

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号
WO2005/089800

発行日 平成20年1月31日 (2008.1.31)

(43) 国際公開日 平成17年9月29日 (2005.9.29)

(51) Int. Cl.			F 1		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 B O 6 3
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	31/713		4 C O 8 4
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		4 C O 8 6
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く						
出願番号 特願2006-511313 (P2006-511313)			(71) 出願人 301050902			
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/005311		株式会社ロコモジェン			
(22) 国際出願日	平成17年3月16日 (2005. 3. 16)		神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 番地 1			
(31) 優先権主張番号	特願2004-76931 (P2004-76931)		リーディングベンチャープラザ2号館40			
(32) 優先日	平成16年3月17日 (2004. 3. 17)		O号室			
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		(74) 代理人 100092783			
(31) 優先権主張番号	特願2004-314364 (P2004-314364)		弁理士 小林 浩			
(32) 優先日	平成16年10月28日 (2004. 10. 28)		(74) 代理人 100095360			
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 片山 英二			
			(74) 代理人 100093676			
			弁理士 小林 純子			
			(74) 代理人 100120134			
			弁理士 大森 規雄			
			最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 h s H R D 3を含む医薬組成物

(57) 【要約】
本発明は、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物の提供であり、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも1つの疾患を診断又は治療するために有用な、滑膜組織又は滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する医薬組成物、並びに滑膜細胞のh s H R D 3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

【請求項 2】

滑膜細胞の増殖を抑制する物質が、シノビオリンの発現阻害物質である請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

シノビオリンの発現阻害物質が、h s H R D 3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

h s H R D 3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、h s H R D 3 をコードする遺伝子に対する s i R N A 又は s h R N A である請求項 3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

h s H R D 3 をコードする遺伝子が、以下の (a) 又は (b) の D N A を含むものである請求項 3 又は 4 記載の医薬組成物。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる D N A

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる D N A と相補的な塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ h s H R D 3 活性を有するタンパク質をコードする D N A

【請求項 6】

s i R N A が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するための請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

滑膜細胞の h s H R D 3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

【請求項 9】

滑膜細胞の h s H R D 3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させる方法。

【請求項 10】

滑膜細胞の h s H R D 3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

【請求項 11】

滑膜細胞の h s H R D 3 の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞及び破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン-6 の産生を抑制する方法。

【請求項 12】

h s H R D 3 の発現の抑制が、h s H R D 3 とシノビオリンとの結合阻害によるものである、請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

インターロイキン-6 の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。

【請求項 14】

インターロイキン-6 の産生を抑制する物質がシノビオリンの発現阻害物質である請求項 13 記載の医薬組成物。

【請求項 15】

シノビオリンの発現阻害物質が、h s H R D 3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である請求項 14 記載の医薬組成物。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

h s H R D 3 をコードする遺伝子の発現を抑制する物質が、h s H R D 3 をコードする遺伝子に対する s i R N A 又は s h R N A である請求項 15 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

h s H R D 3 をコードする遺伝子が、以下の (a) 又は (b) の DNA を含むものである請求項 15 又は 16 記載の医薬組成物。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ h s H R D 3 活性を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 18】

10

s i R N A が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス及び骨粗しょう症からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するための請求項 13 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

炎症反応を抑制することができる、請求項 13 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

本発明は、シノビオリンと複合体を形成するヒト H r d 3 オルソログ (h s H R D 3) を含む医薬組成物、特にリウマチを診断又は治療するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

関節リウマチ (以下、R A という) は、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の炎症性疾患である。本発明者は、この滑膜組織の異常増殖に必須の遺伝子としてシノビオリン遺伝子を同定している (W O 02/052007)。

シノビオリンは、R A 患者由来の滑膜細胞に存在する膜タンパク質であり、R I N G f i n g e r モチーフを有する E 3 ユビキチンライゲースをコードするものである。このモチーフは、タンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たすが、実際、自己ユビキチン化活性を有すること、P 4 H A 1 というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を起こすことが証明されている (W O 02/052007)。また、最近では、シノビオリンが線維症、癌又は脳神経疾患の発症にも関与することが見出されている (G e n e s D e v. 2003 Vol. 17, p. 2436-49)。

30

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログであり、コレステロール還元酵素の分解に関わる遺伝子である H r d 1 p (H M G - C o A R e d u c t a s e D e g r a d a t i o n 1) は、出芽酵母 H r d 3 p (H M G - C o A R e d u c t a s e D e g r a d a t i o n 3) と機能的複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解にかかわることが見出されている (J. C. B. 2000. Vol. 151, p. 69-82)。

40

しかしながら、H r d 3 p に関する機能は明らかではない。インターロイキン-6 はインターロイキン-1、T N F - α とともに炎症性サイトカインとよばれ、種々の炎症反応を引き起こすサイトカインである。通常免疫系の細胞により産生されるが、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髄腫など様々な増殖性疾患を引き起こす細胞からも産生され、それらの増殖に必須である。インターロイキン-6 が関与する病気として、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などがある。インターロイキン-6 は細胞表面に発現するインターロイキン-6 レセプターに結合する場合もあれば、細胞表面から遊離したレセプターと結合し、レセプターを発現していない細胞に結合することにより、炎症反応を誘導する場合もある。インターロイキン-6 の炎症作用として、B 細胞の抗体産

50

生細胞への分化、肝臓におけるC-反応性タンパク質産生量の増加、骨髄における血小板の誘導、免疫系細胞の炎症部位への誘導、白血球のアポトーシスへの抵抗性の寄与、VEGFの誘導を介した血管の誘導などが挙げられる。最近、インターロイキン-6とレセプターとの結合を阻害する抗インターロイキン-6レセプター抗体が作られるようになり、リウマチ、骨髄腫、クローン病などに効果を発揮している。

【発明の開示】

本発明は、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物、及びhsHRD3を抑制することを特徴とする滑膜細胞の増殖を抑制する方法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。出芽酵母のhrd3破壊株において、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが報告されていることから、ヒトHrd3pオルソログも、シノビオリンと同様に滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6の産生に必須であることがわかった。そして、hsHRD3を用いて、新たな炎症反応の抑制、リウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患等の診断法及び治療法の開発に有効であると考え、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物。

滑膜細胞の増殖を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA (small interfering RNA) 又はshRNA (short hairpin RNA) を例示することができる。

具体的にはhsHRD3をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである。すなわち、

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

さらに、siRNAは、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

本発明の医薬組成物は、リウマチ、線維症、関節炎、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも1つの疾患を診断又は治療するために使用される。

(2) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞の増殖を抑制する方法。

(3) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病又は悪性腫瘍におけるアポトーシスを誘起させる方法。

(4) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、肺の線維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制する方法。

(5) 滑膜細胞のhsHRD3の発現を抑制することを特徴とする、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞、破骨細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞からインターロイキン-6の産生を抑制する方法。

(6) インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物。

インターロイキン-6の産生を抑制する物質としては、例えばシノビオリンの発現阻害物質が挙げられる。シノビオリンの発現阻害物質は、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質、好ましくは、hsHRD3をコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを例示することができる。

具体的にはhsHRD3をコードする遺伝子は、以下の(a)又は(b)のDNAを含むものである。すなわち、

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ h s H R D 3 活性を有するタンパク質をコードする DNA である。

さらに、s i R N A は、h s H R D 3 をコードする遺伝子の塩基配列のうち一部の配列を標的とするものであってもよい。

本発明の医薬組成物は、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス及び骨粗しょう症から選ばれる少なくとも 1 つの疾患を診断又は治療するために使用される。また、本発明の医薬組成物は炎症反応を抑制することもできる。

上記 (2) ~ (5) 記載の方法において、滑膜細胞の h s H R D 3 の発現抑制は、例えば h s H R D 3 とシノビオリンとの結合阻害により行うことができる。 10

【図面の簡単な説明】

図 1 は、H r d 3 p と S E L 1 L / h s H R D 3 のドメイン構造を示す図である。

図 2 は、s i R N A による S E I L / h s H R D 3 の発現が抑制されたことを示す図である。

図 3 は、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が抑制されたことを示す図である。

図 4 は、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞のアポトーシスが誘導されたことを示す図である。

図 5 は、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞へのアポトーシスが誘導されたことを示す図である。 20

図 6 は、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞のシノビオリンタンパク質が減少したことを示す図である。

図 7 は、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞のコラーゲン産生が抑制されたことを示す図である。

図 8 は、S E I L / h s H R D 3 とシノビオリンが複合体を形成したことを示す図である。

図 9 は、S E I L / h s H R D 3 とシノビオリンが小胞体に共局在することを示す図である。

図 10 は、S E L 1 L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞のインターロイキン 30
- 6 の産生が抑制されたことを示す図である。

図 11 は、S E L 1 L / h s H R D 3、およびシノビオリンの発現抑制により、両タンパク質の発現が抑制されたことを示す図である。

図 12 A は、シノビオリンの非存在下では S E L 1 L / h s H R D 3 は不安定であることを示す図である。

図 12 B は、シノビオリンの非存在下では S E L 1 L / h s H R D 3 は不安定であることを示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、h s H R D 3 の発現を抑制し、滑膜細胞の異常増殖やインターロイキン 40
- 6 の産生を抑制する物質を含む、リウマチ等の疾患の診断、治療に有効な医薬組成物に関する。

シノビオリンは酵母からヒトまで高度に保存されており、出芽酵母において詳細な解析が行われている。シノビオリンの出芽酵母オルソログである H r d 1 p は、H r d 3 p と機能的な複合体を形成し、小胞体における異常タンパク質の分解に関与することが見出されている。出芽酵母の h r d 3 破壊株では H r d 1 p の不安定化と減少が観察され、生理学的な基質の安定化と増加が報告されている。このことは、ヒト H r d 3 p オルソログ (h s H R D 3) もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、新たな関節症の診断、および治療法の開発に有効であることを示している。

そこで、本発明において、まず出芽酵母 H r d 3 p のアミノ酸配列を用いてホモロジー 50

検索をした結果、SEL1Lという既知の遺伝子が見出された。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した(図1)。次に2本鎖RNA(sRNA)を用いて滑膜細胞を処理すると、hsHRD3の発現を抑制できることを確認した(図2)。この条件下においては、滑膜細胞の細胞増殖活性は顕著に減少していた(図3)。また約30%の細胞がアポトーシスを起こしていた(図4、5)。

出芽酵母においてHrd3pはHrd1pの安定化に必須である。そこでシノビオリンタンパク質をウェスタンブロットで検出したところ、シノビオリンタンパク質は、hsHRD3抑制下において著しく減少していた(図6)。また、シノビオリンの発現が抑制されると、コラーゲン産生量も減少する。そこで、細胞内のコラーゲン量を測定したところ、これもコントロールに比べて減少していた(図7)。さらに、hsHRD3はシノビオリンと細胞内で複合体を形成し(図8)、共に小胞体に局在している(図9)ことが明らかとなった。なお、滑膜細胞の増殖に重要な役割を果たしているインターロイキン-6も63.2%まで減少していた(図10)。また、細胞内にシノビオリンタンパク質が存在しないときは、hsHRD3は著しく減少し(図11)、非常に不安定であった(図12A及び図12B)。

以上の結果は、hsHRD3をターゲットとするアプローチは、RAをはじめとする関節炎、線維症、癌及び脳神経疾患の新たな診断及び治療法の開発に有効であることを示している。特にSEL1L/hsHRD3の発現や機能のコントロールを介して、シノビオリンの発現や機能を制御するという作用機序に基づいた薬剤の開発に有用である。

1. 滑膜細胞の増殖抑制

本発明において、「滑膜細胞」とは、リウマチ患者の関節部位において異常増殖している一連の細胞群を意味し、滑膜組織も包含する。

本発明において、「hsHRD3」とは、酵母のシノビオリンであるHrd1pと結合して機能的複合体を形成し、小胞体の異常なタンパク質の分解に携わっている「Hrd3p」と呼ばれるタンパク質のヒトオルソログをいう。シノビオリンは、酵母からヒトまで高度に保存されており、特に出芽酵母において詳細な解析が行われている。この出芽酵母のオルソログであるHrd3pとアミノ酸のホモロジーが相同性で80%、類似性で45%であり、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されているSEL1Lという遺伝子が見いだされ、これが後にhsHRD3とされた。このhsHRD3は、配列番号1に示される塩基配列およびそのような配列と実質的に同一な塩基配列よりなる。実質的に同一な塩基配列とは、配列番号1からなるDNAに対し相補的な塩基配列よりなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつhsHRD3活性を有するタンパク質をコードする塩基配列をいう。「hsHRD3活性」とは、小胞体において、異常なタンパク質を分解する活性をいう。このような、hsHRD3をコードするDNAは、当業者に公知の方法で適当な断片を用いてプローブを作製し、このプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーから得ることができる。上記ハイブリダイゼーションにおいてストリンジェントな条件としては、たとえば、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が100~500mM、好ましくは150~300mMであり、温度が50~70℃、好ましくは55~65℃の条件が挙げられる。

hsHRD3のアミノ酸配列を配列番号2に、Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

このhsHRD3の発現を抑制すると、滑膜細胞の増殖活性が著しく抑制される。滑膜細胞とは、通常の関節構成要素となる細胞であって、関節腔の内側の層を満たす滑液を産生する細胞である。

シノビオリン遺伝子の発現を抑制するには、hsHRD3の発現を抑制する方法が採用される。hsHRD3の発現を抑制するには、RNAiという現象を利用することができ

るが、遺伝子工学技術を用いた部位特異的突然変異誘発法、アンチセンスヌクレオチド、リボザイムを用いてもよい。

RNAiとは、dsRNA (double-strand RNA) が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNAを細胞内に導入すると、そのRNAと相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。

上記RNAiを起こさせるために、例えばシノビオリン遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを設計及び合成し、これを作用させればよい。あるいは、hsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制しても、シノビオリンの発現を抑制することができる。

siRNAの設計基準は、以下の通りである。

10

(a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンから100ヌクレオチド下流の領域を選択する。

(b) 選択した領域から、AAで始まる連続する15～30塩基、好ましくは19塩基の配列を探し、その配列のGC含量が30～70%、好ましくは35～45%となるものを選択する。

具体的には、以下の塩基配列を有するものをsiRNAとして使用することができる。

センス鎖 : CUUGAUAUGGACCAGCUUUTT (配列番号4)

アンチセンス鎖 : AAAGCUGGUCCAUAUCAAGTT (配列番号5)

siRNAを滑膜細胞に導入するには、in vitroで合成したsiRNAをプラスミドDNAに連結してこれを細胞に導入する方法、2本鎖RNAをアニールする方法などを採用することができる。

20

このようにsiRNAで滑膜細胞を処理して、hsHRD3の発現を抑制する。

また、本発明は、RNAi効果をもたらすためにshRNAを使用することもできる。

shRNAとは、ショートヘアピンRNAと呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。

shRNAは、その一部がステムループ構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列Aとし、配列Aに対する相補鎖を配列Bとすると、配列A、スペーサー、配列Bの順でこれらの配列が一本のRNA鎖に存在するように連結し、全体で45～60塩基の長さとなるように設計する。配列Aは、標的となるhsHRD3遺伝子 (配列番号1) の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列Aの長さは19～25塩基、好ましくは19～21塩基である。

30

滑膜細胞の増殖を測定する方法は、培養液中にalarBlueを適量添加し、数時間後の540nmを励起波長としたときの590nmの蛍光強度を測定すればよい。

さらに、シノビオリン遺伝子又はhsHRD3をコードする遺伝子の発現を抑制するために、部位特異的突然変異誘発法等を使用することができる。部位特異的突然変異誘発法は当分野において周知であり、市販のキット、例えばGeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等 (タカラバイオ社製)) を使用することができる。

40

本発明は、hsHRD3とシノビオリンが結合して形成された、小胞体に局在する複合体の形成を阻害することにより、シノビオリンの発現を抑制する方法を提供する。

hsHRD3とシノビオリンとが結合して複合体を形成すると、シノビオリンの発現が上昇する。この場合、hsHRD3とシノビオリンの複合体は小胞体に局在する。小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス (例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等) に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス (ERストレス) といい、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質 (unfolded protein) の出現頻度を上昇させる。適切な高次構造がとれずに立体構造に異常をきたした不良又は損傷タンパク質は小胞体を出て

50

ゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質等が蓄積されてしまう。そこで、これらのERストレスに対して、細胞はUPR (Unfolded Protein Response) 及びERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質等を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐことにより、小胞体の品質管理を行い、細胞機能の恒常性を保持している。出芽酵母のhrd3破壊株においては、Hrd1pタンパク質が不安定かつ減少しており、基質が生理学的に安定化かつ増加していることが観察されているため、ヒトにおいても、シノビオリンと複合体を形成しているhsHRD3がこの品質管理機能に何らかの関与をしていると考えられる。

10

つまり、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンと結合するhsHRD3が減少し、その結果シノビオリンの発現も抑制されるのである。

また、シノビオリンの発現が増加すると、ERADが亢進されることにより、ERストレスによるアポトーシスの感受性が低下し、反対に、シノビオリンの発現が抑制されると、アポトーシスの感受性が増加する。したがって、hsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてアポトーシスが亢進する。

一方、コラーゲンについては、シノビオリンはP4HA1というコラーゲン合成に必須のタンパク質のユビキチン化を通じて、その酵素としての品質を保つことにより、コラーゲン合成に必須の働きをしている。シノビオリンの発現が抑制されるとP4HA1の酵素活性が低下し、コラーゲン合成が低下する。したがってhsHRD3の発現が抑制されると、シノビオリンの機能も低下し、結果としてコラーゲン合成が低下する。

20

したがって、hsHRD3もシノビオリンと同様に、滑膜組織の異常増殖に必須であり、hsHRD3の発現を抑制することにより、滑膜細胞の増殖を抑制すること、滑膜細胞、癌細胞、白血病又は悪性腫瘍のアポトーシスを誘起させること、及び、滑膜細胞、肺の繊維化又は肝硬変におけるコラーゲンの産生を抑制することができるため、新たなリウマチ、線維症、関節症、癌および脳神経疾患の診断、および治療法を開発することができる。

上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質は、インターロイキン-6の産生を抑制する物質でもある。

インターロイキン-6はBリンパ球の増殖分化のみならず、広く免疫応答、造血反応、炎症反応、及び神経系の細胞の増殖・分化、あるいは機能発現に重要な役割をしている多機能を有する典型的なサイトカインである。その作用は、骨髄における血小板の誘導、免疫系細胞の炎症部位への誘導、白血球のアポトーシスへの抵抗性の寄与、VEGFの誘導を介した血管の誘導、B細胞の抗体産生細胞への分化、肝臓におけるC-反応性タンパク質産生量の増加などがある。インターロイキン-6は、通常免疫系の細胞により産生されるが、リウマチ滑膜細胞、白血病、骨髄腫など様々な増殖性疾患を引き起こす細胞からも産生され、それらの増殖に必須である。インターロイキン-6が関与する疾患として、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などがある。また、慢性炎症性増殖性疾患においては、インターロイキン-6が病態を形成するのに重要な役割を演じていることが知られており、インターロイキン-6遺伝子の異常発現によりリウマチ等の自己免疫疾患や、血液中の細胞ががん化して起こる多発性骨髄腫及び白血病等の形質細胞腫の発症が誘導されることが明らかになっている。例えば、リウマチ患者関節液中ではインターロイキン-6が著増していること、形質細胞腫/多発性骨髄腫の増殖因子がインターロイキン-6そのものであること、インターロイキン-6が、骨髄性白血病細胞に作用し、増殖を抑制するとともに、マクロファージへの分化を誘導することなどである。

30

40

従って、滑膜細胞、がん細胞、白血病細胞、骨肉種細胞、悪性腫瘍細胞、免疫系細胞及び破骨細胞において、インターロイキン-6の産生を抑制することにより、これらのリウマチ等の自己免疫疾患や、血液中の細胞ががん化して起こる多発性骨髄腫、又は、白血病等の発症を抑制することができる。

50

インターロイキン-6の産生を抑制するには、上記の滑膜細胞の増殖を抑制するシノビオリンの発現阻害物質を用いることができる。具体的には、h s H R D 3をコードする遺伝子の発現を抑制する物質である、h s H R D 3をコードする遺伝子に対するs i R N A又はs h R N Aなどを用いることができる。

2. 医薬組成物

(1) 滑膜細胞の増殖を抑制する物質を含む医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、線維症、関節炎、癌などの細胞増殖性疾患及び脳神経疾患などが挙げられ、単独でも複数の疾患が併発していても適用の対象となる。

本発明の医薬組成物を癌の治療剤として使用する場合は、適用部位は特に限定されず、10
脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆道癌、胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型T細胞白血病、悪性リンパ腫）等を対象として適用される。

上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

脳神経系疾患としては、例えばアルツハイマー、パーキンソン病、ポリグルタミン病が挙げられる。

(2) インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物

本発明の医薬組成物の適用疾患としては、リウマチ、多発骨髄腫、キャッスルマン病、20
クローン病、全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、骨粗しょう症などが挙げられる。

また、インターロイキン6は炎症に伴う多くの症状（痛み、発熱など）を引き起こすサイトカインでもある。したがって、本発明の医薬組成物は、炎症反応を抑制することもできる。炎症反応とは、生体に感染や外傷、火傷あるいはアレルゲンなどの刺激により起こる局所的な組織反応をいい、局所反応に伴う全身的な現象も含まれる。具体的には、発赤、発熱、疼痛、腫脹に機能障害を加えて、炎症の五徴という。これらは急性炎症の肉眼的特徴を示しているが、この現象は局所的な血管の変化、すなわち、血管の拡張、透過性の亢進、白血球の浸潤によるものである。30

本発明の滑膜組織の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を有効成分として含有する医薬組成物の投与形態は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。経口投与の場合は、液剤として、または適当な剤型により投与が可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。40
上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。本発明の医薬組成物を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等から全身投与する。脳等に局所投与することもできる。本発明の医薬組成物を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

本発明の医薬組成物は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される 50

担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせ10
て選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された滑膜組織の異常増殖を抑制する物質を溶剤（例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等）に溶解し、これにTweeen 80、Tweeen 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なる。投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.1 μ g～100mg、好ましくは1～10 μ gである。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。アデノウイルスの場合の投与量は20
1日1回あたり10⁶～10¹³個程度であり、1～8週間隔で投与される。但し、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。siRNAを混合する場合の用量は、0.01～10 μ g/ml、好ましくは0.1～1 μ g/mlである。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

出芽酵母Hrd3pを用いたホモロジー検索

出芽酵母Hrd3p/Ylr207wpのアミノ酸配列を用いてホモロジーサーチを実行した。

その結果、酵母Hrd3pのヒトオルソログである配列番号1に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列に相当するタンパク質を同定し、SEL1L遺伝子が見出された。Hrd3pのアミノ酸配列を配列番号3に示す。Hrd3pとSEL1Lとの間においてアミノ酸配列の相同性は30%、類似性は45%であり、いずれも高くはないが、特異的な繰り返し構造と膜貫通ドメインが保存されている。従って、SEL1LはHrd3pのオルソログであると決定した（図1）。30

【実施例2】

SEL1L/hshRD3の発現抑制の検討

(1) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する2本鎖RNA（siRNA）でトランスフェクションし、96時間後に細胞を回収した。RNAを抽出しRT-PCRで各遺伝子の発現量を定量した。40

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6cmディッシュ1枚に付き、1 $\times$ 10⁴個の細胞を播いた。3種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルに付きディッシュ1枚、合計4枚播いた。培地は10%FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046）を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM 3mlで1回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。

その後トランスフェクション試薬を添加した。トランスフェクション試薬は次のように調整した。GFP、hshRD3、シノビオリンを標的としたRNAiのために、下記配列に示したRNAオリゴ（配列番号4～9）を最終濃度が100 μ MになるようにTEに50

溶かした。

h s HRD 3を標的としたs i RNAのセンス鎖：CUUGAUAUGGACCAGCU
UUTT (配列番号4)

h s HRD 3を標的としたs i RNAのアンチセンス鎖：AAAGCUGGUCCAUA
UCAAGTT (配列番号5)

GFPを標的としたs i RNAのセンス鎖：GGCUACGUCCAGGAGCGCAT
T (配列番号6)

GFPを標的としたs i RNAのアンチセンス鎖：UGC GCUCCUGGACGUAG
CCTT (配列番号7)

シノビオリンを標的としたs i RNAのセンス鎖：GGUGUUCUUUGGGCAAC 10
UGAGTT (配列番号8)

シノビオリンを標的としたs i RNAのアンチセンス鎖：CUCAGUUGCCCCAAA
GAACACCTT (配列番号9)

各遺伝子に対するRNAオリゴのセンス鎖とアンチセンス鎖を20 μ Mになるように混
合した。90℃で2分間熱変性した後、37℃で1時間ゆっくり冷却することにより、両
オリゴをアニーリングさせた。アニーリングした20 μ M RNAオリゴ10 μ lをオプ
ティメン (Opti-mem) 350 μ lと混合しA液を作った。次にOligofect
amineTM Reagent (Invitrogen, Cat. No. 12252-
011) 8 μ lをオプティメン32 μ lと混合しB液を作った。A液とB液を5分間イン
キュベート後、両者を混合し、さらに15分インキュベートした。この混合液400 μ l 20
を全量、培地を交換した各ディッシュに加えた。その4時間後、FBSを200 μ l添加
した。

トランスフェクション試薬添加96時間後、細胞からフェノール抽出法で全RNAを抽
出し、RT-PCRに用いた。RT-PCRはSUPERSCRIPTTM One-
Step RT-PCR 100 Reactions (Invitrogen Cat. N
o. 10928-042)を用いた。すなわち、2 $\times$ RXN混合物50 μ l、RT/P1
atinum2 μ l、DEPC水28 μ l、以下に示す増幅用プライマー3.2 μ M溶液
の各セット10 μ l $\times$ 2、合計100 μ lを混合し、10/ μ lずつPCRチューブに分
注した。そして1 μ lのRNAをRT-PCR鋳型として添加してPCR反応を開始した
。 30

h s HRD 3増幅用オリゴマー (5' $\rightarrow$ 3') : GGCTGAACAGGGCTATG
(配列番号10)

h s HRD 3増幅用オリゴマー (3' $\rightarrow$ 5') : CCGCTCGAGTTACTGTG
GTGGCTGCTGCTC (配列番号11)

シノビオリン増幅用オリゴマー (5' $\rightarrow$ 3') : AGCTGGTGTTTGGCTTT
GAG (配列番号12)

シノビオリン増幅用オリゴマー (3' $\rightarrow$ 5') : GGGTGGCCCCTGATCCG
CAG (配列番号13)

h GAPDH増幅用オリゴマー (5' $\rightarrow$ 3') : AGGTGAAGGTCGGAGTC
AACGGA (配列番号14) 40

h GAPDH増幅用オリゴマー (3' $\rightarrow$ 5') : AGTCCTTCCACGATACC
AAAGTTG (配列番号15)

RNAオリゴ無しは100、50、10 ng、その他は100 ngのRNAを鋳型とし
て用いた。サイクルは、cDNA伸長反応として50℃30分94℃2分を1回、続けて
PCR増幅反応として94℃30秒、50℃30秒、72℃1分を30回行い、最後に7
2℃5分最終伸長反応を行った後4℃で保存した。このPCR反応液に2 μ lの6 $\times$ サン
プルバッファを加え、全量を0.8%アガロースで100ボルト30分泳動しUVイル
ミネーターでPCR産物を検出した。

その結果、s i RNAにより、SEIL/h s HRD 3の発現が抑制された (図2)。
図2において、h s HRD 3のRNA iによりPCR産物の量が、10 ngのオリゴ無し 50

(ネガティブコントロール)と同じレベルに減少したことから、h s H R D 3 の m R N A の発現レベルが10%以下に抑制されたことが分かった。またこのときシノビオリンの m R N A は100 ng のオリゴ無しや G F P R N A i と同レベルであったことから h s H R D 3 の発現抑制はシノビオリンの転写には影響を与えないことが分かった。

(2) R A 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 R N A (s i R N A) でトランスフェクションし、48時間後に a l a m a r B l u e ^{T M} を添加した。さらに48時間後に細胞増殖活性を測定した。

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を96ウェルプレートに、160個の細胞を播いた。培地は10% F B S (牛胎児血清)を含み、抗生物質を含まない D M E M (D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m, S i g m a D 6 0 4 6) を100 μ l 用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まない D M E M 100 μ l で1回洗い、同じ D M E M を80 μ l 加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬を20 μ l ずつ、培地を交換した各ウェルに加えた。さらに4時間後、F B S を10 μ l 添加した。トランスフェクション試薬添加48時間後に各ウェルに10 μ l の a l a m a r B l u e ^{T M} を添加した。48時間37℃でインキュベートした後、560 nm で励起したときの590 nm の蛍光強度を測定した。

その結果、S E I L / h s H R D 3 の発現抑制により、滑膜細胞の増殖活性が約60%にまで抑制された(図3)。

このことは、h s H R D 3 はシノビオリン同様に R A 滑膜細胞の細胞増殖に重要であり、その発現抑制は細胞の増殖低下を引き起こすことを意味する。

(3) R A 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 R N A (s i R N A) でトランスフェクションし120時間後に細胞を回収した。回収した細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、F A C S で D N A 含量を測定した。

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6 cm デイッシュ1枚に、 1×10^4 個の細胞を播いた。三種類の R N A i 用オリゴと R N A オリゴ無し(ネガティブコントロール)の各サンプルをそれぞれデイッシュ1枚、合計4枚播いた。培地は10% F B S (牛胎児血清)を含み、抗生物質を含まない D M E M (D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m, S i g m a D 6 0 4 6) を3 ml 用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まない D M E M 3 ml で1回洗い、同じ D M E M を1.6 ml 加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬400 μ l を全量、培地を交換した各デイッシュに加えた。さらに4時間後、F B S を200 μ l 添加した。

トランスフェクション試薬添加120時間後、全細胞を回収し、0.5 ml の P B S (-) / 0.2% T r i t o n X - 100 で可溶化した後、ナイロンメッシュを通して、細胞塊を取り除いた。1 ml の50 μ g / ml R N a s e / P B S (-) と1 ml の100 μ g / ml のヨウ化プロピジウム / P B S (-) を加え、混合した後、氷中に保存した。各細胞の蛍光量を F A C S C a l i b u r (B E C T O N D I C K I N S O N) で計測し、C E L L Q u e s t で解析した。

その結果、図4に示すようにアポトーシスを起こしたと考えられる D N A 含量 2 n 以下の細胞群が h s H R D 3 の R N A i により30%以上にまで増加した。またこの割合はシノビオリンに対する R N A i と同程度に高かった(図5)。このことは、h s H R D 3 はシノビオリン同様に滑膜細胞の増殖に必須の遺伝子であり、その発現抑制は高頻度のアポトーシスを引き起こすことを意味している。

【実施例3】

(1) S E I L / h s H R D 3 の発現抑制下におけるウェスタンブロットを用いたシノビオリンの検出

R A 滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖 R N A (s i R N A) でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を抽出しウェスタンブロットで各タンパク質を検出した。

すなわち、トランスフェクション前日、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を10cmディッシュ1枚に付き、 9×10^4 個の細胞を播いた。三種類のRNAi用オリゴとRNAオリゴ無し（ネガティブコントロール）の各サンプルに付きディッシュ1枚、合計4枚播いた。培地は10%FBS（牛胎児血清）を含み、抗生物質を含まないDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046）を10ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM10mlで1回洗い、同じDMEMを9ml加えた。その後実施例2（1）と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬の3倍量1.2mlを、培地を交換した各ディッシュに加えた。さらに4時間後、FBSを1ml添加した。

トランスフェクション試薬添加48時間後、全細胞を回収し、50 μ lの抽出バッファーIV（50mM Tris-HCl pH7.5、2mM EDTA、0.1% Triton X-100、1% NP-40、500mM NaCl、1mM PMSF、0.1% アプロティニン（Aprotinin）、0.5 μ g/ml ペプスタチンA（PepstatinA）、1 μ g/ml リューペプチン（Leupeptin））に再懸濁した後、氷中に30分置き、14000rpm、4℃、30分遠心した。上清1 μ lをBio-Rad DC Protein Assay Reagent（BIO-RAD、Cat. No. 500-0116）を用いたタンパク質濃度測定に用い、残り45 μ lに15 μ lの4 $\times$ SDSバッファーを加え、100℃で5分加熱した。10 μ g相当の細胞抽出液を7.5%アクリルアミドゲル2枚で泳動、分離し、ニトロセルロース膜（OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC、Schleicher & Schuell、Cat. No. 10439196）にブロット後、5%スキムミルクで30分ブロッキングした。

一次抗体として1000倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体（10Da）または抗CREB-1抗体（Santa Cruz、Cat. No. sc-58）で30分インキュベートした。抗シノビオリンモノクローナル抗体の二次抗体には2000倍希釈したHRP-結合抗マウスIgG（Amersham Biosciences、Cat. No. NA931V）を、抗CREB-1抗体には3000倍希釈したHRP-結合抗ウサギIgG（Amersham Biosciences、Cat. No. NA931V）を使用し、30分インキュベートした。検出はHome-made ECL（44 μ lの90mMクマリン酸、100 μ lの250mMルミノール、6 μ lの過酸化水素水を20mlの100mM Tris pH8.5で混合したもの）を使用した。

その結果、シノビオリンタンパク質は、SEL1L/h sHRD3抑制下において著しく減少していた（図6）。すなわち、h sHRD3の発現抑制はシノビオリンタンパク質の不安定化を引き起こすことが明らかになった。

（2）シノビオリンの発現抑制下におけるコラーゲン産生量の検討

RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA（siRNA）でトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収した。総抽出液を調製し、細胞内のコラーゲン量を測定した。

すなわち、実施例3（1）と同様な方法でトランスフェクション、細胞抽出液を調製し、30 μ g相当の抽出液を抽出バッファーIVで100 μ lに調節した後、SIRCOL Collagen Assay Kit（QBS社/フナコシ Cat. No. S1111）でコラーゲン量を測定した。

その結果、h sHRD3をノックアウトした細胞はコントロール（GFP）に比べて、細胞内コラーゲン量が約70%にまで減少していた（図7）。

すなわち、h sHRD3はシノビオリンタンパク質の安定化を通じて、コラーゲンの産生を促進しており、h sHRD3の発現を抑制することにより、シノビオリンタンパク質の量が減少し、コラーゲン産生量を低下させることができる。

【実施例4】

SEL1L/h sHRD3とシノビオリンの細胞内における複合体の形成

HEK293細胞にSP-HA-h sHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミ

ドをトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。抗FLAG抗体(a)、または抗HA抗体(b)で免疫沈降し、それぞれの抗体でウェスタンブロットを行った。

すなわち、hsHRD3Bのシグナルペプチド(SP)の直後、配列番号1に示されたアミノ酸配列の26番目と27番目との間にHAタグが挿入されるようにDNA構築したプラスミド(SP-HA-hsHRD3B)をpcDNA3-ベクターにクローニングした。

8×10^5 個のHEK293細胞を10cmディッシュ4枚に播いた。24時間後、以下の(c)~(f)の4種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

(c) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B/pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のpCAGGS-ベクター 10

(d) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B/pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン/pCAGGS

(e) $10 \mu\text{g}$ のpcDNA3-ベクターと $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン/pCAGGS

(f) $10 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B/pcDNA3と $3 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリン/pCAGGS

トランスフェクション48時間後、細胞を回収し、 $200 \mu\text{l}$ の抽出バッファーII(10mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.5%NP-40、10mM MgCl_2 、10%glycerol、5mM EGTA、20mM NaF、50mM β -グリセロフォスフェート(glycerophosphate)、1mM Na_3VO_4 、10mM NEM(N-エチルマレイミド)、1mM PMSF、1mM DTT、0.1%アプロティニン、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチンA、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ リユーペプチン)に再懸濁し、氷上で30分インキュベートした後、 14000rpm 、 4°C 、30分遠心した。タンパク質 $100 \mu\text{g}$ 相当の抽出物を抽出バッファーIIで1mlに調節した。このとき同時に牛血清アルブミンを最終濃度0.5%になるように加えた。 20

次に、トランスフェクション(c)(d)由来の抽出物には4.9mgの抗FLAG抗体(M2、SIGMA、Cat. No. F3165)を、(e)(f)由来の抽出物には2.4mgの抗HA抗体(12CA5、Roche、Cat. No. 1583816)を加え、 4°C で一晩浸透しながらインキュベートした。翌日、50%スラリーのプロテイン-Gセファロースビーズを $60 \mu\text{l}$ 加え、さらに 4°C で1時間インキュベートした。このビーズを0.5mlの抽出バッファーIIで2回、0.5mlの抽出バッファーII+150mM NaCl(最終濃度300mM NaCl)で2回洗い、 $30 \mu\text{l}$ の2×SDSサンプルバッファーを加え、 100°C 、5分加熱することにより、吸着したタンパク質を溶出した。実施例3(1)と同様の方法でSDS-PAGE、ウェスタンブロットを行い、免疫沈降したタンパク質を検出した。 30

その結果、SEL1L/hsHRD3はシノビオリンと細胞内で複合体を形成していることが判明した(図8)。

(2) SEL1L/hsHRD3とシノビオリンの細胞内における共局在 40

HEK293細胞をSP-HA-hsHRD3BとFLAG-シノビオリンのプラスミドでトランスフェクションした。24時間後に細胞を固定し、抗HA抗体と抗シノビオリンモノクローナル抗体で免疫染色した。

すなわち、2000個のHEK293細胞をチャンバースライドの各チャンバーに播いた。24時間後、 $0.15 \mu\text{g}$ のSP-HA-hsHRD3B/pcDNA3と $0.05 \mu\text{g}$ のFLAG-シノビオリンでトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで30分固定し、3%BSA/PBS(-)で1晩ブロッキングした。翌日最終濃度が $1 \text{ng}/\mu\text{l}$ になるように0.3%BSA/PBS(-)で希釈した抗HA抗体(3F10、Roche、Cat. No. 1867431)と100倍希釈した抗シノビオリンモノクローナル抗体(10Da)で染色し、抗 50

HA抗体は抗ラットIg F I T C抗体 (DAKO、Cat. No. F0234) で、抗シノビオリン抗体は抗マウスIg T R I T C抗体 (DAKO、Cat. No. R0270) で検出した。サンプルの観察、撮影は共焦点レーザースキャン顕微鏡LSM510 (Carl Zeiss Co., Ltd.) で、画像解析はLSM510-v3.0で行った。

その結果、SEL1L/h sHRD3とシノビオリンは小胞体に共局在した (図9)。図9において、左列はh sHRD3の局在の図 (緑色)、中央列はシノビオリンの局在の図 (赤色)、右列は両者を重ね合わせた図 (黄色) である。

これらの結果より、h sHRD3はシノビオリンと小胞体において複合体を形成していることが判明した。

10

【実施例5】

SEL1L/h sHRD3の発現抑制下におけるインターロイキン-6産生量の検討

(1) RA滑膜細胞を各遺伝子に対する二本鎖RNA (s iRNA) でトランスフェクションし、96時間後に培地を新しいものに交換した。さらに24時間後に培地を回収し、その中に含まれるインターロイキン-6の量を測定した。

すなわち、トランスフェクション前日に、リウマチ患者から単離した滑膜細胞を6cmディッシュ1枚につき、 1×10^4 個の細胞を播いた。三種類のRNAiとRNAオリゴ無し (ネガティブコントロール) の各サンプルにつきディッシュ1枚、合計4枚播いた。培地は10%FBS (牛胎児血清) を含み、抗生物質を含まないDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6046) を3ml用いた。24時間後、血清も抗生物質も含まないDMEM3mlで1回洗い、同じDMEMを1.6ml加えた。その後実施例2(1)と同様の方法で調製したトランスフェクション試薬400 μ lを全量、培地を交換した各ディッシュに加えた。さらに4時間後、FBSを200 μ l添加した。

トランスフェクション試薬添加96時間後、培地を新しいものに交換した。24時間培養後、培地を回収し、14000rpm、30min、4℃で遠心した。その上清中に含まれるインターロイキン-6タンパク質量をELISA Kit (BIOSOURCE Immunoassay Kit for Human IL-6, Cat. # KHC0061) で測定した。同時に細胞も回収し、20 μ Lの抽出バッファ-III (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 1%NONIDET P-40, 0.1%SDS, 200mM NaCl, 10mM N-エチルマレイミド (NEM), 1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride) (PMSF), 1mMジチオトレイトール, 0.1%アポロチニン, 0.5 μ g/mlペプスタチンA, 1 μ g/mlリユーペプチン) に溶かし氷上に30分置いた。14000rpm、30min、4℃で遠心した後、上清1 μ lをBio-Rad DC Protein Assay Reagent (BIO-RAD, Cat. No. 500-0116) を用いたタンパク質濃度測定に用いて、総タンパク質量を算出した。培地中のインターロイキン-6タンパク質量をこの総タンパク質量で割った値をグラフ化した (図10)。

その結果、SEL1L/h sHRD3の発現抑制により、インターロイキン-6タンパク質の産生量がコントロールに比べ、63.2%にまで減少した (図10)。すなわちSEL1L/h sHRD3はインターロイキン-6の産生に必須な因子であることが明らかになった。

(2) 上記(1)で調整した細胞総抽出液45 μ lに15 μ lの4 $\times$ SDSバッファ-を加え、37℃で10分加熱した。10 μ g相当の細胞抽出液を7.5%アクリルアミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜 (OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC, Schleicher & Schuell, Cat. No. 10439196) を用いてブロットした後、5%スキムミルクで30分ブロッキングした。

一次抗体として1000倍希釈した抗SEL1L/h sHRD3ペプチド抗体で30分

50

インキュベートした。二次抗体には10000倍希釈したHRP-結合抗-ウサギIgG (Amersham Biosciences、Cat. No. NA934V)を用いて30分インキュベートした。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences、Cat. No. RPN2132)を使用した。

検出後、再度ブロッキングし、一次抗体として1000倍希釈した抗シノビオリン抗体と5000倍希釈した抗 α -チューブリン抗体 (SIGMA Clone B-5-1-2)を用いて30分インキュベートした。二次抗体には10000倍希釈したHRP-結合抗-マウスIgG (Amersham Biosciences、Cat. No. NA931V)を用いて30分インキュベートした。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences、Cat. No. RPN2132)を使用した。

その結果、SEL1L/h sHRD3、およびシノビオリンの発現抑制により両タンパク質は発現が見られなくなった(図11)。すなわち両タンパク質は相互に安定化していることが判明した。

【実施例6】

SEL1L/h sHRD3の安定性とシノビオリンとの複合体形成による影響

HEK293細胞にSP-HA-h sHRD3Bとベクター、またはFLAG-シノビオリンのプラスミドをトランスフェクションした。36時間後にシクロヘキシミドを加えてチェイスアッセイを開始した。0、1、2、4、6時間後に細胞を回収し、総抽出液を調整した。ウェスタンブロットで各タンパク質を検出、定量した。

すなわち、 2×10^5 個のHEK293細胞を6-ウェルプレートに播いた。24時間後、以下の(g)、(h)の2種類の組み合わせのプラスミドをトランスフェクションした。

(g) 0.5 μ gのSP-HA-h sHRD3B/p cDNA3と0.25 μ gのp cDNA3-ベクター

(h) 0.5 μ gのSP-HA-h sHRD3B/p cDNA3と0.25 μ gのFLAG-シノビオリン/p cDNA3

トランスフェクション36時間後、培地を新鮮なものに交換した。さらに2時間後、最終濃度が30 μ g/mlになるようにシクロヘキシミドを添加した。0、1、2、4、6時間後に細胞を回収し、50 μ lの抽出バッファーIII (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 1%NONIDET P-40, 0.1%SDS, 200mM NaCl, 10mM N-エチルマレイミド(NEM)、1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)、1mMジチオトレイトール、0.1%アプロテイニン、0.5 μ g/mlペプスタチンA、1 μ g/mlリユーペプチン)に溶かし氷上に30分置いた。14000rpm、30min、4℃で遠心した後、上清1 μ lをBio-Rad DC Protein Assay Reagent (BIO-RAD、Cat. No. 500-0116)を用いたタンパク質濃度測定に用いた。残り45 μ lに15 μ lの4 $\times$ SDSバッファーを加え、37℃で10分加熱した。10 μ g相当の細胞抽出液を7.5%アクリルアミドゲルで泳動、分離し、ニトロセルロース膜(OPTITRAN BA-S 85 REINFORCED NC、Schleicher & Schuell、Cat. No. 10439196)を用いてブロットした後、5%スキムミルクで1晩ブロッキングした。一次抗体として10000倍希釈した抗HA抗体(3F10、Roche、Cat. No. 1867431)で30分インキュベートし、10000倍希釈したHRP-結合抗-ラットIgGで30分インキュベートした。検出はECL plus Western blotting Detection System (Amersham Cat. No. RPN2132)を用いた。検出したバンドをImageJ Softwareで定量した。正確な測定のために0時間目のサンプルを2倍、4倍希釈したものを用いて標準曲線を作成し、それに基づいて両比を推定した。

その結果、SEL1L/h sHRD3はシノビオリンの非存在下では、半減期が4.3

時間から 1.8 時間と半分以下に短くなった (図 12 A、B)。すなわち SEL1L/h sHRD3 はシノビオリンと複合体を形成できないと、細胞内で不安定化することが判明した。

【産業上の利用可能性】

本発明により滑膜細胞（滑膜組織を含む）の異常増殖やインターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物が提供される。この物質は、滑膜組織又は滑膜細胞の異常増殖を抑制することができるため、リウマチ、線維症、関節症、癌及び脳神経疾患から選ばれる少なくとも1つ疾患の診断用又は治療用医薬組成物として有用である。

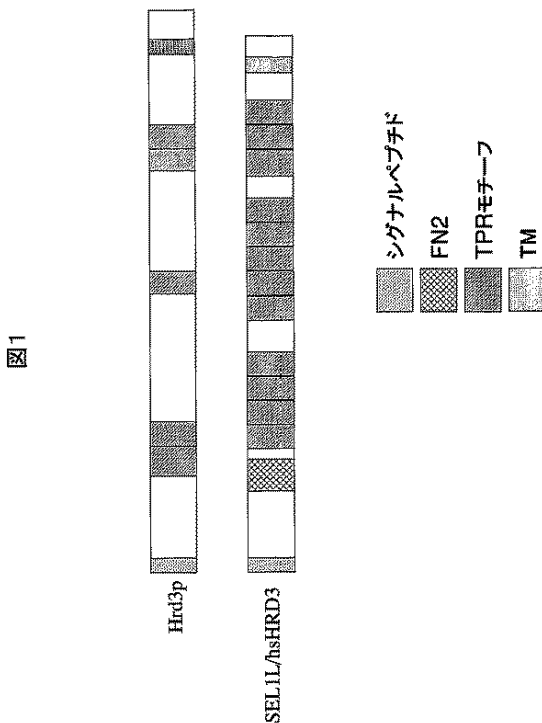
【配列表フリーテキスト】

配列番号 4 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 5 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 6 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 7 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 8 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 9 : DNA/RNA 結合分子
配列番号 10 : 合成 DNA
配列番号 11 : 合成 DNA
配列番号 12 : 合成 DNA
配列番号 13 : 合成 DNA
配列番号 14 : 合成 DNA
配列番号 15 : 合成 DNA

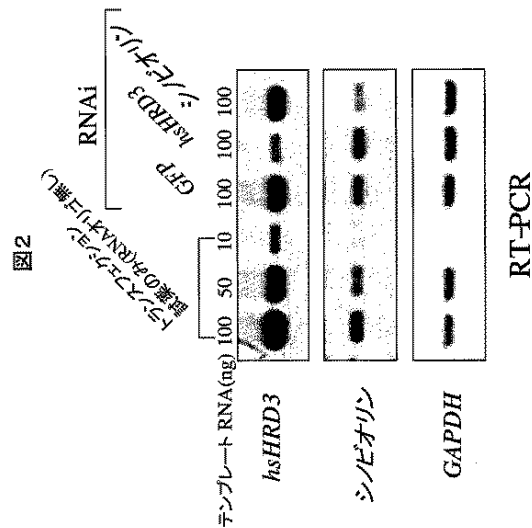
10

20

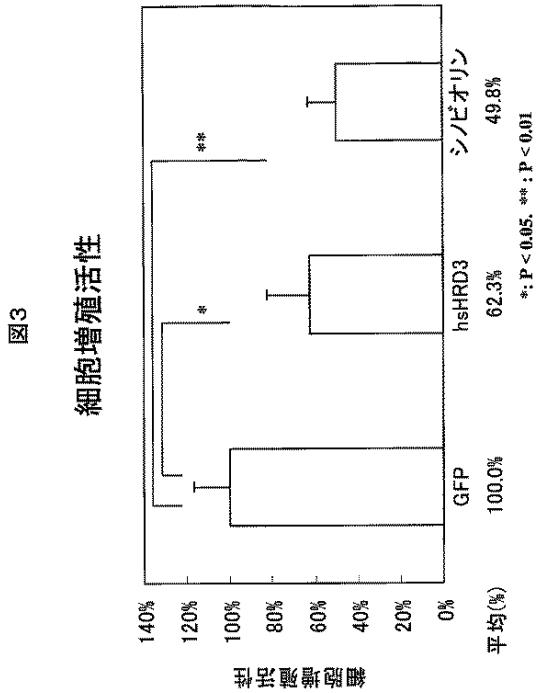
【图 1】



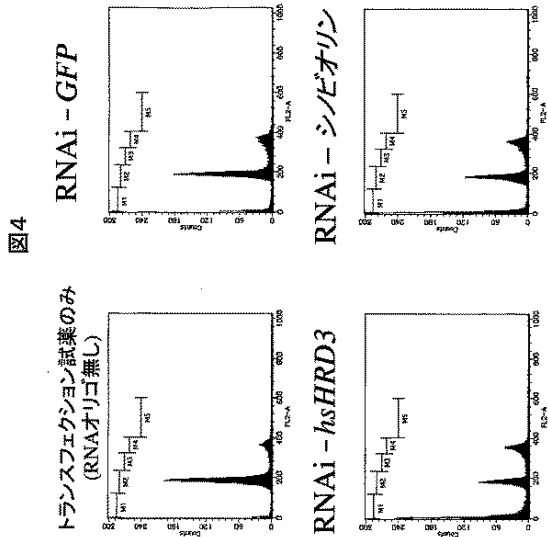
【图 2】



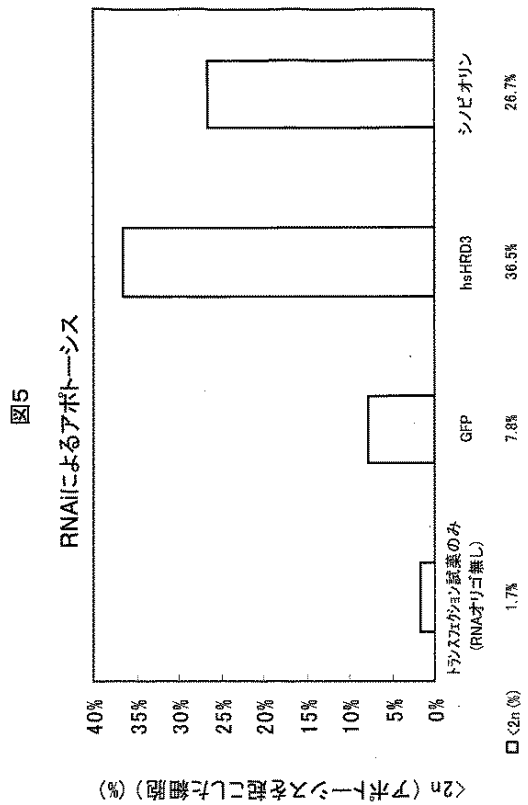
【図 3】



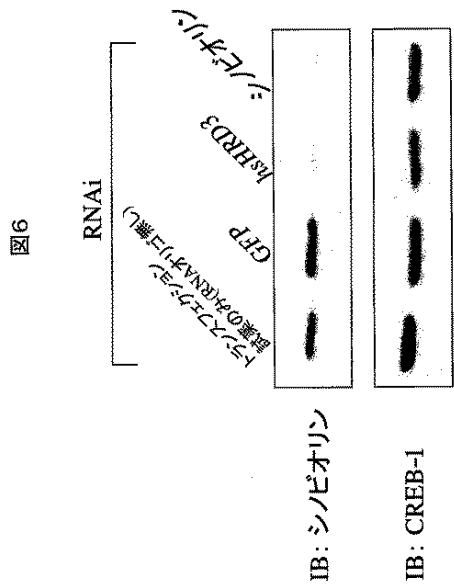
【図 4】



【図 5】

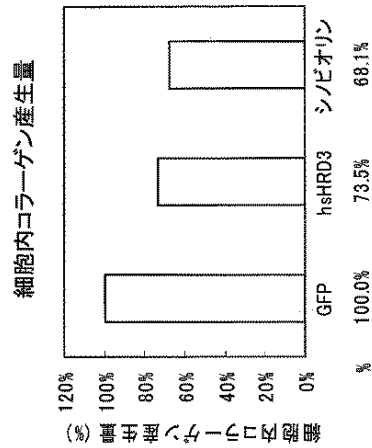


【図 6】



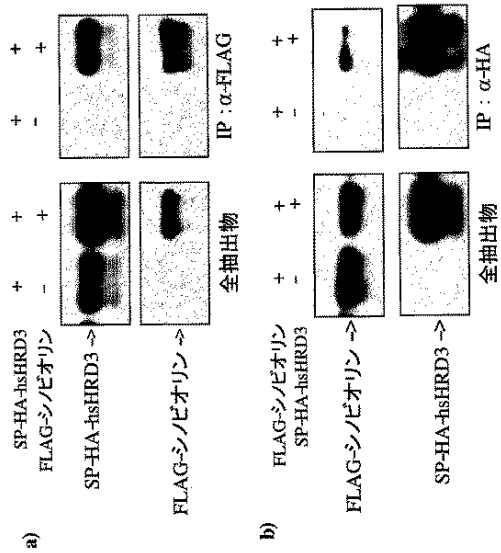
【図 7】

図7



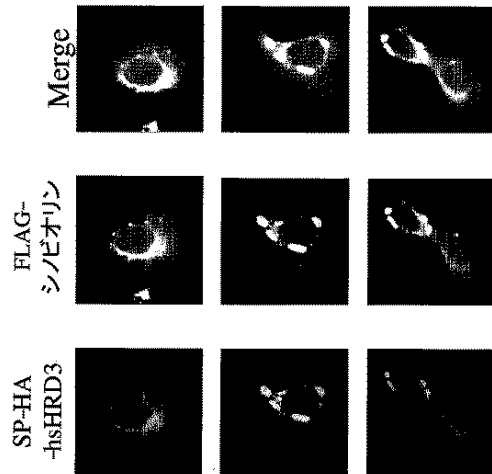
【図 8】

図8



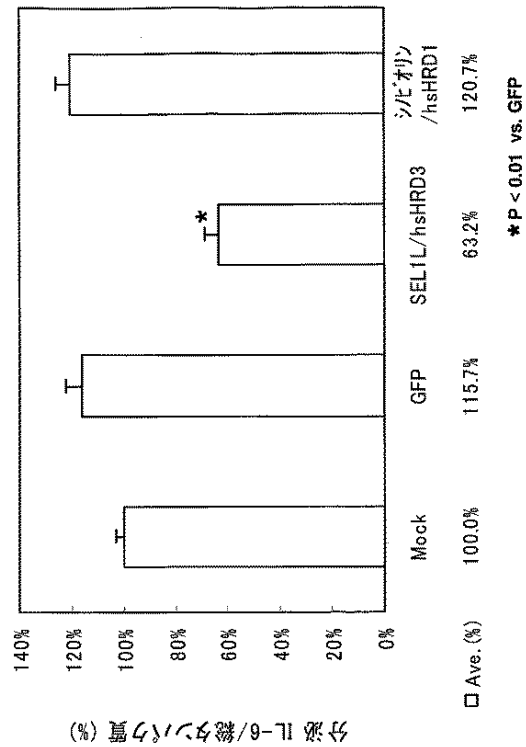
【図 9】

図9

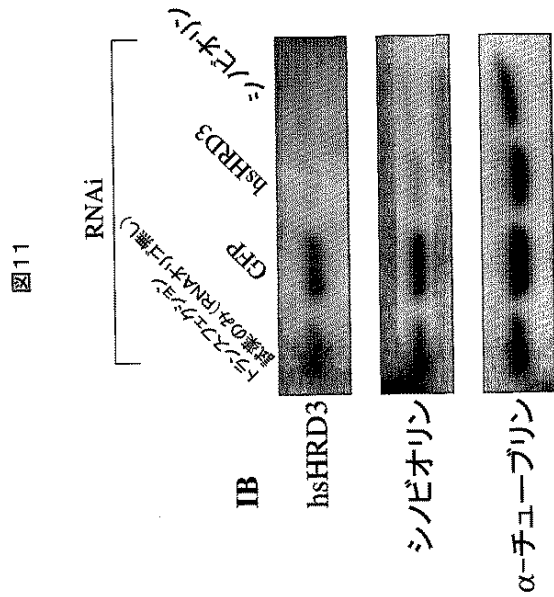


【図 10】

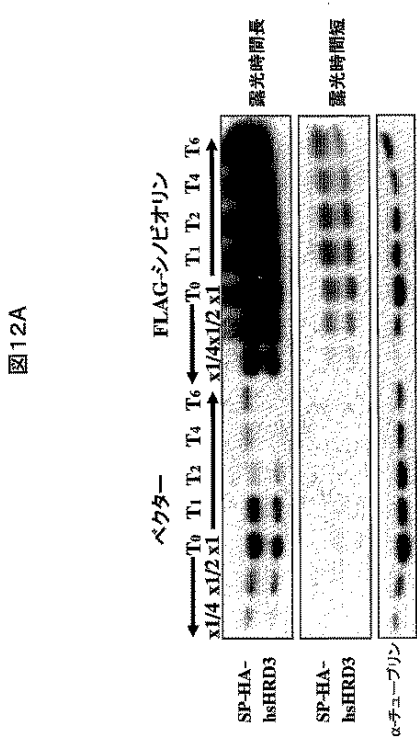
図10



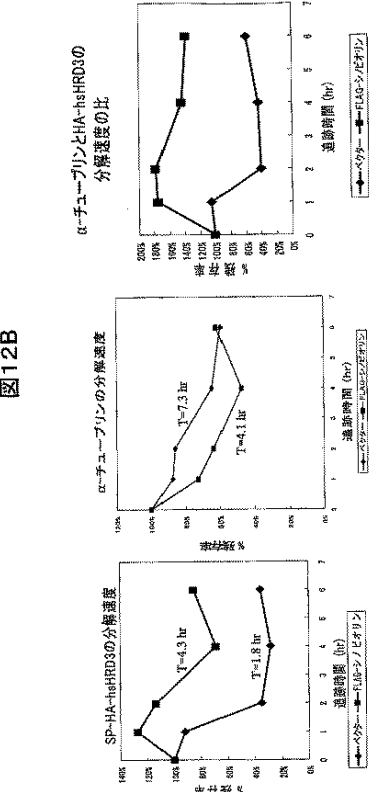
【図 1 1】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【配列表】
2005089800000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/005311												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P19/02, 25/00, 29/00, 35/00//C12N15/09 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) Int.Cl. ⁷ A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00, C12N15/00-15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Claims; examples; industrial applicability</td> <td>1, 2, 7 3-6</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>JP 2003-89647 A (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 28 March, 2003 (28.03.03), Full text</td> <td>1, 7 2-6</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 06 March, 2003 (06.03.03), Claims; examples</td> <td>1, 7 2-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X A	WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Claims; examples; industrial applicability	1, 2, 7 3-6	X A	JP 2003-89647 A (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 28 March, 2003 (28.03.03), Full text	1, 7 2-6	X A	WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 06 March, 2003 (06.03.03), Claims; examples	1, 7 2-6
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X A	WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Claims; examples; industrial applicability	1, 2, 7 3-6												
X A	JP 2003-89647 A (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 28 March, 2003 (28.03.03), Full text	1, 7 2-6												
X A	WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 06 March, 2003 (06.03.03), Claims; examples	1, 7 2-6												
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 30 May, 2005 (30.05.05)		Date of mailing of the international search report 14 June, 2005 (14.06.05)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-10784 A (Teijin Ltd.), 15 January, 2002 (15.01.02), Full text	1,7 2-6
X A	JP 2003-525243 A (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA), 26 August, 2003 (26.08.03), Full text	1,7 2-6
X A	JP 7-324035 A (LTT Institute Co., Ltd.), 12 December, 1995 (12.12.95), Full text	1,7 2-6
X A	JP 7-145062 A (LTT Institute Co., Ltd.), 06 June, 1995 (06.06.95), Full text	1,7 2-6
X A	WO 01/76630 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 October, 2001 (18.10.01), Claims; examples	1,7 2-6
X A	WO 01/21793 A1 (Nobuyuki MIYASAKA), 29 March, 2001 (29.03.01), Full text	1,7 2-6
X A	WO 00/53194 A1 (Takada Seiyaku Kabushiki Kaisha), 14 September, 2000 (14.09.00), Full text	1,7 2-6
Y A	JP 2001-503785 A (ANGIOTECH PHARMACEUTICALS, INC.), 21 March, 2001 (21.03.01), Full text	1,2,7 3-6
X A	WO 00/38693 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 July, 2000 (06.07.00), Full text	13,19,20 14-18
X A	WO 01/51480 A1 (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 19 July, 2001 (19.07.01), Claims; examples	13,20 14-19
X A	WO 01/95921 A1 (Kabushiki Kaisha Gifu Shellac Seizosho), 20 December, 2001 (20.12.01), Claims; test examples	13,19,20 14-18
X A	WO 97/47622 A1 (Japan Tobacco Inc.), 18 December, 1997 (18.12.97), Claims; examples	13,20 14-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 8-73453 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 March, 1996 (19.03.96), Full text	13, 19, 20 14-18
L	CATTANEO, M., et al., Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. Gene, 2004, 326, pages 149 to 156 (Disclosed are that tumour growth is inhibited by SEL1L having Hrd3 motif and that inhibiting action of tumour cell growth is weakened by deletion mutant of SEL1L)	1-7
A	WO 99/28457 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 June, 1999 (10.06.99),	1-7
A	AMANO, T., et al., Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy., Genes & Development, 2003, 17, pages 2436 to 2449	1-7
A	GARDNER, R.G., et al., Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling: Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p., Journal of Cell Biology, 2000, 151(1), pages 69 to 82	1-7
P,X P,A	WO 2005/018675 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 03 March, 2005 (03.03.05), Claims; examples	1, 2, 7 3-6
P,A	Naoko YAGISHITA et al., "Kansetsu Rheumatism Hassho no Byoin Bunshi Synoviolin", Igaku no Ayumi, 02 October, 2004 (02.10.04), 211(1), pages 124 to 128	1-7
T	YAGISHITA, N., et al., Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis., Journal of Biological Chemistry, 2005, 280, pages 7909 to 7916	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2005/005311

WO 02/052007 A1	2002.07.04	EP 1352961 A1	2003.10.15
		KR 2003074664 A	2003.09.19
		AU 2002216399 A1	2002.07.08
		CN 1491280 A	2004.04.21
		US 2004/0152871 A1	2004.08.05
JP 2003-89647 A	2003.03.28	WO 00/53194 A1	2000.09.14
		AU 200029425 A	2000.09.28
		EP 1166788 A1	2002.01.02
		SK 200101250 A3	2002.02.05
		CZ 200103110 A3	2002.01.16
		KR 2001108343 A	2001.12.07
		CN 1343122 A	2002.04.03
		US 6608043 B1	2003.08.19
WO 2003/018033 A1	2003.03.06	JP 2005-508893 A	2005.04.07
		US 2003/0064958 A1	2003.04.03
		EP 1420801 A1	2004.05.26
		AU 2002325113 A1	2003.03.10
		KR 2004032992 A	2004.04.17
		US 6812220 B2	2004.11.02
		MX 2004001876 A1	2004.06.01
		CN 1547478 A	2004.11.17
JP 2002-10784 A	2002.01.15	(Family: none)	
JP 2003-525243 A	2003.08.26	WO 01/64214 A2	2001.09.07
		EP 1261337 A2	2002.12.04
		US 2003/0139353 A1	2003.07.24
JP 7-324035 A	1995.12.12	(Family: none)	
WO 01/76630 A1	2001.10.18	AU 200146850 A	2001.10.23
		EP 1275398 A1	2003.01.15
		US 2003/0152572 A1	2003.08.14
WO 01/21793 A1	2001.03.29	AU 200073202 A	2001.04.24
		EP 1225223 A1	2002.07.24
WO 00/53194 A1	2000.09.14	AU 200029425 A	2000.09.28
		EP 1166788 A1	2002.01.02
		SK 200101250 A3	2002.02.05
		CZ 200103110 A3	2002.01.16
		KR 2001108343 A	2001.12.07
		CN 1343122 A	2002.04.03
		JP 2003-89647 A	2003.03.28
		US 6608043 B1	2003.08.19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2005/005311

JP 2001-503785 A	2001.03.21	WO 98/24427 A2	1998.06.11
		AU 9851132 A	1998.06.29
		NO 9902641 A	1999.07.30
		EP 941089 A2	1999.09.15
		CN 1246791 A	2000.03.08
		BR 9713673 A	2000.10.31
		EP 1070502 A2	2001.01.24
		EP 1090637 A2	2001.04.11
		EP 1092433 A2	2001.04.18
		MX 9905073 A1	2000.03.01
		KR 2000069265 A	2000.11.25
		AU 200148029 A	2001.08.02
		NZ 336094 A	2001.08.31
		US 2002/0013298 A1	2002.01.31
		US 2002/0037919 A1	2002.03.28
		JP 2002-226399 A	2002.08.14
		US 2002/0183380 A1	2002.12.05
		US 6495579 B1	2002.12.17
		US 6515016 B2	2003.02.04
		US 2003/0157187 A1	2003.08.21
		US 6689803 B2	2004.02.10
		AU 2004200715 A1	2004.03.18
WO 00/38693 A1	2000.07.06	EP 1057488 A1	2000.12.06
		CN 1298305 A	2001.06.06
		US 6579860 B1	2003.06.17
WO 01/51480 A1	2001.07.19	EP 1254902 A1	2002.11.06
		KR 2003016216 A	2003.02.26
		CN 1418207 A	2003.05.14
		US 2003/0158250 A1	2003.08.21
WO 01/95921 A1	2001.12.20	AU 200174519 A	2001.12.24
		EP 1312372 A1	2003.05.21
		US 2003/0170329 A1	2003.09.11
WO 97/47622 A1	1997.12.18	AU 9731061 A	1998.07.07
		NO 9805820 A	1999.02.01
		EP 934940 A1	1999.08.11
		CN 1227555 A	1999.09.01
		BR 9710453 A	1999.08.17
		MX 9810605 A1	1999.03.14
		KR 2000016732 A	2000.03.25
JP 8-73453 A	1996.03.19	(Family: none)	
WO 99/28457 A1	1999.06.10	JP 11-215987 A	1999.08.10
		EP 1038957 A1	2000.09.27
		CN 1280617 A	2001.01.17
		US 2004/0204574 A1	2004.10.14
		US 6822083 B1	2004.11.23
WO 2005/018675 A1	2005.03.03	(Family: none)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

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.: 8-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 8 to 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
(Article 17(2)(a)(i) of the PCT, Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT)
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:

- o With respect to claims 1-7 and 13-20:
All the inventions of claims 2-7 directly or indirectly quote claim 1, and it appears that the technical matter common to the inventions of claims 1-7 is "pharmaceutical composition capable of suppressing the multiplication of synovial cells" claimed in claim 1.
On the other hand, all the inventions of claims 14-20 directly or indirectly quote claim 13, and it appears that the technical matter common to the inventions of claims 13-20 is "pharmaceutical composition comprising a substance capable of suppressing the production of interleukin 6" claimed in claim 1.
(Continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

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

Although it appears that the technical matter common to the inventions of claims 1-7 and the inventions of claims 13-20 is a pharmaceutical composition per se, the pharmaceutical composition per se is a technical matter publicly known by persons skilled in the art to which the inventions pertain. Further, with respect to the "pharmaceutical composition capable of suppressing the multiplication of synovial cells" and "pharmaceutical composition comprising a substance capable of suppressing the production of interleukin 6" as well, they are a publicly known matter as respectively described in JP 2003-89647 A and WO 00/38693 A1, and hence this matter cannot be special technical features.

Consequently, these inventions cannot be stated as being linked with each other so as to form a single general inventive concept and hence fail to satisfy the requirement of unity of invention.

Therefore, it appears that the claims 1-7 and 13-20 claim the following two inventions not forming a single general inventive concept:

- 1) invention of claims 1-7, and
- 2) invention of claims 13-20.

With respect to claims 1-3, 7, 13-15, 19 and 20:

All the inventions of these claims relate to pharmaceuticals, and the active ingredients thereof are only defined by their functions.

However, since from provided description, what chemical structures give compounds with the functions cannot be stated as being obvious to even persons skilled in the art to which the inventions pertain, simply specifying of the functions is not sufficient to clarify what compounds are active ingredients.

Further, according to the contents of the description of this application, the compositions whose concrete results showing the functions are ascertained are only those containing nucleic acids specified in claims 4 to 6 and 16 to 18. Since there is no description as to those containing other ingredients, it does not appear that with respect to those as well, exhibiting of the same activity as mentioned in the description has been shown.

Therefore, in view of the way of drafting of claims 1-3, 7, 13-15, 19 and 20, the inventions of these claims are unclear. Further, in view of the way of drafting of the description, it cannot be stated that the description is sufficiently clear and complete for the inventions of the claims to be carried out by persons skilled in the art to which the inventions pertain, and it cannot be stated that the description is drafted so as to fully support the inventions of these claims (PCT Article 5 and Article 6).

(continued to next page)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005311

As the description of this application is lacking in the support for the inventions of these claims, it is to be noted that in the preparation of this international search report, prior art search has been limited to those whose active ingredients are nucleic acids specified in claims 4 to 6 and 16 to 18 and rational scope based on the contents of the description.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/005311	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 31/7088, 48/00, A61P19/02, 25/00, 29/00, 35/00 // C12N15/09			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00, C12N15/00-15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), Caplus (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X A	WO 02/052007 A1 (株式会社ロコモジェン) 2002.07.04, 請求の範囲, 実施例, 産業上の利用の可能性	1, 2, 7 3-6	
X A	JP 2003-89647 A (高田製薬株式会社) 2003.03.28, 全文	1, 7 2-6	
X A	WO 2003/018033 A1 (THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA) 2003.03.06, 請求の範囲, 実施例	1, 7 2-6	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 30.05.2005		国際調査報告の発送日 14.6.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 荒木 英 則 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/005311
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2002-10784 A(帝人株式会社) 2002.01.15, 全文参照	1, 7 2-6
X A	JP 2003-525243 A(サニタリー オブ プリテイッシュ コロンビア) 2003.08.26, 全文参照	1, 7 2-6
X A	JP 7-324035 A(株式会社エルティーティー研究所) 1995.12.12, 全文参照	1, 7 2-6
X A	JP 7-145062 A(株式会社エルティーティー研究所) 1995.06.06, 全文参照	1, 7 2-6
X A	WO 01/76630 A1(協和醗酵工業株式会社) 2001.10.18, 請求の範囲, 実施例	1, 7 2-6
X A	WO 01/21793 A1(宮坂 信之) 2001.03.29, 全文参照	1, 7 2-6
X A	WO 00/53194 A1(高田製薬株式会社) 2000.09.14, 全文参照	1, 7 2-6
Y A	JP 2001-503785 A(アソシエイト ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2001.03.21, 全文参照	1, 2, 7 3-6
X A	WO 00/38693 A1(東レ株式会社) 2000.07.06, 全文参照	13, 19, 20 14-18
X A	WO 01/51480 A1(寶酒造株式会社) 2001.07.19, 請求の範囲, 実施例	13, 20 14-19
X A	WO 01/95921 A1(株式会社岐阜セラック製造所) 2001.12.20, 請求の範囲, 試験例	13, 19, 20 14-18
X A	WO 97/47622 A1(日本たばこ産業株式会社) 1997.12.18, 請求の範囲, 実施例	13, 20 14-19
Y A	JP 8-73453 A(大塚製薬株式会社) 1996.03.19, 全文参照	13, 19, 20 14-18

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/005311
C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
L	CATTANEO, M., <i>et al.</i> , Identification of a region within SEL1L protein required for tumour growth inhibition. <i>Gene</i> , 2004, 326, pp. 149-156 (Hrd3 モチーフを有する SEL1L により癌の増殖が阻害されること、および SEL1L の deletion mutant によりガン細胞成長抑制作用が減弱されることが記載されている。)	1-7
A	WO 99/28457 A1 (大塚製薬株式会社) 1999.06.10	1-7
A	AMANO, T., <i>et al.</i> , Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. <i>Genes & Development</i> , 2003, 17, pp. 2436-2449	1-7
A	GARDNER, R.G., <i>et al.</i> , Endoplasmic Reticulum Degradation Requires Lumen to Cytosol Signaling: Transmembrane Control of Hrd1p by Hrd3p. <i>Journal of Cell Biology</i> , 2000, 151(1), pp. 69-82	1-7
PX PA	WO 2005/018675 A1 (株式会社ロコモジェン) 2005.03.03 請求の範囲, 実施例	1, 2, 7 3-6
PA	八木下 尚子ら, 関節リウマチ発症の病因分子シノビオリン, 医学のあゆみ, 2004.10.02, 211(1), pp. 124-128	1-7
T	YAGISHITA, N., <i>et al.</i> , Essential Role of Synoviolin in Embryogenesis. <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 2005, 280, pp. 7909-7916	1-7

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2005/005311
第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き) 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。 1. ☒ 請求の範囲 <u>8-12</u> は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲8から12に係る発明は、治療による人体の処置方法にあたる。(PCT17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv)) 2. ☐ 請求の範囲 <u> </u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 3. ☐ 請求の範囲 <u> </u> は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。	
第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き) 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。 ○請求の範囲1-7, 13-20について 請求の範囲2-7に係る発明はいずれも請求の範囲1を直接または間接的に引用するものであって、請求の範囲1-7に係る発明における共通の技術的事項とは、請求の範囲1に記載される「滑膜細胞の増殖を抑制する医薬組成物」にあるものと認められる。 一方、請求の範囲14-20に係る発明はいずれも請求の範囲13を直接または間接的に引用するものであって、請求の範囲13-20に係る発明における共通の技術的事項とは、請求の範囲1に記載される「インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物」にあるものと認められる。 (以下、別紙に続く。) 1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。 2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。 3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。 4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。	

第三欄の続き

ここで、請求の範囲1-7に係る発明と請求の範囲13-20に係る発明とに共通の技術的事項とは、医薬組成物そのものであるものと認められるが、医薬組成物自体は当業者に周知の技術的事項であり、また、「滑膜細胞の増殖を抑制する医薬組成物」や「インターロイキン-6の産生を抑制する物質を含む医薬組成物」についても、それぞれ JP 2003-89647 A や WO 00/38693 A1 にあるように公知の事項であるから、これらの点をもって特別の技術的特徴とすることはできない。

したがって、これらの発明が単一の一般的発明概念を形成するように関連したものということとはできず、発明の単一性を有さないものとなっている。

よって、請求の範囲1-7および13-20には、単一の一般的発明概念を形成しない以下の2発明が記載されたものと認められる。

- 1) 請求の範囲1-7に係る発明
- 2) 請求の範囲13-20に係る発明

請求の範囲1-3, 7, 13-15, 19, 20について

これらの請求の範囲に係る発明はいずれも医薬に関するものであって、その有効成分はその機能のみで限定されたものである。

しかしながら、このような記載によつては、いかなる化学構造を有するものであれば当該機能を有するものであるのか当業者といえども自明なものということとはできないから、単に当該機能が特定されるのみではいかなる化合物が有効成分となるのかが不明確である。

また、本願明細書の記載によれば、当該機能を有するものとして具体的にその結果が確認されているのは請求の範囲4から6および16から18に記載された核酸を用いた場合のみであつて、他の成分を用いた場合については何ら記載されていないため、このような場合についてまで明細書に記載されたものと同様の作用を示すことが示されたものとは認められない。

したがって、請求の範囲1-3, 7, 13-15, 19, 20の記載によつてはこれらの請求の範囲に係る発明が不明確であり、また、このような明細書の記載によつては、当業者がこれらの請求の範囲に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものとはいえず、これらの請求の範囲に係る発明について十分な裏付けとなるよう記載されたものということとはできない(PCT5条および6条)。

そして、本願明細書の記載はこれらの請求の範囲に係る発明に関する裏付けを欠くものとなっているから、本国際調査報告の作成に際しては、有効成分が請求の範囲4から6および16から18に記載された核酸の場合のほか、明細書の記載からみて合理的な範囲に限定して先行技術調査を行っている点に留意されたい。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2005/005311

WO 02/052007	A1	2002. 07. 04	EP 1352961	A1	2003. 10. 15
			KR 2003074664	A	2003. 09. 19
			AU 2002216399	A1	2002. 07. 08
			CN 1491280	A	2004. 04. 21
			US 2004/0152871	A1	2004. 08. 05
JP 2003- 89647	A	2003. 03. 28	WO 00/53194	A1	2000. 09. 14
			AU 200029425	A	2000. 09. 28
			EP 1166788	A1	2002. 01. 02
			SK 200101250	A3	2002. 02. 05
			CZ 200103110	A3	2002. 01. 16
			KR 2001108343	A	2001. 12. 07
			CN 1343122	A	2002. 04. 03
			US 6608043	B1	2003. 08. 19
WO 2003/018033	A1	2003. 03. 06	JP 2005-508893	A	2005. 04. 07
			US 2003/0064958	A1	2003. 04. 03
			EP 1420801	A1	2004. 05. 26
			AU 2002325113	A1	2003. 03. 10
			KR 2004032992	A	2004. 04. 17
			US 6812220	B2	2004. 11. 02
			MX 2004001876	A1	2004. 06. 01
			CN 1547478	A	2004. 11. 17
JP 2002-10784	A	2002. 01. 15	ファミリーなし		
JP 2003-525243	A	2003. 08. 26	WO 01/64214	A2	2001. 09. 07
			EP 1261337	A2	2002. 12. 04
			US 2003/0139353	A1	2003. 07. 24
JP 7-324035	A	1995. 12. 12	ファミリーなし		
WO 01/76630	A1	2001. 10. 18	AU 200146850	A	2001. 10. 23
			EP 1275398	A1	2003. 01. 15
			US 2003/0152572	A1	2003. 08. 14
WO 01/21793	A1	2001. 03. 29	AU 200073202	A	2001. 04. 24
			EP 1225223	A1	2002. 07. 24

様式PCT/ISA/210 (パテントファミリー用別紙) (2004年1月)

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2005/005311

WO 00/53194	A1	2000.09.14	AU 200029425	A	2000.09.28
			EP 1166788	A1	2002.01.02
			SK 200101250	A3	2002.02.05
			CZ 200103110	A3	2002.01.16
			KR 2001108343	A	2001.12.07
			CN 1343122	A	2002.04.03
			JP 2003-89647	A	2003.03.28
			US 6608043	B1	2003.08.19
JP 2001-503785	A	2001.03.21	WO 98/24427	A2	1998.06.11
			AU 9851132	A	1998.06.29
			NO 9902641	A	1999.07.30
			EP 941089	A2	1999.09.15
			CN 1246791	A	2000.03.08
			BR 9713673	A	2000.10.31
			EP 1070502	A2	2001.01.24
			EP 1090637	A2	2001.04.11
			EP 1092433	A2	2001.04.18
			MX 9905073	A1	2000.03.01
			KR 2000069265	A	2000.11.25
			AU 200148029	A	2001.08.02
			NZ 336094	A	2001.08.31
			US 2002/0013298	A1	2002.01.31
			US 2002/0037919	A1	2002.03.28
			JP 2002-226399	A	2002.08.14
			US 2002/0183380	A1	2002.12.05
			US 6495579	B1	2002.12.17
			US 6515016	B2	2003.02.04
			US 2003/0157187	A1	2003.08.21
			US 6689803	B2	2004.02.10
			AU 2004200715	A1	2004.03.18
WO 00/38693	A1	2000.07.06	EP 1057488	A1	2000.12.06
			CN 1298305	A	2001.06.06
			US 6579860	B1	2003.06.17
WO 01/51480	A1	2001.07.19	EP 1254902	A1	2002.11.06
			KR 2003016216	A	2003.02.26
			CN 1418207	A	2003.05.14
			US 2003/0158250	A1	2003.08.21

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2005/005311

WO 01/95921 A1	2001.12.20	AU 200174519	A	2001.12.24
		EP 1312372	A1	2003.05.21
		US 2003/0170329	A1	2003.09.11
WO 97/47622 A1	1997.12.18	AU 9731061	A	1998.07.07
		NO 9805820	A	1999.02.01
		EP 934940	A1	1999.08.11
		CN 1227555	A	1999.09.01
		BR 9710453	A	1999.08.17
		MX 9810605	A1	1999.03.14
		KR 2000016732	A	2000.03.25
JP 8-73453 A	1996.03.19	ファミリーなし		
		JP 11-215987	A	1999.08.10
WO 99/28457 A1	1999.06.10	EP 1038957	A1	2000.09.27
		CN 1280617	A	2001.01.17
		US 2004/0204574	A1	2004.10.14
		US 6822083	B1	2004.11.23
WO 2005/018675 A1	2005.03.03	ファミリーなし		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
	G 0 1 N	33/53	M
	C 1 2 N	15/00	A

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 中島 利博

神奈川県横浜市都筑区中川 1-2-5 港北ガーデンヒルズA棟 503号

(72)発明者 天野 徹也

神奈川県川崎市多摩区西生田 3-6-30 楓 107号室

(72)発明者 山崎 聡士

神奈川県横浜市鶴見区小野町 75番地 1 リーディングベンチャープラザ 2号館 400号室

(72)発明者 八木下 尚子

神奈川県横浜市港南区日野中央 2-39-9 コスモ港南台 507号

(72)発明者 佐々木 研

神奈川県横浜市鶴見区小野町 75番地 1 リーディングベンチャープラザ 2号館 400号室

(72)発明者 加藤 幸裕

神奈川県大和市桜森 2-4-14 レックス相模大塚駅前 205号

(72)発明者 張 蕾

神奈川県横浜市鶴見区小野町 75番地 1 リーディングベンチャープラザ 2号館 400号室

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA11 DA02 EA04 GA11

4B063 QA01 QA19 QQ42 QR35 QR66 QS16 QS25 QS36 QX02

4C084 AA13 AA17 NA14 ZA591 ZA681 ZA961 ZA971 ZB021 ZB071 ZB111

ZB151 ZB211 ZB212 ZB261 ZB271 ZC412

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZA68 ZA96 ZA97

ZB02 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26 ZB27 ZC41

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

专利名称(译)	包含hsHRD3的药物组合物		
公开(公告)号	JPWO2005089800A1	公开(公告)日	2008-01-31
申请号	JP2006511313	申请日	2005-03-16
申请(专利权)人(译)	株式会社ロコモジェン		
[标]发明人	中島利博 天野徹也 山崎聡士 八木下尚子 佐々木研 加藤幸裕 張 蕾		
发明人	中島 利博 天野 徹也 山崎 聡士 八木下 尚子 佐々木 研 加藤 幸裕 張 蕾		
IPC分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/713 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 A61K31/7088		
CPC分类号	A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 C12N15/113 C12N2310/14		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K48/00 A61K31/713 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C12Q1/68.A G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR35 4B063/QR66 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA591 4C084/ZA681 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB021 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZA68 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB02 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC41		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 小林顺子		
优先权	2004076931 2004-03-17 JP 2004314364 2004-10-28 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供含有抑制滑膜组织或滑膜细胞增殖的物质和白细胞介素-6产生的药物组合物。它还提供用于抑制滑膜组织或滑膜细胞增殖和白细胞介素-6产生的药物组合物，其可用于诊断和治疗选自类风湿性关节炎，纤维化，关节炎，癌症和脑中的至少一种。神经疾病。此外，它提供了通过抑制滑膜细胞中hsHRD3的表达来抑制滑膜细胞增殖和白细胞介素-6产生的方法。

【図 2】

