

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-528586

(P2010-528586A)

(43) 公表日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
C12Q 1/42 (2006.01)	C12Q 1/42	4B063
C12Q 1/25 (2006.01)	C12Q 1/25	4C084
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-506252 (P2010-506252)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月24日 (2008.4.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年12月24日 (2009.12.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/005280
 (87) 国際公開番号 W02008/133936
 (87) 国際公開日 平成20年11月6日 (2008.11.6)
 (31) 優先権主張番号 60/926, 245
 (32) 優先日 平成19年4月26日 (2007.4.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505070494
 プレジデント アンド フェローズ オブ
 ハーバード カレッジ
 PRESIDENT AND FELLO
 WS OF HARVARD COLLEG
 E
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2138 ケンブリッジ マサチューセッ
 ツ アベニュー 1350 스위트 7
 27
 1350 Massachusetts
 Avenue, Suite 727, C
 ambridge, MA 02138
 (US).

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨形成及び鉱化作用を調節する化合物の同定のためのアッセイ

(57) 【要約】

KRC分子が、骨形成及び鉱化作用を含む多種の細胞プロセスの調節において調節薬として多岐にわたる重要な機能を有していることを本発明は示した。骨芽細胞のTGF-シグナリングは、KRC、Runx2、Smad3とE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成を促進する。なお、Runx2ポリユビキチン化及びプロテアソーム依存にする分解を促進するWWP1の活性により、WWP1はRunx2の活性を阻害する。さらに、KRC及びWWP1は、Runx2ポリユビキチン化を促進するWWP1の活性によりRSK2機能を阻害する、RSK2との複合体を形成する。KRC活性の調節剤を同定するための方法が提供される。KRC発現及び/又は活性を調節する薬剤を使用する、免疫応答、骨形成、鉱化作用、及びKRC関連の疾患を調節するための方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

骨形成及び鉱化作用を増加するのに有効な化合物を同定する方法であって、

- a) (i) KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性なフラグメントを含む細胞インジケータ組成物、並びに(ii)前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、
- b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、
- c) 前記供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、
- d) 前記レポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、
- e) KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性なフラグメントを含む間葉の幹細胞を、関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び前記供試化合物の存在下及び非存在下における間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を測定し、骨形成及び鉱化作用を増加する化合物を同定するステップを含む、間葉の幹細胞の分化を増加する関心のある前記供試化合物の活性を評価するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記インジケータ組成物が、PPXYドメインを含むRunx2の生物学的に活性領域を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記インジケータ組成物が、HECTドメインを含むWWP1の生物学的に活性領域を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

間葉の幹細胞の分化への関心のある供試化合物の効果を、細胞アルカリホスファターゼ (ALP) のレベルを測定することにより評価する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

関心のある化合物の鉱化作用への効果を評価するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、
前記インジケータ組成物を関心のある供試化合物に接触させるステップ、及び
関心ある供試化合物の存在下又は非存在下におけるWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への関心ある供試化合物の効果を測定するステップを含む、WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を調節する関心のある供試化合物の活性を評価するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、
前記インジケータ組成物を関心のある供試化合物に接触させるステップ、及び
関心ある供試化合物の存在下又は非存在下におけるWWP1及びRunx2の間の相互作用への関心ある供試化合物の効果を測定するステップを含む、
WWP1及びRunx2の間の相互作用を減少させる関心ある供試化合物の活性を評価するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記供試化合物をヒト以外の成体動物に投与し、そして前記供試化合物の存在下又は非存在下で骨形成及び鉱化作用への関心のある供試化合物の効果を測定するステップであって、
前記ヒト以外の動物における骨形成及び鉱化作用における増加に基づいて、前記関心ある

50

供試化合物を骨形成及び鉱化作用を増加する化合物として同定するステップを含み、前記動物における骨形成及び鉱化作用への、前記供試化合物の効果を決定するステップをさらに含む、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

SMAD3分子もまた、前記インジケータ組成物に含まれている、請求項 1 に記載の方法

【請求項 10】

RSK2分子もまた、前記インジケータ組成物に含まれている、請求項 1 に記載の方法

【請求項 11】

骨形成及び鉱化作用の増加に有用な化合物を同定する方法であって、

- a) KRC、WWP1及びRunx2を含む間葉の幹細胞又はその生物学的に活性部分を供給するステップ、
- b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、
- c) 骨芽細胞への間葉の幹細胞分化を増加させる関心のある化合物を供試化合物ライブラリーから選び、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、方法。

10

【請求項 12】

骨形成及び鉱化作用の増加に有用な化合物を同定する方法であって、

- a) (i) KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性な部分を含む細胞インジケータ組成物、並びに(ii) 前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、
 - b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、
 - c) 前記供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、
 - d) 前記レポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、
 - e) 間葉の幹細胞を関心のある供試化合物の活性と接触させ、そして前記の供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を決定するステップを含む、
- 間葉の幹細胞の分化を増加させるステップ d) から得られた関心のある供試化合物の活性を評価するステップ、
- f) WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、前記インジケータ組成物を関心ある供試化合物と接触させるステップ及び関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への前記供試化合物の効果を決定するステップを含む、
- WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を減少させる、ステップ e) から得られた関心ある供試化合物の活性を評価するステップ、及び / 又は
- g) WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、前記インジケータ組成物を関心ある供試化合物と接触させるステップ及び関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRunx2との間の相互作用への前記供試化合物の効果を決定するステップを含む、
- WWP1とRunx2との間の相互作用を減少させる、ステップ e) から得られた関心ある供試化合物の活性を評価するステップ、及び
- h) ヒト以外の動物に、ステップ g) から得られた関心ある前記供試化合物を投与するステップ、
- ヒト以外の動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて関心のある前記供試化合物を、骨形成及び鉱化作用を増加する化合物として同定する、前記供試化合物の存在下及び非存在下において骨形成及び鉱化作用への前記供試化合物の効果を決定するステップを含む、

20

30

40

50

ヒト以外の動物における骨形成及び鉱化作用へのステップg)から得られた関心ある供試化合物の効果を決定するステップを含む、方法。

【請求項13】

骨形成及び鉱化作用の増加に有用な化合物を同定する方法であって、

a) (i) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性なフラグメントを含む細胞インジケータ、並びに(ii)前記RSK2ポリペプチド又はその生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、

b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、

c) 前記供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、

d) 前記レポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、

e) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的活性のフラグメントを含む間葉の幹細胞を、関心のある前記供試化合物と接触させるステップ、そして

前記供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への前記供試化合物の効果を測定し、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、

間葉の幹細胞の分化を増加させる関心のある前記供試化合物の活性を評価するステップを含む、方法。

【請求項14】

骨形成及び鉱化作用の増加に有用な化合物を同定する方法であって、

a) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性な部分を含む間葉の幹細胞を供給するステップ、

b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、及び

c) 骨芽細胞への間葉の幹細胞分化を増加させる、関心のある化合物を供試化合物ライブラリーから選び、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、方法。

【請求項15】

骨形成及び鉱化作用の増加に有用な化合物を同定する方法であって、

a) (i) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性な部分を含む細胞インジケータ組成物、並びに(ii)前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性な部分に反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、

b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、

c) 前記供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、

d) 前記レポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、

e) 間葉の幹細胞を関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を決定するステップを含む、

間葉の幹細胞の分化を増加させる、ステップd)から得られた関心のある供試化合物の活性を評価するステップ、

f) WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、

前記インジケータ組成物を前記関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び

関心のある前記供試化合物の存在下及び非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への関心のある前記供試化合物の効果を決定するステップを含む、及び/又は

10

20

30

40

50

WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を減少させるステップ e) から得られた関心のある供試化合物を評価するステップ、及び / 又は

g) WWP1及びRSK2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、

前記インジケータ組成物を関心ある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記供試化合物の存在下及び非存在下において、前記WWP1及びRSK2の相互作用への前記関心のある供試化合物の効果を決定するステップを含む、

WWP1とRSK2との間の相互作用を減少させるステップ e) から得られた前記の関心ある供試化合物の活性を評価するステップ、及び

h) ヒト以外の成体動物に前記関心のある供試化合物を投与するステップ、及び

ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて、前記関心のある供試化合物を、骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物として同定する、

前記供試化合物の存在下及び非存在下において骨形成及び鉱化作用への供試化合物の効果を決定するステップを含む、

ヒト以外の成体動物において骨形成及び鉱化作用へのステップ g) から得られた前記関心のある化合物の効果を決定するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2007年4月26日に出願された、発明の名称が「ASSAYS FOR THE IDENTIFICATION OF COMPOUNDS THAT MODULATE BONE FORMATION AND MINERALIZATION」である米国仮出願第60/926,245号の優先権を主張する。

【0002】

本出願は、2007年2月15日に出願された、発明の名称が「METHODS FOR MODULATING BONE FORMATION AND MINERALIZATION」である米国仮出願第PCT/US08/02082号に関連している。本出願は、また、2006年4月14日に出願された、発明の名称が「METHODS FOR MODULATING BONE FORMATION AND

MINERALIZATION BY MODULATING KRC ACTIVITY」であるPCT/US2006/014295に関連している。本出願は、2002年5月3日に出願されたPCT出願番号第PCT/US02/14166号及び2001年5月3日に出願された米国仮出願第60/288,369号の優先権を主張する、2003年11月3日に出願された米国出願第10/701,401号の一部継続出願である、2004年11月3日に出願されたPCT/US2004/036641にも関連している。これらの出願のそれぞれのすべての内容は、引用により本願に援用されている。

【0003】

政府資金

本明細書に記載された仕事は、少なくとも部分的に承認番号A129673及びAR46983の案件として国立衛生研究所により支援された。政府は、本発明に対していくらかの権利を保有している。

【背景技術】

【0004】

本発明の背景

転写因子は、細胞外のシグナルから細胞内の応答への経路を結合する機能を有する、細胞内の一群の分子である。環境からの刺激の直後に、主に細胞質ゾル中に存在するこれらのプロテインが核に移動し、そこで当該プロテインが標的遺伝子のプロモーター部位の特定のDNA配列に結合して、そしてこれらの標的遺伝子の転写を活性化する。転写因子の一ファミリーである、ZAS (ジンクフィンガー - 酸性ドメイン構造) DNA結合プロテインファミリーは、遺伝子の転写、DNA組換え及びシグナル伝達の制御に関与している (Mak,

10

20

30

40

50

C.H., et al. 1998. *Immunogenetics* 48: 32-39)。

【 0 0 0 5 】

ジンクフィンガープロテインは、高度に保存されたCys2His2ジンクフィンガーの存在下で同定された (Mak, C.H., et al. 1998. *Immunogenetics* 48:

32-39)。前記のジンクフィンガーは、ZASドメインと称される前記のDNA結合構造の不可欠な部分である。前記のZASドメインは、一对のジンクフィンガー、グルタミン酸/アスパラギン酸を豊富に含む酸性配列及びセリン/スレオニンを豊富に含む配列を含む (Mak, C.H., et

al. 1998. *Immunogenetics* 48:

32-39)。前記のZASドメインは、遺伝子のプロモーター又はエンハンサー領域に見出されるkB様シス作動性制御要素と相互作用することが示された。前記のZASプロテインは、特に免疫応答に関与している、多くの遺伝子のエンハンサー配列に存在する、核因子kB結合サイトを認識する (Bachmeyer, et al.

1999. *Nuc. Acid Res.* 27,

643-648)。前記のZAS DNA結合プロテインがこれらの標的遺伝子の転写調節剤であることが示された (Bachmeyer,

et al. 1999. *Nuc. Acid Res.* 27, 643-648;

Wu et al. 1998. *Science* 281, 998-1001)。

【 0 0 0 6 】

ジンクフィンガー転写因子であるカッパ認識成分 (Kappa Recognition Component) (KRCと略称され、schnurri3若しくはShn3及びヒト免疫不全ウイルスI型エンハンサー結合プロテイン3 (HIVEP3)とも称される。)は、ZAS DNA結合プロテインファミリーの一員である (Bachmeyer, et al.

1999. *Nuc. Acid Res.* 27,

643-648; Wu et al. 1998. *Science* 281, 998-1001)。前記のKRC遺伝子は、免疫受容体遺伝子の体細胞性V(D)J組換えに含まれる七量体コンセンサスシグナル配列のためのDNA結合プロテインとして同定された (Mak, C. H., et al.

1994. *Nuc. Acid Res.* 22: 383-390)。KRCは、in

vitroにおいて上皮増殖因子受容体キナーゼ及びp34cdc2キナーゼの基質である (Bachmeyer, et al. 1999.

Nuc. Acid Res. 27, 643-648)。

【 0 0 0 7 】

ショウジョウバエ (*Drosophila*) では、Schnurri (Shn) は、TGF- β スーパーファミリーの一員であるデカペンタプレジック (Dpp) の下流遺伝子の調節における胚形成過程において重要な役割を果たしている。Dppの受容体への連結反応により、Mad、すなわち*Drosophila* R-Smad homologueと組み合わせられるMed、すなわち*Drosophila* Co-Smad homologueを生ずるシグナル・カスケードが開始される (Dai, H., et

al. (2000). *Dev Biol* 227, 373-387)。前記のMad/Med複合体が、Shnと相互作用する核

に移動する。Shnが、Brinker (Brk) の調節領域に結合する前記のMad/Med複合体に、必須な転写コリプレッサーを補充することが示された。Brkは、Dppにより媒介される発現の包括的なリプレッサーであるので、Brk発現のShnにより誘発されたリプレッションにより、目的の遺伝子の発現を誘発するDppの能力が促進される (Arora, K., et

al. (1995). *Cell* 81, 781-790;

Dai, H., et al. (2000). *Dev Biol* 227, 373-387; Marty, T., et al. (2000). *Nat Cell Biol* 2, 745-749)。

【 0 0 0 8 】

多くの研究により、Shn3が、NF- κ B及びAP-1を含む重要な他の転写プロテインの活性を調節することが示されたが、TGF- β シグナリングにおける哺乳動物のShn遺伝子の役割は未だ同定されていない (Hong, J. W., et

10

20

30

40

50

al. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12301-12306; Oukka, M., et al.

(2004). J Exp Med 199, 15-24; Oukka, M., et al. (2002). Mol Cell

9, 121-131)。さらに、Shn3のin vivoにおける役割は、ほとんどわかっていない。

【 0 0 0 9 】

骨は、マトリックス構成成分が連続的に作り直されて、骨格の構造的な完全性を維持する動的な組織である。骨のリモデリングは、正常な生理学的状態においてその前に骨の再吸収が起こった部位でのみ骨の形成が起こる、循環プロセスである。前記の骨格の恒常性リモデリングは、独占的ではないが破骨細胞及び骨芽細胞により主として伝達される (Erlebacher, A., et al. (1995). Cell 80,

10

371-378)。破骨細胞は、骨の再吸収を担う造血器起源の巨大な多核細胞である。間葉の幹細胞に由来する骨芽細胞は、骨形成表面で前記のマトリックス構成成分を合成する。これらの細胞の増殖、分化及び骨リモデリングの活性は、成長因子、シグナリングプロテイン及び転写因子の複雑な一時的なネットワークを含んでいる (Karsenty, G., and Wagner, E. F. (2002). Dev Cell 2, 389-406)。いずれか一つの構成成分の調節異常により、前記のリモデリングプロセスが中断され、そしていくらかの骨格疾患の病因、例えば骨粗しょう症及びパジェット病のような疾患の一因を助長する。まとめて大理石骨病と称される、破骨細胞の欠陥に起因する上昇した骨量を生ずる希少な単一遺伝子疾患 (Rare single gene disorder) が確認された。骨量の増加を生ずる、まとめて骨硬化症と称される、例えばCamerati-Engelman症候群のような希単一遺伝子疾患は、実質的に上昇した骨芽細胞活性に起因する (Appendix 2003)。

20

【 0 0 1 0 】

転写因子Runx2は、胚の発達の期間における骨芽細胞の分化の主な制御因子である。それは多くの核転写因子、コアクチベーター及び細胞外シグナルを解釈するアダプタープロテインと相互作用して、恒常性の骨芽細胞の発達及び活性を保証する (Lian, J. B., et al. (2004). Crit Rev Eukaryot Gene Expr 14, 1-41; Stein,

G. S., et al. (2004). Oncogene 23, 4315-4329)。Runx2において突然変異が起きると、ヒト常染色体優性疾患 鎖骨頭蓋骨形成不全 (human autosomal dominant disease cleidocranial dysplasia) が発症する (Lee, B., et al. (1997). Nat Genet

30

16, 307-310; Mundlos, S., et al. (1997). Cell 89, 773-779; Otto, F., et al. (1997). Cell 89, 765-771)。Runx2^{-/-}マウスでは、無機質を含まない骨格を生ずる、軟骨内骨化及び膜性骨化の両方が完全に欠けている (Komori, T., et al. (1997). Cell 89, 755-764;

Otto, F., et al. (1997). Cell 89, 765-771)。胚の発達期間における骨芽細胞の分化に関する分子レベルでのメカニズムの解明における重要な進歩とは対照的に、少数の遺伝子のみが、生後の骨芽細胞の機能を調節することが知られている (Yoshida, Y., et al. (2000). Cell 103, 1085-1097;

Kim, S., et al. (2003) Genes Dev 17, 1979-1991)。Wnt受容体であるLRP5は、成人及びげっ歯類の骨量の調節に重要である (Johnson, M. L., et al. (2004). J Bone Miner Res 19, 1749-1757)。Runx2は、骨芽細胞の分化に中心的な役割を果たすだけでなく、生後の骨形成に重要であることが示されたもう一つのプロテインであるATF4 (Yang, X., et al. (2004). Cell 117, 387-398) の誘導を通じて成体マウスにおいて成熟した骨芽細胞活性も部分的に調節する (Ducy, P., et al. (1999). Genes Dev 13, 1025-1036)。

40

TGFβは、Smurf1と称されるSMAD3 E3リガーゼの活性を通じて部分的に媒介される骨ホメオスタシスにおいて複雑な機能を有する。

【 0 0 1 1 】

トランスホーミング増殖因子-β (TGF-β) は、骨格パターン形成、骨リモデリング及び骨マトリックス形成に重要な役割を果たすことがしばしば知られている (Chang, H., et al. (2002). Endocr Rev 23,

50

787-823)。

TGF- β は、骨芽細胞形成の過程で多面的な役割を果たしていることが知られている。TGF- β は、初期の骨芽細胞の分化を促進するが、成熟への後期ステージを阻害することが示された (Canalis, E. (2003). Osteogenic Growth Factors. In Primer on the Metabolic Bone Disease

and Disorders of Mineral Metabolism, M. J. Favus, ed. (The American Society for Bone and Mineral Research), pp. 28-31.)。TGF- β は、ポジティブ及びネガティブに遺伝子転写を調節することができるので骨芽細胞における異なる細胞応答を誘発することができる (Alliston, T., et al. (2001). *Embo J* 20,

2254-2272; Takai, H., et al. (1998). *J Biol Chem* 273, 27091-27096)。TGF- β による遺伝子発現の活性化及び抑制の両者は、広範囲に分布するSmadプロテインの同じセットを利用する。しかしながら、Smadに結合する特異的なコファクターは、TGF- β への応答においてアップレギュレート又はダウンレギュレートされるかどうかを指示すると信じられている (Shi, Y., and Massague, J. (2003). *Cell* 113, 685-700)。同様な転写メカニズムにより、骨芽細胞の分化に関するTGF- β の様々な効果のを説明することができる。骨芽細胞の分化の初期に発現する転写コファクターは、分化の初期ステージを駆動するTGF- β の下流遺伝子を調節するのに必要とされる。ついで、骨芽細胞の分化の後期に発現する異なるコファクターは、TGF- β が成熟への最終ステージを抑制するのに必要である。

【0012】

骨芽細胞の活性に影響する前記のコファクターの更なる解明は、骨形成及び鉱化作用を調節することができる薬剤を同定する場合に価値がある。前記の薬剤の同定及び前記の薬剤を使用する方法は、骨の形成が高められたり又は抑制されたりことから利点が得られるであろう疾患の治療において非常に有益である。

【0013】

本発明の要約

本発明は、Shn3、Runx2、SMAD3及び/又はWWP1と相互作用することによる骨形成及び鉱化作用を調節する低分子化合物を同定する新規なスクリーニング方法に少なくとも部分的に基づいている。KRCにおける無発現変異を負ったマウスが、高められた骨芽細胞活性及び骨形成に起因する顕著な骨硬化性表現型を示したことから、KRCは、骨芽細胞の形成及び鉱化作用を調節することが見出された。骨芽細胞においてKRC、Runx2、Smad3及びE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成をシグナリングするTGF- β のダウンストリームが促進される。なお、E3ユビキチンリガーゼであるWWP1は、Runx2ポリユビキチン及びプロテアソーム依存を促進するWWP1の能力によりRunx2機能を阻害する。KRCは、この複合体の不可欠かつ必要とされる構成成分である。なぜならば、骨芽細胞にそれが存在しないとRunx2プロテインのレベルが上昇し、Runx2転写活性が促進され、Runx2標的遺伝子の転写が引き上げられ、そして*in vivo*において骨形成が大いに増加するからである。本発明は、また、KRC及びWWP1が、また、RSK2と複合体を形成し、そしてRSK2ユビキチン化を促進するというWWP1の能力によりRSK2機能を阻害するという発見に少なくとも部分的に基づいている。

【0014】

したがって、一つの態様では本発明は、骨形成及び鉱化作用を増加させるための方法であって、

- a) (i) KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性なフラグメントを含む細胞インジケータ組成物及び(ii)前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、
- b) 前記のインジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、
- c) 前記の供試化合物の存在下又は非存在下において前記のレポーター遺伝子の発現を評価するステップ、
- d) 前記のレポーター遺伝子の発現を増加させる、関心ある化合物を供試化合物のライブ

ラリーから選択するステップ、

e) KRC、WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含む間葉の幹細胞を、前記の関心のある化合物と接触させるステップ、及び

前記の供試化合物の存在下又は非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を測定し、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定させるステップを含む、

間葉の幹細胞の分化を増加させる、前記の関心ある供試化合物の活性を評価するステップを含む、方法に関するものである。

【0015】

一つの態様では、前記のインジケータ細胞は骨芽細胞である。一つの態様では、前記の骨芽細胞は成熟した骨芽細胞である。

【0016】

一つの態様では、前記のレポーター遺伝子はルシフェラーゼである。一つの態様では、前記のルシフェラーゼは機能的にオステオカルシンプロモーターとリンクしている。

【0017】

一つの態様では、前記のインジケータ組成物は前記のPPXYドメインを含む、Runx2の生物学的に活性な部分を含む。もう一つの態様では、前記のインジケータ組成物は前記のHECTドメインを含む、WWP1の生物学的に活性な部分を含む。一つの態様では、前記のインジケータ細胞は完全長のKRCポリペプチドを含む。一つの態様では、前記のKRCポリペプチドは、前記のインジケータ細胞に対して内因性である。もう一つの態様では、前記のKRCポリペプチドは、前記のインジケータ細胞に対して外因性である。。

【0018】

一つの態様では、前記の方法はハイスループット法である。一つの態様では、前記のハイスループット法は、96ウエルフォーマットで実施される。

【0019】

一つの態様では、間葉の幹細胞の分化への前記の関心のある供試化合物の効果は、細胞アルカリホスファターゼ(ALP)のレベルを決定することにより評価される。

もう一つの態様では、細胞アルカリホスファターゼ(ALP)への前記の関心ある供試化合物の効果は、比色法により評価され、その方法は、Alamar blue染色により細胞アルカリホスファターゼ(ALP)のレベルに対する細胞数を標準化するステップを更に含んでもよい。

【0020】

一つの態様では、関心のある供試化合物は、さらに鉱化作用への効果について評価される。一つの態様では、鉱化作用への前記の関心のある供試化合物の効果を評価するステップは、xylenol orange染色法により決定される。

【0021】

一つの態様では、本発明の方法は、WWP1を含むインジケータ組成物又はその生物学的に活性なフラグメントを供給するステップ、前記のインジケータ組成物を前記の関心ある供試化合物に接触させるステップ、及び前記の関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への前記の関心ある供試化合物の効果を決定するステップを含む、

WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を調節する前記の関心ある供試化合物の活性を評価するステップをさらに含む。

【0022】

一つの態様では、本発明の方法は、WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップを含む、WWP1とRunx2との間の相互作用を減少させる、前記の関心ある化合物の活性を評価するステップ、前記のインジケータ組成物を前記の関心ある化合物に接触させるステップ、及び、

前記の供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRunx2との間の相互作用への前記

10

20

30

40

50

の関心ある化合物を決定するステップをさらに含む。

【0023】

一つの態様では、前記の相互作用は、WWP1とRunx2との間の複合体の形成を測定することにより決定される。もう一つの態様では、前記の相互作用は、前記の供試化合物の存在下又は非存在下において前記のRunx2の分解を測定することにより決定される。更なるもう一つの態様では、前記の相互作用は、前記のRunx2のユビキチン化を測定することにより測定される。一つの態様では、前記の相互作用は、前記のRunx2 mRNAの産生を測定することにより測定される。もう一つの態様では、前記の相互作用は、前記のRunx2プロテインレベルを測定することにより測定される。

10

【0024】

一つの態様では、本発明の方法は、前記の関心ある化合物の化学構造を変化させて、最適な化合物を得るステップをさらに含む。

【0025】

一つの態様では、本発明の方法は、ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて、前記の関心ある供試化合物を、骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物として同定する、前記の供試化合物を投与するステップ及び前記の供試化合物の存在下又は非存在下において骨形成及び鉱化作用への前記の関心ある化合物の効果を決定するステップを含む、ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用への前記の関心ある化合物の効果を決定するステップをさらに含む。

20

【0026】

一つの態様では、前記のヒト以外の成体動物はマウスである。一つの態様では、前記のマウスは雌性マウスである。一つの態様では、前記の雌性マウスは卵巣が摘出されている。一つの態様では、前記のヒト以外の動物は、WWP1を過剰に発現するトランスジェニックマウスである。一つの態様では、前記のWWP1を過剰に発現するトランスジェニックマウスはヒトWWP1を過剰に発現する。一つの態様では、前記のトランスジェニックマウスはヒトWWP1の条件対立遺伝子を含む。一つの態様では、前記のヒトWWP1の条件対立遺伝子は、骨芽細胞に対するWWP1の発現を空間的に制限する。もう一つの態様では、前記のヒトWWP1の条件対立遺伝子はI型コラーゲンプロモーターを含む。

30

【0027】

一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱の数を測定することにより決定される。もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱の厚さを測定することにより決定される。更なるもう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱のスペーシングを測定することにより決定される。一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、骨体積を測定することにより決定される。もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、容積測定の前記の骨無機質密度を測定することにより決定される。更なるもう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱の数、小柱の厚さ、小柱の空間、骨体積、及び容積測定の前記の骨無機質密度を測定することにより決定される。

40

【0028】

一つの態様では、本発明の方法は、Trabp5b及びデオキシピリジノリン(Dpd)の血清におけるレベルを決定するステップを更に含む。

【0029】

もう一つの態様では、本発明は、
a) KRC、WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性な部分を含む間葉の幹細胞を供給するステップ、
b) 前記のインジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、及び
c) 前記の間葉の幹細胞を骨芽細胞に分化させるのを増加させる関心ある化合物を、供試

50

化合物のライブラリーから選択し、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、

骨形成及び鉱化作用を増加させるのに有用な化合物を同定する方法に関するものである。

【0030】

一つの態様では、間葉の幹細胞の分化への効果は、細胞アルカリホスファターゼ (ALP) のレベルを決定することにより評価される。一つの態様では、細胞アルカリホスファターゼ (ALP) のレベルへの効果は、比色定量法により評価される。一つの態様では、本発明の方法は、Alamar blue染色法により細胞アルカリホスファターゼ (ALP) のレベルに対する細胞数を基準化するステップを更に含む。もう一つの態様では、本発明の方法は、鉱化作用への前記の供試化合物の効果を評価するステップを更に含む。一つの態様では、鉱化作用への前記の供試化合物の効果を評価するステップは、xylenol orange染色法により決定される。

10

【0031】

一つの態様では、本発明の方法は、

WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、

前記のインジケータ組成物を関心ある供試化合物に接触させるステップ、及び前記の関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への前記の関心ある供試化合物の効果を決定するステップ、

を含む、

20

WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を調節する前記の関心ある供試化合物の能力を評価するステップを

更に含む。

【0032】

もう一つの態様では、本発明の方法は

WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、

前記のインジケータ組成物を関心ある供試化合物に接触させるステップ、及び前記の関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRunx2との間の相互作用への前記の関心ある供試化合物の効果を決定するステップを含む、

30

WWP1とRunx2との間の相互作用を減少させる前記の関心ある供試化合物の活性を評価するステップ、を更に含む。

【0033】

一つの態様では、前記の相互作用は、WWP1とRunx2との間の複合体の形成を測定することにより決定される。もう一つの態様では、前記の相互作用は、前記の供試化合物の存在下及び非存在下においてRunx2の分解を測定することにより決定される。更なるもう一つの態様では、前記の相互作用は、Runx2のユビキチン化を測定することにより測定される。一つの態様では、前記の相互作用は、Runx2 mRNAの産生を測定することにより測定される。もう一つの態様では、前記の相互作用は、Runx2プロテインレベルを定量することにより測定される。

40

【0034】

一つの態様では、本発明の方法は、最適化された化合物を得るために前記の関心のある供試化合物の化学構造を変化させるステップをさらに含む。

【0035】

一つの態様では、本発明の方法は、前記の動物に前記の供試化合物を投与するステップ、及び

ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて、前記の関心のある供試化合物を骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物として同定する、前記の供試化合物の存在下及び非存在下において骨形成及び鉱化作用への供試化合物の効果を決定するステップを含む、

50

ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用への前記の関心のある供試化合物の効果を決定するステップ、さらに含む。

【0036】

一つの態様では、前記のヒト以外の成体動物はマウスである。一つの態様では、前記のマウスは雌性マウスである。

【0037】

一つの態様では、前記の雌性マウスは、卵巣が摘出されている。一つの態様では、前記のヒト以外の成体動物は、WWP1を過剰に発現するトランスジェニックマウスである。一つの態様では、前記のWWP1を過剰に発現するトランスジェニックマウスは、ヒトWWP1を過剰に発現する。一つの態様では、前記のトランスジェニックマウスは、ヒトWWP1条件対立遺伝子を含む。一つの態様では、前記のヒトWWP1の条件対立遺伝子は、骨芽細胞へのWWP1の発現を空間的に制限する。一つの態様では、前記のヒトWWP1の条件対立遺伝子は、I型コラーゲンプロモーターを含む。

10

【0038】

一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱数を定量することにより測定される。もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱の厚さを定量することにより測定される。一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱スペーシングを測定することにより決定される。一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、骨体積を測定することにより決定される。

【0039】

もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、容積測定の前記骨無機質密度を定量することにより測定される。更なるもう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、小柱の数、小柱の厚さ、小柱の空間、骨体積、及び容積測定の前記骨無機質密度を測定することにより決定される。

20

【0040】

一つの態様では、本発明の方法は、Trabp5b及びデオキシピリジノリン(Dpd)の血清におけるレベルを決定するステップを更に含む。

【0041】

一つの態様では、前記のWWP1の生物学的に活性なフラグメントは、HECTドメインを含む。

30

【0042】

もう一つの態様では、本発明は、

- a) (i) KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性な部分を含む細胞インジケータ組成物、並びに(ii)前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、
- b) 前記のインジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、
- c) 前記の供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、
- d) 前記のレポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、
- e) 間葉の幹細胞を関心のある供試化合物の活性と接触させるステップ、及び前記の供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を測定するステップを含む、
- f) WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、前記のインジケータ組成物を関心ある供試化合物と接触させるステップ、及び関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への前記の供試化合物の効果を決定するステップを含む、

40

50

WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を減少させる、ステップ e) から得られた関心ある供試化合物の能力を評価するステップ、

g) WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を供給するステップ、前記のインジケータ組成物を関心ある供試化合物と接触させるステップ及び関心ある供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRunx2との間の相互作用への前記の供試化合物の効果を決定するステップを含む、

WWP1とRunx2との間の相互作用を減少させる、ステップ e) から得られた関心ある供試化合物の能力を評価するステップ、及び

h) ヒト以外の動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて前記の関心のある供試化合物を、骨形成及び鉱化作用を増加する化合物として同定する、

前記の供試化合物の存在下及び非存在下において骨形成及び鉱化作用への前記供試化合物の効果を決定するステップを含む、

ヒト以外の動物における骨形成及び鉱化作用へのステップ g) から得られた関心ある供試化合物の効果を決定するステップを含む、

骨形成及び鉱化作用を増加させるのに有用な化合物を同定する方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

一つの態様では、SMAD3分子もまた、前記のインジケータ組成物に存在している。もう

一つの態様では、RSK2分子もまた、前記のインジケータ組成物に存在している。

さらなるもう一つの本発明の態様は、

a) (i) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性なフラグメントを含む細胞インジケータ、並びに(ii)前記のRSK2ポリペプチド又はそれ生物学的に活性なフラグメントに反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、

b) 前記のインジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、

c) 前記の供試化合物の存在下又は非存在下における前記レポーター遺伝子の発現を評価するステップ、

d) 前記のレポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記供試化合物のライブラリーから選択するステップ、

e) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的活性のフラグメントを含む間葉の幹細胞を、関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を測定し、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、

骨形成及び鉱化作用を増加させるのに有用な化合物を同定する方法を提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明のもう一つの態様は、

a) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性な部分を含む間葉の幹細胞を供給するステップ、

b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステップ、及び

c) 骨芽細胞への間葉の幹細胞分化を増加させる、関心のある化合物を供試化合物ライブラリーから選び、それでもって骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物を同定するステップを含む、

骨形成及び鉱化作用を増加させるのに有用な化合物を同定する方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明の一つ態様は、

a) (i) KRC、WWP1及びRSK2又はその生物学的に活性な部分を含む細胞インジケータ組成物、並びに(ii)前記Runx2ポリペプチド又はその生物学的に活性な部分に反応するレポーター遺伝子を供給するステップ、

b) 前記インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させるステ

10

20

30

40

50

ップ、

c) 前記供試化合物の存在下又は非存在下における前記のレポーター遺伝子の発現を評価するステップ、

d) 前記レポーター遺伝子の発現を増加する関心のある化合物を前記の供試化合物のライブラリーから選択するステップ、

e) 間葉の幹細胞を関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記供試化合物の存在下及び非存在下において間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果を決定するステップを含む、

間葉の幹細胞の分化を増加させる、ステップ d) から得られた前記の関心のある供試化合物の能力を評価するステップ、

f) WWP1又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケーター組成物を供給するステップ、前記インジケーター組成物を前記の関心のある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記の関心のある供試化合物の存在下及び非存在下においてWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への前記の関心のある化合物の効果を決定するステップを含む、

WWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を減少させるステップ e) から得られた関心のある供試化合物の能力を評価するステップ、及び / 又は

g) WWP1及びRSK2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケーター組成物を供給するステップ、

前記のインジケーター組成物を前記の関心ある供試化合物と接触させるステップ、及び

前記の供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRSK2との間の相互作用への前記の関心ある供試化合物の効果を決定するステップを含む、

WWP1とRSK2との間の相互作用を減少させる、ステップ e) から得られた前記の関心ある供試化合物の能力を評価するステップ、

h) ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用の増加に基づいて、前記関心のある供試化合物を、骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物として同定する、

前記の動物に前記の供試化合物を投与するステップ及び前記の供試化合物の存在下及び非存在下において骨形成及び鉱化作用への供試化合物の効果を決定するステップを含む、

ヒト以外の成体動物において骨形成及び鉱化作用へのステップ g) から得られた前記の関心のある化合物の効果を決定するステップを含む、

骨形成及び鉱化作用を増加させるのに有用な化合物を同定する方法を提供する。

【0046】

本発明の詳細な説明

本発明は、KRCが、Runx2、SMAD3及び / 又はWWP1との相互作用により骨形成及び鉱化作用を調節するという発見に少なくとも部分的に基づいている。骨芽細胞におけるTGF- β シグナリングは、KRC、Runx2、Smad3及びE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成を促進する。なお、WWP1は、Runx2のポリユビキチン化及びプロテオソームに依存する分解を促進するというWWP1活性のためRunx2の機能を阻害する。KRCは、前記の複合体の不可欠及び必要とされる構成成分である。なぜならば、骨芽細胞にそれが存在しないと *in vivo* で不完全な破骨細胞が発生するのみならず、Runx2プロテインのレベルが上昇し、Runx2転写活性が促進され、Runx2標的遺伝子の転写が上昇し、そして *in vivo* において骨形成が大いに増加するからである。本発明は、また、KRC及びWWP1が、また、RSK2と複合体を形成し、そしてRSK2ユビキチン化を促進するというWWP1の活性によりRSK2キナーゼ機能を阻害するという発見に少なくとも部分的に基づいている。

【0047】

KRCプロテイン (kB binding and

putative recognition component of the V(D)J Rssの略) は、本明細書ではSchnurri-3 (Shn3) と同義であり、2282個のアミノ酸を含むDNA結合プロテインである。KRCは、T細胞、B細胞及びマクロファージに存在することが確認されている。KRC cDNA配列は、SEQ ID NO:1に開示されている。KRCのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2に開示されている。KRCは、

10

20

30

40

50

kBモチーフに結合するジンクフィンガープロテインのファミリーの一員である (Bachmeyer, C, et al., 1999. *Nuc. Acids. Res.* 27(2):643-648)。ジンクフィンガープロテインは、KRCにより代表される3つのクラスに分けられ、そして2つのMHC Class I遺伝子エンハンサー結合プロテイン、すなわちMBP1及びMBP2に分類される (Bachmeyer, C, et al., 1999. *Nuc. Acids. Res.* 27(2):643-648)。

【0048】

ジンクフィンガープロテインは、高度に保存されたCys2His2ジンクフィンガーの存在により同定される。前記のジンクフィンガーは、ZASドメインと呼ばれるDNA結合構造の不可欠な部分である。前記のZASドメインは、一対のジンクフィンガー、グルタミン酸/アスパラギン酸リッチ酸性配列及びセリン/スレオニンリッチ配列を含まれる。前記のZASドメインは、遺伝子のプロモーター領域又はエンハンサー領域に見られるkB様シス作動性調節エレメントと相互作用することが示された。これらのジンクフィンガープロテインにより標的とされる前記の遺伝子は主に免疫応答に關与する。

【0049】

特にKRC ZASドメインは、Cys2-His2ジンクフィンガーに続いて、グルタミン酸/アスパラギン酸リッチ酸性配列、及びセリン/スレオニン-プロリン-X-アルギニン/リジン配列の5つのコピーを有している。サウスウエスタンブロット法、電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) 及びメチル化干渉法により、KRC組換えプロテインは、Rss配列のみならずkBモチーフにも結合し (Bachmeyer, et al. 1999. *Nuc. Acid Res.* 27, 643-648; Wu et al. 1998. *Science* 281, 998-1001) 及び高度に秩序化された複合体で結合することが示された (Mak, C. H., et al. 1994. *Nuc. Acid Res.* 22, 383-390.; Wu et al. 1998. *Science* 281, 998-1001)。

【0050】

同じようなジンクフィンガー-酸性ドメイン構造は、ヒトのKBP1、MBP1及びMBP2、ラットのATBP1及びATBP2、並びにマウスのaA-CRYBPプロテインにも存在する。最近になり、KRCは、マウスの転移関連の遺伝子であるs100A4/mts1*のSbエレメント (kBと同じような配列) に結合することにより、マウスの転移関連の遺伝子であるs100A4/mts1*の転写を調節することが示された (Hjelmsoe, I., et al. 2000. *J. Biol. Chem.* 275(2):913-920)。プレB細胞核プロテインキナーゼが、KRCプロテインのセリン残基及びチロシン残基をリン酸化するという事実から立証されるように、KRCは、翻訳後修飾により調節される。リン酸化によりDNAへの結合が増加することから、KRCが前記の細胞表面から伝達されたシグナルに应答するというメカニズムが導きだされる (Bachmeyer, C, et al., 1999. *Nuc. Acids. Res.* 27(2):643-648)。シグナル伝達における中心的な役割を果たす、二つの顕著なser/thr-特異的プロテインキナーゼは、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼA (PKA) 及びそのプロテインキナーゼC (PKCファミリー) である。マイトジェン活性化プロテイン (MAP) キナーゼのファミリーを含む、非常に多い他のセリン/スレオニン特異的キナーゼは、成長因子受容体か又はサイトカイン受容体のシグナリングのいずれか一方において活性化される重要なシグナル伝達プロテインとして機能している。細胞内のシグナリングに重要な、他のプロテインser/thrキナーゼは、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CaM-kinase II) 及びc-raf-癌原遺伝子である。KRCは、in vitroにおいて上皮増殖因子受容体キナーゼ及びp34cdc2キナーゼの基質であることが知られている。

【0051】

ベイトとして前記の第三ジンクフィンガーを含む、KRCの204番目から1055番目のアミノ酸配列を使用した酵母の二つのハイブリッドスクリーニングの結果から、KRCがTRAFプロテインのファミリーと相互作用すること、及びこの相互作用がTRAF Cドメインを通じて起こること、及びKRCが、TRAF5及びTRAF6の相互作用よりも高い親和性によりTRAF2と相互作用することが明らかになった (PCT/US02/14166の実施例1を参照。)。

【 0 0 5 2 】

最近の研究により、TNFRシグナル伝達カスケードに關与する腫瘍壊死因子受容体關連因子についてTRAFと名付けられたポリペプチド因子が分離された。TRAFプロテインファミリーの6つのメンバーが哺乳動物細胞において同定された (Arch, R.H., et al. 1998. *Genes Dev.* 12, 2821-2830)。

TRAF1を除くすべてのTRAFプロテインは、多くの部分から成るジンクフィンガーの連続した長さ続く、 Zn^{2+} の結合を配位するシステイン及びヒスチジンの特徴的なパターンを有する、アミノ末端にRINGフィンガードメインを含む (Borden, K. L. B., et al. 1995. *EMBO J* 14, 1532-1521)。すべてのTRAFは、受容体への結合に必要であり、二つの部分に分けられる、高度に保存されたカルボキシ末端ドメイン (TRAF-Cドメイン)、TRAFプロテインのホモ二量体化又はヘテロ二量体化、及びそれらの關連する受容体と前記のアダプタープロテインの結合を媒介する高度に保存されたドメイン、及び超らせん立体配置を取るアミノ末端ハーフを共通して含んでいる。TRAF分子は、組織分布の顕著なパターンを有し、様々な細胞表面の受容体により補充され、TRAF欠損マウスの分析により最も明確に明らかにされているように顕著な機能を有している (M. A., et al. 1999. *Genes Dev.* 13, 1015-24; Nakano, H., et al. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9803-9808; Nguyen, L. T., et al. 1999. *Immunity* 11, 379-389; Xu, Y., et al. 1996. *Immunity* 5, 407-415.; Yeh, W. C., et al. 1997. *Immunity* 7, 715-725を参照。)。

10

20

【 0 0 5 3 】

腫瘍壊死因子 (TNF) は、広範囲の生物学的効果を引き出す活性化されたマクロファージにより主として産生されるサイトカインである。これらは、エンドトキシンショック、炎症活性、免疫調節活性、増殖活性、細胞毒性活性及び抗ウイルス活性において重要な役割を含んでいる (Goeddel, D. V. et al., 1986. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 597-609; Beutler, B. and Cerami, A., 1988. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 505-518; Old, L. J., 1988. *Sci. Am.* 258(5): 59-75; Fiers, W. 1999. *FEBS Lett.* 285(2):199-212によりレビューされている。)。

30

TNFにより媒介される様々な細胞の応答の誘起は、二つの異なった細胞表面の受容体、すなわち、およそ55 kDaの受容体であるTNFR1及びおよそ75 kDaの受容体であるTNFR2との相互作用により開始される。受容体の両タイプに対応するヒト及びマウスのcDNAは分離され、そしてその特性が明らかにされている (Loetscher, H. et al., 1990. *Cell* 61:351; Schall, T. J. et al., 1990. *Cell* 61: 361; Smith, C. A. et al., 1990 *Science* 248: 1019; Lewis, M. et al., 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2830-2834; Goodwin, R. G. et al., 1991. *Mol. Cell. Biol.* 11:3020-3026)。

40

【 0 0 5 4 】

TNF α は、二つの異なる受容体であるTNFR1及びTNFR2に結合するが、殆どの細胞のタイプにおいて、NFkB活性化及びJNK/SAPK活性化は、主としてTNFR1を通じて起こる。TNFR1は、セリンスレオニンキナーゼであるRIP及びTRAF2を含む他のプロテインの補充のためにアダプタープロテインとして機能するTRADDと相互作用することが知られている。6種のTRAFのうちで、TRAF2、TRAF5及びTRAF6の全ては、NFkB活性化とリンクし (Cao, Z., et al. 1996. *Nature* 383: 443-6; Rothe, M., et al. 1994. *Cell* 78: 681-692; Nakano, H., et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:14661-14664)、そして特にTRAF2は、TRAF2が欠損した細胞又はTRAF2の主なネガティブフォームを発現する細胞においてこのMAPキナーゼを活性化するTNF α の欠陥により明確に示されるように、前記のJNK/SAPKプロテインの活性化にリンクしている

50

(Yeh, W. C., et al. 1997. *Immunity* 7: 715-725; Lee, S. Y., et al. 1997. *Immunity* 7:1-20)。

【 0 0 5 5 】

本発明の様々な態様を、さらに詳細に以下のサブセクションに記載する。

I. 定義

本明細書で使用されているように、「KRC」は、「Shn3」又は「schnurri 3」と同義であり、V(D)J RssのkB結合及び仮想認識コンポーネントを意味し、kB binding and putative recognition component of the V(D)J Rssの略である。KRCのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1に開示され、そしてKRCのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2に開示されている。KRCのZASドメインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2の1497-2282のアミノ酸配列（すなわち、SEQ ID NO:4）に開示されている。KRC trのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2の204-1055のアミノ酸配列に開示されている。

本明細書で使用されているように、「KRC」という用語は、特定のSEQ ID NOを引用して具体的に使用しないかぎり、以下に定義されるようにKRCファミリーポリペプチドを意味すると理解されるであろう。

【 0 0 5 6 】

「KRCファミリーポリペプチド」は、KRCの構造ドメイン又はモチーフを有するプロテイン又は核酸分子、及び以下に定義されるようにKRC分子とアミノ酸配列又は核酸配列の十分な相同性を有するプロテイン又は核酸分子を含むことを意味する。前記のファミリーメンバーは、天然又は非天然であってもよく、同一種又は異なる種から得られてもよい。たとえば、ファミリーは、ヒト由来の他の異なるプロテインのみならず、ヒト由来の最初のプロテインを含むことができる。あるいは、ファミリーはヒト以外の由来源のホモログを含むことができる。好ましいファミリーメンバーは、また、共通の機能的な特徴を備えていてもよい。好ましいKRCポリペプチドは、以下の一つ以上のKRCの特徴、すなわち一对のCys2-His2ジンクフィンガーに続くGluリッチ及びAspリッチ酸性ドメイン及びDNAに結合すると考えられるser/Thr-Pro-X-Arg/Lys配列の5個のコピーを含む。もう一つの好ましいKRCファミリーポリペプチドは、SEQ ID NO:2の204-1055のアミノ酸配列（例えば、「KRCと相互作用するドメイン」（KRC tr））を含む。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用されているように、「KRC活性」、「KRC生物学的活性」又は「KRCポリペプチドの活性」は、KRC、例えばKRC trのようなKRCファミリーポリペプチド、又はKRCが関与するシグナル伝達経路により制御される活性を調節する能力を含む。例えば、一つの態様ではKRC生物学的活性は、免疫応答の調節を含む。もう一つの態様では、KRCは骨形成及び鉱化作用を調節する。典型的なKRC活性としては、例えば免疫細胞の活性化及び/若しくは増殖の調節（例えばサイトカイン遺伝子の発現を調節することによる）、細胞の生存の調節（例えばアポトーシスを調節することによる）、シグナリング経路を経由してのシグナル伝達の調節（例えばNFkBシグナリング経路、JNKシグナリング経路及び/若しくはTGFbシグナリング経路の調節による）、アクチンのポリマー化の調節、AP-1のユビキチン化の調節、TRAFのユビキチン化の調節、c-Junの分解の調節、c-Fosの分解の調節、SMADの分解、GATA3の分解、GATA3の発現の調節、Th2細胞の分化の調節、Th2サイトカイン産生の調節、IgA産生の調節、GLa転写の調節、骨の成長の調節、骨の鉱化作用の調節、破骨細胞形成の調節、例えば骨形成及び/若しくは骨のリモデリングにおける骨芽細胞活性対破骨細胞活性の調節、オステオカルシン遺伝子の転写の調節、例えばRunx2プロテインレベルの調節のようなRunx2の分解、Runx2のユビキチン化、RSK2の発現の調節、例えばRSK2プロテインレベルの調節のようなRSK2の分解、RSK2のユビキチン化の調節、RSK2のリン酸化の調節、RSK2のキナーゼ活性の調節、BSP、Co11(a)1、OCN、Osterix、RANKL及びATF4の発現の調節、ATF4プロテインレベルの調節、並びに/又はATF4のリン酸化の調節が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本明細書において使用されているように、「調節」という用語の様々な形態は、刺激（

例えば特定の応答又は活性を増加又はアップレギュレートさせる)及び阻害(例えば特定の応答又は活性を減少又はダウンレギュレートさせる)を含むことを意図されている。

【0059】

上記及び添付された実施例のように、KRCは、TGF- β シグナリングの下流である分子の複雑な相互作用を通じて骨の形成及び鉱化作用を調節する。一つの態様では、前記のKRC活性は、例えばKRCがターゲットとする分子又は結合パートナーとの結合のような直接的な活性である。本明細書で使用されているように、「標的分子」、「結合パートナー」又は「KRC結合パートナー」は、KRCプロテインが現実に結合又は相互作用し、KRCにより調節された機能を達成する分子である。

【0060】

本明細書で使用されているように、「TRAF」という用語は、TNF Receptor Associated Factorの略であり、TNF受容体関連因子を意味する(例えば、Wajant et al, 1999, Cytokine Growth Factor Rev 10:15-26を参照)。「TRAF」ファミリーは、TNF受容体スーパーファミリー及びインターロイキン-1受容体の多くのメンバーからのシグナル伝達を媒介する細胞質アダプタープロテインファミリーを含む(例えばArch, R.H. et al., 1998, Genes Dev.

12:2821-2830を参照)。本明細書で使用されているように、「TRAF Cドメイン」という用語は、TRAFファミリーメンバーに見られる高度に保存されたモチーフを意味する。

【0061】

本明細書で使用されているように、「KRC分子のTRAFが相互作用する部分」又は「KRC分子のc-Junが相互作用する部分」という用語は、TRAF又はc-Junと相互に作用するKRCの領域を含む。好ましい態様では、TRAF又はc-Junと相互に作用するKRCの領域は、SEQ ID NO: 2の204-1055のアミノ酸配列(SEQ ID NO:3)である。本明細書で使用されているように、「TRAF分子のKRCが相互作用する部分」という用語は、又は「c-Jun分子のKRCが相互作用する部分」という用語は、KRCと相互に作用するTRAF又はc-Junの領域を含む。好ましい態様では、KRCと相互に作用するTRAFの領域は、TRAF Cドメインである。

【0062】

本明細書で使用されているように、「相互作用する」という用語は、例えば酵母ツーハイブリッド法又は免疫共沈降法を使用して検出できるような分子間の検出可能な相互作用を含むことを意味する。相互作用という用語は、分子間で「結合する」という相互作用を含むことを意味する。相互作用は、現実にプロテイン-プロテイン又はプロテイン-核酸であってもよい。

【0063】

本明細書で使用されているように、「接触させる」という用語(すなわち、例えば免疫細胞のような細胞を化合物と接触させる)は、in vitroで前記の化合物と前記の細胞と一緒にインキュベートすること(例えば培養した細胞に前記の化合物を加えること)又は前記の化合物を被験体に投与して、前記の化合物がin vivoで前記の被験体の細胞が接触することを含むことを意図されている。「接触させる」という用語は、被験体に生まれつき発生するKRCモジュレーターへの細胞の曝露(すなわち、天然の生理学的なプロセスの結果として発生する曝露)を含むことを意図されていない。

【0064】

本明細書で使用されているように、「供試化合物」という用語は、KRC活性及び/若しくは発現のモジュレーター、並びに/又は骨形成及び/若しくは鉱化作用のモジュレーターであると以前に同定されていないか又は認識されていない化合物を含む。

【0065】

「供試化合物のライブラリー」という用語は、多数の供試化合物を含むパネル又はプールを意味するように意図されている。好ましくは、前記の供試化合物は、KRC活性又は骨形成を調節することが以前に知られていない。

【0066】

10

20

30

40

50

本明細書で使用されているように、「細胞を含まない組成物」という用語は、完全な細胞を含まない分離された組成物を意味する。細胞を含まない組成物の例としては、細胞抽出物及び分離されたタンパク質を含む組成物が挙げられる。

【0067】

本明細書で使用されているように、「インジケータ組成物」という用語は、関心のあるタンパク質（KRCを含むシグナル伝達経路におけるKRC又は分子）を含む組成物を意味し、例えば自然に前記のタンパク質を発現する細胞、前記のタンパク質をコードする発現ベクターを前記の細胞に形質導入することにより前記のタンパク質を発現するように設計された細胞、前記のタンパク質（例えば、分離された天然のタンパク質又は組み替えられたタンパク質）を含む細胞を含まない組成物が挙げられる。

10

【0068】

本明細書で使用されているように、「アンチセンス」核酸は、例えば二重螺旋のcDNA分子のコーディング螺旋に相補性である、mRNA配列に相補性であるか又は遺伝子のコーディング螺旋に相補性であるというような、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補性であるヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合により結合する。

【0069】

一つの態様では、本発明の核酸分子はsiRNA分子である。一つの態様では、本発明の核酸分子はRNAiを媒介する。RNA干渉（RNAi）は、二重螺旋RNA（dsRNA）を使用して、前記dsRNAと同じ配列を含むメッセンジャーRNA（mRNA）を分解する、転写後の標的遺伝子サイ

20

レンシング法である（Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999); Cottrell TR, and Doering TL. 2003. Trends Microbiol. 11:37-43; Bushman F.2003. Mol Therapy. 7:9-10; McManus MT and Sharp PA. 2002. Nat Rev Genet. 3:737-47)。前記のプロセスは、内因性のリボヌクレアーゼを比較的長いdsRNAをより短い、例えばスモール干渉RNA又はsiRNAと称される、21又は22ヌクレオチドからなるRNAに分解する。ついで、前記のより短いRNAセグメントは標的mRNAの分解を調節する。RNAiを合成するためのキットは、例えばNew England Biolabs or Ambionから市販されている。

一つの態様では、アンチセンスRNAに使用される、本明細書に開示された一つ以上の化学反応がRNAiを調節する分子に使用することができる。

30

【0070】

本明細書で使用されているように、「優性ネガティブ（dominant negative）」という用語は、天然（例えば、野生型）のKRC分子と競合するがKRC活性を有しない、例えばKRC分子（例えば、その一部分又はその変異体）を含む。前記の分子は、効果的に細胞中のKRC活性を下げる。

【0071】

本明細書で使用されているように、「NFkBシグナリング経路」という用語は、転写因子であるNFkBの活性化又は不活性化に関与し、かつNFkB因子により少なくとも部分的に調節される、本技術分野で知られているシグナリング経路の何れか一つを意味する（Karin, 1

40

998, Cancer J from Scientific American, 4:92-99; Wallach et al, 1999, Ann Rev of Immunology, 17:331-367)。一般的に、NFkBシグナリング経路は、細胞外からの影響、例えばマイトジェン、サイトカイン、及びストレス等に応答する。前記のNFkBシグナリング経路は、アポトーシスの調節に限定されるものではないが、これを含む細胞のプロセスの領域に関与する。これらのシグナリング経路は、しばしばNFkBの阻害ペプチド（IκB）のリン酸化状態を経由する活性化又は不活性化に関与するメカニズム含むので間接的にNFkBを活性化又は不活性化するが、決してこれに限定されるものではない。

【0072】

本明細書で使用されているように、「JNKシグナリング経路」という用語は、Junアミノ

50

末端キナーゼが関与している、本技術分野で知られているシグナリング経路の何れか一つを意味する (Karin, 1998, Cancer J from Scientific American, 4:92-99; Wallach et al, 1999, Ann Rev of Immunology, 17:331-367)。このキナーゼは、一般に細胞外からの影響、例えばマイトジェン、サイトカイン、及びストレス等に応答する。前記のJNKシグナリング経路は、アポトーシスの調節に限定されるものではないが、これを含む細胞のプロセスの領域に媒介する。好ましい態様では、JNKの活性化は、一つ以上のTRAFプロテインファミリーメンバーの活性を通じて発生する (例えばWajant et al, 1999, Cytokine Growth Factor Rev 10: 15-26を参照)。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用されているように、「TGF β シグナリング経路」という用語は、トランスホーミング増殖因子 - が関与している、本技術分野で知られているシグナリング経路の何れか一つを意味する。TGF β シグナリング経路は、この分子がtype I (TbRI) 及び type II (TbRII) のセリン/スレオニンキナーゼ受容体からなるヘテロ二量体細胞表面複合体に結合し、そしてこのヘテロ二量体細胞表面複合体を誘起するときを開始される。ついでこのヘテロ二量体受容体は、前記のシグナルを下流の標的SMADプロテインのリン酸化を通じて前記のシグナルを伝播する。SMADプロテインには三つの機能クラスがあり、それらは、例えばSMAD2及びSMAD3のような、受容体により制御されるSMAD (R-SMAD)、コメディエーター (Co-SMAD) 及び阻害SMAD (I-SMAD) である。前記のヘテロ二量体受容体複合体によるリン酸化に続いて、前記のR-SMADが前記のCo-SMADと複合体を形成し、そして前記の核に移り、他の各タンパク質と連携して、それらは標的遺伝子の転写を調節する (Derynck, R., et al. (1998) Cell 95: 737-740) Reviewed in Massague, J. and Wotton, D. (2000) EMBO J. 19:1745)。

【 0 0 7 4 】

ヒトSMAD2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 20127489に開示されている。ネズミSMAD2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 31560567に開示されている。ヒトSMAD3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:42476202に開示されている。ネズミSMAD3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 31543221に開示されている。

【 0 0 7 5 】

「GATA3」は、Th2細胞の発達に必要とされるTh2特異的転写因子である。GATA結合プロテインは、一致したWGATAR (WはA又はTであり、RはA又はGである。) に適合する標的サイトを認識する転写因子ファミリーを構成する。GATA3は、SMAD3と相互作用し、ついでTヘルパー細胞の分化を誘起するTGF β シグナリングによりリン酸化される。ヒトGATA 3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No.gi:4503928及びgi:14249369に開示されている。

ネズミGATA 3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No.gi:40254638に開示されている。特異的なDNA結合サイトの認識を負うGATA 3ドメイン (303-348のアミノ酸配列) 及びトランスが活性化 (30-74のアミノ酸配列) は同定された。ヒトGATA 3の核局在化のためのシグナリング配列は、前記のプロテインのアミノフィンガー (249-311のアミノ酸配列) 内及び周辺の配列により授けられる性質である。GATA 3により調節される転写の典型的な遺伝子は、IL-5、IL-12、IL-13及びIL-12R β 2である。

【 0 0 7 6 】

TGF β は、また、骨芽細胞の分化、骨の発達及びリモデリングにおいて鍵となる役割を果たしている。骨芽細胞は、TGF β を分泌し、そしてTGF β を骨マトリックスに堆積させ、それに反応することができるので、可能な作用のオートクラインモードを可能にする。TGF β は、in vitro及びin vivoの両方で骨芽細胞の増殖及び分化を調節するが、骨芽細胞の分化へのTG

10

20

30

40

50

F の効果は、前記の細胞の細胞外の環境及び分化ステージに依存する。TGF は、増殖及び初期の骨芽細胞の分化を刺激するが、末期の分化を阻害する。したがって、TGF は、骨芽細胞の分化及び機能の他のマーカーのうちでアルカリホスファターゼ及びオステオカルシンの発現を阻害すると報告された (Centrella et al., 1994 Endocr. Rev., 15, 27 - 39)。骨芽細胞は、TGF 及びそのイフェクター、Smad2並びにSmad3のための細胞表面受容体を発現する。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用されているように、「骨形成及び鉱化作用」という用語は、例えば骨を形成する骨芽細胞の活性と骨を分解する破骨細胞の活性との間のバランスにより、骨量は維持されるようにそれらの骨リモデリング及び再形成における機能のみならず、骨の細胞外マトリックスのコラーゲン前駆体の合成、骨を形成するための前記マトリックスの鉱化作用の調節という骨芽細胞の細胞内活性を意味する。骨の鉱化作用は、type Iコラーゲン及び様々な非コラーゲンであるタンパク質からなる細胞外マトリックスにおける炭酸化されたヒドロキシアパタイト結晶の沈着により発生する。本明細書で使用されているように、「骨芽細胞」という用語は、間葉の骨芽前駆細胞から派生し、そして骨細胞として骨芽細胞が取り囲まれる骨性のマトリックスを形成する、骨を形成する細胞である。成熟した骨芽細胞は、in vivoで骨の細胞外マトリックスを形成することができる細胞であり、in vitroで細胞外の発生を反映する鉱化された小結節を形成する能力により同定することができる。未成熟な骨芽細胞はin vitroで鉱化された小結節を形成することができない。本明細書で使用されているように、「破骨細胞」は、豊富な好酸性細胞質を備えた、大きな多核細胞であり、骨性の組織の吸収及び除去する機能を有する。破骨細胞は、副甲状腺ホルモンの存在下で非常に活性化され、骨の再吸収が高められ、そして骨塩（リン及び特にカルシウム）を細胞外液中に放出する。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用されているように、「オステオカルシン」は、骨 カルボキシグルタミン酸含有タンパク質とも称され、ビタミンKに依存するカルシウム結合骨プロテインであり、骨における最も豊富な非コラーゲンプロテインである。オステオカルシンは、特に分化された骨芽細胞及び象牙芽細胞で発現する。オステオカルシンのTGF- により媒介される減少は、そのmRNAレベルで発生し、新にプロテインの合成を必要としないが示された。オステオカルシンプロモーターから転写は、前記のオステオカルシンプロモーターに存在するOSE2と称される応答エレメントに対して、Runx2とも称される転写因子CBFA1への結合を必要としない。

【 0 0 7 9 】

Runx因子は、組織特異的な遺伝子の発現又は抑制を促進することができる、DNA結合プロテインである (Lutterbach, B., and S. W. Hiebert. (2000) Gene 245:223-235)。哺乳動物のRunx関連遺伝子は、血液、骨格及び胃の発達に必須であり、そして急性白血病及び胃癌において通例突然変異を受けている (Lund, A. H., and M. van Lohuizen. (2002) Cancer Cell. 1:213-215)。Runx因子は、組織により抑制されるパターンを示し、そして完全な造血及び骨芽細胞の成熟のために必要とされる。Runxプロテインは、形質転換増殖因子- (TGF-) / 成長因子の骨形成タンパク質 (BMP) ファミリーへの応答における発達及び生物学プロセスの多様な配列を調節するシグナリングプロテインのファミリーである、SmadのC末端セグメントを通じて相互作用することが最近示された。さらに、核内分布のRunxプロテインは、Runx因子のC末端に存在するプロテインモチーフである、核マトリックス標的シグナルにより伝達される。さらに重要なことには、in vivoにおける骨形成は、前記の重複核内標的シグナル及び前記のSmad相互作用ドメインを含む、Runx2のC末端を必要とする。前記のRunx及びSmadプロテインは、表現型遺伝子の発現及び分化系列決定の調節に連携して関与する。遺伝子破壊研究により、Runxプロテイン及びSmadは、発生上で造血及び骨形成に関与していることが明らかにされた。さらにRunx2及び前記の BMPに応答するSmadは、間葉の多能性細胞における骨形成を誘起することができる。Runx2プロテ

10

20

30

40

50

ンは、高度に保存されたRuntドメインを含む。

“Runx2” is one of three mammalian homologues of the Drosophila transcription factors, Runt and Lozenge (Daga, A., et al.(1996) Genes Dev. 10:1194-1205).

【 0 0 8 0 】

「Runx2」は、前記のショウジョウバエの転写因子、Runt及びLozengeの三つの哺乳動物のアナログの一つである。Runx2は、また、Tリンパ球において発現し、そして発癌遺伝子であるc-myc、p53及びPim1と協同してマウスにおけるT-細胞リンパ腫の発達を促進する (Blyth, K., et al. (2001) Oncogene 20:295-302)。

【 0 0 8 1 】

Runx2の発現は、また、骨芽細胞の分化及び骨格形成において重要な役割を果たしている。オステオカルシンに加えて、Runx2は、アルカリホスファターゼ、コラーゲン、オステオポンチン及び破骨細胞分化抑制因子リガンドを含む、骨芽細胞の分化の過程で活性化される、他のいくつかの遺伝子の発現を調節する。これらの遺伝子は、また、それらのプロモーターにおいてRunx2結合サイトを含んでいる。これらの観察から、Runx2が、骨芽細胞の分化のために必須な転写因子であることが示唆される。この仮説は、cbfa1遺伝子が不活性化されたマウスの胚では骨が形成されないということにより強く支持される。さらに、いくらかの骨が完全に発達しないヒトの疾患である、鎖骨頭蓋異形成症は、cbfa1対立遺伝子の突然変異と関連していた。骨芽細胞の分化におけるその役割に加えて、Runx2は、分化された骨芽細胞による骨マトリックス沈積の調節に関係していた。Runx2の発現は、骨芽細胞の分化に影響する因子により調節される。したがって、BMPはRunx2の発現を活性化することができるのに対し、Smad2及びグルココルチコイドはRunx2の発現を阻害することができる。加えて、Runx2は、それ自体のプロモーターのOSE2エレメントに結合することができる。このことは、骨芽細胞の分化の間に転写調節の自己調節的なフィードバックメカニズムの存在が示唆される。レビューについては、Alliston, et al. (2000) EMBO J 20:2254を参照されたい、

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用されているように、Runx2は、そのRunt DNA結合ドメインを通じてKRCと相互作用する。Runx2のRuntドメインのための最も良く記載された結合パートナーは、Runx2による高い親和性のDNA結合のために必要とされる、構造的に発現された因子である、CBFである (Tang, Y. Y., et al. (2000). J Biol Chem 275, 39579-39588; Yoshida, C. A., et al. (2002) Nat Genet 32, 633-638)。Runx1により伝達される造血における重大な欠陥のためにCBF^{-/-}マウスはE12.5に死亡したが、CBF^{-/-}マウスはGata1プロモーターによるCBF^{-/-}の形質転換した過剰発現により救出されたとき、Runx2^{-/-} miceの表現型を模倣し、重篤な萎縮症が発症した (Yoshida, C. A., et al. (2002). Nat Genet 32, 633-638)。CBF^{-/-}に結合する場合、Runxファミリーメンバーは、ユビキチン/プロテアソームにより仲介される分解から保護されている (Huang, G., et al. (2001). Embo J 20, 723-733)。CBF^{-/-}に結合する場合、Runx2の安定性は増進され、そしてそれは最適に標的DNA配列に結合する。Shn3に結合する場合、Runx2は、もはや標的配列に高い親和性により結合することができないし、そしてRunx2の分解は促進されたユビキチン化及びそれに続く蛋白質加水分解により促進される。

【 0 0 8 3 】

ヒトRunx2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:10863884に開示されている。ネズミRunx2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:20806529に開示されている。ヒトCBF^{-/-}のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:47132615及び47132616に開示されている。ネズミCBF^{-/-}のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:31981853に開示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用されているように、「WWP1」は、Nedd4、WWP2及びAIP4を含む、多重WWドメイン備えたE3ユビキチンリガーゼファミリーメンバーである。WWP1は、すべてのR-及びI-Smadプロテインと相互作用し、そしてSmad6及びSmad7のユビキチン化を促進することが、以前には示されていた (Komuro, A., et al. (2004). *Oncogene* 23, 6914-6923)。しかしながら、それらのRuntドメイン (Jin, Y. H., et al. (2004). *J Biol Chem* 279, 29409-29417) におけるPPXYモチーフをも備えているRunxプロテインをユビキチン化するWWP1の能力については研究されていない。WWP1は、WWドメインを含む。前記のWWドメインは、二つの保存Trp残基及び保存Proにより特徴付けられる (それゆえ、それはWWPとも称される。)。前記のドメインは、35-40の残基を含み、そしていくらかの配列では4回まで反復される。それは、特徴的なプロリンモチーフ ([AP]-P-P-[AP]-Y) を含むプロテインを結合するようであり、そしてある程度前記のSH3ドメインに類似している。

10

【 0 0 8 5 】

ヒトWWP1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:3946331に開示されている。ネズミWWP1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:51709071に開示されている。

【 0 0 8 6 】

「骨シアロタンパク質」又は「BSP」は、オステオボンチン遺伝子ファミリーに属し、そしてヒドロキシアパタイトに緊密に結合し、骨の鉱化されたマトリックスの不可欠な部分を形成する、非コラゲナーゼ骨マトリックスタンパク質である。

20

【 0 0 8 7 】

ヒトBSPのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:38146097に開示されている。ネズミBSPのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:6678112に開示されている。

【 0 0 8 8 】

「Type Iコラーゲン(a)1 (Coll(a)1)」は、コラゲナーゼ骨マトリックスタンパク質である。ヒトColl(a)1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:14719826に開示されている。ネズミColl(a)1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:34328107に開示されている。

30

【 0 0 8 9 】

別名「CREB2」とも称される「ATF4」、及び別名「SP7」とも称される「Osterix」はそれぞれbZIPプロテインファミリー及びC2H2-タイプジンクフィンガープロテインファミリーに属し、例えば骨形成及び鉱化作用の過程で骨のリモデリングの間に骨マトリックスの生合成の重要な調節剤である (例えば、Yang, X., et al. (2004). *Cell* 117, 387-398; Nakashima, K., et al. (2002). *Cell* 108, 17-2を参照)。BSP、Coll(a)1、ATF4及びOsterixは、骨の形成及び発達の特異的なマーカーである。ヒトATF4のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:33469975及びgi:33469973に開示されている。ネズミATF4のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:6753127に開示されている。ヒトSP7のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:22902135に開示されている。ネズミSP7のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 18485517に開示されている。

40

【 0 0 9 0 】

本明細書で使用されているように、「ATF4シグナリング経路」は、活性化転写因子4を含み、骨芽細胞の発達及び機能を調節する、本技術分野で知られているシグナリング経路のいずれか一つを意味する。上記のようにATF4は、CRE依存性転写の特異的な抑制因子として機能する転写因子である。前記の転写抑制因子活性は、C末端のロイシンジッパー及びATF4プロテインの塩基ドメイン領域の内に在る。ATF4は、成熟した骨芽細胞に高いレベルでのコラーゲン合成に必要とされ、そして骨芽細胞による最適な細胞外マトリックス産

50

生のためのキナーゼであるRSK2によるリン酸化を必要とすることが示された (Yang, et al. (2004) Cell 117:387)。さらに、本明細書に記載されているように、KRCが欠損した動物では、高リン酸化型のATF4の蓄積のみならず、ATF4及びRSK2のmRNA及びプロテインのレベルが高まる。ヒトRSK2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:56243494に開示されている。ネズミRSK2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:22507356に開示されている。

【0091】

本明細書に使用されているように、「AP-1」は、ロイシンジッパーモチーフを經由してもう一方に結合する二つのタンパク質のダイマーからなるDNA結合因子のファミリーである、転写因子活性化因子プロテイン1 (AP-1) を意味する。最も良く特徴付けられているAP-1因子は、Fosプロテイン及びJunプロテインを含む (Angel, P. and Karin, M. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1072:129-157; Orengo, I. F., Black, H. S., et al. (1989) Photochem. Photobiol. 49:71-77; Curran, T. and Franza, B. R., Jr. (1988) Cell 55, 395-397)。

前記のAP-1ダイマーは、細胞の増殖、転移及び細胞メタボリズムに關与する遺伝子の転写を誘起する、シス作動性ホルボールミリステートアセテート (phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate) 応答エレメントを含むDNA上のプロモーター領域に結合し、そしてトランス活性化する (Angel, P., et al. (1987) Cell 49, 729-739)。

AP-1は、様々な刺激により誘起され、そして癌及び自己免疫疾患の進展に關与する。ヒトAP-1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi:20127489に開示されている。

【0092】

本明細書に使用されているように、「核酸」という用語は、そのフラグメント及び等価物 (例えば、KRC、TRAF、c-Jun、c-Fos、GATA3、Runx2、SMAD2、SMAD3、GLa、CBF、ATF4、RSK2及び/又はWWP1のフラグメント及び等価物) を含む。「等価物」という用語は、機能的に等価なタンパク質をコードするヌクレオチド配列、すなわちKRCの天然の結合パートナーに結合する能力を有するKRC変異体プロテイン、又はKRCが關与するシグナル伝達経路における、それらの生物活性を保持する変異体プロテインを含むことを意味する。好ましい態様では、機能的に等価なKRCプロテインは、例えばT細胞のような免疫細胞の細胞質において、例えばTRAF2のようなTRAFに結合する能力を有する。もう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCプロテインは、例えばT細胞のような免疫細胞の核細胞質において、例えばc-JunのようなJunに結合する能力を有する。もう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCプロテインは、例えばT細胞のような免疫細胞の核細胞質において、GATA3に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCプロテインは、例えばB細胞のような免疫細胞の細胞質において、例えばSMAD2及び/又はSMAD3のようなSMADに結合する能力を有する。

【0092】

更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCプロテインは、骨芽細胞の細胞質において、SMAD3に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、例えばB細胞のような免疫細胞の核細胞質において、Runx2に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、Runx2に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、WWP1に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、SMAD3、Runx2及び/又はWWP1に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、KRC分子の機能的に等価物は、PPXYモチーフを含み、そしてWWP1に結合する能力を有する。もう一つの好ましい態様では、KRC分子の機能的に等価物は、例えばRunx2の102-229のアミノ酸配列のようなRuntドメインを含み、そしてKRCに結合する能力を有する。もう一つの好ましい態様では、KRC分子の機能的に等価物は、例えばRunx2の102-229のアミノ酸配列のようなRuntドメインにおいてPPXYを含み、そしてWWP1に結合する能力を有する。更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、RSK2及び/又はWWP1に結合

更なるもう一つの好ましい態様では、機能的に等価なKRCは、RSK2及び/又はWWP1に結合

する能力を有する。

【0093】

「分離された」核酸分子は、前記の核酸の天然の由来源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。例えば、ゲノムDNAに関して、「分離された」という用語は、ゲノムDNAが天然に関連している染色体から分離される核酸分子を含む。好ましくは、「分離された」核酸分子は、前記の核酸分子が由来する生物のゲノムDNAにおいて、天然に核酸分子（すなわち、前記の核酸分子の5'及び3'末端に存在する配列）に隣接する配列を含まない。

【0094】

本明細書において使用されているように、「分離されたタンパク質」又は「分離されたポリペプチド」は、細胞から分離されるか、又は組換え法により製造される場合、他のタンパク質、ポリペプチド、細胞質成分及び培養媒体を実質的に含まないタンパク質又はポリペプチド、又は化学合成に合成された場合、化学的な前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないタンパク質又はポリペプチドを意味する。「分離された」又は「精製された」蛋白質又はその生物学的に活性部分は、KRCプロテインが由来する細胞又は組織からの細胞成分又は他の汚染するタンパク質を実質的に含まないか又は化学合成に合成された場合、化学的な前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない。「細胞成分を実質的に含まない」という用語は、それが分離されたか又は遺伝子組み換えにより製造された細胞の細胞質成分から前記のタンパク質が分離されるKRCプロテインの調製法を含む。

10

【0095】

本発明の核酸は、例えば標準的な組換えDNA法により調製することができる。本発明の核酸は、また、標準的な方法を使用して化学的に合成することができる。化学的にポリデオキシヌクレオチドを合成する方法が知られている。例えば市販されているDNA合成装置により自動化された固相合成法が挙げられる（例えば、本明細書に引用により援用されているItakura et

20

al. U.S. Patent No. 4,598,049; Caruthers et al. U.S. Patent No. 4,458,066; 並びにItakura U.S. Patent Nos. 4,401,796及び4,373,071を参照。)。

【0096】

本明細書において使用されているように、「ベクター」という用語は、それが結合されたもう一つの核酸を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの一つのタイプが、付加されたDNAセグメントが連結された、環状二重螺旋DNAループを意味する「プラスミド」である。ベクターのもう一つのタイプは、付加されたDNAセグメントがウイルスゲノムに連結されたウイルスベクターである。いくらかのベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律的に複製することができる。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され、そして宿主のゲノムと共に複製される。さらに、いくらかのベクターは、それらが効果的に結合された遺伝子の発現を律することができる。前記のベクターは、本明細書では「組換え発現ベクター」又は単に「発現ベクター」として言及されている。一般に、組換えDNA法において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書では、プラスミドが最も一般的に使用されたベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は同義に使用される。しかしながら、本発明は、同等な機能を果たす、例えばウイルスベクターのような前記の発現ベクターの他の形態をも含むことを意図されている。

30

40

【0097】

本明細書で使用されているように、「宿主細胞」という用語は、例えば本発明の組換え発現ベクターのような本発明の核酸分子が導入された細胞を意味するように意図されている。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書では同義である。前記の用語が、特定の細胞だけでなく、前記の細胞の子孫又は潜在的な子孫を意味するということを理解すべきである。いくらかの一時変異は、突然変異又は環境の影響により世代を経る場合に起こるので、前記の子孫は、実際上前記の親細胞とは同一ではないが、本明細書で使用されているように前記の用語の範囲内に依然として含まれる。好ましくは、宿主

50

細胞は、例えばマウス細胞、ヒト細胞のような哺乳動物の細胞である。一つの態様では、それは上皮組織細胞である。もう一つの態様では、宿主細胞は間葉幹細胞である。もう一つの態様では、宿主細胞は骨芽細胞である。

【0098】

本明細書で使用されているように、「トランスジェニック細胞」という用語は、導入遺伝子を含む細胞を意味する。

【0099】

本明細書で使用されているように、「トランスジェニック動物」という用語は、例えばブタ、サル、ヤギ、のようなヒト以外の哺乳動物、又は例えばマウスのようなげっ歯類動物のような動物であって、前記の動物の一つ以上、好ましくは本質的にすべての細胞が導入遺伝子を含む動物である。前記の導入遺伝子は、例えばマイクロインジェクション、導入、又は例えば組換えウイルスによる感染のような感染による、前記の細胞の前駆体への導入により、前記の細胞に直接的又は間接的に導入される。遺伝的な操作という用語は、組換えDNA分子の導入を含む。前記の分子は、染色体内に組み込まれるか、又はそれが染色体外の複製DNAであってもよい。

10

【0100】

本明細書で使用されているように、「抗体」という用語は、イミノグロブリン分子及びイミノグロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、例えば細胞内抗体のみならずFab及びF(ab')₂フラグメント、単鎖抗体、細胞内抗体、scFv、Fd又は他のフラグメントのような、抗原に結合する(免疫反応する)抗原結合サイトを含む分子を含むことを意図されている。好ましくは、本発明の抗体は、特異的に、又は実質的に特異的にKRC、TRAF、c-Jun、c-Fos、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、ATF4、RSK2、WWP1又はRunx2(すなわち、non-KRC、non-TRAF、non-c-Jun、non-c-Fos、non-GATA3、non-SMAD2、non-SMAD3、non-WWP1、non-CBF、non-ATF4、non-RSK2又はnon-Runx2との交差反応性がないことにはない)に結合する。本明細書で使用されているように、「モノクローナル抗体」及び「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合サイトの唯一の種類を含む抗体分子の集まりを意味するのに対し、「ポリクローナル抗体」又はポリクローナル抗体「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することができる抗原結合サイトの多数の種類を含む抗体分子の集合を意味する。したがって、モノクローナル抗体組成物は、典型的にはそれが免疫反応する特定の抗原に対して単一の結合親和性を示す。

20

30

【0101】

本明細書で使用されているように、「KRC活性又は発現の調節が有益である疾患」又は「KRCに関連する疾患」という用語は、KRC活性が異常である疾患又はKRC活性の調節が有益である疾患を含む。典型的なKRCに関連する疾患は、骨形成及び鉱化作用の調節が有益である、異常、疾患、状態又は損傷を含む。

【0102】

一つの態様では、小さな分子は供試化合物として使用することができる。「小さな分子」という用語は、本技術分野の用語であり、その分子量が約7500未満、約5000未満、1000未満又は約500未満である。一つの態様では、小さな分子は、専らペプチド結合を含むものではない。もう一つの態様では、小さな分子はオリゴマーではない。活性についてスクリーニングされる得る典型的な小さな分子化合物は、ペプチド、擬似ペプチド、核酸、炭水化物、小さな有機化合物(例えばCane et al. 1998. Science 282:63)及び天然物の抽出物ライブラリーを含むが、これに限定されるものではない。もう一つの態様では、前記の化合物は、小さい非ペプチドの有機化合物である。更なるもう一つの態様では、小さな分子は生合成されていない。例えば、小さな分子は、好ましくはそれ自体転写又は翻訳の産物ではない。

40

【0103】

本発明の様々な態様を以下に更に詳細に記載する。

【0104】

50

II. スクリーニングアッセイ

KRC活性の調節因子は公知であるか（KRC活性の優勢な陰性阻害剤、KRC活性を妨げるアンチセンスKRC細胞内抗体、KRCから誘導されるペプチド阻害剤）又は本明細書に記載した方法を使用して同定され得る。本発明は、他の調節因子、すなわちKRC活性を調節する、候補化合物、供試化合物又は薬剤（例えば擬似ペプチド、小さな分子又は他の薬剤）を同定するための方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」としても言及されている。）、及び他の薬剤の活性を試験するか又は最適化するための方法を提供する。

【0105】

例えば、一つの態様では、例えばKRCを含むシグナリング経路においてKRC又は分子に結合する分子（例えば、TRAF、NF- κ B、JNK、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、JNK、TGF β 、ATF4、RSK2及び/又はAP-1）、又はKRCを含むシグナル伝達経路においてKRC又は分子の発現及び/又は活性に刺激的な効果及び阻害的な効果を有する分子を同定することができる。例えば、KRCを含むシグナル伝達経路においてc-Jun、NF- κ B、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、WWP1、CBF、JNK、TGF β 、ATF4、RSK2及び/又はAP-1が機能するので、これらの分子の何れも本発明のスクリーニングアッセイに使用することができる。このセクション及び他のセクションにおいて下記の具体的な態様が例としてこれらの分子の一つをリストしたが、KRCを含むシグナル伝達経路における他の分子もまた本発明のスクリーニングアッセイに使用することができる。

10

【0106】

一つの態様では、前記の発現、転写後の修飾（例えばリン酸化）又はKRCの活性を直接調節する化合物の能力は、本発明のスクリーニングアッセイで使用するインジケータ組成物により測定することができる。

20

【0107】

前記のインジケータ組成物は、例えば天然に発現する細胞、又はより好ましくは前記のプロテインをコードする発現ベクターを前記の細胞に導入することにより前記のプロテインを発現するように操作された細胞である、KRCを含むシグナル伝達経路におけるKRCプロテイン又は分子を発現する細胞でありうる。好ましくは、前記の細胞は、例えばマウスの細胞及び/又はヒトの細胞のような哺乳動物の細胞である。一つの態様では、前記の細胞は成人から誘導される。一つの態様では、前記の細胞はT細胞である。もう一つの態様では、前記の細胞はB細胞である。もう一つの態様では、前記の細胞は骨芽細胞である。一つの態様では、前記の骨芽細胞は原発性頭蓋冠の骨芽細胞である。もう一つの態様では、前記の骨芽細胞はC3H10T1/2骨芽細胞である。もう一つの態様では、前記の細胞は成熟した骨芽細胞である。もう一つの態様では、前記の細胞は間葉の幹細胞である。もう一つの態様では、本発明のスクリーニングアッセイに使用される細胞は、例えば*in vitro*で培養された分離された細胞である、不死化されていない原発性細胞である。もう一つの態様では、本発明のスクリーニングアッセイに使用される細胞は、不死化細胞、すなわち株化細胞である。一つの態様では、前記の株化細胞はMC3T3-E1株化細胞である。一つの態様では、前記の株化細胞は293T株化細胞である。あるいは、前記のインジケータ組成物は、前記のプロテイン（例えば、精製された天然又は組換えプロテインのいずれかを含む細胞抽出物又は組成物）を含む無細胞組成物であることができる。

30

40

【0108】

本明細書に開示されている前記のアッセイを使用して同定された化合物は、KRCを含むシグナリング伝達経路における分子若しくはKRCの異常な発現、転写後の修飾、若しくは活性と関連する疾患、例えば、骨形成及び鉱化作用の調節、破骨細胞形成の調節、骨芽細胞活性対破骨細胞活性の調節、オステオカルシン遺伝子の転写の調節、例えばRunx2プロテインレベルの調節のようなRunx2の分解の調節、Runx2のユビキチン化の調節、例えばユビキチン化活性のようなWWP1活性の調節、RSK2の発現の調節、RSK2プロテインレベルの調節のようなRSK2の分解、RSK2のユビキチン化、RSK2のリン酸化の調節、RSK2キナーゼ活性の調節、BSP、Coll(a)1、OCN、Osterix、RANKL及びATF4の発現の調節、ATF4プロテインレベルの調節並びに/又はATF4のリン酸化の調節により利益が得られる疾患を治療するのに

50

有用である。

【0109】

KRCを含むシグナル伝達経路の調節により利益が得られる状態は、骨形成及び鉱化作用が有益である疾患、異常、状態又は損傷を含む。一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、出生後の被験体において調節される。もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用は、例えば長管骨の骨端ディスクが消失した被験体、すなわち骨端及び骨幹が融合した被験体のような成体の被験体において調節される。

【0110】

もう一つの態様では、本発明は二つ以上の、本明細書において記載された前記のアッセイの組み合わせに関するものである。例えば、調節剤を、細胞ベース又は無細胞のアッセイ、及びKRCを含むシグナル伝達経路におけるKRC又は分子の活性を調節する薬剤の能力を使用して同定することができ、そしてin vivo例えば骨粗しょう症又は大理石骨病のための動物モデルのような動物において確認することができる。一つの態様では、骨粗しょう症の動物モデルは、例えばエストロゲンの減少、それに続くFSHの減少による閉経後女性における骨量の喪失の動物モデル、例えば骨粗しょう症のマウスモデル、例えば卵巣摘出マウスである。もう一つの態様では、本発明の方法に使用される動物モデル、例えば骨減少症のマウスモデルは、WWP1（下記参照）を過剰に発現するトランスジェニックマウスである。一つの態様では、前記のWWP1トランスジェニックマウスは、例えば骨芽細胞に対してWWP1の発現を空間的に制限するWWP1の対立遺伝子のような、WWP1のコンディショナルな対立遺伝子を含む。一つの態様では、前記のWWP1のコンディショナルな対立遺伝子は、ヒトのWWP1対立遺伝子を含む。一つの態様では、WWP1は、組織特異的なプロモーターの制御のもとに発現される。一つの態様では、組織特異的なプロモーターはtype Iコラーゲンプロモーターである。もう一つの態様では、組織特異的なプロモーターはOsterixプロモーターである。

10

20

【0111】

さらに、本明細書に記載されているように同定された、KRCを含むシグナリング伝達経路におけるKRC又は分子の調節因子（例えば、アンチセンス核酸分子、特異的な抗体又は小さな分子）を、前記の調節因子による治療の有効性、毒性又は副作用を決定する動物モデルで使用することができる。あるいは、本明細書に記載されたように同定された調節因子を、前記の調節因子の作用メカニズムを決定する動物モデルで使用することができる。

30

【0112】

もう一つの態様では、KRCが相互作用する分子、例えばシグナル伝達経路におけるKRCの上流又は下流のいずれかで作用する分子を使用して、例えば上記のようにスクリーニングアッセイを実施することにより、同様なスクリーニングアッセイは、間接的にKRCの活性及び/又は発現を調節する化合物を同定するために使用できると理解されるであろう。

【0113】

本発明の一つの態様では、細胞ベース及び/又は無細胞アッセイは、ハイスループット方式により実施される。一つの態様では、前記のアッセイは、96ウエルフォーマットを使用して実施される。もう一つの態様では、本発明のアッセイは、192ウエルフォーマットを使用して実施される。もう一つの態様では、本発明のアッセイは、384ウエルフォーマットを使用して実施される。一つの態様では、本発明のアッセイは、例えばアッセイの一部、例えば様々な試薬の添加が自動化されているように半ば自動化されている。もう一つの態様では、本発明のアッセイは、完全に自動化されており、例えばアッセイへのすべての試薬の添加、及びアッセイ結果の捕捉が自動化されている。

40

【0114】

本発明のアッセイは、一般的に予め設定された時間又は予め設定された成長時間（in vitro又はin vivoの何れか）についての関心のある化合物又はライブラリーの化合物とアッセイ組成物と接触させるステップ、及び特定の読み出しに基づく前記の化合物の効果についてアッセイするステップを含む。一つの態様では、前記のアッセイの継続のためにア

50

ッセイ組成物を関心のある化合物又はライブラリーの化合物と接触させる。もう一つの態様では、全アッセイ時間より短い時間に亘り、アッセイ組成物を関心のある化合物又はライブラリーの化合物と接触させる。例えば、細胞は数日又は数週間培養してもよく、そして例えば14日間培養後化合物と接触させてもよい。一つの態様では、細胞を、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21日間関心ある化合物と接触させる。一つの態様では、本発明のアッセイ組成物を予め設定された時間と接触させ、前記の化合物を除き、そして前記のアッセイ組成物を、特定の読み出しに基づく測定までの予め設定された時間前記の化合物の非存在下で維持した。加えて、本発明の方法（以下に詳細に記載）において使用されるヒト以外の動物を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20若しくは21日間、又は4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12週間関心のある化合物と接触させてもよい。例えば、本発明のヒト以外の動物の卵巣を摘出し、そしてその手術後0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12週間本発明の化合物と接触させてもよい。もう一つの態様では、例えば手術を施されたヒト以外の動物を、手術以前、例えば手術以前に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日間関心ある化合物と接触させてもよい。

10

20

30

40

50

【0115】

本発明の化合物は、アッセイに適した濃度でアッセイされてもよく、そして当業者により速やかに測定される。例えば、一つの態様では、アッセイ組成物をミリモラー（millimolar）の濃度の化合物と接触させてもよい。もう一つの態様では、アッセイ組成物をマイクロモラー（micromolar）の濃度の化合物と接触させてもよい。もう一つの態様では、アッセイ組成物をナノモラー（nanomolar）の濃度の化合物と接触させてもよい。

【0116】

本発明の細胞ベース及び無細胞アッセイについては、以下により詳細に記載する。

A. 細胞ベースアッセイ

本発明のインジケータ組成物は、KRCを含むシグナリング伝達経路におけるKRCプロテイン又はKRC以外のプロテイン（例えばTRAF、NF- κ B、JNK、Jun、TGF β 、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、Runx2、RSK2、ATF4、及び/又はAP-1である。）の少なくとも一つを発現する細胞、例えば前記の内因性の分子を天然に発現する細胞、又はより好ましくは前記のプロテインをコードする発現ベクターを前記の細胞に導入することにより、外因性のKRC、TRAF、NF- κ B、JNK、Jun、TGF β 、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はAP-1プロテインの少なくとも一つを発現するように操作された細胞であり得る。あるいは、前記インジケータ組成物は、KRCプロテイン、又は例えばTRAF、NF- κ B、JNK、Jun、TGF β 、GATA3、SMAD2、SMAD3、WWP1、CBF、Runx2、ATF4、RSK2のようなKRC以外のプロテイン、及び/又は（天然若しくは組換えタンパク質のいずれかである、精製されたKRC、TRAF、NF- κ B、JNK、Jun、TGF β 、GATA3、SMAD2、SMAD3、WWP1、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はAP-1プロテインを含むプロテイン又は組成物を発現する細胞からの細胞抽出物）を含む無細胞組成物であり得る。

【0117】

様々なタイプ細胞は、前記のスクリーニングアッセイにおいてインジケータ細胞としての使用に相当である。好ましくは、低濃度レベルの内因性のKRC（または、例えばTRAF、Fos、Jun、NF- κ B、TGF β 、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、AP-1、ATF4、RSK2及び/又はRunx2）を発現し、そして組換えプロテインを発現するように操作されている、株化細胞は使用される。本発明のアッセイにおいて使用される細胞は、真核細胞又は原核細胞の両者を含む。例えば、一つの態様では、細胞は細菌細胞である。もう一つの態様では、細胞は、例えば酵母細胞のような菌類の細胞である。もう一つの態様では、細胞は、例えばトリの細胞又は哺乳動物の細胞（例えばネズミの細胞又はヒトの細胞）のような脊椎動物細胞である。好ましくは前記の細胞は、例えばヒトの細胞のような哺乳動物の細胞である。あるいは、前記のインジケータ組成物は、前記のプロテイン（例えば、精製された天然又は組換えプロテインを含む細胞抽出物又は組成物）無細胞組成物であり得る。

【0118】

上流又は下流で作用するKRC又はKRC以外のプロテインの発現又はノ又は活性を調節する化合物は、様々な読み出しを使用して同定され得る。

【0119】

例えば、インジケータ細胞は、発現ベクターにより形質移入され、供試化合物の存在下又は非存在下でインキュベートされ、そして前記の分子により調節される、前記の分子の発現又は生物学的な応答に基づいて前記の化合物の効果を決定することができる。活性を含む生物学的活性は、標準的な方法に従い *in vivo* 又は *in vitro* で測定される。活性は、例えば *c-Jun* のような *Jun*、例えば *TRAF2*、*GATA3* のような *TRAF*、例えば *SMAD2*、*SMAD3* のような *SMAD*、*CBF*、*Runx2*、*RSK2* 及びノ又は *WWP1* のようなプロテインのような標的分子又は結合パートナーと関連している直接的な活性であり得る。一つの態様では、*Runx2* と *CBF* との相互作用が測定される。一つの態様では、*Runx2* と *WWP1* との相互作用が測定される。一つの態様では、*RSK2* と *WWP1* との相互作用が測定される。一つの態様では、*KRC* と *WWP1* との相互作用が測定される。あるいは、前記の活性は、例えば標的分子による前記のプロテインの相互作用の下流で発生する細胞内シグナリング活性か又は前記の相互作用により引き金が引かれた前記のシグナリングカスケードの結果として発生する生物学的活性のような間接的な活性である。例えば、*KRC* の生物学的活性としては、*TNF α* 産生の調節、*IL-2* 産生の調節、*JNK* シグナリング経路の調節、*NF κ B* シグナリング経路の調節、*TGF β* シグナリング経路の調節、*AP-1* 活性の調節、*Ras* 及び *Rac* 活性の調節、アクチンのポリマー化の調節、*AP-1* のユビキチン化の調節、*TRAF2* のユビキチン化の調節、*c-Jun* の分解の調節、*c-Fos* の分解の調節、*SMAD3* の分解の調節、*GATA3* の分解の調節、T細胞機能のイフェクターの調節、T細胞アネルギーの調節、アポトーシスの調節若しくはT細胞分化の調節、*IgA* 生殖系列転写の調節、骨形成及び鉱化作用の調節、破骨細胞形成の調節、骨芽細胞活性対骨芽細胞活性の調節、オステオカルシン遺伝子転写の調節、例えば *Runx2* プロテインレベルの調節のような *Runx2* 分解の調節、*Runx2* のユビキチン化の調節、例えば *WWP1* のユビキチン化活性のような *WWP1* 活性の調節、*RSK2* の発現の調節、例えば *RSK2* プロテインレベルの調節のような *RSK2* の分解、*RSK2* のユビキチン化 *RSK2* のリン酸化の調節、*RSK2* キナーゼ活性の調節、*BSP*、*Col1(a)1*、*OCN*、*Osterix*、*RANKL* 及び *ATF4* の発現の調節、*ATF4* プロテインレベルの調節、及びノ又は *ATF4* のリン酸化の調節が挙げられる。

10

20

【0120】

本明細書に記載されているように供試化合物が *KRC* プロテイン発現又は *KRC* を含むシグナル伝達経路におけるプロテインの発現を調節するかどうかを決定するために、*in vitro* の転写アッセイが実施される。前記のアッセイの一例では、*KRC* の調節配列（例えば、完全長のプロモーター及びエンハンサー）は、例えばクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ（*CAT*）、*GFP*、又は *OSE2*-*ルシフェラーゼ* のようなレポーター遺伝子と機能的にリンクすることができ、宿主細胞に導入される。一つの態様では、レポーター遺伝子構築物は、多量体化された構築物である。一つの態様では、前記の多量体化された構築物はオステオカルシン調節配列を含む。一つの態様では、前記の多量体化されたオステオカルシン構築物は、機能的に *ルシフェラーゼ* レポーター遺伝子にリンクした前記のオステオカルシン調節配列の6つのコピーを含む。他の技術は、本技術分野で知られている。

30

【0121】

供試化合物が *KRC* mRNA 発現、又は例えば *BSP*、*Col1(a)1*、*OCN*、*RANKL*、*Osterix*、*RSK2* 及び *ATF4* のような、*KRC* により調節される遺伝子の発現を調節するかどうか決定するために、例えば定量的又はリアルタイムPCRのような様々な技術が実施される。

40

【0122】

本明細書では同義に使用されている「操作できるようにリンクされた」及び「有効にリンクされた」という用語は、前記のヌクレオチド配列は、宿主細胞（又は細胞抽出物により）における前記のヌクレオチド配列が発現するように調節配列にリンクされているということを意味しているように意図されている。調節配列は、本技術分野で認識されており、そして適切な宿主細胞における所望のプロテインの直接的な発現のために選ばれる。前記の調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル及び

50

発現調節エレメントを含むことを意図されている。前記の調節配列は、当業者に知られ、そしてGoeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に開示されている。前記の発現ベクターのデザインが、発現されるように望まれているプロテインの量及び/又はタイプ及び/又は導入される宿主細胞の選択として前記の因子に依存してもよい。

【0123】

様々なレポーター遺伝子が本技術分野で知られ、そして本発明のスクリーニングアッセイにおける使用に適している。適しているレポーター遺伝子の例としては、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グリーン蛍光プロテイン又はトランスフェラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子産物の活性を測定する標準的な方法は、本技術分野では知られている。

10

【0124】

様々なタイプの細胞は、前記のスクリーニングアッセイにおいてインジケータ細胞として使用するのに適している。一つの態様では、低レベルの少なくとも一つの内因性のKRC(又は、例えばTRAF、Fos、Jun、NF-kB、TGFb、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、AP-1、ATF4、RSK2及び/又はRunx2)を発現し、そして組換えプロテインを発現するように操作されている、株化細胞が使用される。前記のアッセイに使用される細胞は、真核細胞又は原核細胞の両者を含む。例えば、一つの態様では、細胞は細菌細胞である。もう一つの態様では、細胞は、酵母細胞のような真菌細胞である。もう一つの態様では、細胞は、例えばトリの細胞又は哺乳動物の細胞(例えばネズミの細胞又はヒトの細胞)のような脊椎動物細胞である。もう一つの態様では、低レベルの少なくとも一つの内因性のKRC(又は、例えばTRAF、Fos、Jun、NF-kB、TGFb、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、AP-1、ATF4、RSK2及び/又はRunx2)を発現する原発性細胞が使用される。

20

【0125】

一つの実施態様では、供試化合物の存在下におけるインジケータ細胞における前記のレポーター遺伝子の発現レベルが、供試化合物の非存在下におけるインジケータ細胞における前記のレポーター遺伝子の発現レベルよりも高い場合には、前記の供試化合物は、KRC(又は、例えばTRAF、Fos、Jun、NF-kB、TGFb、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、AP-1、ATF4、RSK2及び/又はRunx2)の発現を刺激する化合物として同定される。もう一つの実施態様では、供試化合物の存在下におけるインジケータ細胞における前記のレポーター遺伝子の発現レベルが、供試化合物の非存在下におけるインジケータ細胞における前記のレポーター遺伝子の発現レベルよりも低い場合には、前記の供試化合物は、KRC(又は、例えばTRAF、Fos、Jun、NF-kB、TGFb、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、AP-1、ATF4、RSK2及び/又はRunx2)の発現を阻害する化合物として同定される。

30

【0126】

一つの態様では、本発明は、KRCが関与する細胞内応答を調節する化合物を同定する方法を提供する。

【0127】

一つの態様では、T細胞又は間葉細胞のような細胞の分化は、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の調節のインジケータとして使用することができる。直接的には、例えば細胞の分化をモニターするための顕微鏡観察により、又は間接的には、例えば細胞の分化に関連する遺伝子産物のためのmRNAの増加、又は例えばサイトカインの分泌のようなプロテインの分泌若しくはマーカー(例えばCD69)の発現のような、細胞の分化に関連する遺伝子産物の分泌のような細胞の分化の一つ以上のマーカーをモニターすることにより、細胞の分化をモニターすることができる。例えばリバー転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)及びノーサンブロットイングのような関心のあるmRNAを検出する標準的な方法が知られている。酵素リンク免疫吸着アッセイ(ELISA)のような培養液の上澄液におけるプロテイン分泌を検出する標準的な方法もまた知られている。プロテインは、また、例えば免疫沈澱反応における、又は染色及びFACS分析のような抗体を使用して検出することが

40

50

できる。

【0128】

もう一つの態様では、T細胞機能イフェクターを調節する化合物の能力を決定することができる。例えば、一つの態様では、T細胞増殖の調節、サイトカイン増殖及び/又は細胞毒性を調節する化合物の能力は、本技術分野で知られた技法を使用して測定することができる。

【0129】

一つの態様では、IL-2の産生を調節する化合物の能力を決定することができる。IL-2の産生は、例えばノーサンプロティング又はウエスタンプロティングを使用してモニターすることができる。IL-2は、また、ELISAアッセイ又は、例えばIL-2に反応する細胞（例えば、前記のサイトカインに反応して増殖するか又は前記のサイトカインの存在下において生存する、細胞）を使用する、標準的な技法バイオアッセイを使用して検出される。

【0130】

もう一つの態様では、を調節する化合物の能力を決定することができる。

アポトーシスは、Fasにより媒介されるシグナルの存在下又は非存在下において測定することができる。一つの態様では細胞のアポトーシスの過程においてミトコンドリアからのシトクロムC放出は、例えば血漿細胞のアポトーシス（例えばBossy-Wetzel E. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:235-42に記載されている。）において検出されている。他の典型的なアッセイとしては、無細胞システムにおいて誘発された核アポトーシスのサイトフローメトリー定量法（例えば、Lorenzo H.K. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:198-201に開示されている。）、アポトーシスヌクレアーゼアッセイ（例えば、Hughes F.M. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:47-62に開示されている。）、フロー及びレーザースキャニングサイトメトリーによる、例えばアポトーシス血漿細胞のようなアポトーシス細胞の分析（例えば、Darzynkiewicz Z. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:18-39に開示されている。）、アネキシンVによるラベリングによるアポトーシスの検出（例えば、Bossy-Wetzel E. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:15-18に開示されている。）、細胞死遺伝子ための一過性導入アッセイ（例えば、Miura M. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:480-92に開示されている。）例えばアポトーシス血漿細胞のようなアポトーシス細胞における核酸開裂を検出するアッセイ（例えば、Kauffman S.H. et al. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:3-15に開示されている。）が挙げられる。アポトーシスは、また、プロピジウムヨージド染色法又はTUNELアッセイにより測定される。もう一つの態様では、アポトーシスに含まれる細胞シグナリング経路と関連する遺伝子（例えば、JNK）は、標準的な方法を使用して検出することができる。

【0131】

もう一つの態様では、ミトコンドリアの内膜透過を、例えばカルセイン（calcein）のような前記の内膜を通常透過しない死に伴う細胞質又はミトコンドリアマトリックスに付加することにより完全な細胞において検出することができる（Bernardi et al. 1999. *Eur. J. Biochem.* 264:687; Lemasters, J., J. et al. 1998. *Biochem. Biophys. Acta* 1366:177）。

もう一つの態様では、ミトコンドリアの内膜透過を、例えば前記のミトコンドリアの内膜ポテンシャルにおける変化（ $\Delta \psi$ ）を決定することにより、評価することができる。例えば、細胞を、例えばDiOC6（Gross et al. 1999. *Genes Dev.* 13:1988）、3,3'-ジヘキシルオキサカルボシアニン ヨージド（3,3'-dihexyloxa carbocyanine iodide）又はJC-1（5,5',6,6'-テトラクロロ-1,1',3,3'-テトラメチルベンズイミダゾリルカルボシアニン ヨージド（5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide））のような親油性カチオンフロ

のような親油性カチオンフロ

ロクロームと共にインキュベートされる。これらの染料は、 m により導かれる、ミトコンドリアに蓄積する。散逸が蛍光強度発光の減少（例えばDiOC6についてGross et al. 1999. Genes Dev. 13:1988を参照）又は前記の染料の排出スペクトルにおけるシフトを生ずる。これらの変化を、サイトフローメトリー又は顕微鏡検査により測定することができる。

【0132】

更なるもう一つの態様では、核へのKRCの移動を調節する化合物の能力が決定することができる。核へのKRCの移動を、例えば二つ以上の蛍光でラベルされたスピーシーの排出が同時に検出される核移動アッセイにより測定することができる。例えば、前記の細胞の核を、例えばHoechst 33342のようなDNAに特異的な公知の蛍光発色基によりラベルすることができる。前記のKRCプロテインを、GFPとの融合体としての発現又はKRCに特異的な蛍光発色基でラベルされた抗体に前記の試料を接触させることを含む、様々な方法によりラベルすることができる。核へ移動するKRCの量を、引用により本明細書に全ての内容が援用されている米国特許第6,400,487号に記載されているように、第一の蛍光でラベルしたスピーシーの量、すなわち第二の蛍光でラベルされたスピーシー、すなわちKRCに関して相関関係があるか又は相関関係がないように配列されている核の量を決定することにより決定することができる。

【0133】

一つの態様では、JNKシグナリング経路に関する化合物の効果を決定することができる。JNKグループのMAPキナーゼは、環境的なストレスに細胞を曝すことによるか又は親炎症サイトカインにより細胞を処理することにより活性化される。遺伝子ノックアウトを含む研究及び優勢な陰性ミュータントの使用の組み合わせにより、のリン酸化及び活性化におけるMKK4及びMKK7の両者が密接に結び付けられた。前記のJNKシグナル伝達経路の標的は、転写因子であるATF2及びc-Junを含む。JNKは、ATF2及びc-JunのNH₂末端領域に結合し、そして各転写因子の活性化ドメインのうちの二つのサイトをリン酸化することにより、転写活性を高める。JNKは、Thr-183及びTyr-185の両方のリン酸化により活性化される。JNKシグナル伝達経路に関する化合物の効果を決定するために、前記のシグナル伝達経路における様々な分子の活性化状態を調節する化合物の能力を、標準的な技法を使用して決定することができる。例えば、一つの態様では、JNKのリン酸化状態を、二つのリン酸化されたTPYモチーフを特異的に認識する抗-ACTIVE-JNK抗体（Promega）によるイミノプロットティングにより調べることができる。

【0134】

もう一つの態様では、NFkBシグナル伝達経路への化合物の効果を決定することができる。NFkBシグナル伝達経路の様々な構成成分の活性化状態を調節する化合物の能力を、標準的な技法を使用して決定することができる。NFkBは、炎症、抗アポトーシス及び免疫応答においてきわめて重要な役割を果たしている転写因子を含むRelドメインファミリーを形成する。NFkB/Relファミリーメンバーの機能は、細胞質に保持されるようにするNFkBの核内局在化ドメインをマスクする、IBと称される細胞質阻害プロテインという種類により調節されているTNF-a及びIL-1によるNFkBの活性化は、キナーゼを誘起するNFkB（NIK）に集中する一連のシグナリング中間体を含む。このキナーゼは、IBキナーゼ（IKK）イソホームを順に活性化する。これらのIKKは、IB分子のN末端に存在する二つの調節セリンをリン酸化し、26Sプロテオソーム複合体におけるの速いユビキリン化及び分解を誘発する。IBの分解はNFkB複合体における核内局在化シグナルのマスクを取り除き、核内への急速な移動を可能にし、それは、核内において同系のBエンハンサーエレメントを固定し、そして様々なNFkB応答標的遺伝子の転写を調節する。一つ以上の、NFkB阻害剤の状態、核内への移動するNFkBの能力、又はNFkBに依存する遺伝子転写の活性化を調節する化合物の能力を測定することができる。

【0135】

一つの態様では、AP-1活性を調節する化合物の能力を測定することができる。前記のは、前記の転写因子Fos及びJunからなる。前記のAP-1複合体の活性は、Jun及びFos

10

20

30

40

50

転写の調節により、翻訳後の修飾、例えばいくつかのMAPKS、ERK、p38及びJNの活性化により制御され、AP-1転写活性に必要される。一つの態様では、AP-1により媒介される転写の調節を測定することができる。もう一つの態様では、例えばAP-1活性を調節する化合物の能力、例えばそのリン酸化又はそのユビキチン化を調節することによる能力を測定することができる。一つの態様では、本技術分野で知られた測定法を使用してAP-1のユビキチン化を測定することができる。本技術分野で知られた測定法を使用してAP-1（すなわち、c-Jun及び/またはc-Fos）の分解を測定することができる。

【0136】

AP-1の低下はT細胞アレルギーへと繋がっている。したがって、一つの態様では、T細胞アレルギーを調節する供試化合物の能力を、例えば第二のT細胞応答をアッセイすることにより決定することができる。IL-2産生及び/又はT細胞増殖により測定されるように、T細胞が第二の活性化攻撃に应答しないならば、アレルギーの状態が誘発された。標準のアッセイ手順によりT細胞アレルギーを測定することができる。例えばT細胞増殖を、^[3H]チミンの取り込みをアッセイすることにより測定することができる。もう一つの態様では、シグナル伝達を測定することができる。例えばMAPキナーゼカスケードのメンバーの活性化又はAP-1複合体の活性化を測定することができる。もう一つの態様では、細胞内のカルシウムの可動化、NFATカスケードのプロテインレベルメンバーを測定することができる。

10

【0137】

もう一つの態様では、Ras及びRac活性への化合物の効果を標準的な測定法を使用して測定することができる。一つの態様では、例えばF-アクチンの蛍光免疫を測定することにより、アクチンポリマー化を測定することができる。

20

【0138】

もう一つの態様では、例えばAP1、SMAD、TRAF、RSK2及び/またはRunx2のユビキチン化への前記の化合物の効果を、例えばin vitro又はin vivoにおけるユビキチン化アッセイにより測定することができる。in vitroにおけるユビキチン化アッセイは、例えばFuchs, S. Y., Bet al.

(1997) J. Biol. Chem. 272:32163-32168に記載されている。in vivoにおけるユビキチン化アッセイは、例えばTreier, M., L. et al.

(1994) Cell 78:787-798に記載されている。

【0139】

一つの態様では、ユビキチン化への化合物の効果を評価するためにロウスルーブットアッセイを使用してもよい。例えば、WWP1の自己ユビキチン化又はRunx2のWWP1媒介ユビキチン化を、HECTドメイン及び組換え型E1及びE2 (UbcH7)を使用するアッセイで測定してもよい。供試化合物の存在下又は非存在下におけるポリユビキチン化された生成物を検出するために、SDS-PAGEを還元することにより生成物を分離してもよい。ビオチン化されたユビキチン及び検出可能なラベルを有するストレプトアビジンが、前記の生成物におけるユビキチンを可視化するために使用されてもよい。

30

【0140】

もう一つの態様では、ユビキチン化に影響する化合物をスクリーニングするために、ハイスルーブットアッセイが使用されてもよい。例えば、プロテインタグ（例えば、myc）を認識する抗体がプレートのウェルに結合してもよい。ついで、HECTドメインを含む、エピトープをタグとしたWWP1が、前記のプレート上の抗体に結合してもよい。ビオチン化されたユビキチン及びE1/UbcH7の存在下でWWP1の自己ユビキチン化を調節する化合物の能力について、化合物が試験されてもよい。

40

ビオチン化されたユビキチンは、例えばアルカリホスファターゼによりラベルされたストレプトアビジンにより検出されることができる。

【0141】

もう一つの態様では、例えば標的分子及び/又は結合パートナーの分解への前記の化合物の効果を、例えば完全長のKRC及び/又はそのフラグメントのようなKRCと、例えばSMAD、GATA3、Runx2、RSK2、TRAF、Jun及び又はFosとの免疫共沈降により測定することができ

50

る。分解が発生したかどうかを決定するために、前記の免疫共沈物のウエスタンブロッティング、及びKRC及び前記のKRC標的分子及び/又はKRC結合パートナーに対する抗体との前記のプロットのプローブを定量することができる。プロテインレベルを決定するために、パルス追跡実験も実施することができる。

【0142】

一つの態様では、B細胞におけるTGFβシグナリングを調節する化合物の能力を測定することができる。例えば、本明細書に記載されているように、KRCは、Glaプロモーター活性の共同活性化因子であり、そしてオステオカルシン遺伝子の共同抑制因子である。KRCの非存在下において、Gla転写はB細胞において減少し、そしてオステオカルシン遺伝子の転写は骨芽細胞において増加する。したがって、一つの態様では、B細胞におけるTGFβシグナリングを調節する化合物の能力を、Glaの転写を測定することにより測定することができる。もうオステオカルシン遺伝子転写を測定することができる。

RT-PCRは前記の転写を測定するために使用される。さらに、SMADと相互作用するKRCの能力が与えられ、そしてSMADレポーター構築物をドライブする。B細胞におけるシグナリングを調節する化合物の能力を、SMADの転写能力を測定することにより測定することができる。SMAD又はそのフラグメント、例えば塩基性SMAD結合エレメントは使用できるようにルシフェラーゼレポーター遺伝子にリンクしている。他のTGFβ調節遺伝子は本技術分野では知られている(例えば、Massague and Wotton, 2000 EMBO 19:1745.)。

【0143】

一つの態様では、骨芽細胞においてATF4シグナリングを調節する化合物の能力を測定することができる。例えば、本明細書に記載されているように、KRCの過剰発現は、ATF4により推進される転写及びATF4機能のRSK2により媒介される強化を阻害する。KRCの非存在下では、ATF4

mRNA及びプロテインレベルが上昇し、高リン酸化されたATF4が蓄積し、そしてRSK2の自己リン酸化が増加し、例えば過度にリン酸化されたRSK2となる。したがって、一つの態様では、骨芽細胞においてATF4シグナリングを調節する化合物の能力を、例えばATF4の転写を測定することにより測定することができる。もう一つの態様では、ATF4のリン酸化を測定する。更なるもう一つの態様では、RSK2の自己リン酸化を測定する。リン酸化は、例えば、*in vitro*キナーゼアッセイを使用して測定され、そして例えばRSK2のようなプロテインの自己リン酸化は、例えば前記のプロテインのリン酸化された形態及び/若しくはリン酸化されない形態に特異的である抗体による免疫プロット、並びに/又は二つの上流のアルギニン残基により先行されたリン酸化されたセリン/スレオニン、すなわちRskプロテイン基質のためのコンセンサスモチーフを認識する抗体による免疫プロットを使用して決定することができる。もう一つの態様では、RSK2のキナーゼ活性は、例えばRSK2基質をリン酸化するRSK2の能力を評価することにより決定される。

【0144】

もう一つの態様では、骨形成及び鉱化作用を調節する化合物の能力が測定される。例えば、本明細書に記載されているように、KRCが欠損している動物は、増加した骨芽細胞活性及び骨形成と関連する骨硬化性表現形質を発症する。KRC、Runx2、Smad3及び/又はE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成は、Runx2のポリユビキチン化及びプロテアソーム依存分解を促進するWWP1の能力のために、Runx2の機能を阻害する。KRCは、この複合体の不可欠でありかつ必要とされる構成成分である。なぜならば、骨芽細胞においてそれが欠損すると、Runx2プロテインのレベルが高まり、Runx2転写活性が促進され、Runx2標的遺伝子の転写が高まり、そして*in vivo*で大いに骨形成が増加するからである。同様にKRC、RSK2及び/又はE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成は、RSK2のポリユビキチン化を促進するWWP1の能力、及びRSK2の自己リン酸化を阻害するKRC及びWWP1の能力のために、RSK2機能を阻害する。KRCが存在しない場合、RSK2の自己リン酸化は増加することから、RSK2機能の調節においてKRCが決定的な役割を果たしていることを示唆している。骨形成及び鉱化作用を調節する化合物の能力を決定

10

20

30

40

50

するための様々なin vitroの測定法は当業者に知られている。例えば、骨格構造は、肉柱形成（骨髄により満たされている交信し合うスペースの網を形成する癌性の骨における吻合する骨性の骨片）のデジタルラジオグラフィーによりアッセイすることができ、三次元 μ -QCTイメージングにより、及び骨の断面の分析により決定することができる。加えて、小柱数、小柱の厚さ、小柱のスペース、組織量あたりの骨量（BV/TV）及び骨密度（BMD）も μ -QCTイメージングにより決定することができる。これらの分析を全骨格の調製物又は個々の骨について実施することができる。鈣化された骨及び鈣化されていない軟骨形成は、例えばアリザリンレッド/アルシアンブルー染色のような組織化学的分析により決定することができる。骨芽細胞機能対破骨細胞機能に対して効果を発揮する化合物をアッセイするために、M-CSF及びRANKLの存在下で骨髄（BM）を培養して、TRAP+破骨細胞を発生させることにより、in vitroにおける破骨細胞の分化アッセイが実施される。In vivoにおいて化合物が破骨細胞機能又は破骨細胞に効果を有するかどうかの決定は、例えば骨髄移植により実施されることができる。加えて、様々な組織形態計測的パラメーターが分析され、骨形成速度を決定することができる。例えば、蛍光顕微鏡検査により可視化される、骨のカルセインによる二重ラベリングは、骨芽細胞の骨形成能力を反映する骨石灰化速度（MAR）を掛けることにより、及び骨表面あたりの石灰化面（MS/BS）により算定される骨形成速度（BFR）を決定することができる。一つの態様では、キレート化する蛍光色素、例えばxylenol orangeを使用して骨を可視化することができる。さらに、骨芽細胞数の信頼性の高いインジケータである全破骨細胞表面が、骨様の厚さ、すなわち石灰化を經ていない骨の厚さとして測定されることができる。骨の断片もまた、in vivoにおける骨形成の分析のためVon Kossa及びToluidine Blueによる染色に分析することができ、例えばTrapp5b及びデオキシピリジノリン（deoxypyridinoline）の血清レベルは、骨形成の指標として決定することができる。骨芽細胞の前駆体及び未成熟な骨芽細胞のex vivo培養もまた、細胞が細胞外マトリックス、すなわち骨の鈣化されたマトリックスの生成を反映する、鈣化された小結節を形成する能力を備えているかどうかを決定するために実施することができる。さらに、これらの培養細胞は、例えば細胞数のカウントによりそれらの増殖能力についてアッセイすることができ、そして例えばアルカリホスファターゼのような、骨形成の様々なマーカー存在のために染色することができる。これらの同じ培養細胞は、例えばBSP、Coll(a)1、及びOCN、ALP、LRP5、Osterix、Runx2、RANKL、RSK2、及びATF4のような、骨形成、鈣化作用及び破骨細胞の形成に関与していると知られている数多くの分子のmRNA及びプロテイン産生の様々な分析に供することができる。

10

20

30

【0145】

骨形成及び鈣化作用を調節する化合物の能力もまた、培養細胞を使用して測定することができる。

【0146】

一つの態様では、間葉の肝細胞は、結合形成のためのアッセイに使用してもよい。例えば、骨芽細胞を形成することができる多能性細胞、すなわち間葉の肝細胞（例えば、一次細胞又は株化細胞）は、関心ある化合物と接触させることができ、そして前記の多能性細胞が骨芽細胞へ分化するのを視覚的に評価することができる。前記の多能性細胞の骨芽細胞への分化もまた、比色定量アッセイを使用して細胞のアルカリホスファターゼのレベルをアッセイすることにより評価される。一つの態様では、全細胞数は、例えばAlamar blueで細胞を染色することにより細胞のアルカリホスファターゼのレベルに対して標準化される前記の培養された、分化された細胞の鈣化作用は、例えばxylenol orange染色及びvon Kossa染色により決定することができ、培養0日にプレートに接種してもよい。培養1日目に、細胞が分化される。培養1日目に、供試化合物を前記の培養物に添加する。分化は、アルカリホスファターゼアッセイを使用して分析さら、そして細胞生存率はalamar blueを使用して測定する（例えば、培養4日目 - 10日目）。細胞外マトリックスの形成は、例えば培養21日目に測定する。

40

【0147】

基質又は標的分子（例えば、KRCの場合にはRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、CBF、WWP1、

50

AP-1、RSK2及び/又はRunx2)へのKRC(又はKRCをシグナル伝達経路における分子)の結合を調節する化合物の能力もまた決定することができる。標的分子(例えば基質のような結合パートナー)へのKRCの結合を調節する供試化合物の能力を決定することは、例えばラジオアイソトープ又は酵素ラベルを前記の標的分子にカップリングし、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子への前記標的分子の結合が、複合体における前記のラベルされたKRC標的分子を検出することにより決定されることができ、複合体における前記のラベルされたKRC標的分子を検出することにより決定されることができ、成し遂げることができる。あるいは、KRCは、複合体における標的分子へのKRCの結合を調節する供試化合物の能力をモニターするために、ラジオアイソトープ又は酵素ラベルとカップリングすることができる。KRCに結合する前記の供試化合物の能力を決定することは、例えばラジオアイソトープ又は酵素ラベルと前記の化合物とカップリングさせ、KRCへの前記の化合物の結合が複合体における前記のラベルされた化合物を検出することにより決定されることができ、成し遂げることができる。例えば、標的は ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 又は ^3H により直接的か又は間接的の何れかでラベルされることができ、そして前記のラジオアイソトープは放射線放出を直接カウントするか又はシンチレーションカウントにより検出することができる。あるいは、化合物は、例えばセイヨウワサビパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はルシフェラーゼによりラベルされることができ、前記の酵素ラベルは、適当な基質を産生物への変換を決定することにより検出することができる。

10

【0148】

もう一つの態様では、酵素により作用されるか又は基質に作用する、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の能力は測定されることができ。例えば、一つの態様では、KRCのリン酸化への化合物の効果は、本技術分野で知られている測定法を使用して測定することができる。

20

【0149】

もう一つの態様では、WWP1とRunx2との間の相互作用は、本技術分野で認識された技術を使用して測定されてもよい。

【0150】

あらゆる相互作用する物質によりラベルされることなく、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子と相互作用する化合物の能力を決定することもまた本発明の範囲内である。例えば、マイクロフィジオメーター(microphysiometer)は、化合物又はKRC分子の何れか一方がラベルされることなく、前記の化合物と前記のKRC分子との間の相互作用を検出するために使用されることができ(McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912)。本明細書で使用されているように「マイクロフィジオメーター(microphysiometer)」(例えば、サイトセンサー(Cytosensor))は、light-addressable potentiometric sensor (LAPS)を使用して細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、化合物との間の相互作用のインジケータとして使用されることができ。

30

【0151】

KRCの典型的な標的分子としては、Jun、TRAF(例えばTRAF2)、GATA3、例えばSMAD2及びSMAD3のようなSMAD、CBF、RSK2及び/又はRunx2が挙げられる。

【0152】

もう一つの態様では、KRCの上流又は下流で作用する、KRCが関与する経路において作用する異なる(すなわち非KRC)分子は、スクリーニングアッセイにおいて使用されるインジケータ組成物に含まれる。前記の分子を使用するスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物は、また、間接的ではあるがKRC活性を調節するのに有用である。例えば、NFkB-依存遺伝子の発現を活性化する、TRAF(例えば、TRAF2)能力は測定されることができ。又はTGFb-依存遺伝子の転写を活性化するSMADの能力は測定されることができ。

40

【0153】

本発明の細胞は、内因的にKRCが関与するシグナル経路におけるKRC又はもう一つのプロテインの少なくとも一つを発現することができるか、又は組換え法を使用して操作される

50

ことができる。例えば、前記のKRCプロテイン及び/又はKRCの上流若しくは下流で作用する非プロテインを発現するように操作された細胞は、前記の細胞に前記のプロテインをコードする発現ベクターを導入することにより調製されることができる。

【0154】

KRC、又KRCが関与するシグナル伝達経路の分子の発現に使用されることができる組換え発現ベクターは本技術分野では知られている。例えば、前記のcDNAが、標準的な分子生物学の技法を使用して、最初に組換え発現ベクターに導入される。cDNAは、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する増幅法又は適当なcDNAライブラリーのスクリーニングにより得られることができる。KRCが関与するシグナル伝達経路(例えば、ヒト、ネズミ及び酵母)における分子又はKRCのcDNAのヌクレオチド配列は本技術分野では知られており、そして、前記のcDNAのヌクレオチド配列は、標準的なPCR法によるcDNAの増幅を見込めるPCRプライマーのデザイン、及び標準的なハイブリダイゼーション法を使用してcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用されることができるハイブリダイゼーションプローブのデザインに使用されることができる。

10

【0155】

KRC及びKRCが関与するシグナル伝達経路におけるKRC以外の分子をコードするcDNA分子の分離又は増幅に続いて、前記のDNAフラグメントが発現ベクターに導入される。本明細書に使用されているように、「ベクター」という用語は、それが結合されているもう一つの核酸を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの一つのタイプは、付加されたDNAセグメントが連結されている環状の二重らせんループを意味する「プラスミド」である。もう一つのタイプのベクターは、付加されたDNAセグメントがウイルスゲノムに連結されているウイルスベクターである。いくらかのベクターは、それらが導入される宿主細胞で自律増殖できる(例えば、細菌由来の複製能力を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター及び/例えばレンチウイルスのようなウイルスのベクター)は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それでもって宿主ゲノムに従って複製される。さらに、いくらかのベクターは、それらが機能的に結合されている遺伝子の発現を方向付けることができる。前記のベクターは、本明細書では「組換え発現ベクター」又は単に「発現ベクター」として言及される。一般に組換えDNA法において有用である発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書では、「プラスミド」及び「ベクター」は、同義に使用される。しかしながら、本発明は、同等の機能を供する、例えばウイルスベクター(例えば、複製欠損のレトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス)のような前記の他の形態の発現ベクターを含むことを意図されている。

20

30

【0156】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞で前記の核酸の発現に適した形態である核酸を含む。このことは、前記の組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に機能的に結合された、発現に使用される宿主細胞及び望ましい発現レベルに基づいて選ばれた一つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターの範囲内において、「機能的に結合された」は、関心あるヌクレオチド配列が前記のヌクレオチド配列(例えば、前記のベクターが前記の宿主細胞に導入された場合、*in vitro*の転写/翻訳システムにおいて又は宿主細胞において)の発現が見込まれる様式で調節配列に結合されていることを意味することを意図されている。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含む。前記の調節配列は、例えばGoeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。調節配列としては、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現を方向付けるもの、いくらかの宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現を方向づけるもの(例えば、組織特異的調節配列)、又はいくらかの条件のみにおいてのみヌクレオチド配列の発現を方向づけるもの(例えば、誘発性調節配列)が挙げられる。

40

50

【 0 1 5 7 】

哺乳動物細胞で使用した場合に、前記の発現ベクターの制御機能が、しばしばウイルス調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス及びサルウイルス40から誘導される。哺乳動物発現ベクターの非制限的な例としてはpCDM8が挙げられる (Seed, B., (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman et al. (1987), *EMBO J.* 6:187-195)。異なる調節配列を担っている様々な哺乳動物発現ベクターは市販されている。哺乳動物宿主細胞における前記の核酸の構成的発現のために、好ましい調節エレメントは、サイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーである。さらに、哺乳動物細胞のための誘発性調節システムは本技術分野では知られており、例えば遺伝子発現が金属イオンにより調節されるシステム (例えば、Mayo et al. (1982) *Cell* 29:99-108; Brinster et al. (1982) *Nature* 296:39-42; Searle et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:1480-1489を参照。)、ヒートショック (例えば、Nouer et al. (1991) in *Heat Shock Response*, e.d. Nouer, L., CRC, Boca Raton, FL, pp167-220を参照。)、ホルモン (例えば、Lee et al. (1981) *Nature* 294:228-232; Hynes et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2038-2042; Klock et al. (1987) *Nature* 329:734-736; Israel & Kaufman (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2589-2604; and PCT Publication No. WO 93/23431を参照。)、FK506関連分子 (例えば、PCT Publication No. WO 94/18317) 又はテトラサイクリン (Gossen, M. and Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) *Science* 268:1766-1769; PCT Publication No. WO 94/29442; and PCT Publication No. WO 96/01313を参照。) である。さらに、多くの組織特異的調節配列が本技術分野では知られ、その例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的、Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、特にT細胞受容体 (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) 及びイミノグロブリン (Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748) のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター (ニューロフィラメント、Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916) 及び乳腺特異的プロモーター (乳清プロモーター、U. S. Patent No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166)、type Iコラーゲンプロモーター又は骨芽細胞において発現を方向付けるOsterixプロモーターが挙げられる。発生上で調節されたプロモーターもまた、例えばネズミhoxプロモーター (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) 及びa-フェトプロテインプロモーター (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546) を含む。

【 0 1 5 8 】

DNAベクターは、一般に行われている形質移入法により哺乳動物に導入されることができ、本明細書で使用されているように、「形質移入」という用語の様々な形態は、本技術分野で認められた外来性核酸 (例えば、DNA) を哺乳動物宿主細胞へ導入する様々な方法を意味することを意図され、例えばリン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン媒介形質移入法、リポフェクション法又はエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞に形質移入するための適切な方法はSambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) 及び他の実験マニュアルに

開示されている。DNAベクターもまた、例えばウイルス粒子に取り込まれたものであるウイルスベクターによる感染により導入されることができる。

【0159】

哺乳動物細胞の安定な形質移入ためには、使用された発現ベクター及び形質移入法により、細胞の小さな画分が前記の外來性DNAをそれらのゲノムに結合することができる。組み込み体を同定してそして選択するために、分別できるマーカー（例えば、抗生物質への耐性）をコードする遺伝子が、関心ある遺伝子とともに一般に宿主細胞に導入される。好ましい分別できるマーカーとしては、例えばG418、ハイグロマイシン及びメトトレキサートのような薬剤に対する耐性を付与するものが挙げられる。分別できるマーカーをコードする核酸は、KRCをコードするベクターとは異なるベクター、又はより好ましくは同じベクターにより宿主細胞に導入されることができる。導入された核酸により安定して形質移入された細胞は、薬剤による分別により同定されることができる（例えば、分別できるマーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生き残るのに対し他の細胞は死滅する。）。 10

【0160】

一つの態様では、前記の発現ベクターのうちで、コードされた配列は、前記のインジケータ細胞における前記の分子の恒常的発現を見込める調節配列に機能的に結合されている（ウイルス性調節配列、例えばサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーを使用することができる。）。インジケータ細胞におけるKRC、又はKRCが関与するシグナル伝達経路における分子の恒常的発現を見込める組換え発現ベクターの使用は、前記の分子の活性を促進又は阻害する化合物の同定には好ましい。代替の態様では、前記のコードされた配列は、前記の発現ベクターのうちでは、KRC、又はKRCが関与するシグナル伝達経路における分子の内因性の遺伝子の調節配列（すなわち、前記の内因性遺伝子から誘導される前記の調節プロモーター領域）に機能的に結合されている。発現が内因性調節配列により調節されている組換え発現ベクターの使用は、前記の分子の転写発現を促進又は阻害する化合物の同定に好ましい。 20

【0161】

さらなるもう一つの発明の態様では、前記のKRC又はそのフラグメントは、ベイトプロテイン、例えばツーフライブリッド法又はスリーハイブリッド法（例えばU.S. Patent No 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; and Brent WO94/10300を参照。）においてKRCに結合するか又はKRCと相互作用し（「結合プロテイン」又は「bp」）、そしてKRC活性に関与する他のプロテインを同定するために使用されることができる。前記のKRC結合プロテインもまた、例えばKRCにより媒介されるシグナリング経路の下流エレメントのようなKRCプロテイン又はKRCの標的によるシグナルの伝達に関与しているようである。あるいは、前記のKRC結合プロテインはKRC阻害剤でありうる。 30

【0162】

ツーフライブリッドシステムは、分離できるDNA結合及び活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュラー性質に基づいている。簡単には、前記のアッセイは、二つの異なるDNA構築物を利用している。一つの構築物では、KRCプロテインをコードする遺伝子は、公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合されている。その他の構築物では、DNA配列のライブラリーから得られた、同定されていないプロテイン（「プレイ」又は「試料」）をコードするDNA配列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合されている。前記の「ベイト」プロテイン及び「プレイ」プロテインが相互作用し、in vivoでKRC依存性複合体を形成することができるならば、前記の転写因子のDNA結合ドメイン及び活性化ドメインが近接した部位に導入される。この近接した部位への導入により、前記の転写因子に応答する転写調節サイトに機能的に結合されているレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写が可能になる。前記のレポータ 40 50

一遺伝子の発現は検出されることができ、そして前記の機能的な転写因子を含む細胞コーンが分別されることができ、KRCプロテイン又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子と相互作用するプロテインをコードする、クローニングされた遺伝子を得るために使用されることができる。

【0163】

B. 無細胞アッセイ

もう一つの態様では、前記のインジケータ組成物は無細胞組成物である。宿主細胞若しくは培養液に組換え法により発現された、KRC若しくはKRCが関与するシグナル伝達経路の非KRCプロテインの少なくとも一つは、プロテイン精製の標準的な方法を使用して宿主細胞又は細胞培養液から分離されることができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過法、電気泳動法、及び抗体による免疫親和性精製法が、無細胞組成物で使用されることができると精製されたか又は半ば精製されたプロテインを調製するために使用されることができる。あるいは、関心のあるプロテインを発現する細胞の可溶化液又は抽出物は、無細胞組成物として使用するために調製されることができる。

【0164】

一つの態様では、特異的にKRC活性、又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の活性を調節する化合物は、KRCが結合する標的分子とKRCとの相互作用を調節する能力に基づいて同定される。前記の標的分子は、DNA分子（例えばシャペロン遺伝子のようなKRC応答エレメント）又はプロテイン分子であり得る。プロテイン-プロテイン相互作用の検出（例えば、免疫沈降法及びツーハイブリッド法等）を見込めるか、又はDNA結合プロテインと標的DNA配列との間の相互作用の検出（電気泳動移動度シフト解析、デオキシリボヌクレアーゼIフットプリント法、及びオリゴヌクレオチドプルダウン法等）を見込める、適切なアッセイ法が本技術分野では知られている。供試化合物の存在下又は非存在下で前記のアッセイを実施することにより、これらのアッセイは、標的分子とKRCとの相互作用を調節する（例えば、阻害又は促進する）分子を同定するために使用されることができる。

【0165】

一つの態様では、供試化合物の存在下でのKRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の標的分子への結合量は、前記の供試化合物の非存在下でのKRCの前記の標的分子への結合量よりも多い場合、前記の供試化合物は、KRCが標的分子に結合するのを促進する化合物であると同定される。もう一つの態様では、供試化合物の存在下でのKRCの前記の標的分子への結合量は、前記の供試化合物の非存在下での前記のKRC（又は、例えばJun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、RSK2、ATF4及び/又はWWP1）の前記の標的分子への結合量よりも少ない場合、前記の供試化合物は、KRCが標的分子に結合するのを阻害する化合物であると同定される。KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子への前記の供試化合物の結合は、上記のように直接的か又は間接的かのいずれかで決定されることができる。供試化合物に結合するKRCプロテインの能力を決定することはまた、例えばリアルタイムBiomolecular Interaction

Analysis (BIA) のような測定法を使用して成し遂げられる (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem.

63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705)。本明細書で使用されているように、「BIA」は、あらゆる相互作用する物質 (BIACore) をラベルすることなく、リアルタイムで生体分子特異的な相互作用を研究するためのテクノロジーである。表面プラズモン共鳴法 (SPR) の光学的な現象の変化は、生物学的な分子間のリアルタイムな反応の指標として使用されることができる。

【0166】

KRC（又は、例えばJun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、RSK2、ATF4及び/又はWWP1）プロテインと標的分子との間の相互作用、又はKRCが関与する経路の他の分子（例えば、WWP1及びRunx2）との相互作用を調節する供試化合物を同定するための本発明の方法において、一つの態様において、完全なKRCアミノ酸配列を含むポリペプチドは、前記の

方法で使用されることができる。あるいは前記のプロテインの部分のみを含むポリペプチドは使用されることができる。例えば、分離されたKRC相互作用ドメイン（204-1055のアミノ酸又は相互作用ドメインを含むより大きなサブ領域からなる）は使用されることができる。もう一つの態様では、Runx2のRuntドメインを含むポリペプチド又は分離されたドメインは、本発明のアッセイに使用されることができる。更なるもう一つの態様では、前記のRuntドメインのPPXYモチーフは、本発明のアッセイに使用されることができる。もう一つの態様では、WWP1のWWドメインを含むポリペプチドは、アッセイに使用されることができる。前記のKRCプロテインと標的分子との間の相互作用を刺激又は阻害する供試化合物を同定するためにアッセイは使用されることができる。前記のプロテインと標的分子との間の相互作用を刺激する供試化合物は、供試化合物の非存在下における相互作用の程度に比べて、例えばKRCと標的分子との間の相互作用の程度を増加させる能力に基づいて同定され、そして前記の化合物は、細胞中でのKRCの活性を増加させると期待される。前記のプロテインと標的分子との間の相互作用を阻害する供試化合物は、供試化合物の非存在下における相互作用の程度に比べて、例えばKRCと標的分子との間の相互作用の程度を減少させる能力に基づいて同定され、そして前記の化合物は、細胞中でのKRCの活性を減少させると期待される。

10

20

30

40

50

【0167】

本発明の前記のアッセイ法の一つの態様では、例えば一方又は両者のプロテインの複合体を形成しなかったものから複合体を形成したものの分離を促すか又は前記のアッセイの自動化に適応させるために、KRC（又は、例えばJun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、RSK2及び/又はWWP1のようなKRCが関与するシグナル伝達経路の分子）又はそれぞれの標的分子のいずれかを固定化することが望ましい。供試化合物の存在下又は非存在下における、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子への供試化合物の結合、又は標的分子とKRCプロテイン（又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子）との間の相互作用は、反応する物質を入れるのに適したあらゆる容器において成し遂げられる。前記の容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管及びマイクロ遠心分離チューブが挙げられる。一つの態様では、プロテインの一方又は両方がマトリックスに結合することができるドメインが一つ以上の前記の分子に付加される融合プロテインが供給されることができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合プロテイン又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合プロテインは、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St.

Louis, MO）又はグルタチオン誘導マイクロタイタープレートの上に吸着されることができ、ついで前記の供試化合物と結合させ、ついでそれらは、前記の供試化合物、及び吸着されていない標的プロテインか又はKRCプロテインのいずれかと結合され、そして得られた混合物は、複合体形成を促す条件下（例え、塩及びpHについての生理学的条件）でインキュベートされた。インキュベーション後、前記のビーズ又はマイクロタイターウエルは洗浄され、結合していない構成成分を除去され、ビーズの場合前記のマトリックスは固定化され、そして複合体形成は、例えば上記のように直接的か又は間接的のいずれかで決定される。あるいは、前記の複合体は、前記のマトリックスから解離されることができ、そして結合又は活性のレベルは、標準的な測定法を使用して決定される。

【0168】

マトリックス上にプロテインを固定化する他の技法は、また、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用されることができる。例えば、KRCプロテイン若しくはKRCが関与するシグナル伝達経路の分子か、又は標的分子のいずれかは、ビオチン又はストレプトアビジンの結合を利用して固定化されることができる。ビオチン化されたプロテイン又は標的分子は、本技術分野で知られた調製法（例えば、biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL）によりビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシイミド）から調製されることができ、そしてストレプトアビジンがコートされた96ウエルプレート（例えばPierce Chemical）に固定化される。あるいは、プロテイン又は標的分子に反応するが、その標的分子への前記のプロテインへの結合を妨げない抗体は、前記のプレートの

ウエルに対して誘導体化されることができ、そして結合されない標的プロテイン又はKRCプロテインは、抗体結合により前記のウエル中でトラップされる。GST-固定化複合体のための上記アッセイ法に加えて、前記の複合体を検出するアッセイ法としては、KRCプロテイン又は標的分子と関連する酵素活性を検出することに依存する酵素結合アッセイのみならず、KRC若しくはKRCが関与するシグナル伝達経路の分子又は標的分子と反応する抗体を使用する複合体の免疫検出が挙げられる。

【0169】

C. *in vivo* アッセイ法

一つの態様では、*in vivo* アッセイ法は、骨形成を調節する化合物の能力を分析するために使用されることができ、例えば、一つの態様では、供試化合物はマウスに投与され、ついで前記の化合物の骨形成への効果は、本技術分野で知られた測定法を使用して測定される。例えば、骨の切片は、また、*in vivo*での骨形成の分析のためにVon Kossa及びToluidine Blueによる染色により分析されることができ、一つの態様では、例えば血清又は他の体液におけるTRAP 5b又はデオキシピリジノリン (DPD) のレベルは、本技術分野で知られた測定法を使用して測定される。

10

【0170】

一つの態様では、前記のマウスは成体マウスであり、そして成体における骨形成への前記の化合物の効果が測定される。もう一つの態様では、前記のマウスは、雌性マウスである。もう一つの態様では、前記のマウスは、卵巣を摘出されたマウスである。

20

【0171】

更なるもう一つの態様では、前記のマウスは、WWP1を過剰に発現するトランスジェニックマウスである。もう一つの態様では、前記のマウスは、WWP1の条件的な対立遺伝子を発現する。更なるもう一つの態様では、前記の条件的な対立遺伝子は、骨芽細胞に対するWWP1発現を制限する。

【0172】

もう一つの態様では、腫瘍転移モデルにおいて骨形成を調節する化合物の能力が試験される。例えば、一つの態様では、腫瘍細胞 (例えば、乳癌細胞のようなヒトの腫瘍細胞) が、免疫不全のマウスに注射され (例えば、心臓注射又は頸骨注射)、そして動物で骨形成に効果を示した化合物の能力が決定される。

30

【0173】

もう一つの態様では、本発明は、少なくとも一つのKRC (又は、例えば、Jun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はWWP1) が欠損した細胞を使用してKRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の生物学的効果を調節する化合物を同定する方法を提供する。前記の実施例に記載されているように、細胞におけるKRC活性の阻害 (例えば、KRC遺伝子の破壊) は、例えば骨形成及び鉱化作用を高める。KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子が欠損した細胞は、KRC自体よりも他の手段によりKRCにより調節される生物学的な応答を調節する薬剤 (すなわち、KRC欠損表現型を「救出する」化合物) を同定するために使用されることができ、あるいは、前記の遺伝子が条件的な方式で非機能的に与えられる「条件的なノックアウト」システムは、スクリーニングアッセイにおいて使用するために欠損した細胞を作るために使用されることができ、

40

WO 94/29442及びU.S. Patent No. 5,650,298に開示されているように遺伝子の条件的な破壊のためのテトラサイクリンによる調節システムは、細胞又は細胞が分離されることができ哺乳動物を作るために使用されることができ、前記の細胞と接触させる場合にテトラサイクリンの濃度の調節という調節方式においてKRC (又は、例えばJun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、CBFb、ATF4、RSK2及び/又はWWP1のような、KRCが関与するシグナル伝達経路における分子) における欠損を発現することができる。前記の動物から、例えばリンパ系細胞 (例えば、胸腺細胞、脾臓細胞及び/又はリンパ節細胞) のような特異的な細胞のタイプ又は例えばT細胞、B細胞、骨芽細胞、破骨細胞のような精製された細胞がスクリーニングアッセイに使用されることができ、一つの態様では、KRCの全長5.4 kB exon 2は、ネオマイシンカセツ

50

トにより置換されることができ、KRCプロテインを産生しない対立遺伝子を生ずることができる。

【0174】

同様に、本発明は、WWP1（又は、例えばJun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はKRC）を過剰に発現する細胞を使用して、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の生物学的効果を調節する化合物を同定する方法を提供する。本実施例に開示したように、KRC、WWP1とRunx2との間の多量体複合体の形成により、WWP1ポリユビキチン化及びプロテアソームに依存するRunx2の分解を生ずる。さらに、細胞においてWWP1のトランスジェニック過剰発現により、例えば骨形成及び鉱化作用の低下、すなわちオステオペニアが発症する。それゆえ、WWP1を過剰発現する細胞は、WWP1の生物学的活性を調節することにより、KRCにより調節される生物学的応答を調節する薬剤（すなわち、WWP1の過剰発現のオステオペニア表現型を救済する化合物）を同定するために使用されることができ、一つの態様では、空間的に制限される様式で前記の遺伝子が過剰に産生される「条件的ノックアウト」システムは、前記のスクリーニングアッセイに使用するためのトランスジェニック細胞を作るために使用されることができ、例えば、WWP1遺伝子は、type Iコラーゲンプロモーター又はosterixプロモーターと機能的にリンクされることができ、そしてこの構築物は、調節された様式でWWP1を過剰に発現し、そして空間的にWWP1の発現を調節する、細胞、又は細胞が分離されうる哺乳動物を作り出すために使用されることができ、前記の哺乳動物からの、具体的な細胞のタイプ、例えば骨芽細胞、又は例えば間葉の幹細胞、骨芽細胞、破骨細胞のような精製された細胞は、スクリーニングアッセイに使用されることができ、

10

20

【0175】

RSK2動物

前記のスクリーニング方法において、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子又はトランスジェニックWWP1細胞（以下、簡略化するために集合的にトランスジェニック細胞とする。）の少なくとも一つが欠損した細胞は、供試化合物と接触させることができ、そしてKRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子により調節される生物学的応答はモニターされることができ、トランスジェニック細胞における前記の応答の調節（適切なコントロール、例えば、未処理の細胞、又はコントロール薬で処理された細胞、又は適切な野生型の細胞と比較して）は、前記のKRCにより調節される応答の調節剤として供試化合物を同定する。

30

【0176】

一つの態様では、前記の供試化合物は、前記のトランスジェニック細胞のin vivoでの応答を調節する供試化合物を同定するために、ヒト以外のトランスジェニック動物、好ましくはマウス（例えば、前記のKRC遺伝子又はKRCが関与するシグナル伝達経路の遺伝子が、条件的に前記の手段により途絶されるマウス、又は前記のリンパ組織が、上記のようにKRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子において欠損したキメラマウス、又は上記のようにWWP1を過剰に発現するWWP1トランスジェニックマウス）に直接投与される。もう一つの態様では、トランスジェニック細胞が本発明のヒト以外の動物から分離され、そして前記の細胞においてKRCにより調節される応答を調節するex vivoで供試化合物を同定するために供試化合物と接触させる。

40

【0177】

トランスジェニック細胞は、KRC若しくはKRCが関与するシグナル伝達経路の分子において欠損しているように作られたヒト以外の動物、又はWWP1が過剰に発現される動物から得られることができる。好ましいヒト以外の動物としては、サル、イヌ、ネコ、マウス、乳牛、ウマ、ヤギ及びヒツジが挙げられる。好ましい態様では、前記の欠損した動物はマウスである。KRC、又はKRCが関与したシグナル伝達経路の分子（又はWWP1を過剰発現する）において欠損したマウスは、本技術分野において知られた方法を使用して作られることができる。前記の方法及び得られたKRC異型接合又は同型接合の動物の一例は、添付の実施例に開示されている。特定の遺伝子産物が欠損したヒト以外の動物は、典型的には同型組

50

み換えにより作られる。典型的な態様では、削除、付加又は置換が導入され、それによって例えば機能的な破壊のように前記の内因性KRCを変質する遺伝子の少なくとも一部を含む、ベクターが調製される。前記の遺伝子は、好ましくはマウスの遺伝子である。例えば、マウスKRC遺伝子は、プローブとしてマウスのKRC cDNAを使用してマウスゲノムDNAライブラリーから分離されることができる。ついで、前記のマウスKRC遺伝子は、前記のマウスゲノムにおいて内因性KRC遺伝子を調節するために適切な相同的組換えベクターを構築するために使用されることができる。好ましい態様では、前記のベクターは、相同的組換えの際に前記の内因性遺伝子が機能的に破壊されるようにデザインされる（すなわち、「ノックアウト」ベクターとしても言及され、機能的なプロテインを最早コードしていない。）。

10

【0178】

あるいは、前記のベクターは、相同的組換えの際に前記の内因性遺伝子が変異されるか又はさもなければ変質されるが、それでもなお機能的なプロテイン（例えば、前記の上流調節領域が変性されることができ、それによって前記の内因性KRCプロテインの発現を変化させる。）をコードしているようにデザインされる。相同的組換えベクターにおいて、前記の遺伝子の変性された部分は、その5'及び3'末端において相同的組換えが前記ベクターにより運ばれる外因性の遺伝子と胚性幹細胞における内因性遺伝子との間に起こるようにする前記の遺伝子の付加的な核酸により隣接させられる。付加された隣接する核酸は、前記の内因性遺伝子との相同的組換えを成功裡に行うのに十分な長さである。典型的には数千ベースの隣接DNA（5'及び3'末端の両端における）は、前記のベクターに含まれる（例えば、相同的組換えベクターの記述のためにはThomas, K.R. and Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503を参照のこと。）。前記のベクターは、胚性幹細胞の株化細胞に導入され（例えば、エレクトロポレーションにより）、そして前記の導入された遺伝子が前記の内因性遺伝子と相同的に結合された細胞が選択される（Li, E. et al. (1992) *Cell* 69:915を参照。）。ついで前記の選択された細胞は、動物（例えば、マウス）の胚盤胞に注入され、凝集キメラを形成する（例えば、Bradley, A. in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152を参照。）。ついでキメラの胚は、適切な偽妊娠の雌性里親動物に移植され、そして前記の胚は、満期出産させられる。前記の相同的に組換えられたDNAを生殖細胞に宿す前記の子孫は、動物のすべての細胞が導入遺伝子の生殖系列伝達により相同的に組換えられたDNAを含む、前記の動物を繁殖するのに使用されることができる。相同的組換えベクター及び相同的組換え動物を構築する方法は、さらにBradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829 and in *PCT International Publication Nos.*: WO 90/11354 by Le Mouellec et al.; WO 91/01140 by Smithies et al.; WO 92/0968 by Zijlstra et al.; and WO 93/04169 by Berns et al.に開示されている。

20

30

【0179】

前記のスクリーニングアッセイの一つの態様では、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子により調節される生物学的応答を調節する能力について試験される化合物は、前記の供試化合物をin vivoでヒト以外の動物に投与し、そして前記の動物における前記の応答に関する前記の供試化合物の効果を評価することによりトランスジェニック細胞と接触させる。

40

【0180】

前記の供試化合物は、薬学的組成物としてトランスジェニック動物に投与されることができる。前記の組成物は、典型的には前記の供試化合物及び薬学的に受容されるキャリアーを含む。本明細書で使用されているように、「薬学的に受容されるキャリアー」としては、薬学的投与に適合した、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌化合物、抗真菌化合物、等張化化合物及び吸収遅延化合物等が挙げられる。薬学的に活性な物質のための前記の媒体及び化合物の使用は、本技術分野ではよく知られている。あらゆる一般に

50

行われている媒体又は化合物が前記の活性化合物と不適合である範囲を除いて、前記の組成物におけるその使用は意図されている。追加の活性化合物もまた、前記の組成物に添加されることができる。薬学的組成物は、以下でより詳細に記載される。

【0181】

もう一つの態様では、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子により調節される生物学的応答を調節する化合物は、*ex vivo*で一つ以上の供試化合物をトランスジェニック細胞と接触させるステップ、そして読み出しの際に前記の供試化合物の効果を決定するステップにより同定される。一つの態様では、*ex vivo*で供試化合物と接触させたトランスジェニック細胞は、被験体に再度投与されることができる。

【0182】

*ex vivo*で前記のスクリーニング方法を実施するためには、トランスジェニック細胞はヒト以外のトランスジェニック動物又は胚から標準的な方法により分離されることができ、そして*in vitro*で供試化合物と共にインキュベート（培養）されることができる。細胞（例えば、T細胞、B細胞及び/又は骨芽細胞）は、標準的な方法によりトランスジェニック動物から分離されることができる。もう一つの態様では、前記の細胞は、一つ以上のKRC、Jun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はWWP1が欠損した動物から分離される。もう一つの態様では、細胞は、一つ以上のKRC、Jun、TRAF、GATA3、SMAD2、SMAD3、Runx2、ATF4、RSK2及び/又はWWP1が欠損し、且つWWP1を過剰に発現する動物から分離される。

【0183】

前記のトランスジェニック細胞と供試化合物との接触（*ex vivo*又は*in vivo*において）に続いて、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子により調節される前記の生物学的応答への前記の供試化合物の効果は、例えば前記の細胞の顕微鏡分析、前記の細胞の組織化学的分析、プロテインの産生、IL-2のようなサイトカイン遺伝子のような特定の遺伝子の誘発、本明細書に記載したように特定のプロテインのユビキチン化のような特定のプロテインの分解のような、例えば本明細書で述べた方法のうちの様々な適切な方法の一つにより決定されることができる。

【0184】

前記のアッセイが、化合物を試験する様々なレベルを提供するために組み合わせて使用されることは、当業者ならば理解されるであろう。例えば、一つの態様では、KRC、WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含む細胞インジケータ組成物、及びRunx2ポリペプチドに应答するレポーター遺伝子又はその生物学的に活性なフラグメントをさらに含む細胞インジケータ組成物を供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させる。前記のKRCシグナリング経路の構成分子の活性のインジケータが測定される。例えば、前記の供試化合物の存在下又は非存在下におけるレポーター遺伝子の発現が決定される。前記のKRCシグナリング経路におけるポリペプチドの活性を調節する関心のある化合物が選択される。ついで、前記の関心ある化合物は、第二のスクリーニングアッセイにより試験される。例えば、間葉の幹細胞の分化を増やす前記の関心ある化合物の能力が試験される。一つの態様では、KRC、WWP1及びRunx2、又はその生物学的に活性なフラグメントを含む間葉の幹細胞を前記の関心ある供試化合物と接触させ、ついで前記の供試化合物の存在下又は非存在下における間葉の幹細胞の分化への供試化合物の効果が決定される。

【0185】

補足的に、又は代用的に（例えば、第一スクリーニング、第二スクリーニングとして、又は補足的な第三のスクリーニング）例えば、Runx2に結合するWWP1の能力、又は基質分子をユビキチン化するWWP1の能力のようなWWP1の活性を調節する、関心ある供試化合物の能力が測定される。

【0186】

もう一つの態様では、関心ある化合物は、ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用を調節する、その化合物の能力について*in vivo*モデルでアッセイされる。例えば、

10

20

30

40

50

前記の供試化合物は、前記の動物に投与され、そして前記の供試化合物の存在下又は非存在下における骨の形成及び鉱化作用への前記の供試化合物の鉱化が決定され、そこで前記のヒト以外の動物における骨の形成及び鉱化作用が増加することが確認されると前記の関心ある供試化合物が、骨の形成及び鉱化作用を増加させる化合物であると同定される。このアッセイは第一スクリーニング、第二スクリーニング、第三のスクリーニング又は第四のスクリーニングとして使用されることが理解されるであろう。

【0187】

もう一つの態様では、KRC、WWP1及びRunx2又はその生物学的に活性なフラグメント及びRunx2ポリペプチドに応答するレポーター遺伝子又はその生物学的に活性なフラグメントを含むインジケータ細胞組成物は、供試化合物のライブラリーの各化合物と接触させる。前記の供試化合物の存在下又は非存在下における前記のレポーター遺伝子の発現が測定される。

10

【0188】

前記のレポーター遺伝子の発現を増やす関心ある化合物が選択される。間葉の幹細胞の分化を増やすステップからの前記の関心ある供試化合物の能力は、前記の関心ある供試化合物と間葉の幹細胞とを接触させるステップ、及び前記の供試化合物の存在下又は非存在下における間葉の幹細胞の分化への前記の供試化合物の効果を決定するステップを含む。一つの態様では、WWP1又はその生物学的な活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を提供するステップ、関心ある前記の供試化合物にインジケータ組成物を接触させるステップ、及び前記の供試化合物の存在下又は非存在下において前記のWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性への関心ある前記の供試化合物の効果を決定するステップを含む、前記のWWP1のE3ユビキチンリガーゼ活性を減少させる、関心ある前記の供試化合物の能力、及び/又は、

20

g) WWP1及びRunx2又はその生物学的な活性なフラグメントを含むインジケータ組成物を提供するステップ、関心ある前記の供試化合物にインジケータ組成物を接触させるステップ、及び前記の供試化合物の存在下又は非存在下においてWWP1とRunx2との相互作用への関心ある前記の供試化合物の効果を決定するステップを含む、WWP1とRunx2との間の相互作用を減らすステップ e) からの関心ある前記の供試化合物の能力を評価するステップ、及び

30

【0189】

一つの態様では、前記の供試化合物を前記の動物に投与するステップ及び前記のヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用における増加が確認された場合、関心ある前記の供試化合物が、骨形成及び鉱化作用を増加させる化合物として同定される、前記の供試化合物の存在下又は非存在下における骨形成及び鉱化作用への供試化合物の効果を決定するステップを含む、ヒト以外の成体動物における骨形成及び鉱化作用への関心ある前記の供試化合物の効果。

【0190】

D. 供試化合物

様々な供試化合物は、本明細書に開示されたスクリーニングアッセイを使用して評価されることができる。

40

「供試化合物」という用語は、本発明のアッセイで使用され、且つKRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子の発現及び/又は活性に影響するその能力についてアッセイされる、あらゆる試薬又は供試薬剤を含む。一つより多いの化合物、例えば複数の化合物は、例えばKRCの発現及び/又は活性を調節する能力について同時にスクリーニングアッセイにおいて試験されることができる。

「スクリーニングアッセイ」という用語は、好ましくは読み出しに影響する一つの化合物の能力を試験する試験よりもむしろ選択の読み出しに影響する複数の化合物の能力を試験するアッセイを意味する。好ましくは、前記のアッセイは、スクリーニングされた効果を有することがすでに知られていない化合物を同定する。一つの態様では、ハイスループットスクリーニングは、化合物の活性をアッセイするのに使用されることができる。

50

【 0 1 9 1 】

いくらかの態様では、試験される前記の化合物は、ライブラリー（すなわち、化合物ライブラリーに収容された化合物）から誘導されることができる。ペプチドライブラリーの使用は本技術分野ではよく確立されているのに加えて、例えばベンゾジアゼピンのような他の化合物の混合物を使用することができる新しい技術が開発された。（Bunin et al. (1992). J. Am. Chem. Soc. 114:10987;

DeWitt et al. (1993). Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 90:6909) peptoids (Zuckermann. (1994). J. Med. Chem.

37:2678) oligocarbamates (Cho et al. (1993). Science.

261:1303-), and hydantoins (DeWitt et

al. supra)。記載されているように様々な104-105により有機低分子の分子ライブラリーの合成のためのアプローチ (Carell et al.

(1994). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059- ; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061-)

10

【 0 1 9 2 】

本発明の化合物は本技術分野で知られたコンビナトリアルライブラリー法におけるあらゆるアプローチを使用して得られることができる。当該アプローチとしては、例えば生物学的ライブラリー、空間的にアドレスできる固相又は液相ライブラリー、解析が必要な合成ライブラリー、ワンビーズ - ワンコンパウンドライブラリー法及び親和性クロマトグラフィーによる選択を使用する合成ライブラリー法が挙げられる。前記の生物学的ライブラリー法は、ペプチドライブラリーに限られるのに対し、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は低分子ライブラリーに適用できる (Lam, K.S. (1997) Anticancer

20

Drug Des. 12:145)。分子ライブラリーの合成のための他の典型的な方法は、本技術分野では知られており、例えばErb et al. (1994). Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 91:11422- ; Horwell et al. (1996) Immunopharmacology 33:68 - ; and in Gallop et al. (1994); J. Med. Chem. 37:1233-に開示されている。

30

【 0 1 9 3 】

化合物ライブラリーは、溶液（例えば、Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421）、ビーズ (Lam (1991) Nature 354:82-84)、チップ (Fodor (1993) Nature 364:555-556)、細菌 (Ladner USP 5,223,409)、孢子 (Ladner USP '409)、プラスミッド (Cull et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869) 又はファージ (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390) (Devlin (1990) Science

249:404-406) (Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci.

87:6378-6382) (Felici (1991) J.

Mol. Biol. 222:301-310) として提供されることができる。更なるもう一つの態様では、前記のコンビナトリアルポリペプチドはcDNAライブラリーから調製される。

40

【 0 1 9 4 】

活性のためにスクリーニングされることができる典型的な化合物としては、ペプチド、核酸、炭水化物、有機低分子及び天然物抽出物ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 9 5 】

候補化合物 / 供試化合物としては、

1) Ig-tailed融合ペプチド及びランダムペプチドライブラリー (例えば、Lam, K.S. et al. (1991) Nature

354:82-84; Houghten, R. et al. (1991) Nature 354:84-86) 及びD-及び / 又はL-アミノ酸から構成されるコンビナトリアルケミストリーより誘導された分子ライブラリーを含む溶解性ペプチドのようなペプチド、

50

- 2) ホスホノペプチド (例えば、ランダム及び部分的に変性した、誘導されたホスホノペプチドライブラリー、Songyang, Z. et al. (1993) Cell 72:767-778を参照)
- 3) 抗体 (抗体のFab、F(ab')₂、Fab発現ライブラリーフラグメント及びエピトープ結合フラグメントのみならず、ポリクローナル、ヒト化された、抗自己志向的の、キメラ及び単鎖抗体)
- 4) 有機及び無機低分子 (例えば、コンビナトリアル及び天然物ライブラリー)
- 5) 酵素 (例えば、エンドヌクレアーゼ、ヒドロラーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、イソメラーゼ、ポリメラーゼ、キナーゼ、オキシドリダクターゼ及びATPアーゼ)、及び
- 6) KRCの突然変異体 (例えば、前記の分子の優性陰性変異体) が挙げられる。

【0196】

10

本発明の供試化合物は本技術分野において知られたコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチの何れかを使用することにより得られることができる。前記のアプローチとしては、生物学的ライブラリー、空間的にアドレスできる固相又は液相ライブラリー、解析が必要な合成ライブラリー、ワンビーズ-ワンコンパウンドライブラリー法及び親和性クロマトグラフィーによる選択を使用する合成ライブラリー法が挙げられる。前記の生物学的ライブラリー法は、ペプチドライブラリーに限られるのに対し、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は低分子ライブラリーに適用できる (Lam, K.S. (1997) Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0197】

20

分子ライブラリーの合成のための他の典型的な方法は、本技術分野では知られており、例えばDeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Science 261:1303; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; and Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233に開示されている。

【0198】

30

化合物ライブラリーは、溶液 (例えば、Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421)、ビーズ (Lam (1991) Nature 354:82-84)、チップ (Fodor (1993) Nature 364:555-556)、細菌 (Ladner USP 5,223,409)、孢子 (Ladner USP '409)、プラスミッド (Cull et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865-1869) 又はファージ (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390) (Devlin (1990) Science 249:404-406) (Cwirlla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382) (Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner supra.) として提供されることができる。

【0199】

40

前記のスクリーニングアッセイにおいて同定された化合物は、KRCにより調節される生物学的応答の一つ以上を調節する方法において使用されることができる。細胞と前記の化合物を接触させる前に、薬学的組成物 (前記) として前記の化合物を製剤化することが望ましいことは理解されるであろう。

【0200】

例えばKRCの発現若しくは活性、又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子を直接的又は間接的に調節する供試化合物が、前記の様々な方法の一つにより同定されると、ついで細胞へのその効果をさらに前記の選択された供試化合物 (すなわち、「関心ある化合物」) は細胞へのその効果についてさらに評価されることができる。例えば、前記の細胞への効果は、in vivo (例えば、前記の関心ある化合物を被験体に投与するステップによる)

50

又はex vivo（例えば、前記の被験体から細胞を分離し、ついで前記の分離された細胞を前記の関心ある化合物と接触させるステップか、あるいは前記の関心ある化合物を株化細胞と接触させるステップによる）のいずれかで前記の関心ある化合物と接触させるステップ、及び適切なコントロール（例えば、前記の生物学的応答を調節しない、コントロール化合物若しくはキャリアーで処理又は未処理の細胞）と比較して前記の細胞への前記の関心ある化合物の効果を決めるステップにより評価される。本発明は、また、前記のスクリーニングアッセイで同定された化合物に関するものである。

【0201】

VI. 治療 / 薬学的組成物の方法

一つの態様では、前記のアッセイは、骨形成が促進されることから利益を受ける被験体の予防治療に有用である化合物を同定するために使用されることができる。もう一つの態様では、前記のアッセイは、例えばKRCの生物学的活性、又はKRCにより調節されるシグナル伝達経路における分子の活性を阻害することにより、骨形成が促進されることから利益を受ける被験体の治療において有用である化合物を同定するために使用されることができる。一つの態様では、骨形成が促進されることから利益を受ける被験体は、成体の被験体、例えば雌性被験体である。一つの態様では、前記の方法を使用して同定される化合物は、例えば、単独又は他の治療方法と組み合わせて、骨の治療を促進するために使用されてもよい。

【0202】

骨形成が促進されることの恩恵を受ける典型的な疾患は、びらん性関節炎、骨の悪性疾患、骨粗しょう症、特発性骨粗しょう症、二級骨粗しょう症、股関節部の一時的な骨粗しょう症を含む骨粗しょう症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症における骨格の変形、慢性の腎不全（腎性骨形成異常症）、変形性骨炎（骨のパジエット病）、骨溶解性の転移、及び骨減少症を含む。前記の疾患は、骨密度の進行性消失及び骨組織が薄くなるという症状があり、骨形成及び鉱化作用が増加することの恩恵を受けることにより、破損及び / 又は骨折が発生しない疾患である。骨粗しょう症及び骨減少症は、加齢及び生殖状態から発症するだけでなく、例えば、鎮痙薬（例えば、癲癇の治療）、コルチコステロイド（例えば、関節リュウマチ及び喘息の治療）及び / 又は免疫抑制剤（例えば、癌の治療）のような数多くの医薬を長期にわたり使用した場合のみならず、数多くの疾患の二次的な症状においても発症する。例えば、グルココルチコイドにより誘発される骨粗しょう症は、例えばプレドニゾン（Deltasone, Orasone, etc.）、プレドニゾロン（Prelone）、デキサメタゾン（Decadron, Hexadrol）及びコルチゾン（Cortone Acetate）のようなグルココルチコイド医薬を投与されることにより発症する骨粗しょう症の一形態である。これらの医薬は、多くのリュウマチ疾患、例えば関節リュウマチ、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、及びリュウマチ性多発性筋痛を治療するためにしばしば使用される。骨粗しょう症が二次的な症状である他の疾患としては、若年性関節リュウマチ、糖尿病、骨形成不全症、甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進、クッシング症候群、吸収不良症候群、神経性食欲不振症及び / 又は腎疾患が挙げられるが、これらに限定されるものではない。加えて、非常に多くの行動が骨粗しょう症と関連している。前記の挙動としては、例えば長引く不活性又は不動、不十分な栄養（特にカルシウム、ビタミンD）、無月経症に至る過度な運動（月経の周期がなくなる。）、喫煙及び / 又はアルコール中毒が挙げられる。さらに、骨の形成及び鉱化作用の誘発を促進することは、例えば骨折又は破損、被験体自身の歯又は義歯のいずれかによる歯の置換、又は例えば閉経周辺期又は閉経と関連する骨喪失のような進行症状の回復症状を治療するために有益である。

【0203】

さらに、骨形成及び鉱化作用を抑制する手段として、KRC活性を刺激する本発明の化合物もまた、治療に使用されることができる。例えば、KRCを強めることにより骨形成及び鉱化作用を減少させるか又は阻害することは、二つ以上の骨による早熟の融合があるか、又は骨密度が非常に高い疾患、障害、状態又は傷害において有益である。前記の疾患、障害

、状態又は傷害は、頭蓋骨癒合症（骨癒合症）、骨粗しょう症（悪性の小児性形態、中間形態、成人形態を含む。）、原発性外骨格骨形成、及び顔面の多発粟粒性骨腫皮膚及び硬化性骨炎である。

【0204】

本発明の薬学的組成物は、想定される投与ルートに適合するように製剤化される。例えば、非経口投与、皮内投与、又は皮下投与に使用される液剤又は懸濁剤は、以下の構成成分を含むことができる。前記の構成成分としては、例えば注射用水、生理食塩水、不揮発油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又はその他の合成溶媒の無菌の希釈剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベンのような抗菌化合物、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸のようなキレート化剤、例えば酢酸、クエン酸又はリン酸のような緩衝剤及び例えば塩化ナトリウム又はデキストロースのような浸透圧調節剤が挙げられる。pHは、例えば塩酸又は水酸化ナトリウムのような酸又は塩基により調節されることができる。前記の非経口投与用調製物は、アンプル、使い捨てのシリンジ又はガラス若しくはプラスチック製の多回投与用バイアルに充填されることができる。

10

【0205】

注射に適した薬学的組成物としては、無菌水性溶液（水溶性の場合）又は分散液及び無菌の注射液又は注射分散液の用時調製用の無菌粉末が挙げられる。静脈内投与に適したキャリアーとしては、生理学的食塩水、Cremophor ELTM（BASF, Parsippany, NJ）のような無菌水、又はリン酸バッファー食塩水（PBS）が挙げられる。すべての場合において、好ましくは前記の組成物は、無菌であり、注入しやすい液体であるべきである。好ましくは、それは、製造及び貯蔵の条件下において安定であろうし、そして例えば細菌及び真菌のような微生物による汚染作用に対して保護されねばならない。前記のキャリアーは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等）及びその適切な混合物を含む、溶媒又は分散媒体であることができる。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティング剤の使用により、前記の分散剤の場合には必要な粒子サイズの維持により、及び界面活性剤の使用により維持されることができる。微生物の作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸及びチメロサル等の様々な抗菌化合物及び抗真菌化合物により成し遂げられる。多くの場合、例えばマンニトール、ソルビトールのような糖、ポリアルコール、塩化ナトリウムのような等張化合物を前記の組成物に含ませることが好ましいであろう。前記の注射組成物の持続的な吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような吸収を遅らせる化合物を前記の組成物に含ませることによりもたらされることができる。

20

30

【0206】

無菌注射液は、必要とされる量の前記の活性化化合物を、前記に列挙された成分の一つ又は組み合わせと共に適切な溶媒と混合し、必要に応じて無菌濾過することにより調製されることができる。一般的に、分散剤は、前記の活性成分を、上記に列挙した成分からの必要な他の成分及び基礎となる分散溶媒を含む無菌ビークルに混合することにより調製される。無菌の注射液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、前記の活性成分及びあらゆる望ましい成分を、その予め無菌濾過した溶液から粉末にする真空乾燥及び真空凍結乾燥である。

40

【0207】

経口投与組成物は、一般に不活性な希釈剤又は食用のキャリアーを含む。それらは、ゼラチンカプセルに充填されるか、又は錠剤に圧縮される。経口投与により治療するために、前記の活性化化合物は、賦形剤と混合されて、そして錠剤、トローチ又はカプセルの形態で使用されることができる。経口投与組成物は、また、口内洗浄剤として使用するために液体キャリアーを使用して調製されることができる。その際に液体キャリアー中の前記の化合物は、経口で投与され、そしてヒューツと音を立てて動き、吐き出されるか又は飲み込まれる。薬学的に適合して結合する化合物及び/又はアジュバント材料は前記の組成物

50

の一部として含めることができる。前記の錠剤、ピル、カプセル及びトローチ等には、以下の成分、又は同じような性質の化合物を含めることができる。前記の成分としては、例えば結晶セルロース、トラガントガム若しくはゼラチンのような結合剤、例えばデンプン若しくはラクトースのような賦形剤、例えばアルギン酸、プリモゲル（Primogel）（登録商標）若しくはコーンスターチのような崩壊剤、例えばステアリン酸マグネシウム若しくはステロート（Sterotes）（登録商標）のような滑沢剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤、例えばスクロース若しくはサッカリンのような甘味剤、又は例えばペパーミント、サリチル酸メチル、若しくはオレンジフレーバのような着香剤、が挙げられる。

【0208】

一つの態様では、前記の供試化合物は、例えばインプラント及びマイクロカプセル放出システムを含む持続性製剤のような、前記の化合物が体から速やかに排泄されるのを妨げるキャリアーにより調製される。例えばエチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸のような生物分解性であり、生体適合性であるポリマーを使用することができる。前記の製剤の調製法は当業者には明らかである。前記の材料は、また、例えばAlza Corporation及びNova Pharmaceuticals,

Inc. から購入できる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染された細胞を指向するリポソームを含む）もまた薬学的に受容されるキャリアーとして使用されることができる。これらは、例えばU.S. Patent No.

4,522,811に開示された方法のような当業者に知られた方法に従い調製されることができる。

【0209】

VII. 本発明のキット

本発明のもう一つの態様は、本発明のスクリーニングアッセイ又は調節する方法、又は診断アッセイを実施するためのキットに関するものである。例えば本発明のスクリーニングアッセイを実施するキットは、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子を含むインジケータ組成物、読み出し（例えばプロテインの分泌）を測定する手段、及びKRCの生物学的な効果の調節因子を同定するキットを使用するための指示書を含むことができる。もう一つの態様では、本発明のスクリーニングアッセイを実施するキットは、KRC又はKRCが関与するシグナル伝達経路の分子が欠損した細胞、読み出しを測定する手段、及びKRCの生物学的な効果の調節因子を同定するキットを使用するための指示書を含むことができる。

【0210】

もう一つの態様では、本発明は、本発明の調節方法を実施するキットを提供する。前記のキットは、例えば適切なキャリアー中の本発明の調節剤（例えば、KRCの阻害剤又は刺激剤）及びKRCの生物学的な効果を調節する前記の調節剤を使用するための指示書とともに適切な容器に梱包されている本発明の調節剤を含むことができる。

【0211】

本発明のもう一つの態様は、被験体におけるKRCの生物学的な効果に関連する疾患を診断するためのキットに関するものである。前記のキットは、KRCの発現を測定する試薬（例えば、KRC mRNAを検出する核酸プローブ又はKRCプロテインを検出するための抗体）、前記の被験体の結果が比較されるコントロール及び診断するためにキットを使用するための指示書を含むことができる。

【0212】

本発明の実施には、特に別に明記されない場合には、本技術分野内における、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学の一般に行われている技法が利用される。

前記の技法は、以下の文献に十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A

10

20

30

40

50

Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent NO: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 3 】

本発明は、本発明を限定すると解釈すべきでない次の実施例により、さらに説明されている。図及び配列リストのみならず、本出願で引用された全ての文献、特許及び公開された特許出願の全ての内容は、引用により本明細書に援用されている。

【 0 2 1 4 】

実施例

次の材料及び方法は、本実施例で使用された。

KRC欠損マウスの生殖

Shn3標的ベクターは、Exon 3及び4の間の5-kbゲノムフラグメント、並びにExon 2の5.5-kbフラグメントをPGKNEOベクターにクローニングすることにより構築された。前記の標的構築物は直線化され、そして電気穿孔によりES細胞に導入される。遺伝子標的ベクターは、相同遺伝子組換えによりネオマイシン耐性カセットとExon 4のアミノ酸1-108を置換され、Shn3プロテインを産生しない対立遺伝子を生じた。Shn3を標的とするESクローンは、サザンブロット法により同定され、そしてC57BL/6胚盤胞に注入された。Shn3 ES細胞は、破壊された対立遺伝子を129/B6 offspringに伝達した。ヘテロ接合性の子は、分析する前に5世代について野生型C57BL/6マウスに戻し交配された。すべての研究において分析されたマウスは、ヘテロ接合性F5の交雑雑種から派生される、性別を一致させた同腹仔のうちの一匹である。遺伝子型解析は、ネオマイシン特異的なプライマー及び前記のShn3遺伝子のexon 4のアミノ酸1-103に及ぶプライマーを使用して尾部DNAにおけるPCRにより実施された。

【 0 2 1 5 】

骨及び軟骨組織の染色

新生仔のマウスを除膜し、内臓を抜き、そして一夜95% ETOH中で脱水した。ついで前記の試料は、アセトン中に移し、されに48時間インキュベートした。骨格調製物をアルシアンブルー及びアリザリンレッドを使用して前記のように4日間染色した (McLeod, M. J. (1980). Teratology 22, 299-301)。染色に続いて、前記の試料を95% ETOHで30分間洗浄を3回繰り返した。ついで前記の軟部組織を1% KOHで洗浄した。

【 0 2 1 6 】

組織形態計測的な分析

in vivoにおける骨形成の分析のために、犠牲にする8日前及び3日前にカルセイン (1.6 mg/kg body weight) を2月齢WT及びShn3^{-/-}マウスに腹腔内に注射した。脛骨を採取し、軟部組織を取り除き、そして70%エタノール中に固定した。Development and Discovery Services at Charles River Laboratoriesにより組織形態計測的分析を実施した。手短に説明すれば、骨を脱灰させることなく、メタクリル酸メチルブロック中に包埋した。断面

をVon Kossa及びトルイジンブルーにより染色するか又は染色せずに放置した。前記の成長プレートの最も低い部分の下およそ1 mmの第二海綿質において組織形態計測を実施した。Olympus BX-60

fluorescenceを備えた顕微鏡及びOptronicsデジタルカメラシステムを利用するBioquant True Colors

softwareにより分析した。

【0217】

細胞及び組織培養

in vitroにおける破骨細胞形成の測定のために、aMEM (Mediatech, Inc.)中でマウスの大腿骨及び脛骨から骨髓細胞を分離した。赤血球細胞を溶解後、前記の細胞を一回洗浄し、そしてaMEM + 10% FBSに再度懸濁した。次いで、前記の骨髓細胞をaMEM + 10% FBS 250 μ lあたり 2×10^5 個の細胞を含むように48ウエルプレートに蒔いた。ついで、前記の細胞をM-CSF (Peprotech) 50

ng/mlの存在下で2日間培養した。ついで、最初の2日間培養後、M-CSF (50 ng/ml)、及びRANKL (Peprotech)の25 ng/mlか又は100 ng/mlのいずれかの存在下でさらに5日間培養した。ついで、前記の細胞を固定し、そして製造者の指示 (Sigma) に従い、tartate-耐性アルカリホスファターゼの存在のために染色した。

【0218】

前記のように骨芽細胞を、新生仔のWT及びShn3^{-/-}である同腹仔のうちの一匹の頭頂骨から分離した (7 Yoshida, Y., et al. (2000). Cell 103, 1085-109)。頭頂骨に由来する細胞を6-ウエルプレート中のaMEM + 10% FBS + 50 μ g/mlアスコルビン酸+ 5 mM b-グリセロリン酸中に蒔いた。低いコンフルエント段階で細胞を収穫し、そして 10^4 細胞/cm²という濃度で6-ウエルプレート中のaMEM + 10% FBS + 50 μ g/mlアスコルビン酸+ 5 mM b-グリセロリン酸中に再度蒔いた。von Kossa染色のために、細胞を培養21日目に10%中性にバッファー化されたホルマリンにより固定し、そして30分間5%硝酸銀により染色した。ALPのために、培養14日目に培養物を100%エタノールに固定し、ついで製造者の指示に従いアルカリホスファターゼキット (Sigma) を利用して染色した。細胞増殖アッセイのために、頭頂骨から得られた細胞 (0日における 10^5 /ウエル) を、6-ウエルプレート中のaMEM + 10% FBS + 50 μ g/mlアスコルビン酸+ 5 mM b-グリセロリン酸中に蒔いた。細胞を収穫し、そして生きている細胞を染色するトリパンブルー排除に続いて培養5日目に細胞数を、血球計数器を利用してカウントした

【0219】

骨髓移植

骨髓細胞を、ゲージ26の針を備えたシリンジを使用してRPMI 1640 (Mediatech, Inc.) + 10% FBSを流すことにより8週齢WTマウス的大腿骨及び脛骨から集めた。RBC溶解に続いて、細胞をRPMI 1640 + 10% FBS中で洗浄し、PBS (Gibco) に再度懸濁した。ついで 1×10^7 個の骨髓細胞を尾静脈注射によりg-線 (1200 rad) を照射した4週齢のWT 及びShn3^{-/-}マウスに移植した。前記の照射されたマウスを移植後4週間経過時にエックス線撮影により分析した。

【0220】

定量的リアルタイムPCR

定量的リアルタイムPCRのために、全RNAをトリゾール (Invitrogen) を利用して培養14日目のWT 及びShn3^{-/-}骨芽細胞から抽出した。amplification-grade DNase I (Invitrogen) による分離されたRNAの処理に続いて逆転写反応をiScript cDNA Synthesis

kit (BioRad) を使用して1 μ g RNAについて実施した。ついで定量的PCRをABI Prism 7700 Sequence

Detection System (Applied Biosystems) 上で実施した。PCR反応を、SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) 及び特定のプライマー0.2 μ Mを使用して25 μ l容量で実施した。二つの試料の間の特定の遺伝子に対するmRNAの相対的なレベルを、各試料にお

けるcDNAの量がb-actin Ctに対してノルマライズされるDDCT法を利用して算定した (Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). *Methods* 25, 402-408)。

【0221】

一過性導入及びレポーター遺伝子アッセイ

前骨芽細胞の株化細胞であるMC3T3-E1 Subclone 4及びネズミの間葉の幹細胞の株化細胞であるC3H10T1/2をATCCから入手し、そしてDMEM (Mediatech, Inc.) + 10% FBSに保持した。一過性導入のために、細胞を一夜で12ウエルプレートに 8×10^4 細胞/ウエルという濃度で蒔いた。ついで、Effectene transfection reagent (Qiagen) を使用して、細胞をルシフェラーゼレポーター遺伝子プラスミド及び示したように異なる組み合わせの発現構築物により導入した。導入されたDNAの全量を、必要とされるコントロールの空の発現ベクタープラスミドにより補足することにより一定に保たれた。全ての細胞に、導入の有効性のための標準化コントロール (normalization control) としてpRL-TK (Promega) により同時導入した。導入から48時間後に細胞を収穫し、そして1X Passive Lysis Buffer (Promega) 中で溶解した。Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用してルシフェラーゼアッセイを実施した。前記のShn3発現プラスミドはすでに知られている (Oukka, M., et al. (2002). *Mol Cell* 9, 121-131)。

10

20

【0222】

免疫沈降反応及び免疫プロット法

免疫沈降反応のために、293T細胞 (6×10^6 細胞/皿) をDMEM + 10% FBS を入れた10 cm皿に蒔き、そしてEffectene transfection reagentにより一過性に導入した。36時間から48時間後、細胞を収穫し、プロテアーゼ阻害剤を追加したTNT lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) 中で溶解した。4°Cで一夜アガロース共役anti-FLAG (M2, Sigma) 又はanti-Myc (9E10, Santa Cruz) モノクローナル抗体により免疫沈降反応に付した。ついで、免疫沈降物をlysis bufferで3回洗浄し、ついでSDS-PAGEに付し、ついでShn-3のための免疫プロット法に付した (Oukka, M., et al. (2002). *Mol Cell* 9, 121-131), FLAG (M2, Sigma), or Myc (9E10, SantaCruz)。

30

【0223】

内因性のShn3とRunx2との間の相互作用を検出するために、MC3T3-E1細胞を10 cm皿のDMEM + 10%子ウシの胎児の血清中でコンフルエンス (confluency) になるまで培養した。細胞がコンフルエンス (confluency) に達したとき、記載のように培養液を、 β -グリセロリン酸10 mM、アスコルビン酸50 μ M、及びBMP-2 (100 ng/ml) を補充したaMEM + 10%子ウシの胎児の血清、又は β -グリセロリン酸10 mM、及びアスコルビン酸50 μ Mを補充したaMEM + 10%子ウシの胎児の血清に変更した (Zamurovic, N., et al. (2004). *J Biol Chem* 279, 37704-37715)。細胞をさらに3-4日間分化させた。溶解の48時間前にTGF (2 ng/ml, R+D Systems) を幾らかの培養物に加え、溶解の2時間前にMG132 (10 μ M, Boston Biochem) を全培養物に添加した。細胞を収穫し、そしてTNT bufferに溶解させた。溶解物を、抗Runx2抗体3 μ g (Santa Cruz) 又はコントロールとしたウサギIgGとの免疫沈降反応に4°Cで一夜付した。Protein A/G-agarose (Santa Cruz) を加えて、免疫複合体を沈殿させ、ついで得られた免疫複合体の沈殿物をlysis bufferにより5回洗浄し、ついでSDS-PAGE及びShn3のための免疫プロット法に付した。

40

【0224】

さらに共免疫沈降実験をFLAG-epitope-tagged

Runx2 deletion mutantにより実施した。完全長 (アミノ酸1-521) は、QA、Runt及びPSTドメインを含む。QA変異株 (アミノ酸48-89) は、QAドメインを含むが、Runt及びPSTドメインを欠損している。Runt変異株 (アミノ酸102-229) は、Runt及びPSTドメインを含む。

50

Runt/PST変異株（アミノ酸102-521）はRunt及びPSTドメインを含むが、QAドメインを欠損している。Shn3とこれらの変異株との相互作用は、anti-FLAG抗体による免疫沈降に続く、ウエスタンブロット分析により決定される。

【0225】

Shn3^{-/-}及びWT骨芽細胞における内因性のAtf4及びRunx2プロテインレベルを検出するために、培養14日目及び培養21日目に頭頂骨の骨芽細胞を、プロテアーゼ阻害剤を追加したRIPA buffer中で溶解した。プロテイン濃度を決定し、試料当たりプロテイン50 µgをSDS-PAGEにより溶解し、ついでRunx2（EMD Biosciences）、Atf4（Santa Cruz）又はHsp90（Santa Cruz）について免疫ブロット法を実施した。

【0226】

ユビキチン化アッセイ

293T細胞においてRunx2のユビキチン化を検出するために、すでに確立されたプロトコールに従った（Campanero, M. R., and Flemington, E. K. (1997). Proc Natl Acad Sci U S A 94, 2221-2226）。手短に言えば、293T細胞にHis-Ub、FLAG-Runx2、Myc-WWP1及びShn3の組み合わせで一過性導入した。36時間から48時間後、細胞をMG132 10 µMで2時間処理した。細胞を洗浄し、そして6M guanidium-HClを含むbuffer中で溶解させた。ユビキチン化されたプロテインをNi-NTA-agarose（Novagen）により沈殿させ、そしてlysis buffer中で洗浄し、ついで25 mM Tris pH 6.8、20 mM イミダゾールを含むbufferにより洗浄した。沈殿物をSDS-PAGEに溶解し、ついでユビキチン化されたFLAG-Runx2をanti-FLAG（M2, Sigma）抗体による免疫ブロッティング法により検出した。

【0227】

免疫沈降された、in vitroでユビキチン化を促進するRunx2/Shn3複合体の能力をアッセイするために、上記の如く、FLAG-Runx2及びShn3の様々な組み合わせを293T細胞に一過性導入した。36時間から48時間後に、細胞をMG132 10 µMにより2時間処理した。細胞を洗浄し、TNT buffer中で溶解し、ついでanti-FLAG免疫沈降法を上記のように実施した。免疫複合体をTNT buffer中で洗浄し、ついで50 mM Tris、pH 8、50 mM NaCl、1 mM DTT、5 mM MgCl₂及び1 mM ATPを含むユビキチンアッセイ（UA）バッファー中で洗浄した。免疫沈澱物を、ユビキチン、ビオチン化されたユビキチン（Boston Biochem）並びに組換えE1及びE2（UbcH5a and UbcH7, Boston Biochem）を追加されたUA buffer、又はユビキチン及びビオチン化されたユビキチン（Boston Biochem）を追加されたUA buffer中に再び懸濁させた。ユビキチン化反応を30°Cで2時間行った。つづいて反応をSDS-PAGEにより分析し、PVDF膜に移動させ、ついでユビキチン化されたプロテインをstreptavidin-HRP（Zymed）によるブロッティングにより可視化した。

【0228】

パルスチェイス分析

293T細胞（1x10⁶細胞）を6ウエルプレートにおいてFLAG-Runx2（200 ng）及びShn3（1 µg）によるか、又はFLAG-Runx2（200 ng）により一過性導入した。36時間後、細胞を洗浄し、そしてシステイン/メチオニンを含まない培地で1時間インキュベートした。細胞を0.1 mCi/ml S³⁵でラベルされたシステイン/メチオニンで1時間ラベルした。次に、細胞を過剰の放射性元素でラベルされていないシステイン/メチオニンを含む培地で示された時間について追跡した。細胞を集め、そしてプロテアーゼ阻害剤を追加したTNT buffer中で溶解させ、ついでanti-FLAG免疫沈降法（M2 agarose slurry, Sigma）を4°Cで一晩行った。免疫沈降物をlysis buffer中で4回洗浄し、SDS-PAGEにより分析し、ついで免疫沈降物を蛍光間接撮影法により可視化し、そしてPhosphorImagerにより定量した。

【0229】

一過性のRunx2レポーターアッセイ

C3H10T1/2細胞を10%子ウシの胎児の血清を追加したDMEMを通過させた。細胞を、6X10⁴細胞/ウエルで、12ウエルプレートに蒔いた。次の日に、細胞に、Effectene transfecti

10

20

30

40

50

on

reagent (Qiagen) を使用する6xOSE2-ホタルルシフェラーゼ、pTK-ウミシタケルシフェラーゼ、Runx2及びShn3 cDNA発現構築物を導入した。24時間後、前記の培地を換え、そしてDMSOに溶解した化合物又はDMSOのみのコントロールを添加した。18時間後、細胞を収穫し、製造者の指示書 (Promega) に従いホタルルシフェラーゼ及びウミシタケルシフェラーゼの活性について分析した。Runx2により誘導される転写活性の、KRCにより媒介される発現を阻害する化合物はこのアッセイで陽性であると記録される。

【 0 2 3 0 】

C3H-Runx2細胞アッセイ

C3H10T1/2細胞に、コントロール (RV-GFP) 又はRunx2発現 (RV-Runx2) レトロウイルスを感染させた。さらに、レトロウイルスを感染させた細胞をcell sorting based on GFP expressionにより精製した。骨芽細胞のマーカであるOsterix、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン及び骨シアロプロテインを高いレベルで発現するために、RT-PCRにより、GFP-陽性のRV-Runx2感染細胞を決定する。さらに、RV-Runx2細胞におけるRunx2プロテインレベルが増加し、ついでWWP1 RNAiが増加する。化合物をスクリーニングするために、RV-Runx2細胞を 6×10^3 細胞/ウエルで96ウエルプレートのDMEM-10%培地中に蒔いた。24時間後、前記の培地を換え、供試化合物又はコントロール (DMSOのみ含む) とともに5mM beta-グリセロリン酸及び50 mg/L アスコルビン酸を含む骨形成の培地に置き換えた。72時間後、アルカリホスファターゼ活性を製造者の指示書 (Sigma) に従い測定し、ついでAlamar Blue染色により決定されたウエル毎の細胞数を標準化した。アルカリホスファターゼ活性を増加させる化合物は、このアッセイで陽性であると記録される。

【 0 2 3 1 】

標準的なWWP1ユビキチンリガーゼアッセイ

20 mM Tris-HCl pH 8、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1 mM ATP、1 mM DTT、50 ng E1 (yeast, Boston Biochem)、50 ng E2 (UbcH7, Boston Biochem) 及びWWP1の100 ng組換えHECTドメインを含む反応液量20 μ lでユビキチンリガーゼをアッセイした。反応液は、アッセイ生成物の検出を容易にするためにビオチン化されたユビキチン100 ng (Boston Biochem) を含む。反応液を氷冷下で集め、ついで化合物又はコントロールのDMSOを添加した。アッセイを30 で15分間行い、そして即座にSDS-sample bufferによりアッセイを止めた。反応液をSDS-PAGEにより分離し、そしてstreptavidin-HRP (Zymed) によるプロテイングにより生成物を検出した。WWP1ユビキチンリガーゼ活性を阻害する化合物はこのアッセイで陽性であると記録される。

【 0 2 3 2 】

ハイスルーブットWWP1ユビキチンリガーゼアッセイ

Effectene (Qiagen) を使用する293T細胞においてMyc-tagged WWP1が過剰に発現される。48時間後、lysis buffer (20 mM Tris pH 8、250 mM NaCl、3 mM EDTA、0.5% Triton X-100) 中で全細胞溶解物が調製され、そして溶解物を分取し、ついで次回の使用のために-80 で凍結した。96ウエルプレートをanti-Mycモノクローナル抗体 (9E10, Santa Cruz) により一夜4 でコートする。翌朝、プレートを洗浄し、そして2-3時間室温でPBSに溶解された3% BSA中でブロックした。ついでプレートを洗浄し、そして293T細胞溶解物を、抗体でコートされたプレートを使用して4 で一夜インキュベートした。翌朝、プレートを洗浄し、そして氷冷下ビオチン化されたユビキチンを含むユビキチンリガーゼアッセイ混合物 (上記参照) とともにインキュベートした。化合物を加え、ついで得られた反応液を30 で30分間放置した。プレートを洗浄し、ストレプトアビジンを結合したアルカリホスファターゼとインキュベートし、ついで標準的なアルカリホスファターゼ比色定量法で測定した。WWP1自己ユビキチン化活性をブロックする化合物は、このアッセイでは陽性であると記録される。

【 0 2 3 3 】

ヒト間葉の幹細胞 (hMSC) の培養

in vitroにおける骨芽細胞の分化のために、hMSC (Cambrex) を製造者のプロトコール

に従い維持し、そして分化させた。MSC生育培地 (MSGM) 中の 3.1×10^3 細胞/cm²の濃度のhMSCをOptilux 96-ウエルプレート (BD Biosciences) に蒔いた。一夜のインキュベーションに続いて、前記の生育培地を、化合物又はピークルを含む骨形成の誘起培地 (Cambrex) に換えた。細胞を、前記の化合物又はピークルの存在下で7日間培養した。この時点で骨芽細胞の分化をアルカリホスファターゼ発現によりアッセイした。

【0234】

細胞外マトリックス形成を評価するために、上記の骨形成条件下でhMSCを前記の化合物又はピークルの存在下で21日間培養した。前記の生育培地を前記の培養期間の間3日間毎に交換した。各培地の交換時に、前記の化合物又はピークルを新たに前記の細胞培養液に加えた。ついで培養21日目にXyelonol orange (Sigma) を18時間にわたり前記の生育培地に添加した。ついで細胞外マトリックスの形成を可視化するために、前記の培養物の各々を蛍光顕微鏡により検査した。

【0235】

アルカリホスファターゼインデックス (API)

APIを決定するために、Alamar blue (Biosource) を含む培地で細胞を37°Cで4時間培養することにより細胞数を最初に樹立した。プレートをfluorimeterにより570nmで読み取った。Alamar Blueを含む培地を除去し、そして細胞を無菌のPBSにより1回洗浄した。ついで、細胞をアルカリホスファターゼ基質 (Sigma) の存在下室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、前記のプレートを405nmで読み取った。ついで、API (API=Alk. Phos./alamar

blue) を確立するためにアルカリホスファターゼレベルを細胞数に対して標準化した。

【0236】

実施例1: Shn3欠損マウスの生殖

in vivoにおけるShn3の機能を研究するために、ネズミのShn3遺伝子における機能喪失突然変異を負ったマウスを、同型組み換えにより産生させた。マウス染色体4上の前記のShn3遺伝子のExon 4は、前記の全プロテインの80%のコード配列のみならず、前記のATG開始コドンを含む5.4 kB DNAを含む。Exon 4における前記のATG開始コドンはネオマイシン耐性カセットにより置換された場合、検出できるmRNA又はプロテインを産生しないヌルShn3対立遺伝子を生じた。前記の標的Shn3対立遺伝子が、129/B6 Shn3異型接合マウスとして期待された頻度で保持された。全ての以下の実験は、C57BL/6マウスに対して少なくとも5世代で戻し交配されたShn3^{-/-}及びWTマウスを使用して実施された。

【0237】

実施例2: Shn3欠損マウスにおける増加した骨量

同型接合のShn3突然変異体 (Shn3^{-/-}) マウスは、期待されたMendelian ratioで誕生し、そして検査した主な組織において明白に肉眼で確認できる表現型の異常がない健康体であった。しかしながら、 μ -QCTデジタルラジオグラフィーによる8週齢野生型 (WT) 及びShn3^{-/-}マウスの分析により同型接合突然変異の成体マウスの長い骨における放射線不透過の増加を示した。さらに、二次元 μ -QCTによるこれらのマウスにおける骨格構造の分析から、Shn3^{-/-}マウスの長い骨及び椎骨内に存在する小柱形成が劇的に増加していることが明らかになった。Shn3^{-/-}マウスからの大腿骨の一連の断面は、増加した小柱骨が前記の骨幹の遠位領域を含む前記の大腿骨の長さに見事に存在することを示した (Figure 1E)。これに反して、WTマウスから分離された大腿骨は、前記の骨幹内に小柱形成を示さず、そして前記の大腿骨に骨端及び骨幹端においてのみ適度のレベルの小柱骨を示した。定量分析の結果、小柱の数及び小柱の厚さの両方がShn3^{-/-}マウスの大腿骨において増加したことが示された。これらの二つのパラメーターにおける増加は、コントロールのWTマウスにおいて観察された小柱骨量よりも4.5倍増加している、Shn3^{-/-}マウスの小柱骨量 (BV/TV) を生じた。加えて、Shn3^{-/-}マウスの骨密度 (BMD) は、WTマウスの骨密度の250%に相当する。

【0238】

成熟したShn3^{-/-}マウスに存在する増加した骨量は、機能障害性の出生前の骨の発達及

び / 又は出生後の骨格リモデリングにおける機能障害から生じるかもしれない。Shn3^{-/-}マウスに存在する前記の骨量の増加が骨の形態発生における調節不全の結果であるかどうかをより良く理解するために、WTマウスの新生児及びShn3^{-/-}マウスの新生児において骨の成長及び発達を分析した。ミネラル化された骨及びミネラル化されていない軟骨組織の形成を分析するために、P4 WT及びShn3^{-/-}マウスからの全骨格調製物をalizarin red/alcian blueにより染色した。未熟な軟骨組織のミネラル化が、軟骨内骨化を起こす骨格のこれらの部位において検出されることなく、骨格の形態発生はP4で分析されたShn3^{-/-}マウスにおいて正常に起こる。纏めると、これらの結果は、Shn3が骨形成を阻害するように機能する骨格のリモデリングにおけるShn3の出生後の役割を示唆している。

【0239】

実施例3：Shn3は骨芽細胞の分化又は機能に必要とされない。

骨格リモデリングにおけるShn3の役割を理解するために、Shn3の発現は、骨のリモデリングに参与するそれらの細胞のタイプにおいて検査された。全ての骨、骨芽細胞、及びより少ない程度ではあるが破骨細胞において、Shn3 mRNAを検出できる。非制限的なパターンでのShn3の発現から、Shn3^{-/-}マウスにおいて観察された骨量の増加は、骨芽細胞及び / 又は破骨細胞の機能における変化から生じていることが示唆されている。Shn3が破骨細胞の生物現象を調節するように機能するかどうかを決定するために、骨髄を収穫し、そしてM-CSF及びRANKLの存在下で培養してTRAP+破骨細胞を形成する、次のすでに確立されたプロトコールによりin vitroにおける破骨細胞分化アッセイを実施した。Shn3^{-/-}マウスから収穫された骨髄の分化は、その時に同様な条件下で培養されたWT骨髄と比較すると、ほぼ同数の多核TRAP+細胞を生じた。WT及びShn3^{-/-}の脾細胞を、破骨細胞形成を促進する条件下で培養した場合に、ほぼ同数の破骨細胞も観察された。これらの結果から、Shn3発現が前駆細胞から破骨細胞への分化に必要でないことを示唆される。

【0240】

前記の破骨細胞に固有の欠陥から生ずる骨格の異常が、野生型骨髄を照射された宿主へ移植することにより救済されることが、すでに報告されている (Li, J., et al. (2000). Proc Natl Acad Sci U S A 97, 1566-1571)。前記の宿主の表現型の救済は、造血前駆細胞から誘導され、前記の宿主の骨のを再配置し、そして骨の再吸収を調節する、前記のドナー破骨細胞の結果として起こる。Shn3^{-/-}マウスにおいて観察される前記の骨格の表現型が破骨細胞の本質的な欠陥の結果ではないことを確認するために、骨髄細胞をWTマウスから収穫し、致死的に照射された4週齢のShn3^{-/-}マウスに注射するという、一連の骨髄移植実験を実施した。4週間後、前記のマウスを犠牲にし、そしてその大腿骨をラジオグラフィで分析した。前記のWT骨髄の移植により、レシピエントであるShn3^{-/-}マウスの大腿骨に存在する肉柱形成の量が減少しなかった。さらにこれらの結果から、Shn3^{-/-}マウスに存在する骨量の増加が破骨細胞の分化系列における欠陥の結果ではなく、むしろ骨芽細胞機能の増加及び調節不全の骨形成から生ずることが示された。

【0241】

実施例4：Shn3欠損マウスにおける骨形成速度の増加

Shn3^{-/-}マウスに見られる骨量の増加が骨形成における変化から生ずるかどうかを決定するために、in vivoにおける骨形成速度を調べるためにカルセイン二重ラベリング及び蛍光顕微鏡検査を含む、多数の組織形態計測的なパラメーターが8週齢Shn3^{-/-}及びWTマウスにおいて分析された。Shn3^{-/-}マウスの脛骨において観察される二つのカルセインラベルの間隔の増加から、これらのマウスでは新たな骨の形成のレベルがWTマウスに比べて増加したことを示している。定量的な分析により、Shn3^{-/-}マウスにおける形成速度は、コントロールであるWTマウスの速度の5倍であることが明らかになった。BFRは、骨芽細胞の骨形成能力を反映する骨石灰化速度 (MAR) に骨表面当たりの石灰化面 (MS/BS) を掛けることにより算定される。更なる組織形態計測的分析により、前記のShn3^{-/-}マウスが骨石灰化速度 (MAR) 及び石灰化面 (MS/BS) の両者の増加を示されている。しかしながら、Shn3^{-/-}マウスにおける前記の骨芽細胞面 (Ob.S/BS) (骨芽細胞数の信頼できるインジケータ) は、WTマウスに匹敵する。これらのデータにより、Shn3^{-/-}マウスにおいて観察さ

10

20

30

40

50

れた骨形成速度の増加は、骨芽細胞数の増加によるのではなく、前記の骨芽細胞の機能的な増加により引き起こされることが示唆される。興味深いことに、類骨の厚さは、WTマウスとShn3^{-/-}マウスにおいて同じであった。コントロールであるWTマウスと比較した場合Shn3^{-/-}マウスは同じような類骨の厚さを有するが、MARにおける増加を示すので、類骨形成と鉱化作用の開始との間の時間がShn3^{-/-}マウスにおいて短縮されなければならない。それゆえ、Shn3^{-/-}マウスに存在する骨硬化性表現型は異常な骨形成及び鉱化作用から生ずる。

【0242】

実施例5：In VitroでのShn3^{-/-}骨芽細胞の活性の変化

Shn3^{-/-}マウスにおいて観察された骨量の増加が、調節不全の骨芽細胞活性の効果であることを立証するために、一連のin vitroの実験が、Shn3^{-/-}マウス及びWTマウスの新生児の頭頂骨から誘導された初生の骨芽細胞を使用して実施された。これらの骨芽細胞のex vivoにおける培養物が、主として骨芽細胞の前駆細胞及び未熟な骨芽細胞から構成されることがすでに報告された。培養において成熟すると、これらの骨芽細胞は、細胞外のマトリックスを産生する前記の細胞の能力を反映する、石灰化された小結節を形成する能力を保有する (Ducy, P., et al. (1999). Genes Dev 13, 1025-1036; Yoshida, Y., et al. (2000). Cell 103,

1085-1097)。Shn3^{-/-}骨芽細胞及びWT骨芽細胞の培養物について、石灰化されたマトリックスの存在について培養0日目及び培養5日目にvon Kossa染色により調べた。その結果、Shn3^{-/-}培養物では石灰化された骨の小結節が増加していることが見出された。さらに、Shn3^{-/-}骨芽細胞の培養物に形成された石灰化された小結節は、WT骨芽細胞の培養物に形成された石灰化された小結節よりも概して大きかった。Shn3^{-/-}培養物の内部に存在する石灰化されたマトリックスの増加は、骨芽細胞数が増加しているこれらの培養物に起因しているものではなかった。なぜならば、Shn3^{-/-}培養物及びWT培養物の両者は、ほぼ同数のアルカリホスファターゼ (ALP) 陽性細胞を有し、そして細胞の増殖速度がほぼ同じであったから。in vitroにおける前記のShn3^{-/-}骨芽細胞において増加した活性は、in vivoにおけるBFRの増加を示す前記のShn3^{-/-}マウスと相関しており、そしてさらに調節不全の骨芽細胞活性が、前記の観察された表現型に起因することが示している。

【0243】

Shn3^{-/-}骨芽細胞による石灰化された小結節の形成の増加は、骨形成に關与する遺伝子の発現における変化に起因しているかもしれない。定量的リアルタイムPCR (Q-PCR) による遺伝子転写の分析により、WT骨芽細胞に比べて高いレベルのBSP、Col1(a)1及びOCN mRNAを発現し、そしてWT骨芽細胞と同等レベルのALP mRNAを発現するShn3^{-/-}骨芽細胞が明らかになった。骨芽細胞生物学のキイとなる調節因子であるATF4 (Yang, X., et al. (2004). Cell 117, 387-398) もまたShn3^{-/-}骨芽細胞においてそのRNAレベル及びプロテインレベルで高められた。付け加えるとすれば、Shn3自体は、in vitroにおける骨芽細胞の分化の過程でアップレギュレートされ、さらにShn3についての骨芽細胞固有の役割を際立たせた。それゆえ、Shn3は、骨形成及び鉱化作用において重要である多数の遺伝子の発現を調節する。

【0244】

実施例6：Shn3は、直接的な相互作用を通じてRunx2プロテインの安定性を調節する。

Shn3^{-/-}骨芽細胞に過剰に発現された骨芽細胞に特異的な遺伝子は、転写因子であるRunx2のすべての直接の標的であるので (tein, G. S., et al. (2004). Oncogene 23, 4315-4329; Yang, X., et al. (2004). Cell 117, 387-398)、Shn3は、Runx2自体への影響を經由して骨芽細胞に阻害的な影響を発揮するかもしれない。したがって、Runx2 mRNA及びプロテインのレベルは、Shn3^{-/-}骨芽細胞及びWT骨芽細胞において正確に測定された。興味深いことに、Runx2 mRNAのレベルにおいてShn3^{-/-}骨芽細胞とWT骨芽細胞とほぼ同じであったとしても、Shn3^{-/-}骨芽細胞はRunx2プロテインのレベルの上昇を示した。このことから、Shn3がRunx2プロテインの安定性を調節するかどうかという疑問が生じた。293T細胞において過剰に発現すると、Runx2が一定のレ

ベルに保たれた状態でShn3は投与量に依存して減少した。さらに、パルスチェイス実験から判断されるように、Shn3の過剰発現により過剰に発現されたRunx2の分解速度が加速された。

【0245】

Shn3がRunx2の分解を促進することについての可能性のある多数のメカニズムを案出することで、そこでShn3、Runx2及びTGF- β の間の関係が次の理由により研究された。最初に、*in vivo*において骨におけるTGF- β の過剰発現により骨粗しょう症が発症する (Erlebacher, A., and

Derynck, R. (1996). *J Cell Biol* 132, 195-210; Erlebacher, A., et al. (1998). *Mol Biol Cell* 9, 1903-1918) が、一方、Shn3^{-/-}マウスにおいても同様な現象が観察されるように優性阻害のTGF- β Rの骨芽細胞特異的な過剰発現により小柱状の骨量が増加する (Fivaroff, E., et al. (1999). *Development* 126, 4267-4279)。第二に、*Drosophila*におけるMadへのShnへの結合と同様に、Shn3は、R-Smadプロテイン、そなかでも注目すべきはTGF- β - dependent R-SmadであるSmad3と直接相互作用をすることができたことは、すでに観察された。第三に、Runx2のよく記録された結合パートナーはSmad3である (Alliston, T., et al. (2001). *Embo J*

20, 2254-2272; Ito, Y., and Zhang, Y. W. (2001). *J Bone Miner Metab* 19, 188-194; Sowa, H., et al. (2004). *J Biol Chem* 279,

40267-40275)。それゆえ、Shn3は、物理的な相互作用によりRunx2プロテインの安定性を調節することが支持された。確かに、Runx2は、同時導入実験において特異的にShn3を同時に免疫沈降し、そしてこの相互作用は、Runx2のRunt (DNA結合) ドメインを經由して調節された。加えて、アスコルビン酸、 α -グリセロリン酸及びBMP-2により成熟した骨芽細胞にさらに分化される造骨性の細胞MC3T3-E1における内因性のRunx2とShn3との間の相互作用を検出することが可能であった (Zamurovic, N., et al. (2004). *J Biol Chem* 279, 37704-37715)。低レベルのShn3/Runx2の結合が細胞において検出され、つづいて分化するが、TGF- β により前記の分化した細胞をTGF- β で処理すると、劇的にRunx2及びShn3の結合が促進された。

【0246】

Runx2の機能に関して、前記のRunx2/Shn3相互作用の意義を決定するために、オステオカルシンプロモーターである、よく解明されている、OSE2 (Ducy, P., et al. (1997). *Cell* 89, 747-754) と称されるRunx2結合サイトが利用された。Runx2は、多量体を形成したOSE2-ルシフェラーゼレポーター構築物からの転写を強力に活性化したのに対し、Shn3の同時発現はRunx2活性を用量依存的に阻害した。TGF- β による細胞の同時処理又はSmad3の同時発現は、さらにRunx2に対するShn3の阻害効果を増加させた。これらの研究から、Shn3は物理的にRunx2に結合し、その結合はTGF- β シグナリングにより促進され、そしてShn3は、このTGF- β で誘発される複合体の状況においてRunx2の機能を阻害することが結論される。

【0247】

実施例7：Shn3はRunx2のユビキチン化を促進する。

Shn3がRunx2の分解に関与し、そしてRunx2の分解を促進することが示されたので、Shn3がRunx2のユビキチン化を促進することができるかどうか決定された。過剰発現に関する研究において、Shn3はRunx2のユビキチン化を促進した。さらにShn3/Runx2複合体が293T細胞から免疫精製され、そして*in vitro*でのユビキチン化のアッセイで使用された場合に、特異的なユビキチンリガーゼ活性が検出された。

【0248】

Shn3がRunx2のユビキチン化を促進したが、Shn3自体標準的なE3ユビキチンリガーゼドメインを含んでいない (RING, HECT, or U box, for review see, Patterson, C. (2002). *Sci STKE* 2002, PE4; Pickart, C. M. (2001). *Annu Rev Biochem* 70, 503-533,)。さらに、Shn3の様々な組換えプロテインフラグメントは、

*in vitro*で検出できるE3ユビキチンリガーゼ活性を備えていなかった。これらの観察から、Shn3は、Runx2のユビキチン化を促進する、知られたE3ユビキチンリガーゼと結合するかもしれないという仮説が導かれた。Runx2がSmurf1によりユビキチン化されることができたことが以前に示された (Zhao, M., et al. (2004). *J Biol Chem* 279, 12854-12859; Zhao, M., et al. (2003).

J Biol Chem 278, 27939-27944)。Smurf1は、膜ターゲティングのためのN末端のC2ドメイン、PPXYモチーフによる基質認識を担うインターナルWWドメイン、HECT E3リガーゼドメインの全てを備えるNedd4ファミリーと称されるHECTドメインを含むE3リガーゼのファミリーの属する (Ingham, R. J., et al. (2004). *Oncogene* 23, 1972-1984)。

【0249】

Shn3とSmurf1との間の物理的な相互作用は検出されなかったが、Shn3は、E3ユビキチンリガーゼのNedd4ファミリーであるWWP1のもう一つのメンバーと同時に免疫沈降した。WWP1は、すでにR-及びI-Smadプロテインと相互作用し、そしてSmad6及びSmad7のユビキチン化を促進することが示された (Komuro, A., et al. (2004). *Oncogene* 23, 6914-6923)。しかしながら、そのRuntドメイン (in, Y. H., et al. (2004). *J Biol Chem* 279, 29409-29417)におけるPPXYモチーフをも有するRunxプロテインをユビキチン化するWWP1の能力は研究されていない。293T細胞において過剰に発現すると、WWP1がRunx2ユビキチン化のを低レベルを促進することが観察された。しかしながら、WWP1がShn3と同時に発現すると、この両者は、Runx2のユビキチン化を促進することにおいて相乗的に作用する。

【0250】

理論により拘束されることを望むものではないが、これらのデータから、骨芽細胞におけるTGF-シグナリングは、Runx2、Smad3、Shn3とE3ユビキチンリガーゼであるWWP1との間の多量体複合体の形成を促進するモデルを提案される。この複合体は、Runx2ポリキチン化及びプロテアソームに依存する分解を促進するWWP1の能力のためにRunx2機能を阻害する。Shn3は、この複合体の不可欠な構成成分である。なぜならば、それが欠損した骨芽細胞は、Runx2プロテインのレベルの高まり、Runx2転写活性の高まり、Runx2標的遺伝子の転写の高まり、及び*in vivo*における骨形成の増加を示すからである。骨芽細胞の表面に発現する前記のTGF β 受容体を通じてのシグナリングにより、Smad3のSmad4との複合体形成及び前記の核への移動が生ずる。Smad3とのその相互作用を通じて、Shn3は、前記の核内においてこの複合体と結合して、骨マトリックスの生合成に關与する遺伝子の転写を抑制する。さらに、前記の核Shn3/Smad複合体は、E3リガーゼを含むHECT-ドメインであるWWP1と結合する。この複合体は、破骨細胞の分化及び細胞外マトリックスの生合成に關与する遺伝子の重要な転写調節因子であるRunx2と相互作用し、Runx2のユビキチン化を促進する。前記のSmad/Shn3/WWP1複合体によるRunx2のユビキチン化は、プロテアソームにより媒介される分解のためにRunx2をターゲットにし、及び/又はRunx2のユビキチン化は、このプロテインの転写活性を阻害する。

【0251】

実施例8: *in vivo*においてShn3^{-/-}マウスでは不完全な破骨細胞形成が起こる。

われわれのShn3-欠損マウスにおいて観察された高い骨量表現型の構成成分は、骨芽細胞マトリックス合成活性の増加に明確に起因している。骨マトリックスを合成し、そして骨マトリックスの鉱化作用を方向付けるそれらの能力に加えて、骨芽細胞は、*in vivo*において破骨細胞合成を誘発することが知られている欠くことのできないサイトカインであるRANKLを産生することが知られている (Teitelbaum and Ross (2003) *Nat Rev Genet.* 4(8):638-49)。*in vivo*における不完全な破骨細胞形成がわれわれのShn3^{-/-}種において観察される骨硬化性の表現型を説明することができるかどうかを決定するために、新生児の頭蓋冠の全量調製物を、成熟破骨細胞の特異的なマーカーであるTRAPについてその部位で染色した。Shn3-欠損頭蓋におけるTRAP-陽性細胞の細胞数の減少は*in vivo*における破骨細胞の生成を減少させることを示す。全骨又は頭蓋冠の骨芽細胞の培養物からのRANKL mRNAレベルを分析した。Shn3-欠損骨芽細胞は、*in vitro*にお

10

20

30

40

50

る分化の全過程においてRANKL転写のレベルを低下させることを示した。

それゆえ、亢進した骨芽細胞マトリックス合成が*in vivo*において観察される骨形成速度の増加に寄与するが、全般の骨量における断言された増加は、*in vivo*における骨芽細胞活性の増加及び不完全な破骨細胞の生成の両者に起因するかもしれない。

実施例9：in vivoでは骨量を減少させるためには、TGFβはSHN3を必要とする。

モデル生物であるシヨウジョバエ (*Drosophila*) において、前記のSchnurri遺伝子は、デカペンタプレジック (Decapentaplegic (Dpp)) シグナリング経路において機能することが知られている。前記のDppサイトカインの哺乳動物ホモログは、多形質発現性シグナリング分子であるトランスホーミング成長因子- (TGF) である。SHN3 (KRCとも呼ばれる) は、*Drosophila* Schnurriの哺乳動物ホモログであるので、骨形成に拮抗するSHN3の能力はTGFの下流であるかどうか決定された。

10

【0252】

以前の研究により骨格生物学におけるTGF についての重要な役割が提案された。骨中に活性化されたTGF を過剰に発現するマウス (D4マウスと呼ばれる。) は、無機質化された小柱の骨、組織が崩壊し且つ過剰細胞性の皮質性の骨及び突発性の骨折における減少を伴う劇的な骨減少症を呈する (Erlebacher, et al. (1998) Mol Biol Cell. 9(7):1903-18)。

【0253】

TGF シグナリングプロテインであるSmad3は結合し、そして骨芽細胞におけるRunx2により媒介される遺伝子発現を阻害することが既に報告された (Alliston, et al. (2001) EMBO J. 20(9):2254-72; Kang, et

20

al. (2005) EMBO J. 24(14):

2543-2555)。TGF が*in vivo*において骨量を減少させるためにSHN3を必要とするかどうかを決定するために、293T細胞にSmad1-8のFLAG-tagged versionsとともにShn3を導入した。48時間後、細胞を収穫し、ついで抗FLAG免疫沈降法を行った。結合したプロテインをSDS-PAGEで溶解し、そしてShn3又はFLAGについて免疫プロット法を実施した。これらの結果により、SHN3はSmad3プロテインと相互作用することができることが示す。

【0254】

さらに、SHN3とRunx2との間の相互作用はTGF により促進された。それゆえ、SHN3が*in vivo*においてTGF の下流であるかどうか決定された。確かに、野生型バックグラウンドであるD4マウスは前記の骨格異常を示すのに対し、D4 SHN3^{-/-}マウスは、より組織化された皮質性の骨及び突発性の骨折が減少することだけでなく、小柱骨量の顕著な救出 (rescue) を示す。それゆえ、SHN3は*in vivo*における骨量を減少するTGF の能力のために必要とされる。

30

【0255】

実施例10：Shn3は直接的な相互作用を通じてRSK2の機能を調節する。

未処理の質問は、前記のSHN3/WWP1ユビキチンリガーゼのための基質が、存在するRunx2以外と複合体を形成するかどうかである。前記のRSK2/ATF4経路が直接的にSHN3/WWP1により調節される可能性は、以下の(1)~(3)の理由のために検討された。

(1) ATF4は、成熟した骨芽細胞による高いレベルのコラーゲン合成のために必要とされる転写因子である。

40

(2) RSK2は、骨芽細胞による最適な細胞外マトリックスの産生のために必要とされるATF4をリン酸化することが知られたキナーゼである (Yang, et al. (2004) Cell. 117(3):387-98.)。

(3) SHN3^{-/-}骨芽細胞は、過リン酸化されたATF4の蓄積だけでなく、ATF4 mRNA及びプロテインのレベルを高められることを示す。

【0256】

確かに、レポーターアッセイにおいてSHN3の過剰発現が、Runx2により推進される転写を阻害すると、SHN3の過剰発現が、ATF4機能のRSK2により媒介されるATF4機能の効力を高めることだけでなく、ATF4により推進される転写を阻害する。SHN3及びWWP1は物理的にAT

50

F4プロテインと結合していないが、両者は速やかにRSK2と免疫沈降する。SHN3及びWWP1はRSK2のユビキチン化を促進することができる。加えて、SHN3及びWWP1の両者は、in vitroにおけるキナーゼアッセイにおいてRSK2機能を阻害することができる。

【 0 2 5 7 】

重要なことは、RSK2自己リン酸化のレベルがSHN3^{-/-}骨芽細胞において増加し、そしてリン酸化部位特異的抗RSK基質抗体により検出される数種のタンパク質の免疫活性の増加がSHN3^{-/-}骨芽細胞において検出されることである。興味深いことに、ATF4が、野生型の骨芽細胞においてRSK2についての重要な基質であると思われているが、SHN3^{-/-}ATF4^{-/-}マウスは、SHN3^{-/-}マウスに比べて小柱骨量の増加を示す。このことはATF4以外のRSK2基質は、SHN3^{-/-}マウスに観察される骨形成において重要な役割を果たすことを示唆する。

10

【 0 2 5 8 】

均等

当業者は、本明細書に開示された本発明の多くの均等物を、認識するであろうし、又は通常の実験を使用して確かめることができるであろう。前記の均等物は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図されている。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/005280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/68		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/113559 A (HARVARD COLLEGE [US]; GLIMCHER LAURIE H M D [US]; JONES DALLAS C [US];) 26 October 2006 (2006-10-26) abstract claims 35,39,40	1-15
A	JONES D C ET AL: "Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, WASHINGTON, DC, vol. 312, no. 5777, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 1223-1227, XP002403273 ISSN: 0036-8075 abstract	1-15
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 January 2009		26/02/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hohwy, Morten

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/005280

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/066048 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; US GOVERNMENT [US]; UNIV OREGON HEALTH & SCIEN) 14 August 2003 (2003-08-14) pages 31-33; example 3	1-15
A	YANG XIANGLI ET AL: "ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: Implication for Coffin-Lowry syndrome" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 117, no. 3, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 387-398, XP002403269 ISSN: 0092-8674 abstract	13-15
A	BRUNING J C ET AL: "Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 14 MAR 2000, vol. 97, no. 6, 14 March 2000 (2000-03-14), pages 2462-2467, XP002510992 ISSN: 0027-8424 page 2467	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2008/005280**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:

see additional 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 an additional fee, 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.:

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 Application No. PCT/US2008 /005280

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12

A method for identifying compounds that increase bone formation in a subject by using an assay based on the polypeptides KRC, WWP1, and Runx2.

2. claims: 13-15

A method for identifying compounds that increase bone formation in a subject by using an assay based on the polypeptides KRC, WWP1, and RSK2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/005280

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006113559 A	26-10-2006	AU 2006236521 A1	26-10-2006
		CA 2604580 A1	26-10-2006
		EP 1874811 A2	09-01-2008
		JP 2008536869 T	11-09-2008
WO 03066048 A	14-08-2003	AT 385835 T	15-03-2008
		AU 2003206822 A1	02-09-2003
		BR 0307522 A	07-12-2004
		CA 2474431 A1	14-08-2003
		CN 1630518 A	22-06-2005
		CN 1896270 A	17-01-2007
		CN 1936023 A	28-03-2007
		EP 1476153 A2	17-11-2004
		ES 2299923 T3	01-06-2008
		JP 2005531498 T	20-10-2005
		KR 20060029705 A	06-04-2006
		MX PA04007611 A	27-05-2005
		RU 2319483 C2	20-03-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)		G 0 1 N 33/53			D
G 0 1 N 33/573	(2006.01)		G 0 1 N 33/573			A
A 6 1 K 45/00	(2006.01)		A 6 1 K 45/00			
A 6 1 P 19/00	(2006.01)		A 6 1 P 19/00			

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100136630

弁理士 水野 祐啓

(72)発明者 グリムシャー, ローリー, エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 6 5 ウェスト ニュートン ハンプシャー ストリート 5 1

Fターム(参考) 2G045 AA29 CB01 CB13 DA20 DA36 FB14

4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ33 QQ40 QQ79 QR48 QR69 QR77

QR80 QS24 QS36

4C084 AA17 NA14 ZA962

专利名称(译)	用于鉴定调节骨形成和矿化的化合物的测定		
公开(公告)号	JP2010528586A	公开(公告)日	2010-08-26
申请号	JP2010506252	申请日	2008-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛大学校长及研究员协会		
申请(专利权)人(译)	哈佛大学校董委员会		
[标]发明人	グリムシャー ローリー エイチ		
发明人	グリムシャー, ローリー, エイチ.		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/25 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573 A61K45/00 A61P19/00		
CPC分类号	A61P19/00 G01N33/5073		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/25 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/573.A A61K45/00 A61P19/00		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/CB01 2G045/CB13 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB14 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ33 4B063/QQ40 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS36 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA962		
优先权	60/926245 2007-04-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明证明KRC分子在调节包括骨骼形成和矿化在内的多种细胞过程中具有多种重要的调节剂功能。TGF- β ; 成骨细胞中的信号转导促进了KRC, Runx2, Smad3和E3泛素连接酶WWP1之间的多聚体复合物的形成, 由于WWP1具有促进Runx2多泛素化和蛋白酶体依赖性降解的能力, WWP1抑制Runx2功能。此外, 由于WWP1具有促进RSK2泛素化的能力, KRC和WWP1与RSK2形成了复合物, 从而抑制了RSK2的功能。提供了鉴定KRC活性调节剂的方法。还提供了使用调节KRC表达和/或活性的试剂来调节免疫应答, 骨骼形成和矿化以及与KRC相关的疾病的方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2008/005280
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Inv.: G01N33/50 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
2. FIELD OF SEARCHED		
G01N (Documentation searched (classification system followed by classification symbols))		
Documentation searched other than the minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search process (if data base used, where practical, search terms used) EPO-Internal, MPI Data, EMBASE, BIOSIS		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
X	NO 2006/113559 A (HARVARD COLLEGE [US]; GLIMCHER LAURIE H M D [US]; JONES DALLAS C [US]); 26 October 2006 (2006-10-26) abstract claims: 39, 40	1-15
A	JONES D C ET AL: "Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein SMURF1" SCIENCE - AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, WASHINGTON, DC, Vol. 312, no. 5777, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 1223-1227, XP002403273 ISSN: 0036-8075 abstract	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further statements are filed in the continuation of this CI <input checked="" type="checkbox"/> See patent family group.		
Special categories of cited documents:		
A Document cited to the general state of the art which is not a prior document of the applicant or available via international filing date		
B Document which may show disclosure priority claims or addition or variation to an oral disclosure, invention, exhibition or other special kind of disclosure		
C Document which may show disclosure, publication or other special kind of disclosure		
D Document published prior to the international filing date but after the priority date		
E Document published after the international filing date which is a continuation of the application or a document used to substantiate the priority or theory underlying the invention		
F Document of particular importance, the applicant claims the conventional method or process for conducting the invention is modified or improved by the document in question		
G Document of particular importance, the applicant claims the conventional method or process for conducting the invention is modified or improved by the document in question, and where the applicant has designated the document as a prior art document in the art		
H Document of particular importance, the applicant claims the conventional method or process for conducting the invention is modified or improved by the document in question, and where the applicant has designated the document as a prior art document in the art		
Date of the actual completion of the international search: 28 JANUARY 2009		
Date of mailing of the international search report: 26/02/2009		
Name and mailing address of the ISA/EPO EPO Patent Dept., P.O. Box 1010, 7000 Lausanne, Switzerland Fax: +41-71-310-3018		Authorized officer: Holby, Morten