス p 6 2 のアミノ酸配列 (配列番号: 3) 中の 3 4 9 位のアスパラギン酸、3 5 0 位のプロリン、3 5 2 位のスレオニン、3 5 3 位のグリシン、または 3 5 4 位のグルタミン酸に特異的に結合する、上記 (9) ~ (13) のいずれかに記載の方法。

本発明は、ユビキチン陽性封入体形成を制御する p 6 2 と K e a p 1 の相互作用の制御方法を提供する。

オートファジーが欠失することにより、細胞内の p 6 2 タンパク質の蓄積と不溶化、p 6 2 -ユビキチン陽性封入体が蓄積、それに伴った肝障害が起こることが知られている。またこの封入体の蓄積が p 6 2 の欠失により解消されることが知られている。

本発明者らは今回、p 6 2 と K e a p 1 が直接結合すること、その結合部位は K I R (K e a p 1 I n t e r a c t i n g R e g i o n) 配列 (マウス p 6 2 のアミノ酸配列 (配列番号 3) における 3 4 5 番目から 3 5 9 番目アミノ酸残基からなる領域に相当する) で、その中でも特に 5 つのアミノ酸 (3 4 9 番目アスパラギン酸、3 5 0 番目プロリン、3 5 2 番目トレオニン、3 5 3 番目グリシン、3 5 4 番目グルタミン酸) が結合に重要であることを見出した。

また p 6 2 と K e a p 1 の相互作用は、K e a p 1 の不溶化、肝細胞における解毒酵素群の転写因子である N r f 2 の安定化と活性化を導き、解毒酵素群 (抗酸化タンパク質等) の発現、細胞内封入体の蓄積、肝機能の低下を誘発することを新規に見出した。

したがって、p 6 2 と K e a p 1 との相互作用 (または結合) を制御 (抑制または促進) することにより、K e a p 1 の不溶化、肝細胞における解毒酵素群の転写因子である N r f 2 の安定化と活性化、解毒酵素群 (抗酸化タンパク質等) の発現、細胞内封入体の蓄積、肝機能の低下等を制御できる。

本発明は細胞保護酵素遺伝子の転写を制御するメカニズムにおける、選択的オートファジーの新たな役割を見出した点において、重要な意義を有する。

続いて、本発明は p 6 2 と K e a p 1 の相互作用を阻害又は抑制する肝疾患の治療薬を提供する。

10

20

30

40

50

上述の通り、オートファジーの減弱が、様々な疾患で確認されるユビキチン・p62陽性封入体を伴った肝細胞がんや肝障害を引き起こす。これはp62とKeap1の相互作用を抑制することで解消されるため、p62とKeap1の相互作用を阻害又は抑制する物質は、肝疾患治療薬および抗がん剤に適用できる可能性が高い。

Keap1と結合するp62の部位は、p62の他のタンパク質と相互作用する部位とは異なることから、この治療薬および抗がん剤によりオートファジーの異常が起きる可能性は低い。またKeap1とp62の相互作用がNrf2の安定化、活性化を導くが、p62-Keap1の結合に伴うNrf2活性化システムは肝臓以外ではほとんど機能していないと考えられることから、p62とKeap1の相互作用を阻害又は抑制する抗がん剤は、副作用が少ないと考える。

10

さらに、本発明は細胞内のp62の量を抑制することでKeap1とp62の相互作用を阻害又は抑制する肝疾患の治療薬および抗がん剤を提供する。

上述の通り、オートファジーの減弱が、p62の蓄積を促し、肝細胞がんなどの肝疾患を引き起こす。この病変はp62を欠損させることで大きく改善される。またp62はLC3と結合しオートファジーにより分解される。p62とLC3が結合できない変異体を細胞に導入するのみで、ユビキチン陽性封入体が形成される。これらのことより、p62の発現そのものを抑制する物質や、p62を積極的分解に誘導できる物質は、肝疾患の治療薬に適用できる可能性が高い。

【発明の効果】

【0006】

20

本発明は、新規な作用機序に基づく肝疾患治療薬および抗がん剤、診断薬またはそのスクリーニング方法などに応用できる。本発明の肝疾患治療剤は、副作用が少ないという利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】Keap1の欠失変異構築物（左パネル）の模式図とそれに対応する免疫沈降アッセイ（右パネル）の結果を示す図である。

【図2】（a）p62の欠失変異構築物（左パネル）とそれに対応するインプット（右上パネル）およびプルダウンアッセイ（右下パネル）を示す図である。（b）種々の種におけるp62のホモログのKeap1-interacting regions（KIR；赤線部）およびLC3認識配列（LRS；緑線部）のアラインメントを示す。黒およびグレーを付した部分は、それぞれ、完全保存および部分的保存の同一のアミノ酸残基を示す。

30

【図3】p62の点変異構築物のリストおよびそれに対応するプルダウンアッセイを示す図である。GST-Keap1-DC、MBP-p62M80およびその点変異、ならびにMBP-p62M83が示されている。

【図4】免疫沈降アッセイの結果を示す図である。各FLAGタグを付けたKeap1およびリストされている点変異をHek293T細胞において発現した。細胞溶解物を抗FLAG抗体により免疫沈降し、得られた免疫沈降物をSDS-PAGEに供し、抗FLAG抗体および抗p62抗体で免疫ブロットにより分析した。FLAG-Keap1、内因性のp62、Nrf2、およびアクチンが示されている。3つの独立した実験からの結果を示す。

40

【図5】免疫沈降アッセイの結果を示す図である。FLAGタグの付いたp62およびKeap1との相互作用ができない変異体（p62 T352A）を、アデノウイルスシステムを用いて野生型初代マウス肝細胞において過剰発現させた。感染の48時間後に、細胞を10μMラクタシスチンの非存在下（レーン1, 3, および5）または存在下（レーン2, 4, および6）で4時間培養した。細胞溶解物を、抗Nrf2抗体で免疫沈降した後、SDS-PAGEに供し、抗Nrf2抗体および抗ユビキチン抗体で免疫沈降することにより分析した。Nrf2、ユビキチン化Nrf2、FLAG-p62、内因性p62、およびアクチンに対応するバンドが示されている。3つの独立した実験からの結果を示

50

す。

【図6】Keap1に対するp62の競合的活性をルシフェラーゼアッセイによって測定した結果を示す図である。Nr f 2、Keap1、およびp62野生型またはその変異体についての発現プラスミドを、pNq o 1-A R Eレポータープラスミドおよび内部コントロールとしてのp R L-T KとともにHe p a 1細胞へトランスフェクトした。トランスフェクションの36時間後に、製造業者の指示書に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。アッセイは3連で2回行った。

【図7】(a) At g 7欠損肝細胞におけるKeap1の不溶化を示す図である。(b) At g 7欠損(F/F : M x 1)およびAt g 7/p62欠損(F/F : M x 1 : p62-/-)肝臓の免疫ブロット分析の結果を示す図である。

【図8】マウス肝臓におけるNq o 1およびG s t m 1の定量的リアルタイムPCR分析の結果を示す図である。

【図9】p62およびKeap1の細胞内局在の免疫蛍光分析の結果を示す図である。p I p C注入後28日での図に示された遺伝子型のマウス由来の肝臓切片を抗p62抗体(上段パネル)および抗Keap1抗体(中段パネル)で免疫染色した。下段パネルはKeap1(グリーン)およびp62(レッド)の画像を重ね合わせたものである。At g 7欠損肝臓のパネルの中の各差し込み図は、四角で囲んだ領域の拡大図である。バーは20 μmである。

【図10】At g 7欠損(F/F : M x 1)およびAt g 7/Nr f 2欠損(F/F : M x 1 : Nr f 2-/-)肝臓の免疫ブロッティングの結果を示す図である。

【図11】p62およびKeap1の細胞内局在の免疫蛍光分析の結果を示す図である。

【図12】マウス肝臓中のNq o 1、G s t m 1、およびCy 2 a 5の定量的リアルタイムPCR分析の結果を示す図である。トータルRNAを、p I p C注入後28日目に図に示された遺伝子型の肝臓から調製した。値は、At g 7^{F/F}肝臓におけるmRNA量に対して正規化したものである。実験は3回行った。パネル(d)-(h) : At g 7^{F/F}(コントロール)(パネル(d))およびAt g 7/Nr f 2欠損(At g 7-/Nr f 2-)(パネル(e)-(h))肝臓の電子顕微鏡写真である。パネル(e)および(g)中の四角で囲んだ領域は拡大され、それぞれパネル(f)および(h)として示されている。コントロールの肝臓で容易に検出されるグリコーゲン領域(アスタリスク)は、大量の平滑ERで占められ、多数のペルオキシソーム(そのいくつかはパネル(f)およびパネル(g)中、矢印で示されている)が周囲領域に蓄積していることに注意。パネル(g)および(h)はAt g 7/Nr f 2欠損肝臓において観察される典型的な封入体を示す。バー : (d)および(e), 5 μm ; (f)および(g), 1 μm ; (h), 0.2 μm。

【図13】(a) p I p C注入後28日目における異なる遺伝子型のマウス肝臓の重量の測定結果を表す図である。データは、各グループについて5匹のマウスの平均値±SDを表す。***P<0.001(Student's Tテスト)。(b)図に示された遺伝子型のマウスの典型的な肝組織学を示す。p I p C注入後28日目の肝臓を、H&E染色で処理した。高次の拡大写真は、下側のパネルに示されている。C Vは中心静脈、Pは門脈である。バー : 100 μm。

【図14】図13で使用したマウスの肝機能テストの結果を示す図である。

【図15】ヒト肝細胞癌の二重免疫蛍光顕微鏡画像を示す図である。典型的な封入体を含む肝細胞癌の3つの症例(組織学的段階を示した)について、抗Keap1抗体および抗p62抗体で免疫染色した。Keap1(グリーン)およびp62(レッド)の画像を重ね合わせたものを右側のパネルに示した。バーは10 μmである。

【図16】Nr f 2の標的プロモーターであるAREにLuciferase遺伝子を繋げたプラスミドを安定に保持する細胞株にアデノウイルス感染系を用いてp62-WT、p62-T352A(Keap1と結合できない変異体)、Keap1、GFP(コントロール)を過剰発現させて、ルシフェラーゼ活性を測定したアッセイの結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 17】オートファジー欠損マウスの長期飼育により形成された腫瘍における Keap1 の不溶化および Nrf2 の活性化は、p62 依存的であることを示す図である。(A) は Ap^g7^{f/f} マウス (コントロール) および Ap^g7^{f/f}; Alb-Cre マウス (肝特異的オートファジー欠損マウス) の各月齢における肝臓の写真を示す。(B) は各 12 月齢マウスの肝臓から調節した抽出液の免疫ブロッティングの結果を示す図である。(C) は各 12 月齢マウスの肝臓から調整した RNA を用いた定量的 PCR の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

1. p62 と Keap1 との相互作用を阻害または抑制する物質

10

本発明は、1つの実施形態において、p62 と Keap1 との相互作用を阻害または抑制する物質 (agent) を提供する。p62 と Keap1 との相互作用を阻害又は抑制する物質は、肝疾患治療薬および抗がん剤として適用できる可能性がある。

「p62 と Keap1 との相互作用を阻害又は抑制する物質」としては、

例えば

(1) p62 の立体構造中の、Keap1 との結合部位に対して特異的に結合する物質

(2) p62 の立体構造中の、Keap1 との結合部位の近傍に結合することにより、前記相互作用を阻害または抑制する物質、

(3) p62 と結合して、p62 の立体構造を変化させる物質、

20

(4) p62 の発現を阻害することにより、相互作用を阻害又は抑制する物質、

(5) p62 をオートファジーで分解することにより、相互作用を阻害又は抑制する物質、等が含まれる。

典型的には、「p62 と Keap1 との相互作用を阻害又は抑制する物質」としては、

i) p62 に特異的に結合する分子、または

ii) p62 の発現阻害物質

が含まれる。

「p62」は、ユビキチン結合タンパク質として知られている。p62 のアミノ酸配列またはそれをコードするヌクレオチド配列の情報は、一般に利用可能な配列データベースから入手することができる。それらのデータベースのアクセッション番号のいくつかをここに記載する。[データベース名称:アクセッション番号(種名)]:NCBI:NP_003891.1(ヒト)、NCBI:NM_003900.4(ヒト)、NCBI:NP_035148.1(マウス)、NCBI:NM_011018.2(マウス)Swiss-Prot:008623.1(ラット)、NCBI:NP_787037.2(ラット)、NCBI:NM_175843.3(ラット)、Swiss-Prot:Q5RBA5.1(オランウータン)。本明細書中で「p62」という場合、ヒト p62 に限定されず、p62 の他の種 (例えば、他の哺乳動物種 (例えば、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラットなど)、は虫類、両生類、魚類など。) のホモログも含まれるものとする。そのようなホモログのアミノ酸配列は、例えば、ヒト p62 のアミノ酸配列 (配列番号 1) もしくはマウス p62 のアミノ酸配列 (配列番号 3) に対して、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、もしくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはヒト p62 のアミノ酸配列 (配列番号 1) もしくはマウス p62 のアミノ酸配列 (配列番号 3) において1~数個 (例:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、もしくはそれ以上) のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる。

30

40

「Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)」は、NF-E2 関連因子 2 (NF-E2-related factor 2 (Nrf2)) とレドックス感受性な様式で相互作用し、細胞質でこのタンパク質が乖離すると Nrf2 は核へ移行することが知られている。この相互作用は、γ グルタミルシステインシンセターゼの触媒サブユニットの発現を制御することが知られている。Keap

50

1のアミノ酸配列またはそれをコードするヌクレオチド配列の情報は、一般に利用可能な配列データベースから入手することができる。それらのデータベースにおけるアクセッション番号のいくつかをここに記載する。〔データベース名称：アクセッション番号（種名）〕：Swiss-Prot：Q14145.2（ヒト）、Swiss-Prot：Q9Z2X8.1（マウス）、GenBank：BAA34639.1（マウス）、GenBank：AB020063.1（マウス）、Swiss-Prot：Q684M4.1（ブタ）。本明細書中で「Keap1」という場合、ヒトKeap1に限定されず、keap1の他の種（例えば、他の哺乳動物種（例：サル、ウシ、ブタ、マウス、ラットなど）、は虫類、両生類、魚類など。）のホモログも含まれるものとする。そのようなホモログのアミノ酸配列は、例えば、ヒトKeap1のアミノ酸配列に対して、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、もしくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはヒトKeap1のアミノ酸配列において1～数個（例：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、もしくはそれ以上）のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、もしくは付加を有するアミノ酸配列からなる。

本明細書中、「p62に特異的に結合する」分子とは、その分子が他のアミノ酸配列に対するその親和性よりも、p62またはその断片の特定のアミノ酸配列に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、所望の測定装置によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味し、典型的には、結合定数（ K_a ）が少なくとも 10^7 M^{-1} 、好ましくは、少なくとも 10^8 M^{-1} 、より好ましくは、 10^9 M^{-1} 、さらに好ましくは、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、 10^{12} M^{-1} またはそれより高い、例えば、最高で 10^{13} M^{-1} またはそれより高いものであるような結合親和性を意味する。

「p62に特異的に結合する分子」の例には、下記のi)およびii)が含まれる。

i) p62のKeap1相互作用領域（Keap1 Interacting Region）〔SKEVDPS TGE LQSLQ（配列番号：5）〕、配列番号5のアミノ酸配列に対して、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、もしくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列中に1～数個（例：1、2、3個、もしくはそれ以上）のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、もしくは付加を有するアミノ酸配列〕に特異的に結合する物質、

ii) マウスp62のアミノ酸配列（配列番号：3）中の349位のアスパラギン酸、350位のプロリン、352位のスレオニン、353位のグリシン、もしくは354位のグルタミン酸に特異的に結合する物質。

本明細書中、「Keap1相互作用領域（Keap1 Interacting Region：KIP）」とは、マウスp62のアミノ酸配列中の345位～359位のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列の領域、またはマウス以外の哺乳動物種（例：ヒト、サル、ウシ、ラット等）もしくはその他の種（例：は虫類、両生類、魚類等）のp62のアミノ酸配列中の上記部分アミノ酸配列の領域に対応する高度に保存されたアミノ酸配列の領域であって、Keap1と特異的に結合するp62上の領域を指すものとする（図2bを参照）。

p62はKeap1と相互作用し、p62の過剰状態の際は、Keap1と結合したp62が増加し、p62-Keap1複合体は不溶化状態となっている。Keap1は通常p62と同じ領域でNrf2と結合しており、Nrf2をユビキチン-プロテアソーム分解経路へと誘導する。しかしp62が高発現すると、p62とKeap1が結合・不溶化することでフリーのNrf2量が増大する。蓄積したNrf2は核内に移行し、下流因子の発現が誘導され、p62・ユビキチン陽性封入体が形成される。過剰な封入体形成は肝細胞がん、肝障害などの肝疾患を引き起こす。

したがって、上記阻害または抑制剤は、典型的には、i) ユビキチン陽性封入体形成の阻害又は抑制剤、ii) 肝疾患の治療剤、またはiii) 抗がん剤として使用され得る。

細胞内の p 6 2 の量は、L C 3 との相互作用に対してオートファジーで規定されているので、この結合を増強させる物質の投与は細胞内での p 6 2 の量を減少させ、肝細胞がんや肝障害を抑える。

したがって、本発明のさらなる実施形態では、上記「p 6 2 に特異的に結合する分子」が L C 3 である。

また、さらに別の実施形態では、上記「p 6 2 に特異的に結合する分子」は、p 6 2 に特異的に結合する抗体（抗 p 6 2 抗体）である。

本明細書中、「p 6 2 の発現阻害物質」とは、p 6 2 遺伝子の mRNA への転写および／または p 6 2 遺伝子（mRNA）のタンパク質への翻訳を阻害する物質のことを指す。

「p 6 2 の発現阻害物質」の例には、下記の i i i) および i v) が含まれる。

i i i) 前記 p 6 2 の発現阻害物質が、p 6 2 をコードするヌクレオチド配列に対するアンチセンス核酸もしくは siRNA、

i v) p 6 2 遺伝子の転写産物（mRNA）を特異的に切断するリボザイム活性を有する核酸。

本明細書中、「核酸」とはRNAまたはDNAを意味する。ここでいう「核酸」は、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであって良い。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた、糖部分が修飾されていて良く、例えば、1 個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されているか、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明の肝疾患の治療剤またはがん治療剤においては、p 6 2 遺伝子の発現をRNAi 効果により阻害する作用を有する核酸を有効成分として用いることができる。RNAi とは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも阻害される現象のことをいう。ここで用いられるRNAとしては、例えば、19～30 塩基長のRNA干渉を生ずる二重鎖RNA、例えば、dsRNA（double strand RNA）、siRNA（small interfering RNA）又はshRNA（short hairpin RNA）が挙げられる。このようなRNAは、リボソームなどの送達システムにより所望の部位に局所送達させることも可能であり、また上記二重鎖RNAが生成されるようなベクターを用いてこれを局所発現させることができる。このような二重鎖RNA（dsRNA、siRNAまたはshRNA）の調製方法、使用方法などは、多くの文献から公知である（特表2002-516062号；米国公開許第2002/086356A号；Nature Genetics, 24(2), Feb., 180-183；Genesis, 26(4), April, 240-244；Nature, Spec. 21, 407:6802, 319-20；Genes & Dev., Vol. 16, (8), Apr. 16, 948-958；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(8), 16 Apr., 5515-5520；Science, 296(5567), 19 Apr., 550-553；Proc Natl. Acad. Sci. USA, Apr. 30, 99:9, 6047-6052；Nature Biotechnology, Vol. 20(5), May, 497-500；Nature Biotechnology, Vol. 20(5), May, 500-508；Nucleic Acids Res., May 15など）。

本発明で用いられるRNAi 効果を奏する二重鎖RNAの長さは、通常、19～30 塩基、好ましくは20～27 塩基、より好ましくは21～25 塩基、最も好ましくは21～23 塩基である。

本明細書中、「アンチセンス核酸」、または「アンチセンスポリヌクレオチド」とは、ある対象となるDNA領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドを有し、そのポリヌクレオチドが当該領域の少なくとも一部とハイブリダイズすることができる核酸のこ

とをいう。本発明のアンチセンス核酸またはアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。それらは二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであってもよい。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、さらにはポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性を有するものなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで、所望の動物へ形質転換できる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される動物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。

遺伝子の翻訳阻害に効果的なアンチセンス核酸は、標的遺伝子の転写産物に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相補性を有する。

アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは少なくとも約10塩基以上（例えば、10～40個程度）、好ましくは約15塩基以上であり、より好ましくは約100塩基以上であり、さらに好ましくは約500塩基以上である。アンチセンス核酸は公知の文献を参照して設計することができる（例えば、平島および井上、新生化学実験講座2核酸IV遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993、p. 319-347）、J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, p. 247, 1992; Vol. 8, p. 395, 1992; S. T. Crooke et al., ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993など参照）。

本明細書中、「リボザイム活性」とは、ターゲットとする遺伝子の転写産物であるmRNAを部位特異的に切断する核酸のことをいう。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（タンパク質核酸酵素、1990、35、p. 2191）。ハンマーヘッド型リボザイムについては、例えば、FEBS Lett, 1988, 228, p. 228; FEBS Lett, 1988, 239, p. 285; タンパク質核酸酵素、1990、35、p. 2191; Nucleic Acids Res, 1989, 17, p. 7059などを参照することができる。また、ヘアピン型リボザイムについては、例えば、Nature, 1986, 323, p. 349; Nucleic Acids Res, 1991, 19, . 6751; 菊池洋、化学と生物、1992、30、p. 112などを参照することができる。このようなりボザイムを用いてp62遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

これらの物質によりp62の発現が抑制された場合、Keap1とNrf2の結合が回復し、Nrf2が不活性化することで、肝細胞がんや肝障害を抑えることができる。

したがって、本発明のさらなる実施形態では、p62とKeap1との相互作用を阻害または抑制する物質を、それを必要とする患者に投与する工程を包含する、肝疾患および／またはがんの治療方法が提供される。

2. p62とKeap1との相互作用を阻害または抑制する物質を含有する剤

本発明のさらなる（further）実施形態では、Keap1とp62との結合の阻害または抑制剤が提供される。この剤（composition）は、典型的には、上記のp62とKeap1との相互作用を阻害又は抑制する物質を含有する。具体的には、この剤は、

i) p62に特異的に結合する分子、または

ii) p62の発現阻害物質

を含有する。

10

20

30

40

50

本発明の上記剤は、肝疾患またはがんの治療用製剤として使用され得る。このような製剤 (pharmaceutical composition) は、上記の p 6 2 と K e a p 1 との相互作用を阻害又は抑制する物質を、慣用されている製剤担体とを混合することにより製造することができる。

製剤担体は、投与形態に応じて、適宜、組み合わせて用いられよく、例えば、乳糖等の賦形剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の結合剤；マクロゴール等の界面活性剤；炭酸水素ナトリウム等の発泡剤；シクロデキストリン等の溶解補助剤；クエン酸等の酸味剤；エドト酸ナトリウム等の安定化剤；リン酸塩等の pH 調整剤などが挙げられる。

それを必要とする患者に投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤および、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤、点眼剤、吸入剤等として用いることもできる。

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。また錠剤には舌下錠、口腔内貼付錠、口腔内速崩壊錠などが含まれる。

このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質はそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また 2 以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

経口投与のための内服用液剤は、薬剂的に許容される水剤、懸濁剤・乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

非経口投与のための外用剤の剤形には、例えば、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、湿布剤、貼付剤、リニメント剤、噴霧剤、吸入剤、スプレー剤、点眼剤、および点鼻剤等が含まれる。これらはひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、公知の方法または通常使用されている処方により製造、調製される。

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート 8 0（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造、調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

3. 本発明のスクリーニング方法

本発明は、さらに別の実施形態において、K e a p 1 と p 6 2 との相互作用を阻害または抑制する物質 (agent) のスクリーニング方法を提供する。この方法は、典型的には、

i) 試験物質の存在下および非存在下で K e a p 1 と p 6 2 との結合量を測定する工程、および

i i) 前記試験物質の存在下と非存在下との間で K e a p 1 と p 6 2 との前記結合量を

比較し、前記試験物質の存在下での前記結合量が前記試験物質の非存在下での前記結合量よりも低い場合に、当該試験物質をK e a p 1とp 6 2との相互作用を阻害または抑制する物質として選択する工程、を包含する。

p 6 2とK e a p 1の相互作用を阻害又は抑制する物質は、肝疾患治療薬および抗がん剤に適用し得る。p 6 2とK e a p 1のタンパク質間相互作用を阻害又は抑制する物質を探索することにより、肝疾患の治療のための新規薬剤をスクリーニングすることができる。

相互作用の検出は、プルダウン法（例：図3）、質量分析計を用いた方法、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出する方法、蛍光標識を用いたイメージング等の方法により行うことができる。

本発明のスクリーニング方法のより具体的な実施形態では、「試験物質の存在下および非存在下でK e a p 1とp 6 2との結合量を測定する工程」が、p 6 2のK I R配列（例：S K E V D P S T G E L Q S L Q（配列番号：5）、配列番号5のアミノ酸配列に対して、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、もしくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列中に1～数個（例：1、2、3個、もしくはそれ以上）のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、もしくは付加を有するアミノ酸配列）に対するK e a p 1の結合量を測定することを含む。

本発明のスクリーニング方法のより具体的な実施形態では、「K e a p 1とp 6 2との相互作用を阻害または抑制する物質」が、マウスp 6 2のアミノ酸配列（配列番号：3）中の349位のアスパラギン酸、350位のプロリン、352位のスレオニン、353位のグリシン、または354位のグルタミン酸に特異的に結合する。

本発明のスクリーニング方法のより具体的な実施形態では、さらに、

i i i) K e a p 1とp 6 2との相互作用を阻害または抑制する物質を肝疾患モデル動物に投与して、N r f 2の活性を測定する工程、および

i v) N r f 2の活性が減少した場合に、上記物質を肝疾患の治療剤候補として選択する工程を包含する。

このような本発明のスクリーニング方法により得られる物質の例としては、L C 3、抗p 6 2抗体などが挙げられるが、これらに限定されず、低分子化合物（天然または合成）、タンパク質またはペプチド、多糖、脂質、核酸などが含まれ得る。

p 6 2とK e a p 1の相互作用を阻害又は抑制する物質、あるいは細胞内のp 6 2の量を減少させる物質は肝疾患治療薬および抗がん剤に適用し得る。これらの物質はK e a p 1と結合するp 6 2の量を低下させ、K e a p 1とN r f 2との結合を増大させることでN r f 2を不活性化（分解）させる。p 6 2とK e a p 1の相互作用を阻害又は抑制する物質、あるいは細胞内のp 6 2の量を減少させる物質を肝疾患モデル動物（例：マウス）に投与して、N r f 2の活性を測定することで、新規薬剤を見出し得る。

K e a p 1とp 6 2との相互作用の検出は、培養細胞（H u h - 1, J H H 5, H e p a - 1, H E K 2 9 3 Tなど）へN r f 2転写活性レポーターA R E (a n t i o x i d a n t - r e s p o n s i v e e l e m e n t) をルシフェラーゼ遺伝子につなげたプラスミドを一過的に導入した、あるいは安定に保持する細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイ（図6および図16を参照）によって、N r f 2転写活性レポーターとβ-ラクタマーゼ遺伝子を繋げたA R E - b l aを組み込んだ培養細胞によるβ-ラクタマーゼと蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）を用いたN r f 2転写活性レポーターアッセイによって、p 6 2を過剰発現させた肝細胞を用いて、N r f 2の下流因子の発現をr e a l t i m e P C Rによって、免疫ブロット（I m m u n o b l o t（以下I . B .））によって、またはR T - P C R等によって確認することができる。

本発明のスクリーニング方法のより具体的な実施形態では、試験物質の存在下および非存在下でK e a p 1とp 6 2との結合量の測定は、プルダウン法、質量分析法、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出する方法、または蛍光標識を用いたイメージングのいずれかを用いて行われる。

10

20

30

40

50

p 6 2 と K e a p 1 の相互作用を阻害又は抑制する物質、あるいは細胞内の p 6 2 の量を減少させる物質は肝疾患治療薬および抗がん剤に適用できる可能性がある。これらの物質は、マウスのオートファジーを欠失させた肝臓における細胞内のユビキチン陽性封入体の量を減少させる。K e a p 1 の相互作用を阻害又は抑制する物質、あるいは細胞内の p 6 2 の量を減少させる物質をマウスに投与して、ユビキチン陽性封入体の量、N r f 2 の活性、肝障害のレベルを測定することで新規薬剤候補をスクリーニングすることができる。

ユビキチン陽性封入体の検出は、マウス肝臓組織の免疫染色を行うことができる（図 9）。

N r f 2 の活性測定は、N r f 2 の下流因子である解毒酵素遺伝子群の発現を r e a l t i m e P C R により確認することができる（図 8）。

肝障害のレベル測定は、肝臓の重量測定（図 1 3 a）、肝臓組織の H E 染色による肝細胞肥大と小葉構造の崩壊検出（図 1 3 b）、肝機能テスト（A S T, A L T, A L P）（図 1 4）によって行うことができる。

本発明のスクリーニング方法により得られた物質は、i）ユビキチン陽性封入体形成の阻害又は抑制剤、i i）肝疾患の治療剤、または i i i）抗がん剤として使用され得る。

4. 肝疾患の診断方法、診断剤、及び診断用キット

本発明は、さらなる実施形態において、肝疾患の診断方法を提供する。特に、上記の本発明の肝疾患の治療剤の適用患者を判定または診断する方法を提供する。この方法は、典型的には、

i）被験者の肝生検による p 6 2 もしくは N r f 2 の発現量を測定する工程、または

i i）被験者の肝生検による N r f 2 の活性を測定する工程、を含む。

肝疾患の被験者の肝生検による p 6 2 の発現量が正常者と比較して過剰であることが判明すれば、該被験者の肝疾患が p 6 2 の過剰発現に起因している可能性が高い。そのような場合、上記の本発明の肝疾患の治療剤を、p 6 2 と K e a p 1 との相互作用を阻害もしくは抑制し、または p 6 2 の発現を阻害するために該疾患の治療を必要とする患者に適用することで有利な効果が得られると考えられる。したがって、このような治療の適用患者を判定または診断することは有用である。

また、肝疾患の被験者の肝生検による N r f 2 の活性が正常者と比較して高いことが判明すれば、該被験者の肝疾患が N r f 2 の異常活性化に起因している可能性が高い。そのような場合、上記の本発明の肝疾患の治療剤を該疾患の治療を必要とする患者に適用すれば、p 6 2 と K e a p 1 との相互作用を阻害もしくは抑制し、または p 6 2 の発現を阻害することによって、N r f 2 と K e a p 1 との相互作用と競合する p 6 2 の量を減少させることができるため、遊離の N r f 2 の量が減少し、N r f 2 の活性化が抑制される。そのため、本発明の肝疾患の治療剤を該疾患の治療を必要とする患者に適用することで有利な効果が得られると考えられる。したがって、このような治療の適用患者を判定または診断することは有用である。

被験者の肝生検による p 6 2 の発現量の測定は、蛍光標識によるイメージング、免疫プロット法、質量分析法等の当業者に周知の方法によって行うことができる。

被験者の肝生検による N r f 2 の活性の測定は、N r f 2 の標的プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ、免疫プロットによる細胞核内の N r f 2 量測定、N r f 2 によって転写誘導される酵素（N q o 1 や G s t m など）の、定量的 P C R、免疫プロットや蛍光イメージングによる発現解析および酵素活性測定等の当業者に周知の方法によって行うことができる。

本発明の肝疾患の治療剤の適用患者を判定する方法のさらなる実施形態では、N r f 2 の活性測定、および／またはユビキチン陽性封入体の検出を行うことを含む。

本発明の肝疾患の治療剤の適用患者を判定する方法のさらなる実施形態では、被験者の血液中の A S T, A L T, A L P, および／または γ -G T P の濃度を測定することを含む。なお、 γ -G T P（ γ グルタミルトランスペプチダーゼ）は、肝臓の解毒作用に関係

10

20

30

40

50

する酵素であり、肝臓や胆管の細胞が壊れると血液中に γ -GTP が血液の中に流れ出てくることから、「逸脱酵素」といわれ、肝臓や胆管の細胞が壊れたことの指標として一般に利用されている。

本発明のさらなる実施形態では、本発明の診断方法に用いられる診断用キットまたは診断剤が提供される。これらの診断用キットまたは診断剤は、典型的には、抗 p62 抗体または抗 Nrf2 抗体を含む。さらに、これらの診断用キットまたは診断剤は、抗体を標識するための標識剤（例えば、蛍光標識）または蛍光標識された抗体を含んでいてもよい。診断用キットはさらに、使用説明書を含んでいてもよい。使用説明書には、キットに含まれる抗体、標識剤等の使用方法、免疫プロットティングを含む実験の手順等が記載されていてもよい。

なお、本明細書中に現れるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と配列番号との関係は以下のとおりである

〔配列番号 1〕

この配列は、ヒト p62 のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号 2〕

この配列は、ヒト p62 のアミノ酸配列（配列番号 1）をコードするヌクレオチド配列を表す。

〔配列番号 3〕

この配列は、マウス p62 のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号 4〕

この配列は、マウス p62 のアミノ酸配列（配列番号 3）をコードするヌクレオチド配列を表す。

〔配列番号 5〕

この配列は、マウス p62 のアミノ酸配列（配列番号 3）の第 345 位～第 359 位までの連続するアミノ酸残基からなる部分配列（KIR 配列）を表す。

以下、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されないことはいうまでもない。

【実施例】

【0009】

〔実施例 1〕

実施例 1 では、p62 と Keap1 の相互作用および p62 に結合する Keap1 の領域を調べた。

Flag-tag を N 末に繋げたマウス Keap1 と Keap1 の各変異タンパク質を発現させた HeK293T 細胞を、lysis buffer により溶解し、細胞抽出液を得た。次に抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、Flag-tag を付加した Keap1 あるいはその deletion mutant、およびその相互作用複合体を回収した。回収したタンパク質複合体と細胞抽出液を SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）によりゲル内に展開し、抗 Flag 抗体、抗 p62 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 actin 抗体の各抗体を用いて、免疫プロットティング（I. B.）を行った。

結果を図 1 に示す。図 1 は Keap1 の機能ドメイン領域および FLAG-tag をつけた Keap1 およびその各 mutant の名称および模式図、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った場合における I. B. の写真、および細胞抽出液を用いた I. B. の写真である。

模式図最上部には Keap1 のドメイン領域とその名称を示している。NTR（N-terminal region）、BTB（Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-brac）、IVR（intervening region）、DSG（the double glycine repeat）and CTR（the C-terminal region）。FLAG-tag を付加したタンパクの模式図とその左に名称を記す。抗 FLAG 抗体の免疫沈降による I. B. の写真を IP: FLAG で示す。また細胞抽出液による I. B. の写

10

20

30

40

50

真をCrudeで表し、これは各細胞でのKeap1, p62, actin (loading control) の発現の確認を行う。I. B. の写真の左横には使用した抗体を示す。

図1に示すように、Flag-Keap1を発現させた細胞で免疫沈降を行った場合(レーン2)、内在性p62が検出されたことから、keap1とp62は複合体を形成することが分かった。Keap1の各mutantを発現させた細胞で免疫沈降を行った場合(レーン3-9)では、レーン9でp62が検出され、レーン6とレーン8では検出されないことから、p62と複合体を形成する為に必要なKeap1の部位はDC領域(DGR+CTR)であることが分かった。

[実施例2]

実施例2では、p62とKeap1の直接の相互作用と、Keap1に結合するp62の領域を調べた。

まず、大腸菌に実施例1で示したp62と結合する領域Keap1-DCとのGST (Glutathione S-transferase) 融合タンパク質、GSTタグのついたマウスKeap1-DC (GST-Keap1-DC) とマウスp62あるいは各p62 mutantのMBP (Maltose Binding Protein) 融合タンパク質を産生させ、glutathione-Sepharose 4B resinとamylose resinをそれぞれ用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。これらの精製タンパク質をTNE buffer中で混和させ、amylose resinで沈殿させる。Amylose resin結合タンパク質を氷冷TNEで5回washし、SDS-PAGEとCBB (Coomassie brilliant blue) 染色を行った。

結果を図2に示す。図2はp62の機能ドメイン領域およびMBP-tagをつけたマウスp62とその各mutantの名称および模式図、SDS-PAGE、CBB染色後の写真である。

模式図最上部にはp62のドメイン領域とその名称を示している。PB1 (Phox and Bemlp), Zinc (Zinc finger), LRS (LC3-recognition sequence) and UBA (ubiquitin-associated domain)。MBP-tagを付加したタンパクの模式図とその左に名称を記す。MBP immobilized AM resinは各タンパク質の発現を表し、MBP-Pull down assayでは各p62-MBP融合タンパクへのGST-Keap1-DCの結合を示す。

図2aに示すように、MBP immobilized AM resinの図で各タンパク質の精製が全て確認された中で、MBP-Pull down assayを行うと、p62とKeap1の結合が確認されたことから、p62とKeap1は直接結合することが示された。またレーン5, 6, 7, 8, 11, 12, 14 (14については図3を参照) でp62の結合が確認されたことから、Keap1へのp62の結合領域は345-359アミノ酸の領域であることが分かった。また、この領域は、図2bに示すように種間で高度に保存されており、このアミノ酸配列の領域をKIR (Keap1 interacting region) (Keap1相互作用領域) 配列と名づけた。

[実施例3]

実施例3では、Keap1の結合に重要なp62-KIR配列中のアミノ酸を調べた。

MBP-p62M80の-KIR配列の各アミノ酸をそれぞれアラニンに置換したタンパク質と、GST-Keap1-DCを用いて実施例2と同様のプルダウンアッセイを行った。

結果を図3に示す。図の左上には各サンプル番号に対するアミノ酸の置換部位を示し、下部ではSDS-PAGE, CBB染色後のゲルの写真、写真の右側にはバンドが示すタンパク質の名称を示す。

レーン6, 7, 9, 10, 11でGST-Keap1-DCのバンドがほとんど見られず、結合が劇的に低下していることから、p62とKeap1との結合にはp62のD3

10

20

30

40

50

49, P350, T352, G353, E354の5アミノ酸が重要であることが分かった。

[実施例4]

実施例4では、p62とNrf2はKeap1の同じポケットで結合していることを調べた。

タンパク質結晶化立体構造解析により、Keap1-DCのp62あるいはNrf2との結合に重要なアミノ酸を予想した。これらのアミノ酸をそれぞれアラニンに置き換えたKeap1-DC mutantおよびKeap1-DCタンパク質にFLAGタグを付けHek293T細胞に発現させた。これらの細胞をlysis bufferにより溶解し、細胞抽出液を得た。次に実施例1と同様に免疫沈降およびI. B.を行った。

結果を図4に示す。図4の左には、各サンプル番号とその番号に対するアミノ酸置換部位を示す。抗FLAG抗体の免疫沈降によるI. B.の写真をIP:FLAGで示す。また細胞抽出液によるI. B.の写真をCrudeで表し、これは各細胞でのKeap1, p62, actin (loading control)の発現の確認を示す。I. B.の写真の右横には使用した抗体を示す。

図4で示すように、R483A (レーン8)以外のKeap1-DC mutantにおいてp62との結合が劇的に低下しており、またR483Aを含めた全てのmutantにおいてNrf2との結合も劇的に低下していることから、p62とNrf2は、Keap1の同じポケットを使用して拮抗的に結合していることが示された。

[実施例5]

実施例5では、Keap1-Nrf2の結合をp62が拮抗的に阻害することを示す。

Flag-tagをN末に繋げたp62とp62-T352Aを発現させたHek293T細胞を、lysis bufferにより溶解し、細胞抽出液を得た。次に抗Nrf2抗体を用いて免疫沈降を行い、Nrf2およびその相互作用複合体を回収した。次にSDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)により、回収したタンパク質複合体と細胞抽出液をゲル内に展開し、抗ubiquitin抗体、抗Nrf2抗体、抗p62抗体、抗actin抗体の各抗体を用いて、I. B.を行った。

結果を図5に示す。抗Nrf2抗体を用いて免疫沈降を行った場合におけるI. B.の写真をIP:Nrf2で示す。また細胞抽出液を用いたI. B.の写真をCrudeで示す。写真上部にはFLAG-p62あるいはFLAG-p62-T352Aの過剰発現、Lactacystin (プロテアソーム阻害剤)の存在の有無を+で示す。また図の左右に、I. B.に使用した抗体名、検出されたタンパク名を示す。

p62を過剰発現させていない細胞のNrf2免疫沈降 (IP:Nrf2のレーン1)では、ユビキチン化されたNrf2, Nrf2そのものの検出レベルが低い、プロテアソーム阻害剤を加える (レーン2)と顕著に高くなる。通常Nrf2はkeap1と結合しユビキチン化されプロテアソームにより分解されていることから説明できる。この状態でp62を過剰発現させると、Nrf2タンパク量が顕著に上昇した。一方、ユビキチン化されたNrf2が低下した (IP:Nrf2のレーン3、4)。これはp62がKeap1と結合することにより、Nrf2とKeap1の結合が低下し、Nrf2がユビキチン化および分解されないことから、Nrf2が増加することを示す。またKeap1と結合能が顕著に低下しているp62-T352Aを入れると (IP:Nrf2のレーン5、6) p62を発現させない時と同様の状態 (IP:Nrf2のレーン1、2)を示すことから、Keap1とNrf2の結合をp62が拮抗的に阻害していることを示す。

[実施例6]

実施例6では、Keap1とp62の結合がNrf2下流因子の発現活性を増大させることを示す。

Nrf2, Keap1, そしてp62 wild-typeあるいはp62 mutantsを発現するプラスミドをpNQO1-ARE reporter plasmidとpRL-TK (リポフェクションの内部コントロール)と共にマウス肝細胞癌由来のHepa1細胞に導入して、36時間後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図6に示す。Nr f 2, Ke ap 1, p 6 2-WT, p 6 2-mut ant s 導入の有無を＋で示し、発現ベクターを導入していない(カラム1)をスタンダードとして相対的なルシフェラーゼの活性を示す。

Nr f 2を過剰発現させると(カラム2)、活性が大幅に上昇し、Nr f 2とKe ap 1の2重トランスフェクション(カラム3)ではNr f 2がKe ap 1に捕まえられプロテアソームにより分解される為カラム1と同程度まで活性が低下した。Nr f 2, Ke ap 1, p 6 2-WTの3重トランスフェクションでは、p 6 2がKe ap 1と結合することでフリーのNr f 2が増加する為、ルシフェラーゼ活性が上昇したが、Nr f 2, Ke ap 1, p 6 2-mut ant の3重トランスフェクション(カラム5-10)では、p 6 2はKe ap 1と結合できない為、活性はカラム4と変わらなかった。またp 6 2-WT 10
T単独のトランスフェクションでも活性の上昇が見られ、p 6 2-mut ant では見られないことから、内在性のKe ap 1に結合することで内在性Nr f 2が活性化したものと考えられる。以上の結果より、p 6 2の過剰発現によりKe ap 1と結合するp 6 2が増加し、Nr f 2の活性が上昇することを示唆している。

また、カラム4とカラム5-10でルシフェラーゼ活性に大きな差が見られることから、カラム4での高活性状態において、p 6 2とKe ap 1の阻害剤を加えると確実に活性が低下すると予想される。また他の肝臓がん由来細胞等では、もともとp 6 2の発現量が高くNr f 2の転写活性も高い細胞も存在することから、これらの細胞にpNQO1-ARE reporter plasmidを安定に持たせた安定株を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行うことで、p 6 2とke ap 1の結合をモニターでき、また阻害剤が探 20
索可能となることが示唆された。

[実施例7]

実施例7では、肝臓特異的にオートファジーを欠損させたマウスにおいて、p 6 2と共にKe ap 1が蓄積・不溶化し、Ke ap 1の不溶化はp 6 2に依存していることを示す。

結果を図7に示す。F/F:Mx1はAtg7遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスで、マウスの腹腔内にピペラシリン(PIPC)を投与すると肝臓特異的にAtg7遺伝子が欠損し、オートファジーが機能しなくなるマウスである。またp 6 2-/-はp 6 2が欠損したマウスで、F/F:Mx1:p 6 2-/-はp 6 2が欠損したF/F:Mx1マウス、F/FはWTマウスを指す。図7aでは、PIPCを投与後、肝臓をスク 30
ロースバッファー(0.25M sucrose, 10mM HEPES pH7.4, 1mM DTT)に回収し、ホモジナイズする。破碎液を0.5% Triton X-100可溶性と不溶性に分画する。各分画をSDS-PAGEで展開し、抗p 6 2抗体、抗Ke ap 1抗体、抗LC3抗体、抗Nqo1抗体、および抗actin抗体(load ing control)で免疫プロットを行う。

図の左側には使用した抗体の種類、上部には投与後の日数、あるいはマウスの遺伝子型を示す。図の下部に示した、Totalは全細胞抽出液、Sol.は可溶性分画、Insol.は不溶性分画を示す。PIPC投与によりオートファジーが欠損されてから8-12時間後には、p 6 2が過剰に発現されるようになるが、Ke ap 1の発現はほとんど変 40
化しない。またp 6 2の過剰発現に伴い不溶性のp 6 2が蓄積し、同時に不溶性Ke ap 1も蓄積する。また各遺伝子型マウスのPIPC投与後12時間では、F/F:Mx1ではp 6 2の過剰発現、および不溶性のp 6 2とKe ap 1の増加がみられるが、F/F:Mx1:p 6 2-/-では見られない(図7b)。これらの結果からオートファジーが欠損したマウスの肝臓においてp 6 2の過剰発現、および不溶性のp 6 2, Ke ap 1の蓄積がみられる。また不溶性ke ap 1の蓄積はp 6 2依存的であることが示された。

[実施例8]

実施例8では、実施例7で用いた遺伝子型マウスの肝臓でのNr f 2の下流因子の発現状態をRT-PCRにより調べた。

各遺伝子型マウスにPIPC投与後12時間後のマウス肝臓から、Total RNAを抽出する。Transcript or First Strand cDNA Syn 50

thesis Kit (Roche Applied Science) を使用し、total RNA 1 microg から cDNA を合成し、そして Light Cycler 480 Probes Master in (Roche Applied Science) を使い Light Cycler で定量的 PCR を行った。シグナルは β -glucuronidase (GUS) で標準化を行った。結果を図 8 に示す。

図 8 の上部には、遺伝子名、左部には F/F を 1 とした時の mRNA 量の比率、下部には各遺伝子型を記す。

示されたように、オートファジー欠損マウス ($F/F : Mx1$) では *Nqo1*, *Gstm1* 共に、発現量が劇的に上昇している。このことからオートファジー欠損により *Nrf2* 下流遺伝子の発現が上昇することが示された。一方 *p62* を欠損させたマウス (*p62* および $F/F : Mx1 : p62$) では野生型マウス (F/F) とほとんど変わらないことから、オートファジー欠損による *Nqo1*, *Gstm1* の活性化は *p62* に依存していることが示された。

[実施例 9]

実施例 9 では、*Keap1* は *p62* 依存的に封入体へ隔離されることをマウスの肝細胞で示す。

実施例 7 で示された遺伝子型マウスに PIPC 投与後 28 時間のマウスから得た肝臓を切断し、抗 *p62* 抗体、および抗 *Keap1* 抗体を用いた 2 重免疫染色により *p62* と *Keap1* の細胞内局在を蛍光観察した。結果を図 9 に示す。

図 9 の上段は *p62*、中段は *Keap1*、下段は *p62* と *Keap1* の局在を合わせたもの (Merge) とし、核染色図の左上部にはそれぞれの遺伝子型を記す。 $F/F : Mx1$ 右上部の白四角枠で囲った領域の拡大図を左下に示す。

示されたように、オートファジー欠損マウス ($F/F : Mx$) では白で示した *p62* と *Keap1* は凝集し封入体を形成しており、共局在観察では黄色で示されたように *p62* と *Keap1* の局在がほぼ一致していることから、*p62* と *Keap1* が同じ封入体を形成しているものと考えられる。またオートファジー欠損マウスで *p62* を欠失させると ($F/F : Mx : p62 -/-$)、*p62* と *Keap1* を含む封入体形成が見られなくなることから、*Keap1* 陽性封入体形成は *p62* の発現に依存していることが示された。

これまでの結果より、オートファジー欠損により、過剰発現した *p62* が *Keap1* と結合することで、*Keap1* を不溶化、封入体を形成させ、また *Nrf2* の下流因子の発現が上昇することが分かった。オートファジー欠損させたマウスの肝臓では、*p62* の発現上昇と不溶化に伴い *Keap1* も不溶化し、*Keap1* にトラップされない *Nrf2* が増え、抗酸化タンパク質の発現を増加すると考えられる。

[実施例 10]

実施例 10 では、オートファジー欠損による *Keap1* の不溶化は *Nrf2* に依存していることを示す。

オートファジー欠損により *p62* の発現依存的に *Keap1* が不溶化し、*Nrf2* の下流因子の発現も上昇する。そこでこれまで用いた実施例 7 で示した F/F 、 $F/F : Mx1$ に加えて、*Nrf2* 欠損マウス ($Nrf2 -/-$, $F/F : Mx1 : Nrf2 -/-$) を作成し、実施例 7 と同様の方法で *Keap1* の不溶化の検討を行った。

Nrf2 欠失による *Nrf2* の発現、さらに *Nrf2* 下流遺伝子 (*Nqo1* と *Gstm1*) の発現も同時に確認している。結果を図 10 に示す。

結果が示すように、オートファジー欠損マウス ($F/F : Mx1$) で見られた *p62* の過剰発現および不溶タンパクの蓄積は、*Nrf2* を 2 重で欠損させると劇的に低下した。また *Nrf2* は通常 *Keap1* と結合することで分解されていることから、*p62* の蓄積は *Keap1* を捕らえて不溶化し、*Keap1* - *Nrf2* の pathway の欠如を導いていることが分かった。

[実施例 11]

実施例 11 では、オートファジー欠損による *p62*, *Keap1* 陽性封入体の蓄積は *Nrf2* に依存していることを示す。

実施例 10 の遺伝子型マウスを使用し、実施例 9 と同様の方法で免疫染色を行った。結果を図 11 に示す。

結果が示すように、オートファジー欠損 ($F/F : Mx1$) で見られた *Keap1* 陽性、*p62* 陽性封入体の形成は、*Nrf2* を欠損させると ($F/F : Mx1 : Nrf2-/-$) 劇的に減少した。これは *p62* 陽性 *Keap1* 陽性の封入体形成は *Nrf2* に依存していることを示す。

[実施例 12]

実施例 12 では、オートファジー欠損による *Nrf2* 下流遺伝子の過剰発現は *Nrf2* に依存していることを示す。

実施例 10 の遺伝子型マウスを使用し、実施例 9 と同様の方法で *Nrf2* 下流遺伝子 (*Nqo1*, *Gstm1*, *Cyp2a5*) の RT-PCR 解析を行った。結果を、図 12 に示す。 10

結果が示すように、オートファジー欠損 ($F/F : Mx1$) で見られた *Nrf2* 下流遺伝子 (*Nqo1*, *Gstm1*, *Cyp2a5*) の過剰発現は、*Nrf2* を欠損させると ($F/F : Mx1 : Nrf2-/-$) 劇的に減少した。これはオートファジー欠損による *Nrf2* 下流遺伝子の過剰発現は *Nrf2* に依存していることを示す。

実施例 10、11、12 より、*p62* の異常蓄積による *Keap1* が不溶化は、*p62* 陽性 *Keap1* 陽性封入体を形成し、*Nrf2-Keap1 pathway* を欠如させることが示された。

p62 の過剰発現では *Keap1* と結合する *Nrf2* の割合が減少することで、*Nrf2* が蓄積し、*Nrf2* の下流遺伝子の転写量が増大することが示唆される。 20

[実施例 13]

オートファジー欠損による肝障害は *p62* の異常蓄積による *Nrf2-Keap1 pathway* 欠如の結果であるかどうかを調べる為に、実施例 10 の遺伝子型マウスを使用し、*p1pC* 投与後 28 日のマウス肝臓の重量を測定し、さらに HE 染色により、各遺伝子欠損マウスの肝細胞肥大を測定した。結果を、図 13 a および図 13 b にそれぞれ示す。

オートファジー欠損マウス ($F/F : Mx1$) では肝臓の重量が大きく増加し肝肥大を示すのに対し、オートファジー/*Nrf2* ダブル欠損マウスでは上昇を示さないことから、*p62* の異常蓄積による *Nrf2-Keap1 pathway* 欠如により肝肥大を引き起こすことが分かった。 30

[実施例 14]

実施例 14 では、オートファジー欠損による肝障害は *p62* の異常蓄積による *Nrf2-Keap1 pathway* 欠如の結果であるかどうかを調べる為に、肝障害の指標として、マウス血中 *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT), *alkaline phosphatase* (ALP) の酵素活性を測定した。結果を図 14 に示す。

オートファジー欠損マウス ($F/F : Mx1$) では AST, ALT, ALP 全て野生型マウス (F/F) に比べて劇的な上昇を示すのに対し、オートファジー/*Nrf2* ダブル欠損マウス ($F/F : Mx1 : Nrf2$) では上昇を示さない (野生型と同レベルである) ことから、*p62* の異常蓄積による *Nrf2-Keap1 pathway* 欠如により肝障害を引き起こすことが分かった。 40

[実施例 15]

実施例 15 では、ヒトの肝細胞がん腫において *p62*, *Keap1* 陽性封入体が観察されることを示す。抗 *p62* 抗体と抗 *Keap1* 抗体を使ったヒトの肝細胞がん組織アレイ (BioChain Institute, Inc から購入) の免疫組織化学染色を行った。結果を、図 15 に示す。

ヒト肝細胞がん腫 25 サンプルのうち 6 サンプルについて *p62* 陽性の封入体が確認された。さらに重要なことに *p62* 陽性封入体が見られるサンプルにおいて *Keap1* 陽性封入体も確認された。さらに *p62*, *Keap1* 2 重染色による蛍光顕微鏡では、*p62* 50

2とKeap1の共局在が観察された。これらの結果、ヒトの肝細胞がん腫でもNr f 2－Keap1 pathwayの異常調節が示唆された。

【実施例16】

実施例16では、肝がん由来細胞（Hepa-1）のARE-Luciferase遺伝子を安定に保持するcell lineにおいて、p62蓄積におけるNr f 2活性システムの存在を示すと共に、p62－Keap1結合阻害剤のスクリーニングに使用できることを示す。実験の結果を図16に示す。

Nr f 2の標的プロモーターであるAREにLuciferase遺伝子を繋げたプラスミドを安定に保持する細胞株を作成し、この株にアデノウイルス感染系を用いてp62－WT, p62－T352A（Keap1と結合できないmutant）, Keap1, GFP（control）を過剰発現させて、ルシフェラーゼ活性を測定した。Hepa-1はもともとNr f 2の活性が高いので、Keap1を過剰発現させるとルシフェラーゼ活性が低下することが示された。Keap1の過剰発現状態で、p62－WTあるいはp62－T352Aを過剰発現させると、感染度を高くするとp62－WTではルシフェラーゼ活性が上昇し、p62－T352Aでは上昇を示さなかった。またp62－WT単独の発現ではルシフェラーゼ活性が劇的な上昇を示すが、p62－T352A単独の過剰発現では少し低下することがわかった。これはp62－WTが過剰発現されると、p62と結合するKeap1の割合が多くなりNr f 2が活性化状態になり、またp62－T352Aの過剰発現ではドミナントネガティブ効果により若干活性が低下することを示す。

このデータは、この細胞株でもp62蓄積におけるNr f 2活性システムの存在を示しており、またp62－Keap1の結合阻害剤を加えるとルシフェラーゼ活性低下を示すと予想されることから、p62－Keap1結合阻害剤のスクリーニングに適している。

【実施例17】

実施例17では、オートファジー欠損マウスまたはオートファジー欠損p62ノックアウトマウスの肝臓における、腫瘍やKeap1やNr f 2下流因子の分子状態を示す。結果を図17に示す。

左上図は、4、7、9、12、14、16ヶ月齢のApg7^{f/f}マウス（コントロール）およびApg7^{f/f}；Alb-Creマウス（肝特異的オートファジー欠損マウス）の肝臓の写真である。Apg7^{f/f}；Alb-Creマウスでは、7ヶ月齢以降に小さな腫瘍（矢印）が確認され、加齢と共に腫瘍の数および大きさが増大した。左下図は12月齢のApg7^{f/f}（コントロール）マウス肝臓、p62ノックアウト肝臓、Apg7^{f/f}；Alb-Creマウスの肝臓非腫瘍部、肝臓腫瘍部およびApg7^{f/f}；Alb-Cre；p62ノックアウト肝臓抽出液を用いたウェスタンブロット解析の結果である。Apg7^{f/f}；Alb-Creマウスの肝臓非腫瘍部、肝臓腫瘍部ともにp62が過剰に蓄積・不溶化し、p62結合タンパク質Keap1の不溶化も顕著であった。p62およびKeap1の不溶化に伴い、Nr f 2の標的遺伝子産物であるNqo1のタンパク質量もApg7^{f/f}；Alb-Creマウスの肝臓非腫瘍部、肝臓腫瘍部で増加していた。上記Keap1の不溶化およびNqo1の発現上昇は、Apg7^{f/f}；Alb-Cre；p62ノックアウト肝臓において抑制されていた。右下は12月齢のApg7^{f/f}（コントロール）マウス肝臓、p62ノックアウト肝臓、Apg7^{f/f}；Alb-Creマウスの肝臓非腫瘍部、肝臓腫瘍部およびApg7^{f/f}；Alb-Cre；p62ノックアウト肝臓から調整したRNAを用いた定量的PCR解析の結果である。Apg7^{f/f}；Alb-Creマウスの肝臓非腫瘍部、肝臓腫瘍部ともに、Nr f 2の標的遺伝子であるNqo1やGstm1の遺伝子発現が増加していた。これらの発現上昇は、Apg7^{f/f}；Alb-Cre；p62ノックアウト肝臓において抑制されていた。

これらの結果より、オートファジー欠損マウスの長期飼育により形成された腫瘍におけるKeap1の不溶化およびNr f 2の活性化は、p62依存的であることが明らかとなった。このことから、in vivo自然発症肝臓がんにおいても、p62－Keap1のpathwayが機能していることが示唆される。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 1 0 】

本発明は、新規な作用機序に基づく肝疾患治療薬および抗がん剤、診断薬またはそのスクリーニング方法などとして有用である。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research
Link Genomics, Inc.

<120> Medicament for treating hepatic disease

<130> PCT10-0065

<150> JP 2010-001892

10

<151> 2010-01-07

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Met Ala Ser Leu Thr Val Lys Ala Tyr Leu Leu Gly Lys Glu Asp Ala
1 5 10 15

Ala Arg Glu Ile Arg Arg Phe Ser Phe Cys Cys Ser Pro Glu Pro Glu
20 25 30

Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Gly Pro Gly Pro Cys Glu Arg Leu Leu
35 40 45

30

Ser Arg Val Ala Ala Leu Phe Pro Ala Leu Arg Pro Gly Gly Phe Gln
50 55 60

Ala His Tyr Arg Asp Glu Asp Gly Asp Leu Val Ala Phe Ser Ser Asp
65 70 75 80

Glu Glu Leu Thr Met Ala Met Ser Tyr Val Lys Asp Asp Ile Phe Arg
85 90 95

Ile Tyr Ile Lys Glu Lys Lys Glu Cys Arg Arg Asp His Arg Pro Pro
100 105 110

40

Cys Ala Gln Glu Ala Pro Arg Asn Met Val His Pro Asn Val Ile Cys
115 120 125

Asp Gly Cys Asn Gly Pro Val Val Gly Thr Arg Tyr Lys Cys Ser Val
130 135 140

Cys Pro Asp Tyr Asp Leu Cys Ser Val Cys Glu Gly Lys Gly Leu His
 145 150 155 160

Arg Gly His Thr Lys Leu Ala Phe Pro Ser Pro Phe Gly His Leu Ser
 165 170 175

Glu Gly Phe Ser His Ser Arg Trp Leu Arg Lys Val Lys His Gly His
 180 185 190

Phe Gly Trp Pro Gly Trp Glu Met Gly Pro Pro Gly Asn Trp Ser Pro
 195 200 205

Arg Pro Pro Arg Ala Gly Glu Ala Arg Pro Gly Pro Thr Ala Glu Ser
 210 215 220

Ala Ser Gly Pro Ser Glu Asp Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Asn Val
 225 230 235 240

Gly Glu Ser Val Ala Ala Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ile Glu Val Asp
 245 250 255

Ile Asp Val Glu His Gly Gly Lys Arg Ser Arg Leu Thr Pro Val Ser
 260 265 270

Pro Glu Ser Ser Ser Thr Glu Glu Lys Ser Ser Ser Gln Pro Ser Ser
 275 280 285

Cys Cys Ser Asp Pro Ser Lys Pro Gly Gly Asn Val Glu Gly Ala Thr
 290 295 300

Gln Ser Leu Ala Glu Gln Met Arg Lys Ile Ala Leu Glu Ser Glu Gly
 305 310 315 320

Arg Pro Glu Glu Gln Met Glu Ser Asp Asn Cys Ser Gly Gly Asp Asp
 325 330 335

Asp Trp Thr His Leu Ser Ser Lys Glu Val Asp Pro Ser Thr Gly Glu
 340 345 350

Leu Gln Ser Leu Gln Met Pro Glu Ser Glu Gly Pro Ser Ser Leu Asp
 355 360 365

Pro Ser Gln Glu Gly Pro Thr Gly Leu Lys Glu Ala Ala Leu Tyr Pro
 370 375 380

His Leu Pro Pro Glu Ala Asp Pro Arg Leu Ile Glu Ser Leu Ser Gln
 385 390 395 400

Met Leu Ser Met Gly Phe Ser Asp Glu Gly Gly Trp Leu Thr Arg Leu
 405 410 415

10

20

30

40

Leu Gln Thr Lys Asn Tyr Asp Ile Gly Ala Ala Leu Asp Thr Ile Gln
 420 425 430

Tyr Ser Lys His Pro Pro Pro Leu
 435 440

<210> 2
 <211> 1320
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 2
 atggcgctgc tcaccgtgaa ggccctacett ctgggcaagg aggacgcgge gcgcgagatt 60
 cgccgcttca gcttctgctg cagccccgag cctgaggcgg aagccgagge tgcggcgggt 120
 ccgggaccct gcgagcggct gctgagccgg gtggccgccc tgttccccgc gctgcggcct 180
 ggcggttcc aggcgcacta ccgcgatgag gacggggact tggttgcctt ttccagtgc 240
 gaggaattga caatggccat gtccctacgtg aaggatgaca tcttccgaat ctacattaaa 300
 gagaaaaaag agtgccggcg ggaccaccgc ccaccgtgtg ctcaggagge gccccgcaac 360
 atggtgcacc ccaatgtgat ctgcgatggc tgcaatgggc ctgtggtagg aaccgcgtac 420
 aagtgcagcg tctgcccaga ctacgacttg tgtagcgtct gcgagggaaa gggcttgcac 480
 cgggggcaca ccaagctcgc attccccagc cccttcgggc acctgtctga gggttctcg 540
 cacagccgct ggctccggaa ggtgaaacac ggacacttcg ggtggccagg atgggaaatg 600
 ggtccaccag gaaactggag cccacgtcct cctcgtgcag gggaggcccg ccctggcccc 660
 acggcagaat cagcttctgg tccatcggag gatccgagtg tgaatttcct gaagaacgtt 720
 ggggagagtg tggcagctgc ccttagccct ctgggcatig aagttgatat cgatgtggag 780
 cacggaggga aaagaagccg cctgaccccc gtctctccag agagttccag cacagaggag 840
 aagagcagct cacagccaag cagctgctgc tctgacccca gcaagccggg tgggaatgtt 900
 gagggcgcca cgcagtctct ggccggagcag atgaggaaga tcgccttgga gtccgagggg 960
 cgccctgagg aacagatgga gtoggataac tgttcaggag gagatgatga ctggacccat 1020
 ctgtcttcaa aagaagtgga cccgtctaca ggtgaactcc agtccctaca gatgccagaa 1080
 tccgaagggc caagctctct ggacccctcc caggagggac ccacagggt gaaggaagct 1140

20

30

40

gccttgtagc cacatctccc gccagaggct gacccgcggc tgattgagtc cctctcccag 1200
 atgctgtcca tgggtctctc tgatgaagge ggetggctca ccaggctcct gcagaccaag 1260
 aactatgaca tcggagcggc tctggacacc atccagtatt caaagcatcc cccgcggtg 1320

<210> 3
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 3

Met Ala Ser Phe Thr Val Lys Ala Tyr Leu Leu Gly Lys Glu Glu Ala
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Ile Arg Arg Phe Ser Phe Cys Phe Ser Pro Glu Pro Glu
 20 25 30

Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala Gly Pro Gly Pro Cys Glu Arg Leu Leu
 35 40 45

20

Ser Arg Val Ala Val Leu Phe Pro Thr Leu Arg Pro Gly Gly Phe Gln
 50 55 60

Ala His Tyr Arg Asp Glu Asp Gly Asp Leu Val Ala Phe Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Thr Met Ala Met Ser Tyr Val Lys Asp Asp Ile Phe Arg
 85 90 95

30

Ile Tyr Ile Lys Glu Lys Lys Glu Cys Arg Arg Glu His Arg Pro Pro
 100 105 110

Cys Ala Gln Glu Ala Pro Arg Asn Met Val His Pro Asn Val Ile Cys
 115 120 125

Asp Gly Cys Asn Gly Pro Val Val Gly Thr Arg Tyr Lys Cys Ser Val
 130 135 140

Cys Pro Asp Tyr Asp Leu Cys Ser Val Cys Glu Gly Lys Gly Leu His
 145 150 155 160

40

Arg Glu His Ser Lys Leu Ile Phe Pro Asn Pro Phe Gly His Leu Ser
 165 170 175

Asp Ser Phe Ser His Ser Arg Trp Leu Arg Lys Leu Lys His Gly His
 180 185 190

Phe Gly Trp Pro Gly Trp Glu Met Gly Pro Pro Gly Asn Trp Ser Pro
 195 200 205
 Arg Pro Pro Arg Ala Gly Asp Gly Arg Pro Cys Pro Thr Ala Glu Ser
 210 215 220
 Ala Ser Ala Pro Pro Glu Asp Pro Asn Val Asn Phe Leu Lys Asn Val
 225 230 235 240
 Gly Glu Ser Val Ala Ala Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ile Glu Val Asp
 245 250 255
 Ile Asp Val Glu His Gly Gly Lys Arg Ser Arg Leu Thr Pro Thr Thr
 260 265 270
 Pro Glu Ser Ser Ser Thr Gly Thr Glu Asp Lys Ser Asn Thr Gln Pro
 275 280 285
 Ser Ser Cys Ser Ser Glu Val Ser Lys Pro Asp Gly Ala Gly Glu Gly
 290 295 300
 Pro Ala Gln Ser Leu Thr Glu Gln Met Lys Lys Ile Ala Leu Glu Ser
 305 310 315 320
 Val Gly Gln Pro Glu Glu Gln Met Glu Ser Gly Asn Cys Ser Gly Gly
 325 330 335
 Asp Asp Asp Trp Thr His Leu Ser Ser Lys Glu Val Asp Pro Ser Thr
 340 345 350
 Gly Glu Leu Gln Ser Leu Gln Met Pro Glu Ser Glu Gly Pro Ser Ser
 355 360 365
 Leu Asp Pro Ser Gln Glu Gly Pro Thr Gly Leu Lys Glu Ala Ala Leu
 370 375 380
 Tyr Pro His Leu Pro Pro Glu Ala Asp Pro Arg Leu Ile Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Ser Met Gly Phe Ser Asp Glu Gly Gly Trp Leu Thr
 405 410 415
 Arg Leu Leu Gln Thr Lys Asn Tyr Asp Ile Gly Ala Ala Leu Asp Thr
 420 425 430
 Ile Gln Tyr Ser Lys His Pro Pro Pro Leu
 435 440

10

20

30

40

<210> 4

<211> 1326

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

atggcgctcgt tcacggtgaa ggcctatctt ctgggcaagg aggaggcgac ccgcgagatc	60	
cggcgcttca gcttctgctt cagcccgag cgggaggcgg aagcccaagc cggggccggc	120	
ccggggccct gcgagaggct gctgagccga gtggctgtgc tgttccccac gctgaggcct	180	10
ggcggttcc aggcgcacta ccgcgatgag gatggggact tggttgcctt ttccagtgat	240	
gaggagctga caatggctat gtctatgtg aaagatgaca tcttccgcat ctacattaaa	300	
gagaagaagg agtgccggcg ggaacatcgc ccacatgtg ctcaggagge accccgaaac	360	
atggtgcacc ccaatgtgat ctgtgatggt tgcaacgggc ctgtggtggg aactcgtat	420	
aagtgcagtg tgtgccaga ctacacctg tgcagcgtgt gcgaggggaa gggcctgcac	480	
aggaacaca gcaagctcat ctttcccaac ccctttggcc acctctctga tagcttctct	540	20
catagccgct ggcttcggaa gctgaaacat ggacactttg gctggcctgg ctgggagatg	600	
ggcccaccgg ggaactggag cccacgtcct cctcgtgcag gggatggccg cccttgcct	660	
acagctgagt cagcttctgc tccaccagaa gatcccaatg tcaatttcct gaagaatgtg	720	
ggggagagtg tggcagctgc cctcagccct ctaggcattg aggttgacat tgatgtggaa	780	
catggaggga agagaagccg cctgacaccc actaccccag aaagttccag cacaggcaca	840	30
gaagacaaga gtaacactca gccaaagcgc tgccttcgg aagtcagcaa acctgacggg	900	
gtggggagg gccctgctca gtctctgaca gagcaaatga aaaagatagc cttggagtcg	960	
gtgggacagc cagaggaaca gatggagtcg ggaaactget caggaggaga cgatgactgg	1020	
acacatttgt cttaaaaaga agtggaccca tctacagggt aactccagtc tctacagatg	1080	
ccagaatcgg aaggccaag ctctctagac ccctcacagg aaggaccac agggetgaag	1140	40
gaagctgccc tataeccaca tctccacca gaggetgate cccggetgat tgagtccttc	1200	
tccagatgc tgtccatggg ttctcggat gaaggcggct ggctcaccag gctcctacag	1260	
accaagaatt acgacatcgg ggetgctctg gacacgatec agtattcgaa gcacctcca	1320	
ccattg	1326	

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

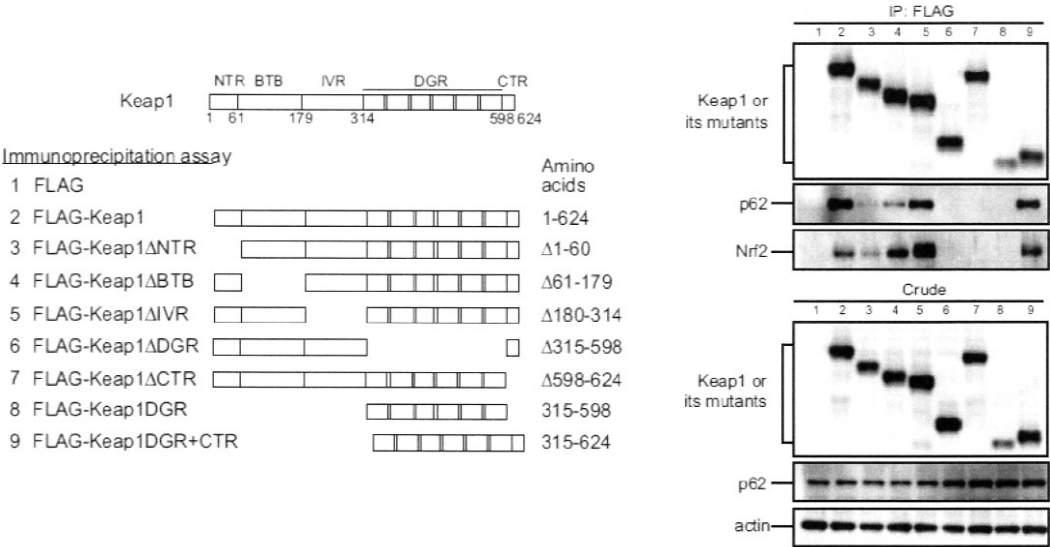
<400> 5

Ser Lys Glu Val Asp Pro Ser Thr Gly Glu Leu Gln Ser Leu Gln
1 5 10 15

10

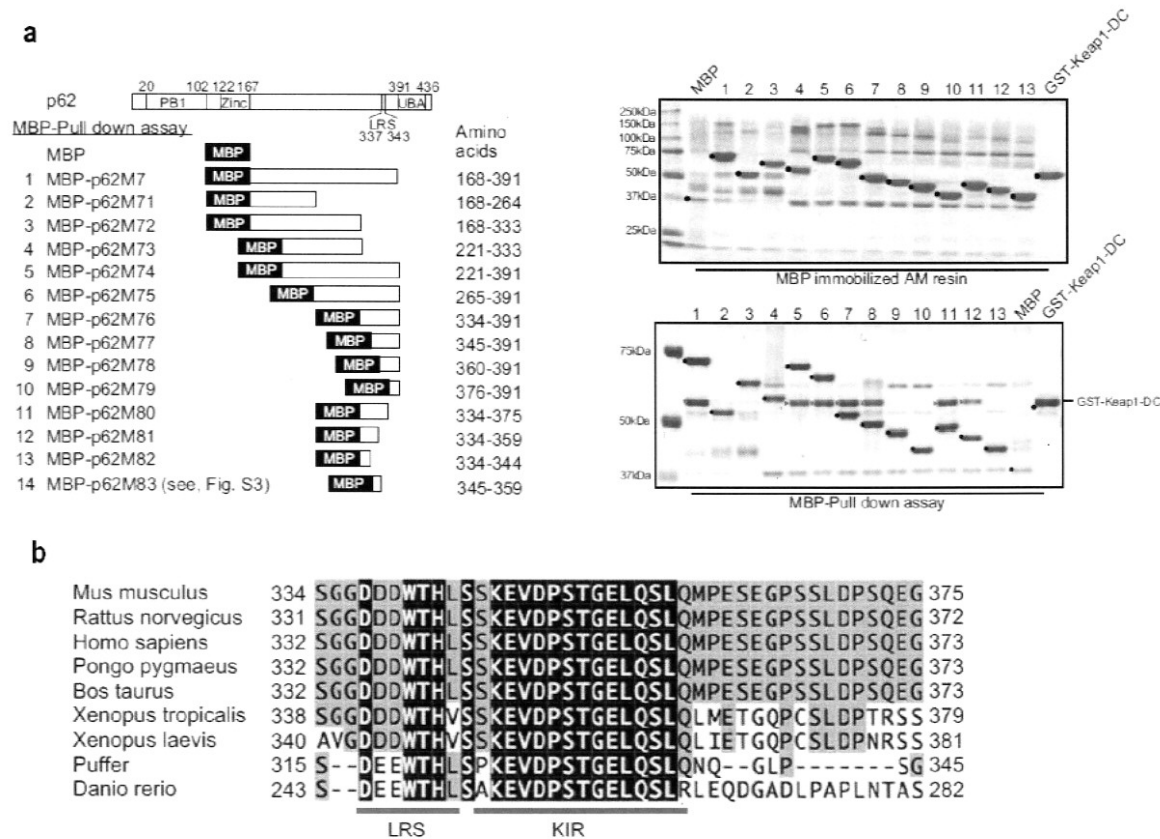
【 図 1 】

Fig. 1



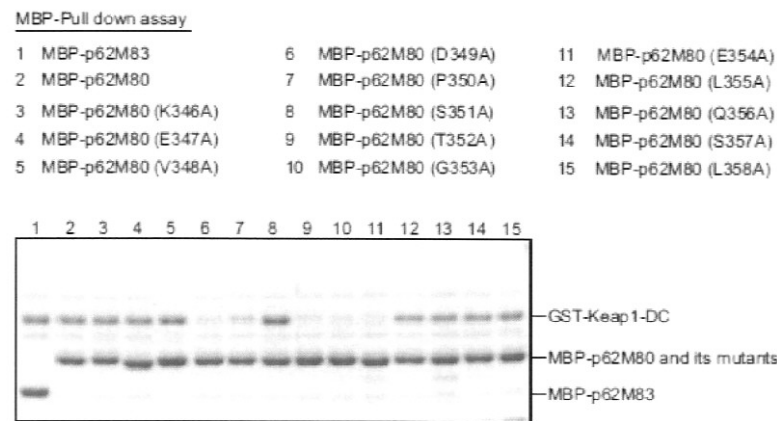
【 図 2 】

Fig. 2



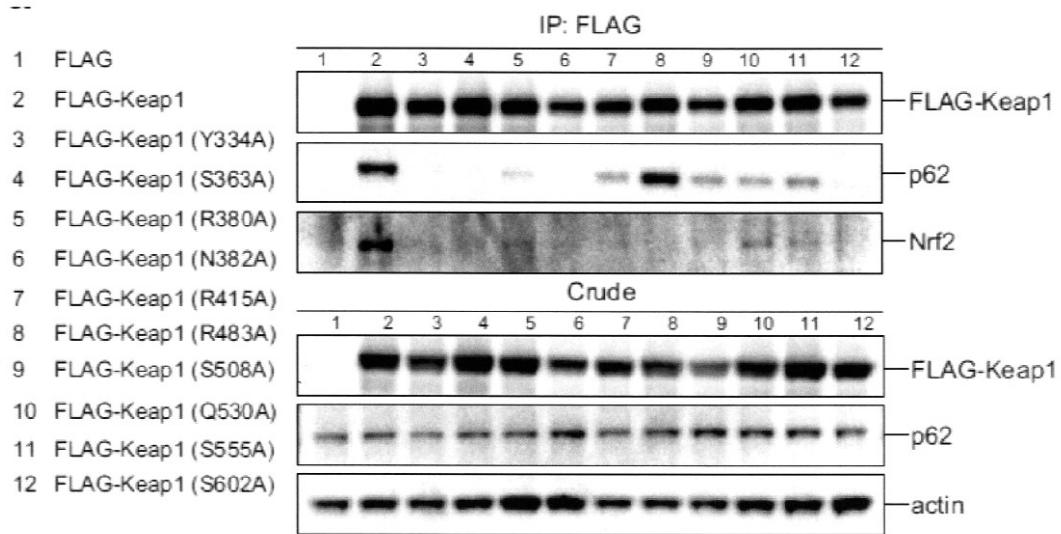
【 図 3 】

Fig. 3



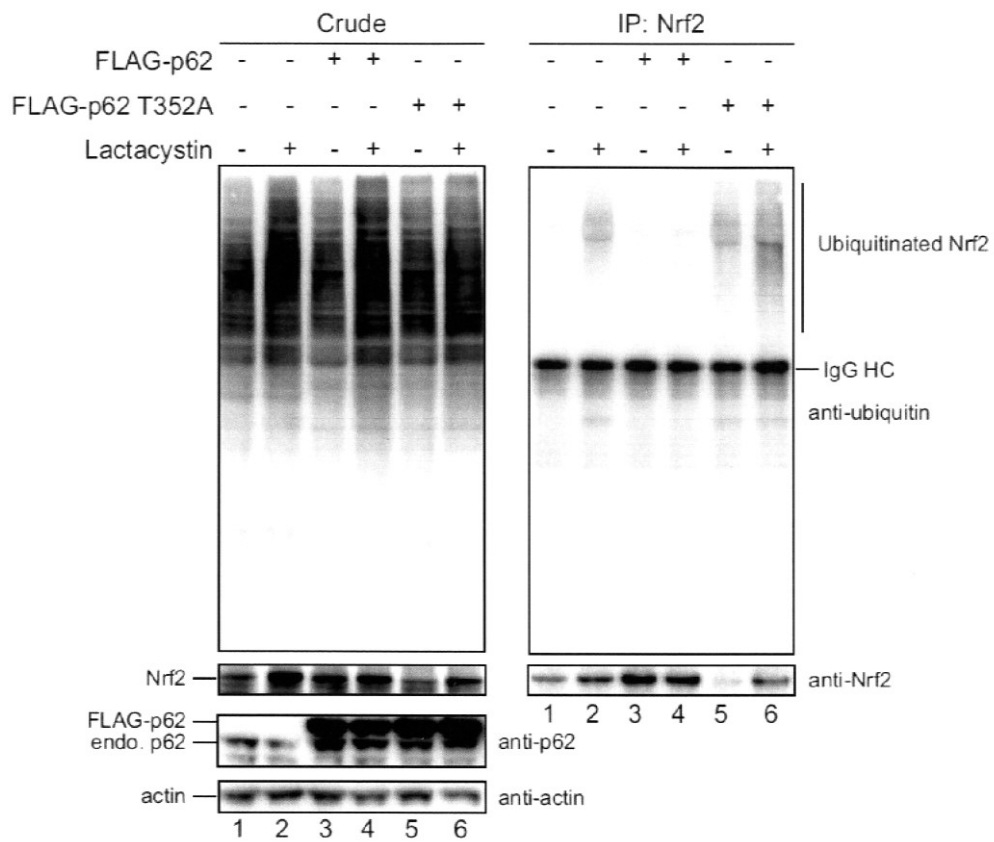
【図 4】

Fig. 4



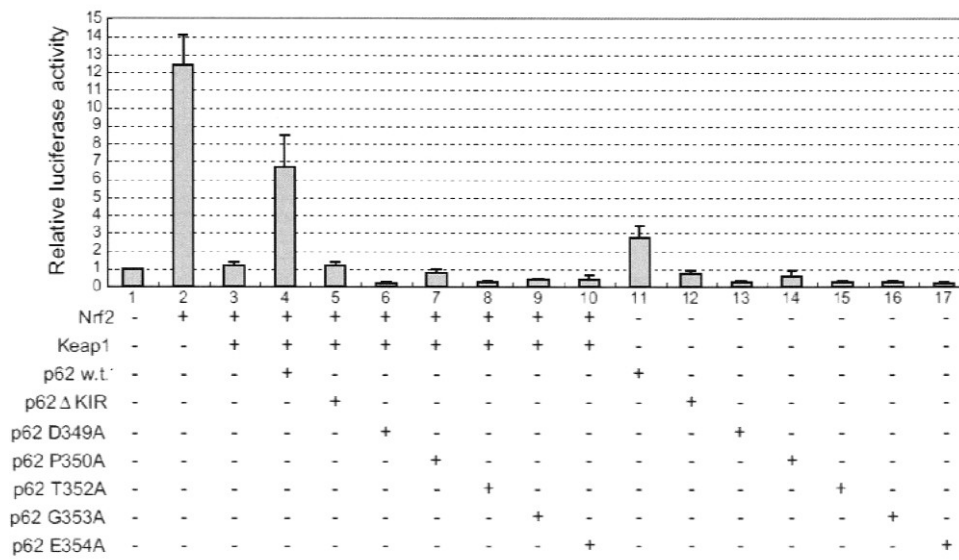
【図 5】

Fig. 5



【 図 6 】

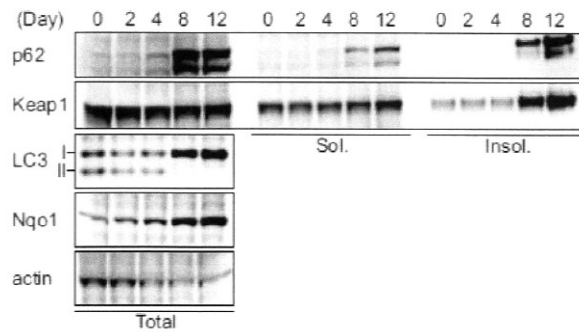
Fig. 6



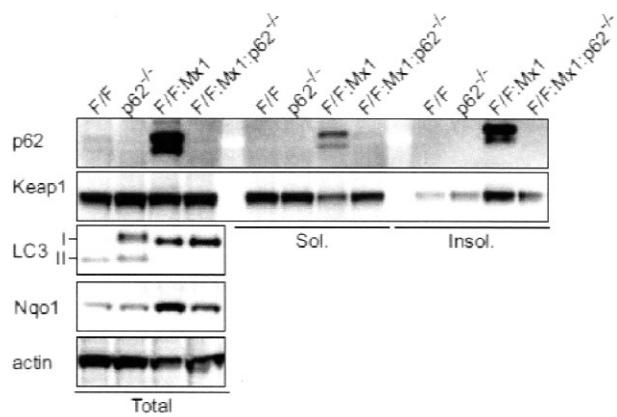
【 図 7 】

Fig. 7

a

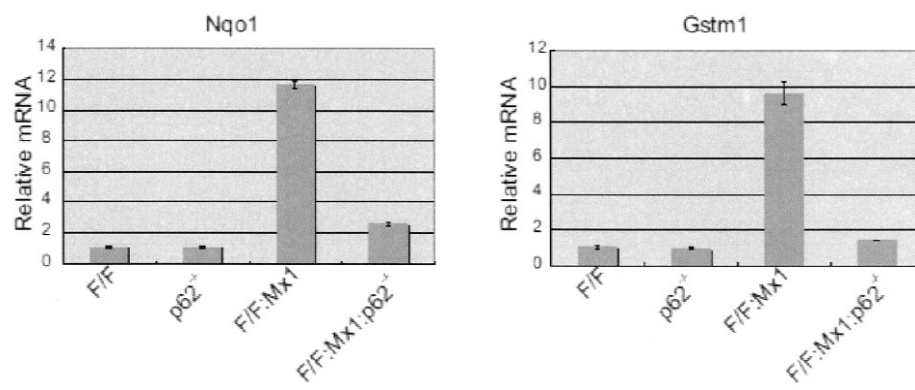


b



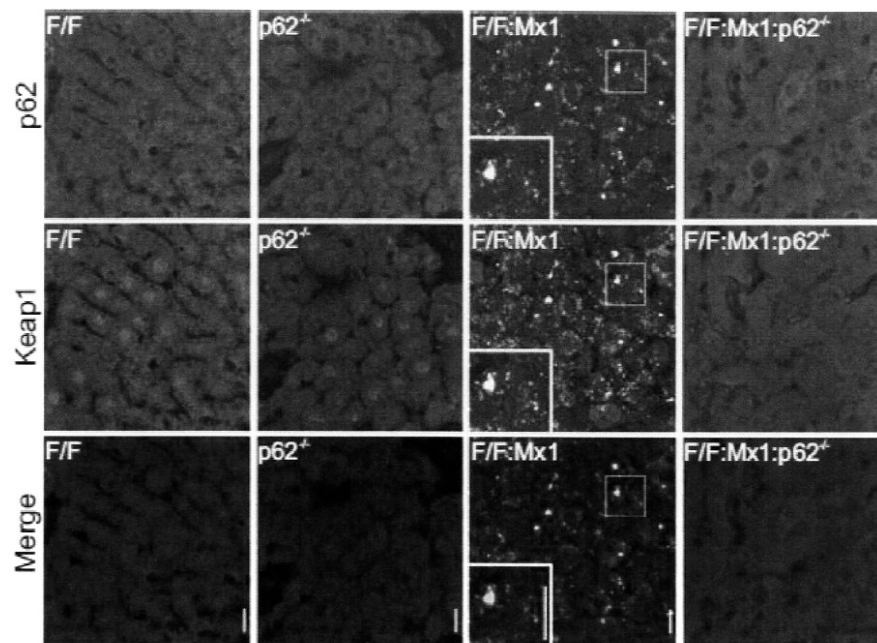
【 図 8 】

Fig. 8



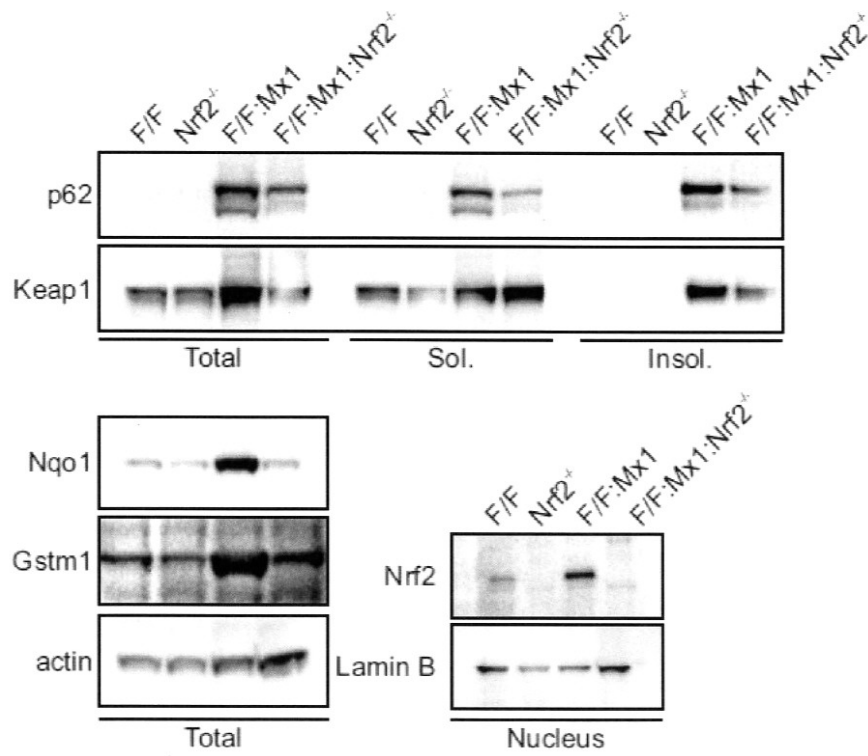
【 図 9 】

Fig. 9



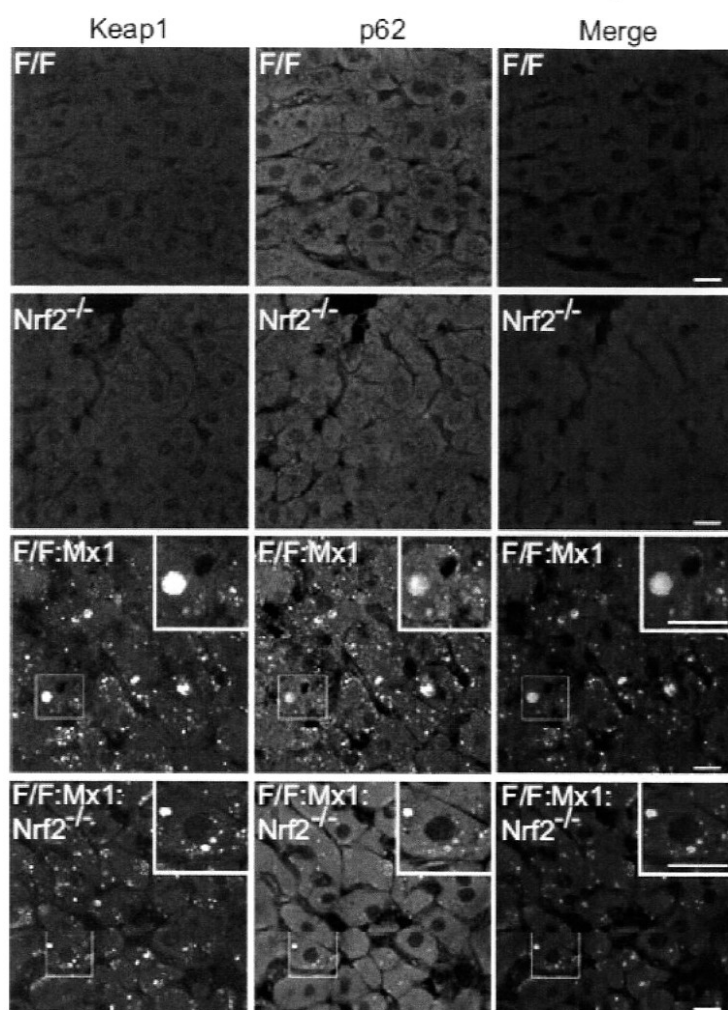
【図 10】

Fig. 10



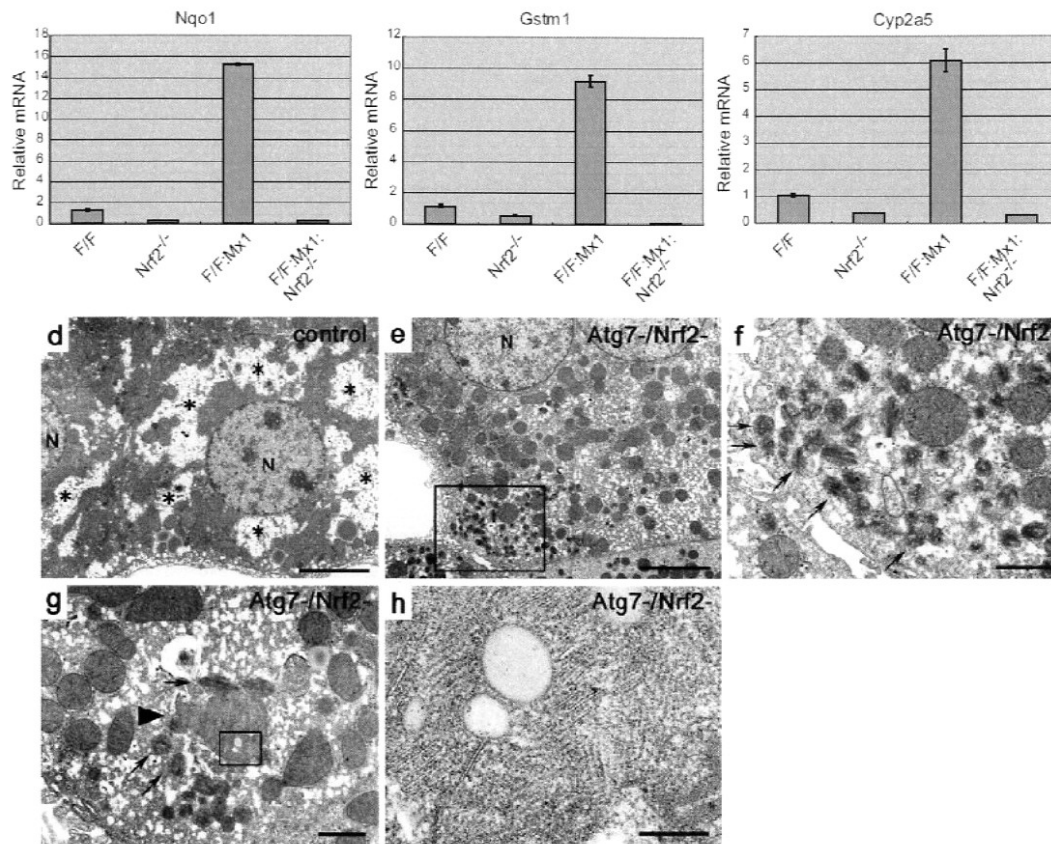
【図 11】

Fig. 11



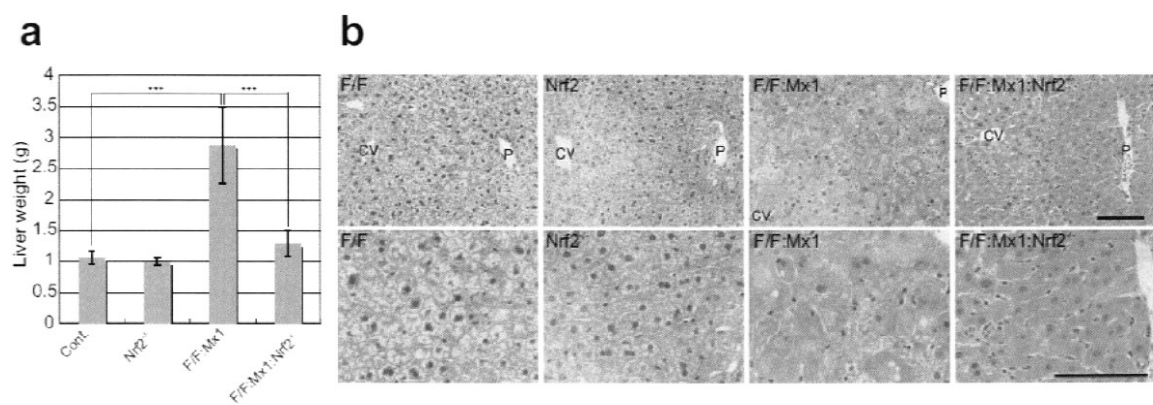
【図 1 2】

Fig. 12



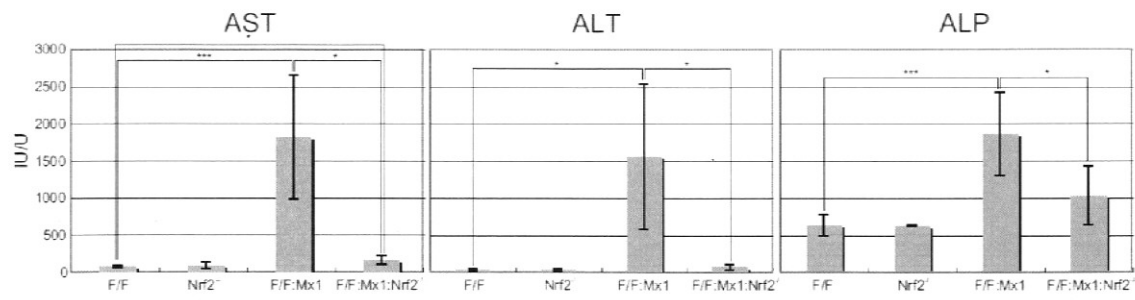
【図 1 3】

Fig. 13



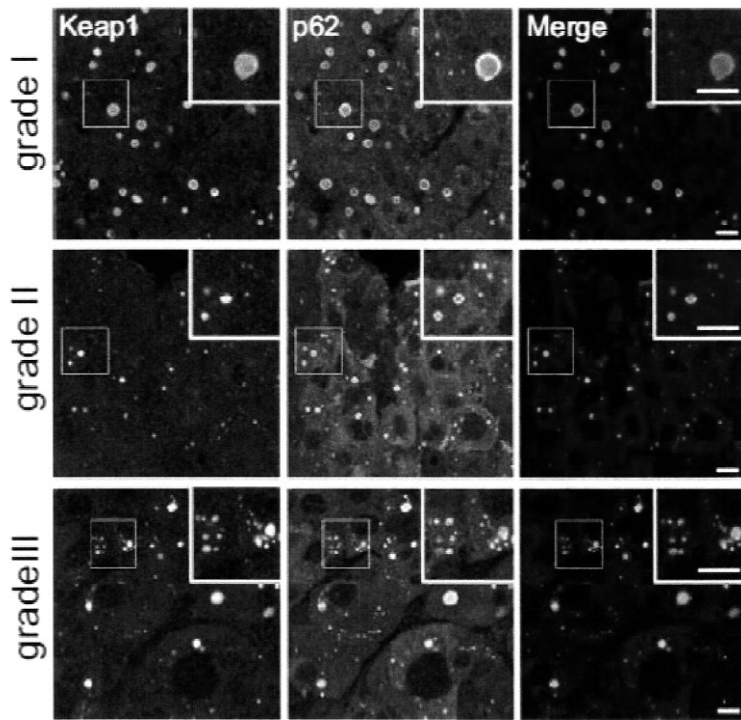
【図 1 4】

Fig. 14



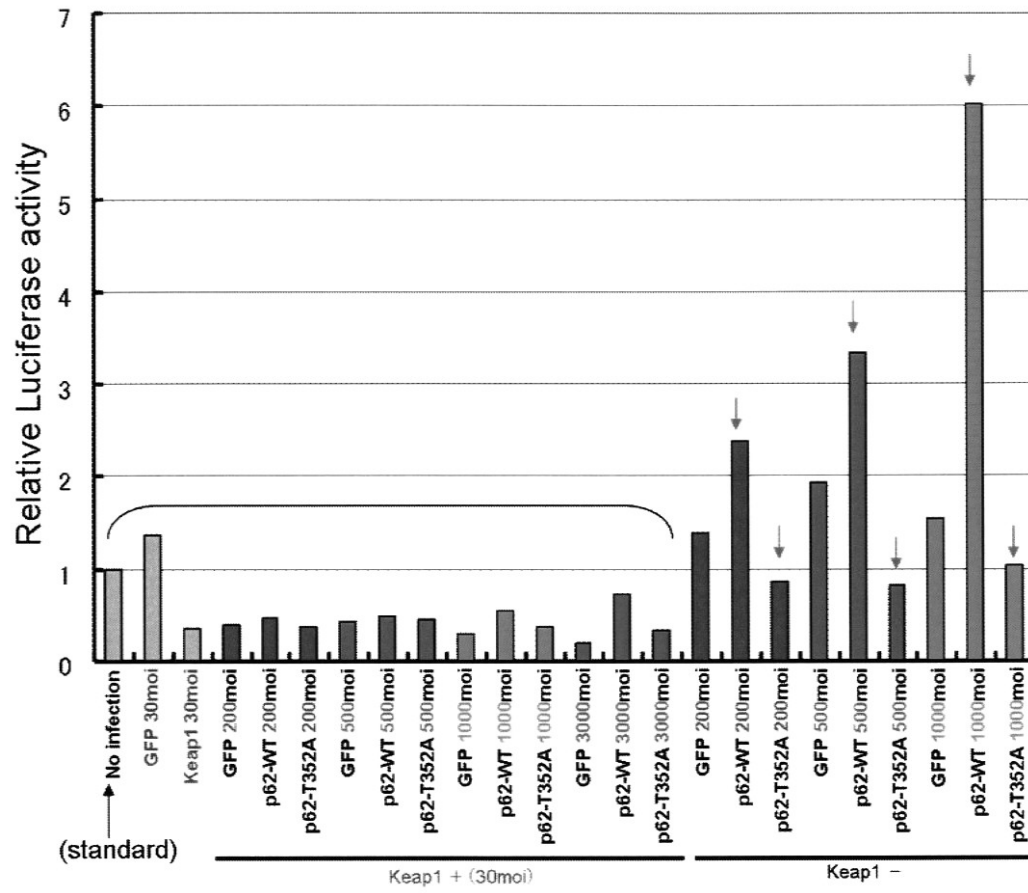
【図 1 5】

Fig. 15



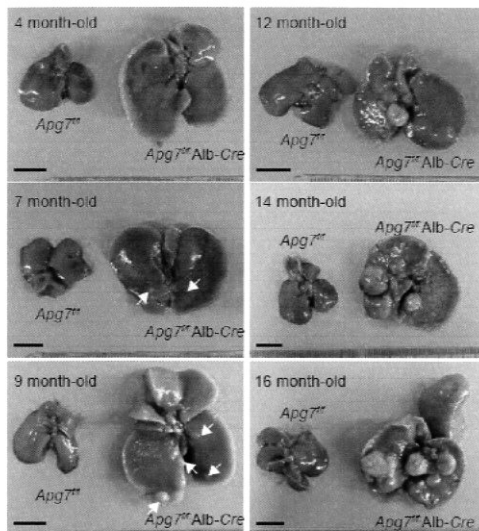
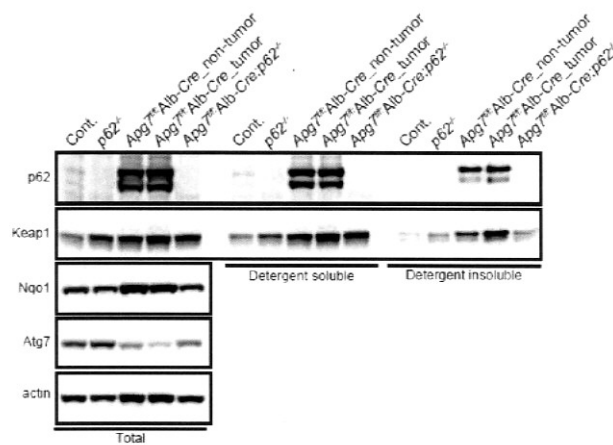
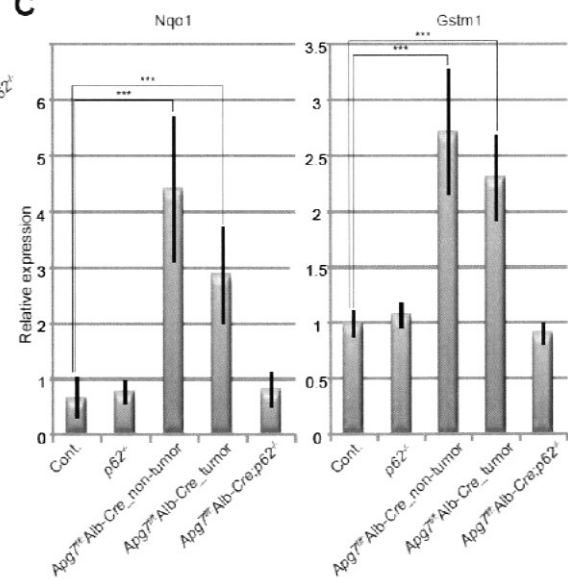
【図 16】

Fig. 16



【図 17】

Fig. 17

A**B****C**

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/113, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12Q1/48, G01N33/15, G01N33/50, C07K14/47

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Masaaki KOMATSU, "Sentakuteki Autophagy ni yoru Atarashii Tensha Yokusei Kiko", 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 20 November 2009 (20.11.2009), 2W2-7, entire text	1-12/13, 14
X/A	CHEN, W. et al., Direct Interaction between Nrf2 and p21 ^{Cip1/WAF1} Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response., Mol. Cell, 2009.06, vol.34, pages 663 to 673, abstract, Introduction, page 667, left column, 2nd paragraph to page 669, right column, 1st paragraph	1-3/4-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 December, 2010 (13.12.10)Date of mailing of the international search report
21 December, 2010 (21.12.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071186

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Masaaki KOMATSU et al., "Kankyo Stress Yudosei Autophagy to Shikkan", Juntendo Medical Journal, 31 December 2009 (31.12.2009), vol.55, no.4, page 528, entire text	6-8/1-5, 9-14
A	KOMATSU, M. et al., Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice., Cell, 2007, Vol.131, P.1149-1163, entire text	1-14
A	COPPLE, I. M. et al., The Hepatotoxic Metabolite of Acetaminophen Directly Activates the Keap1-Nrf2 Cell Defense System., HEPATOLOGY, 2008, Vol.48, No.4, P.1292-1301, entire text	1-14
P,X	KOMATSU, M. et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1., Nat. Cell Biol., 2010.03, Vol.12, No.3, P.213-223, entire text	1-14
P,X	JAIN, A. et al., p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NFE2L3 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription., J. Biol. Chem., 2010.07, Vol.285, No.29, P.22576-22591, entire text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071186

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

C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P1/16(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i,
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/071186									
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. 特別ページ参照											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/113, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K39/395, A61K45/00, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/18, C12N15/09, C12Q1/48, G01N33/15, G01N33/50, C07K14/47											
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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用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/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、PubMed											
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/ A	小松雅明, 選択的オートファジーによる新しい転写抑制機構, 第3 2回日本分子生物学会年会 講演要旨集, 2009.11.20, 2W2-7, 全文	1-12/ 13, 14									
X/ A	CHEN, W. et al., Direct Interaction between Nrf2 and p21 ^{Cip1/WAF1} Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response., Mol. Cell, 2009.06, Vol.34, P.663-673, 要約、導入、第667頁左欄第2段 落-第669頁右欄第1段落等	1-3/ 4-14									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 13.12.2010		国際調査報告の発送日 21.12.2010									
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） 鈴木 崇之	4B 4152								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 7 1 1 8 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	小松雅明他, 環境ストレス誘導性オートファジーと疾患, 順天堂医学, 2009.12.31, Vol.55, No.4, P.528, 全文	6-8/ 1-5, 9-14
A	KOMATSU, M. et al., Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice., Cell, 2007, Vol.131, P.1149-1163, 全文	1-14
A	COPPLE, I. M. et al., The Hepatotoxic Metabolite of Acetaminophen Directly Activates the Keap1-Nrf2 Cell Defense System., HEPATOLOGY, 2008, Vol.48, No.4, P.1292-1301, 全文	1-14
PX	KOMATSU, M. et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1., Nat. Cell Biol., 2010.03, Vol.12, No.3, P.213-223, 全文	1-14
PX	JAIN, A. et al., p62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-driven Gene Transcription., J. Biol. Chem., 2010.07, Vol.285, No.29, P.22576-22591, 全文	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/071186

発明の属する分野の分類

C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
C12Q1/48(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

(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, T M), 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, R S, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

特許法第 3 0 条第 1 項適用申請有り

(72)発明者 小松 雅明
東京都世田谷区上北沢二丁目 1 番 6 号 公益財団法人東京都医学総合研究所内
(72)発明者 田中 啓二
東京都世田谷区上北沢二丁目 1 番 6 号 公益財団法人東京都医学総合研究所内
(72)発明者 丹羽 眞一郎
東京都中央区日本橋堀留町 2-1-8 リンク・ジェノミクス株式会社内
(72)発明者 牧野 泰孝
東京都中央区日本橋堀留町 2-1-8 リンク・ジェノミクス株式会社内
(72)発明者 笠間 隆志
東京都中央区日本橋堀留町 2-1-8 リンク・ジェノミクス株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 FB05
4B024 AA01 BA80 CA11 GA11 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ22 QQ26 QQ36 QQ43 QQ53
QR32 QR50 QR62 QR72 QR77 QS03 QS05 QS25 QS28 QS34
QS36 QS39 QX02
4C084 AA02 AA13 AA17 NA14 ZA75 ZB26 ZC41
4C085 AA13 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA07 NA14 ZA75 ZB26 ZC41
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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)	肝疾患治疗薬		
公开(公告)号	JPWO2011083637A1	公开(公告)日	2013-05-13
申请号	JP2011548929	申请日	2010-11-19
申请(专利权)人(译)	公益財団法人東京都医学総合研究所 链接基因组公司		
[标]发明人	小松雅明 田中啓二 丹羽眞一郎 牧野泰孝 笠間隆志		
发明人	小松 雅明 田中 啓二 丹羽 眞一郎 牧野 泰孝 笠間 隆志		
IPC分类号	C12N15/113 C12N15/09 A61K45/00 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K48/00 A61K39/395 A61P1/16 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K16/18 C12Q1/48 C07K14/47		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K31/7105 A61P1/16 C12N15/113 C12N2310/11 C12N2310/14		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.G C12N15/00.A A61K45/00 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K48/00 A61K39/395.D A61P1/16 A61P35/00 A61P43/00.111 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C07K16/18 C12Q1/48 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA11 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ22 4B063/QQ26 4B063/QQ36 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR50 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA75 4C084/ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA13 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/NA14 4C086/ZA75 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 藤田 尚 鈴木康仁		
优先权	2010001892 2010-01-07 JP		
其他公开文献	JP5814128B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种控制Keap1和p62之间相互作用的方法，所述相互作用控制了泛素阳性包涵体的形成。

発行日 平成25年5月13日 (2013. 5. 13)

(43) 国際公開日 平成23年7月14日 (2011. 7. 14)

(51) Int. Cl.			F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A G	2 G O 4 5
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	4 B O 2 4
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 B O 6 3
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C O 8 4
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C O 8 5
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
					(全 47 頁)	最終頁に続く

出願番号	特願2011-548929 (P2011-548929)	(71) 出願人	591063394
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/071186		公益財団法人東京都医学総合研究所
(22) 国際出願日	平成22年11月19日 (2010.11.19)		東京都世田谷区上北沢2-1-6
(31) 優先権主張番号	特願2010-1892 (P2010-1892)	(71) 出願人	502019933
(32) 優先日	平成22年1月7日 (2010.1.7)		リンク・ジェノミクス株式会社
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都中央区日本橋蛸留町2丁目1番8号
			神野ビル4階
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肝疾患治療薬