

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/132512

発行日 平成21年9月17日(2009.9.17)

(43) 国際公開日 平成19年11月22日(2007.11.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2008-515400 (P2008-515400)	(71) 出願人 899000079
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/309602	学校法人慶應義塾
(22) 国際出願日 平成18年5月12日(2006.5.12)	東京都港区三田2丁目15番45号
(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, LV, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, 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	(71) 出願人 000103840 オリエンタル酵母工業株式会社 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
	(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
	(74) 代理人 100096183 弁理士 石井 貞次
	(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫
特許法第30条第1項適用申請有り	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患の検出並びに炎症性疾患の予防又は治療用組成物

## (57) 【要約】

炎症性疾患の新規な検出方法および炎症性疾患の新規な予防又は治療用組成物の提供。生体試料中のRANKL及び／又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法、並びにRANKL及び／又はM-CSFを有効成分として含む、炎症性疾患の予防または治療用組成物。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体試料中のRANKL及び／又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 2】

生体試料中のRANKLをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の可溶性RANKL濃度が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、請求項 1 記載の炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 3】

生体試料中のOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中のOPG濃度が正常人に比べて上昇した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、請求項 1 記載の炎症性疾患を検出する方法。

10

## 【請求項 4】

生体試料中のRANKL及びOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の可溶性RANKL/OPG濃度比が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、請求項 1 記載の炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 5】

生体試料中のRANKLをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の細胞上に存在する膜型RANKLをフローサイトメトリー法により測定することを含む、請求項 1 記載の炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 6】

生体試料中のRANKL及びOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の細胞上に存在する膜型RANKLをフローサイトメトリー法により測定し、膜型RANKL測定量/OPG濃度比が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、請求項 1 記載の炎症性疾患を検出する方法。

20

## 【請求項 7】

生体試料中の細胞が末梢血細胞である請求項 5 又は 6 に記載の炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 8】

炎症性疾患が、感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患を検出する方法。

30

## 【請求項 9】

炎症性疾患が、敗血症である請求項 8 記載の炎症性疾患を検出する方法。

## 【請求項 10】

抗RANKL抗体及び／又は抗OPG抗体を含む、RANKL及び／又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出するための検出試薬。

## 【請求項 11】

抗RANKL抗体及び抗OPG抗体を含む、RANKL及び／又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出するための検出試薬。

## 【請求項 12】

炎症性疾患が、感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である請求項 10 又は 11 に記載の炎症性疾患を検出するための検出試薬。

40

## 【請求項 13】

炎症性疾患が、敗血症である請求項 12 記載の炎症性疾患を検出するための検出試薬。

## 【請求項 14】

RANKL及び／又はM-CSFを有効成分として含む、炎症性疾患の予防または治療用組成物。

## 【請求項 15】

RANKL及びM-CSFを有効成分として含む、請求項 14 記載の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

## 【請求項 16】

炎症性疾患の予防又は治療用組成物が配合剤である、請求項 15 記載の炎症性疾患の予防

50

又は治療用組成物。

【請求項 17】

炎症性疾患の予防又は治療用組成物がRANKLを含む薬剤とM-CSFを含む薬剤とからなるキットである、請求項 15 記載の炎症性疾患の予防または治療用組成物。

【請求項 18】

RANKL及び／又はM-CSFが手術の前に投与されることを特徴とし、手術後の炎症性疾患を予防する、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【請求項 19】

炎症性疾患が感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である請求項 15～18 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

10

【請求項 20】

炎症性疾患が、敗血症である請求項 19 記載の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【請求項 21】

RANKL及び／又はM-CSFを有効成分として含む、免疫抑制剤。

【請求項 22】

RANKL及びM-CSFを有効成分として含む、請求項 21 記載の免疫抑制剤。

【請求項 23】

免疫抑制剤が配合剤である、請求項 22 記載の免疫抑制剤。

【請求項 24】

免疫抑制剤がRANKLを含む薬剤とM-CSFを含む薬剤とからなるキットである、請求項 23 記載の免疫抑制剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は炎症性サイトカインの産生抑制や炎症モデル動物における生存率の向上をもたらすRANKLにより敗血症、アレルギー、自己免疫疾患などの炎症性疾患を診断し、又は抑制する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、外科領域中でも侵襲の大きな手術での周術期や感染症などの救急疾患の急性期では、過剰に産生された液性因子が病態形成に重要な役割を果たしていることが分かっている。これら侵襲下において日々刻々と変化する病態を早期から把握し、臨床に応用するには様々な液性因子の測定が大変重要である。敗血症から複数臓器機能が障害される多臓器不全 (multiple organ dysfunction syndrome: MODS) へ至る過程における各種液性因子に関する研究は、分子生物学的手法の開発と相まって飛躍的に進歩した。最近の多臓器不全の研究は細胞レベルの障害機構と微小環境や液性因子を解析して病態に迫るという研究アプローチに移行してきている。すなわち、敗血症による多臓器不全など、その原因は違っても、発生機序や病態は極めて類似しているという認識のもとに、最近では多臓器不全に至る前のもっと早期の段階でかかる病態への移行に関与する因子を制御することが重要視され、現在では臨床家・研究者の目は多臓器不全そのものの治療よりも、その前段階における敗血症の病態解明とそれへの有効な対応策の確立に向けられているといえる。

30

40

【0003】

このような液性因子は炎症マーカーとして有用であるが、具体的にはこれまでCRP(C-reactive protein), TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1, HMGB-1, MIF, C5a, calcitoninなどが知られている (Marshallら, Crit Care Med 31: 1560, 2003)。CRPは血小板数などと組み合わせて重度の敗血症の予後を評価するのに用いた報告 (Asayamaら, Keio J Med 47: 19 1998) はあるが、敗血症と外傷との比較で有意差を認めないという報告 (遠藤ら, 感染症誌 73: 197 1999) もあり、評価が定まっていない。TNF- $\alpha$  やIL-6についても同様に敗血症と外傷との比較で有意差を認めないという報告 (遠藤ら, 感染症誌 73: 197 1999) がある一方で、IL-6を敗血症の予後マーカーとして用いている報告 (Reinhar

50

tら、Crit Care Med 29: 765, 2001) もあり、評価は一定しない。また、IL-10が有効であるという報告 (Onoら、Am J Surg 188: 150, 2004) はあるが、まだ十分に検証されているとは言えない。急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) や気管支喘息などにおいてMIFの関与が報告 (Donnellyら、Nat Med 3: 320, 1997; Rossiら、J Clin Invest 101: 2869, 1998) されているが、マーカーとなりうるかどうかは不明である。以上述べた液性因子も敗血症の原因なのか、その結果として産生されてくるのかも明らかになっていない。

#### 【0004】

炎症反応は侵襲により生体に生じる損傷の拡大を制限し修復する生体反応であり、すべての侵害侵襲に対して非特異的の反応として発来する。その本態は神経内分泌反応、免疫炎症反応、凝固線溶反応が密接に関連して生じる生理的生体反応である。局所的には発赤、腫脹、疼痛、熱感、として発現し、侵襲が大きい場合には発熱、瀕脈、瀕呼吸、白血球増加を伴う全身性反応を生じる。これが全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) であり、外傷、熱傷、肺炎、侵襲の強い術後など感染を伴わない様々な原因によるものと、細菌、真菌、寄生虫、ウイルスなどによる感染を伴うものがある。特に感染に起因するSIRSを敗血症 (sepsis) という。

#### 【0005】

炎症反応は血管拡張、血管透過性亢進、白血球・血管内皮細胞活性化などにより成立する。これらの反応は侵襲に伴い非特異的に産生される補体、アミン、キニン、プロスタノイド、サイトカイン、トロンピンにより引き起こされる。局所的侵害刺激には局所炎症反応が惹起されるが、生体侵襲が大きい場合には、これらの炎症メディエーター (特にサイトカインとトロンピン) の全身逸脱が起こり、全身性の血管拡張、透過性亢進、白血球・血管内皮細胞活性化がみられる。炎症反応は侵害刺激受容、反応、修復の過程をとるが、全身性炎症反応が持続する場合には修復過程に至らず生体の恒常性が破綻する。このような場合、多臓器不全を惹起して生体を死に導くことが知られている。

#### 【0006】

侵襲に対して生体は防御のため神経・内分泌・免疫系の3系が相互に密接に作用しながら反応する。侵襲に伴い、神経・内分泌系は活性化され、エネルギー代謝の亢進、糖新生、心拍出量の増加などをもたらす。全身の炎症反応像を形成するが、一方でコルチゾールは免疫系を抑制し、またカテコールアミンは免疫細胞であるNK細胞やキラーT細胞の活性を抑制することも知られている。細菌感染や組織障害の発生により補体系や血液凝固系が活性化され、これに伴い血管内皮細胞の活性化や貪食系の細胞である単球、マクロファージ、好中球が遊走し、障害部位でのTNF- $\alpha$  やIL-1を中心とする炎症性サイトカインが遊離される。これら炎症性サイトカインの遊離に伴い、プロテアーゼや活性酸素、血小板活性化因子なども遊離されSIRSの病態を形成していく。したがって、SIRSは高サイトカイン血症によってもたらされた病態とも考えることができる (Riedemannら、Nat Med 9: 517, 2003)。

#### 【0007】

米国において年間約75万人が敗血症に罹患し、21万人以上がそのために命を失っていると報告されている (Wheelerら、N Engl J Med 340: 207, 1999; Severanskyら、Sepsis 3: 11, 1999; Hotchkissら、N Engl J Med 348: 138, 2003)。さらに敗血症の処置はICU入院期間の延長や資源使用増加により、重大な経済的影響をもたらす。しかし、この高炎症性サイトカイン血症とも呼べる敗血症に対しての治療法確立が緊急課題として、世界中で試みられてきたにもかかわらず、敗血症の致死率の改善が得られる治療法はないのが現状である (Vincentら、Clin Infect Dis 34: 1084, 2002)。最近になり、治療法として活性型プロテインC (activated protein C: APC) 投与により、有意に重症敗血症の予後の改善が得られるという報告がなされた (Bernardら、N Engl J Med 344: 699, 2001)。米国 Food and Drug Administration (FDA) により重症敗血症に対する治療薬として初めて認可されることとなった。しかしながら、その有効性はわずか6-7%程度の救命率の上昇といった程度のものであり、いまだ敗血症は非常に致死性の高い、極めて治療困難な病的状態であると考えられている。また、活性型プロテインCは凝固抑制機能のみならず、線溶

機能を活性化し、血栓形成や炎症を阻害する内因性タンパク質であり(DePaloら、*Advances in Sepsis* 1: 114, 2001)、対症療法的な作用であるだけでなく、その性質から出血リスクの増大が予想されている。特に、頭蓋内出血は重大な有害事象であり、投与に当たっては禁忌条件を遵守するなどの十分な注意が必要である。この他に試みられてきたものとして以下に示す。

【0008】

(1) 大量ステロイド：内毒素血症や菌血症動物における前処理としての適応成功に基づき、早期臨床試験において敗血症性ショック患者における大量ステロイド投与の効果を検討したが、大規模二重盲検試験では、敗血症性ショックの発症初期に投与した場合でも有益性は報告されていない (Meduriら、*Sepsis* 3: 21, 1999; Bernardら、*N Engl J Med* 317: 1565, 1987; Boneら、*Chest* 92: 1032, 1987)。

【0009】

(2) 抗内毒素抗体：特異的抗内毒素抗体治療、例えば加熱殺菌E. coli J5に対するポリクローナルヒト免疫グロブリンG、内毒素のlipid Aに対するネズミ(E5)およびヒト化(HA1A)モノクローナル抗体が、重度のグラム陰性菌感染症患者を対象として検討された (Llewellynら、*Sepsis* 3: 39, 1999) が、大規模試験では有益性は認められなかった。

【0010】

(3) 抗TNF治療：抗TNF治療とは抗TNFモノクローナル抗体と可溶性TNF受容体による炎症性サイトカインの一つであるTNF- $\alpha$ を標的にした中和療法のことを言う。TNF- $\alpha$ の作用を抑制することで多くの敗血症モデルで生存を改善するとの報告があった (Traceyら、*Nature* 330: 662, 1987; Penningtonら、*Clin Infect Dis* 17(Suppl 2): S515, 1993) が、その後複数の第II相、第III相臨床試験が行われたにも関わらず、抗TNF治療でTNF- $\alpha$ の作用を抑制すると生存率が改善するという報告はない (Abrahamら、*JAMA* 273: 934, 1995; Reinhartら、*Crit Care Med* 24: 733, 1996; Severanskyら、*Sepsis* 3: 11, 1999; Reinhartら、*Crit Care Med* 29: S121, 2001)。

【0011】

(4) IL-1受容体拮抗薬(IL-1Ra)：IL-1も炎症性サイトカインの一つであるが、敗血症の多くの病態を惹起することが知られている (Ohlssonら、*Nature* 348: 550 1990)。これらの影響は天然のIL-1受容体拮抗物質であるIL-1Raにより抑制することができるが、重度敗血症患者を対象として施行された試験3件(二重盲検試験2件)では、治療群とプラセボ群に生存率の差がないことが示された (Fisherら、*JAMA* 271: 1836, 1994; Opalら、*Crit Care Med* 25: 1115, 1997; Severanskyら、*Sepsis* 3: 11, 1999)。

【0012】

(5) PAF受容体拮抗薬(PAFra)：血小板凝集因子(PAF)は敗血症中のサイトカイン放出に関与するリン脂質であるが、2件の二重盲検試験はPAF受容体拮抗薬(BN52021)が生存を有意に改善しないことを示した (Dhainautら、*Crit Care Med* 22: 1720, 1994; Dhainautら、*Crit Care Med* 26: 1963, 1998; Severanskyら、*Sepsis* 3: 11, 1999)。最近、他の化合物(BB-882)を用いた第II相臨床試験において、重度敗血症患者の生存を有意に改善しないことが再度示された。

【0013】

(6) 非ステロイド性抗炎症薬：抗プロスタグランジン薬イブプロフェンは二重盲検試験3件で検討されたが、いずれの場合もイブプロフェンの有用性は示されなかった (Bernardら、*N Engl J Med* 336: 912 1997; Severanskyら、*Sepsis* 3: 11, 1999)。

【0014】

(7) ブラジキニン拮抗薬：ブラジキニンは敗血症におけるサイトカイン放出と血管の変化に関与する生物活性ペプチドであるが、2件の二重盲検試験ではブラジキニン拮抗薬による死亡率改善はみられなかった (Feinら、*JAMA* 277: 482 1997; Severanskyら、*Sepsis* 3: 11, 1999)。

【0015】

以上のように敗血症は種々の治療法の進歩にもかかわらず、依然として発症率の抑制が

認められず、死亡者数の減少が得られない疾患である。敗血症に対する予防法や治療法の新規開発が求められている。

#### 【0016】

RANKのリガンドであるRANKLは破骨細胞分化誘導因子であり、これまでにマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)との共存下でマクロファージ系の前駆細胞から破骨細胞を誘導することが知られている(非特許文献1および2を参照)。すなわち、RANKLは骨芽細胞により産生され、マクロファージ系前駆細胞上のRANKに結合し破骨細胞に誘導する。また、この際RANKと構造が類似しているOPG(osteoprotegerin)がデコイ(おとり)レセプターとしてRANKLの作用を抑制する。このように、RANKL及びOPGの量のバランスにより骨代謝が制御されている。RANKLは膜結合タンパク質であるが、その一部は可溶型として血液中に存在する。可溶型RANKL(sRANKL)濃度の変動が認められる骨代謝疾患もいくつか報告されており、骨代謝マーカーとしての有用性が指摘され、医療応用が検討されている(非特許文献3ならびに特許文献1~3を参照)。また、OPGとの濃度比すなわち可溶型RANKL/OPGの比によって議論されることもしばしばである。このように従来RANKLは、骨代謝系における役割は知られていたが、自然免疫系における機能は明らかでなく、血中に存在する可溶型RANKLの生物学的な意味もはっきりしていなかった。

10

【特許文献1】特表2004-526748号公報

【特許文献2】特表2002-509430号公報

【特許文献3】国際公開第W098/46644号パンフレット

【非特許文献1】Yasudaら、Proc Natl Acad Sci USA 95: 3597, 1998

20

【非特許文献2】Laceyら、Cell 93: 165, 1998

【非特許文献3】Rogersら、J Clin Endocrinol Metab 90: 6323, 2005

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0017】

本発明はRANKLを用いた感染症、アレルギー、自己免疫疾患などの炎症性疾患による症状の予防又は治療の方法及び予防又は治療用組成物の提供を目的とする。特に、これらの炎症性疾患による致死の予防及び治療を目的とする。また、本発明は炎症性疾患における炎症の度合いや致死などのリスクの予測を調べるマーカーとして血液中、滑液中など体内に存在する膜型及び可溶型RANKL及びOPGの濃度などを測定する方法並びに試薬の提供を目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

#### 【0018】

上記のように、骨代謝におけるRANKLの役割は知られていたが、自然免疫系における機能は明らかになっておらず、血中に存在するRANKLの生物学的な意味もはっきりしていなかった。

#### 【0019】

本発明者らは、RANKLが自然免疫系に関与し、自然免疫を制御している可能性を考え、可溶型RANKLのマクロファージに対する作用について検討を行った。その結果、感染による炎症性サイトカイン産生が種々のマクロファージにおいて可溶型RANKLの効果で抑制されていることを見出した。また、血中可溶型RANKL濃度は感染後数時間の間に速やかに低下し、一方、OPG濃度は上昇することから、可溶型RANKL若しくはOPG単独で、又は可溶型RANKLとOPGを組み合わせることにより鋭敏な感染の新規マーカーとなり得ることを見出した。また、薬剤による敗血症ショックの予防が可溶型RANKLの投与により可能になること、可溶型RANKLを炎症予防剤、又は抗炎症剤として用い得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

#### 【0020】

すなわち、本発明は以下の通りである。

#### 【0021】

[1] 生体試料中のRANKL及び/又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法

50

。

【0022】

[2] 生体試料中のRANKLをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の可溶性RANKL濃度が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、[1]の炎症性疾患を検出する方法。

【0023】

[3] 生体試料中のOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中のOPG濃度が正常人に比べて上昇した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、[1]の炎症性疾患を検出する方法。

【0024】

[4] 生体試料中のRANKL及びOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の可溶性RANKL/OPG濃度比が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、[1]の炎症性疾患を検出する方法。

【0025】

[5] 生体試料中のRANKLをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の細胞上に存在する膜型RANKLをフローサイトメトリー法により測定することを含み、[1]の炎症性疾患を検出する方法。

【0026】

[6] 生体試料中のRANKL及びOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出する方法であって、生体試料中の細胞上に存在する膜型RANKLをフローサイトメトリー法により測定し、膜型RANKL測定量/OPG濃度比が正常人に比べて低下した場合に、炎症性疾患に罹患していると判定する、[1]の炎症性疾患を検出する方法。

【0027】

[7] 生体試料中の細胞が末梢血細胞である[5]又は[6]の炎症性疾患を検出する方法。

【0028】

[8] 炎症性疾患が、感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である[1]~[7]のいずれかの炎症性疾患を検出する方法。

【0029】

[9] 炎症性疾患が、敗血症である[8]の炎症性疾患を検出する方法。

【0030】

[10] 抗RANKL抗体及び/又は抗OPG抗体を含む、RANKL及び/又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出するための検出試薬。

【0031】

[11] 抗RANKL抗体及び抗OPG抗体を含む、RANKL及び/又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出するための検出試薬。

【0032】

[12] 炎症性疾患が、感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である[10]又は[11]に記載の炎症性疾患を検出するための検出試薬。

【0033】

[13] 炎症性疾患が、敗血症である[12]の炎症性疾患を検出するための検出試薬。

【0034】

[14] RANKL及び/又はM-CSFを有効成分として含む、炎症性疾患の予防または治療用組成物。

【0035】

[15] RANKL及びM-CSFを有効成分として含む、[14]の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【0036】

[16] 炎症性疾患の予防又は治療用組成物が配合剤である、[15]の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【0037】

10

20

30

40

50

[17] 炎症性疾患の予防又は治療用組成物がRANKLを含む薬剤とM-CSFを含む薬剤とからなるキットである、[15]の炎症性疾患の予防または治療用組成物。

【0038】

[18] RANKL及び/又はM-CSFが手術の前に投与されることを特徴とし、手術後の炎症性疾患を予防する、[15]~[17]のいずれかの炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【0039】

[19] 炎症性疾患が感染症、アレルギー性疾患又は自己免疫疾患である[15]~[18]のいずれかの炎症性疾患の予防又は治療用組成物。

【0040】

[20] 炎症性疾患が、敗血症である[19]の炎症性疾患の予防又は治療用組成物。 10

【0041】

[21] RANKL及び/又はM-CSFを有効成分として含む、免疫抑制剤。

【0042】

[22] RANKL及びM-CSFを有効成分として含む、[21]の免疫抑制剤。

【0043】

[23] 免疫抑制剤が配合剤である、[22]の免疫抑制剤。

【0044】

[24] 免疫抑制剤がRANKLを含む薬剤とM-CSFを含む薬剤とからなるキットである、[23]の免疫抑制剤。

【発明の効果】 20

【0045】

感染症等の炎症性疾患に罹患した場合、RANKLの発現が低下し、かつOPGの発現が亢進する。従って、RANKL又はOPGの量を測定することにより炎症性疾患の検出・診断を行うことができる。特にRANKL/OPG量比を指標にした場合に、高精度で検出・診断を行うことができる。

【0046】

さらに、RANKL及び/又はM-CSFは種々のマクロファージに対して炎症性サイトカインの産生を抑制する作用を有する。また、RANKL及び/又はM-CSFは炎症性疾患を予防又は治療することができる。

【図面の簡単な説明】 30

【0047】

【図1】可溶性RANKLによるサイトカイン産生誘導の欠如を示す図である。

【図2】マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスを炎症性サイトカイン濃度により示す図である。

【図3】マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスを炎症性サイトカインのmRNAレベルにより示す図である。

【図4】マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスを可溶性RANKLで一定時間前処理した後、LPSで刺激した場合の産生TNF- $\alpha$ 濃度により示す図である。

【図5】マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスを、腹腔マクロファージ(PMs)とM-CSF依存性脾臓由来マクロファージ(MDSMs)を可溶性RANKLで一定時間前処理した後、LPS 40  
で刺激した場合の産生TNF- $\alpha$ 濃度により示す図である。

【図6】様々な刺激に対するRANKL誘導性トレランスを示す図である。

【図7】RANKL誘導性トレランスの可逆性を示す図である。

【図8】GM-CSFによるRANKL誘導性トレランスの緩和を示す図である。

【図9】LPS注入に対する血清中の可溶性RANKLとOPGの濃度の変化を示す図である。

【図10】サルモネラ感染に対する血清中の可溶性RANKLとOPGの濃度の変化を示す図である。

【図11】野生型マウスとRANKL欠損マウス(Tnfsf11<sup>-/-</sup>)における血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度を示す図である。

【図12】腹腔内にLPSを注入した野生型マウスとRANKL欠損マウス(Tnfsf11<sup>-/-</sup>)の血清中 50

サイトカイン濃度を示す図である。

【図13】野生型マウスとOPG欠損マウス(Tnfrsf11b<sup>-/-</sup>)における血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度を示す図である。

【図14】腹腔内にLPSを注入した野生型マウスとOPG欠損マウス(Tnfrsf11b<sup>-/-</sup>)の血清中サイトカイン濃度を示す図である。

【図15】高濃度のLPSを野生型マウス(n=10)とTnfrsf11b<sup>-/-</sup>マウス(n=5)に腹腔内注入した後の生存曲線を示す図である。

【図16】マクロファージの可溶性RANKL処理によりTLR4の発現が抑制されることを示す図である。

【図17】可溶性RANKLによる抗原提示の抑制を示す図である。 10

【図18】RANKLトランスがc-Fos非依存性であることを示す図である。

【図19】ヒト型RANKL残基140~317をコードするcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す図である。

【図20】RANKL遺伝子を含むベクターの制限酵素地図を示す図である。

【図21A】RANKL遺伝子を含むベクターの塩基配列を示す図である(その1)。

【図21B】RANKL遺伝子を含むベクターの塩基配列を示す図である(その2、図21Aの続き)。

【図22】GST-RANKLベクターの作製方法を示す図である。

【図23】GST-RANKLとM-CSFを投与したマウスにLPSを投与した場合の生存率を示す図である。 20

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

RANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) は、TNFスーパーファミリーのメンバーであるRANK (NF- $\kappa$ Bの受容体アクティベーター) のリガンドであり、細胞内ドメイン (RANKのN末端から第1番目から48番目のアミノ酸からなるドメイン)、膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを有する2型貫通タンパク質である (特表2002-509430号公報、国際公開第W098/46644号パンフレット)。細胞外ドメイン中、N末端から第152番目以降のアミノ酸からなるドメインは、TNFリガンドファミリー相同性ドメインである。

【0049】

OPG(osteoprotegerin)は、RANKと類似した構造を有し、RANKLに結合し得る。 30

【0050】

被験体が炎症性疾患に罹患すると、RANKLの発現が低下し、OPGの発現が亢進し、血液中の可溶性RANKL濃度が低下し、OPG濃度が上昇する。

【0051】

本発明の方法は、被験体から採取した生体試料中のRANKL及び/又はOPGを測定し、RANKL及び/又はOPGをマーカーとして用いて炎症性疾患を検出する方法である。本発明の方法において測定するRANKLは、血液等の体液である生体試料中に分泌される可溶性RANKL(sRANKL)及び末梢血中などの細胞上に存在する膜型RANKLである。

【0052】

生体試料としては、血液、血漿、血清、涙、尿、羊水、滑膜液、髄液、細胞抽出液、組織抽出液、細胞、組織などの生体試料が挙げられる。炎症性疾患は全身にその影響が発現する場合が多いので、上記生体試料のなかでも血液、血漿、血清が好ましい。 40

【0053】

本発明の方法において、炎症性疾患とは、炎症症状を呈する疾患の総称であり、感染症、アレルギー疾患、自己免疫疾患等が含まれる。例えば、重症の外傷、熱傷、手術侵襲、急性膵炎、腹膜炎、悪性腫瘍、急性腹症 (急激な腹痛を主症状とする腹部疾患にして、早急に手術を行う必要がある疾患)、感染症 (特に、セラチア、緑膿菌、アシネトバクター、サイトロバクター、エンテロバクター等のグラム陰性菌による院内感染症)、敗血症などのICUでの治療を必要とする重症急性疾患 (いわゆるSIRS) などが挙げられる。また、接触過敏症、アレルギー性鼻炎、食物アレルギー、喘息等のアレルギー疾患も対象となる 50

。また、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、光過敏性皮膚炎、手と足の慢性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、全身性剥脱性皮膚炎、うっ血性皮膚炎、局所性擦過皮膚炎、薬物性皮膚炎又は乾癬等の炎症性皮膚疾患も含む。さらに、関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎、自己免疫性血管炎、混合性結合組織病、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、ヒトアジュバント病などの自己免疫疾患も対象となる。

#### 【0054】

本発明の方法により、被験体が上記の炎症性疾患に罹患しているか否かを検出・診断することができる。また、上記の炎症性疾患の重症度を評価・判定することができる。特に、敗血症の重症度を評価・判定することができる。

#### 【0055】

RANKL及び／又はOPGを測定する方法は限定されず、例えばウエスタンブロッティング、EIA、RIA、凝集法、イムノクロマトグラフィー、フローサイトメトリー法等の抗RANKL抗体及び／又は抗OPG抗体を用いた免疫測定法により測定することができる。末梢血等の細胞上の膜結合型RANKLを測定する場合は、フローサイトメトリー法により、細胞上の結合RANKLレベル（RANKL量）を測定すればよい。フローサイトメトリーによる測定は、市販のFACS等のフローサイトメーターを用いて行うことができる。抗RANKL抗体及び／又は抗OPG抗体は公知の方法で作製することができる。抗体を用いて測定を行う場合は、用いる抗体を適宜アルカリフォスファターゼ等の酵素や蛍光色素で標識すればよい。なお、本発明においては可溶性RANKL及び膜型RANKLの細胞外ドメインが測定対象となるので、抗RANKL抗体も可溶性RANKL及び膜型RANKLの細胞外ドメインを認識し、結合する抗体が好ましい。可溶性RANKLは、細胞内ドメインを含まないので、本発明の方法で用いる抗RANKL抗体は、RANKLの細胞内ドメイン以外の細胞外ドメイン、好ましくはTNFリガンドファミリー相同性ドメインに存在するエピトープを認識し得る抗体である。また、市販の抗体を用いることもできる。また、RANKL及び／又はOPGのmRNAを検出して、RANKL及び／又はOPGの発現を検出してもよい。mRNAは、ノーザンブロッティング、RT-PCR法、DNAチップ（DNAマイクロアレイ）を利用した方法等により検出することができる。この際、RANKL及び／又はOPGをコードするmRNAを特異的に測定するために、RANKL及び／又はOPGをコードするmRNAの部分配列に相補的な部分配列からなるプローブ又はプライマーを用いる。RANKL及びOPGの塩基配列は公知であり、公知の塩基配列情報に基づいて、プローブ又はプライマーを設計することができる。該プライマー又はプローブの塩基の数は5～50、好ましくは10～30、さらに好ましくは15～25である。これらの方法は公知の方法で行うことができる。

#### 【0056】

被験体から採取した試料中のRANKL濃度又は量が正常人のRANKL濃度又は量に比べ有意に低い場合に、又はOPG濃度が正常人のOPG濃度に比べ有意に高い場合に、該被験体は炎症性疾患に罹患していると診断することができる。また、RANKL濃度又は量が低いほど、又はOPG濃度が高いほど、敗血症等の炎症性疾患が重症であると評価判定することができる。

#### 【0057】

また、被験体から採取した試料中の可溶性RANKLとOPGの濃度の比（可溶性RANKL濃度/OPG濃度）が正常人の比より低い場合、該被験体は炎症性疾患に罹患していると診断することができる。また、可溶性RANKLとOPGの濃度の比が小さいほど、敗血症等の炎症性疾患が重症であると評価判定することができる。

#### 【0058】

RANKL及び／又はOPGは炎症性疾患に罹患後、数時間内に発現が変化し得るので、本発明の方法によれば、炎症性疾患の初期段階で疾患の検出を行うことができる。また、時間において複数回RANKL及び／又はOPGを測定することにより、より正確に検出することが可能になる。

#### 【0059】

本発明は、RANKL及び／又はOPGをマーカーとして用い炎症性疾患を検出するための試薬又はキットを包含し、該試薬又はキットは、抗RANKL抗体及び／又は抗OPG抗体を含む。ELISA等で可溶性RANKLおよびOPGを測定する場合、抗体はアルカリフォスファターゼ、西洋

10

20

30

40

50

わさびペルオキシダーゼ等の酵素で標識すればよい。また、フローサイトメトリー法で膜結合型RANKLを測定する場合、RANKLに対する抗体は蛍光色素で標識すればよい。

【0060】

本発明は、さらにRANKL及び／又はOPGからなる炎症性疾患検出のためのマーカーを包含し、さらに炎症性疾患検出のためのRANKL及び／又はOPGのマーカーとしての使用を包含する。

【0061】

本発明は、さらにRANKL及び／又はM-CSFを有効成分として含む炎症性疾患の治療又は予防用組成物（抗炎症剤）又は免疫抑制剤を包含する。RANKLを単独で、又はRANKL及びM-CSFを組合せて被験体に投与した場合、被験体においてマクロファージによる炎症性サイトカインの産生が抑制され、TLR4レベルが抑制され、また被験体の抗原提示細胞における抗原提示能が抑制される。このことより、RANKL及びM-CSFは、単独で又は組合せて、炎症性疾患の治療又は予防に用いることができ、また被験体の免疫能を抑制することができる。なお、RANKLによるマクロファージのトランスの惹起（RANKLトランス）は破骨細胞分化に必要なc-Fos非依存的であることから、RANKLのマクロファージに対する効果は、マクロファージが破骨細胞に分化する過程における「脱マクロファージ化現象」とは異なる。

【0062】

本発明の予防又は治療用組成物が対象とする炎症性疾患とは、炎症症状を呈する疾患の総称であり、感染症、アレルギー疾患、自己免疫疾患等が含まれる。例えば、重症の外傷、熱傷、手術侵襲、急性膵炎、腹膜炎、悪性腫瘍、急性腹症（急激な腹痛を主症状とする腹部疾患にして、早急に手術を行う必要がある疾患）、感染症（特に、グラム陰性菌による院内感染症）、敗血症などのICUでの治療を必要とする重症急性疾患（いわゆるSIRS）などが挙げられる。また、接触過敏症、アレルギー性鼻炎、食物アレルギー、喘息等のアレルギー疾患も対象となる。また、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、光過敏性皮膚炎、手と足の慢性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、貨幣状皮膚炎、全身性剥脱性皮膚炎、うっ血性皮膚炎、局所性擦過皮膚炎、薬物性皮膚炎又は乾癬等の炎症性皮膚疾患も含む。さらに、関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎、自己免疫性血管炎、混合性結合組織病、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少性紫斑病、クローン病、ヒトアジュバント病などの自己免疫疾患も対象となる。

【0063】

本発明の治療用組成物又は免疫抑制剤に用い得るRANKLとして、RANKL、可溶性RANKL、可溶性RANKL誘導體、可溶性RANKLアナログ、可溶性RANKL融合タンパク質、又は可溶性RANKL模倣物が挙げられる。ヒト由来のRANKLの全長塩基配列及びアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1及び2に示す。可溶性RANKL誘導體又は可溶性RANKLアナログは、RANKLのトランケート体等、RANKLのアミノ酸配列の一部配列からなるタンパク質であって、RANKLの活性を有するタンパク質を含む。可溶性RANKL誘導體は、好ましくは配列番号2のアミノ酸配列において、第152番目のアミノ酸から始まるTNFリガンドファミリー相同ドメインを含む。可溶性RANKL誘導體として、例えば、第127番目のアミノ酸から第317番目のアミノ酸配列からなるタンパク質、第140番目のアミノ酸から第317番目のアミノ酸配列からなるタンパク質、又は第159番目のアミノ酸から第317番目のアミノ酸配列からなるタンパク質等が挙げられる。さらに、可溶性RANKL誘導體又は可溶性RANKLアナログは、配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRANKLの活性を有するタンパク質、あるいは上記のRANKLのアミノ酸配列の部分配列からなるタンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつRANKLの活性を有するタンパク質を含む。ここで、1又は数個とは1～9個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1若しくは2個である。可溶性RANKL融合タンパク質とは、可溶性RANKLタンパク質、可溶性RANKL誘導體又は可溶性RANKLアナログに他のタンパク質が融合した融合タンパク質をいう。他のタンパク質としては例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）が挙げられる。配列番号3及び4に、RANKLのアミノ酸配列中第127番目のアミノ酸から第31

7番目のアミノ酸配列からなるタンパク質にGSTが融合したタンパク質をコードするDNAの塩基配列及び該タンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号5及び6に、RANKLのアミノ酸配列中第140番目のアミノ酸から第317番目のアミノ酸配列からなるタンパク質にGSTが融合したタンパク質をコードするDNAの塩基配列及び該タンパク質のアミノ酸配列を示す。また、配列番号7及び8に、RANKLのアミノ酸配列中第159番目のアミノ酸から第317番目のアミノ酸配列からなるタンパク質にGSTが融合したタンパク質をコードするDNAの塩基配列及び該タンパク質のアミノ酸配列を示す。可溶性RANKL模倣物は、RANKLの立体構造に類似した構造を有する化合物であって、RANKLの活性を有する化合物をいう。RANKL、可溶性RANKL、可溶性RANKL誘導体、可溶性RANKLアナログ及び可溶性RANKL融合タンパク質は遺伝子工学的手法により組換えタンパク質として作製することができる。

10

## 【0064】

本発明の予防若しくは治療用組成物又は免疫抑制剤に用いるM-CSFとして、RANKLと同様に、M-CSF、M-CSF誘導体、M-CSFアナログ、M-CSF融合タンパク質、又はM-CSF模倣物が挙げられる。M-CSF、M-CSF誘導体、M-CSFアナログ及びM-CSF融合タンパク質は、遺伝子工学的手法により組換えタンパク質として作製することができる。また、市販のM-CSF製剤を用いることもできる。このようなM-CSFとして、例えばロイコプロール（登録商標、一般名：ミリモスチム）等が挙げられる。

## 【0065】

炎症性疾患の予防若しくは治療又は免疫抑制のためには、RANKLを単独で被験体に投与してもよいし、M-CSFを単独で投与してもよい。好ましくは、RANKLとM-CSFの両方を投与する。両方を投与する場合、両者を混合物、すなわち配合剤として同時に投与することができる。また、RANKLを含む組成物とM-CSFを含む組成物を別々に製剤化し、用時に両方の製剤を混合して投与することもできる。さらに、それぞれの製剤を別々に順に投与してもよい。好ましくは、RANKL及びM-CSFを同時に投与する。本発明の予防若しくは治療用組成物又は免疫抑制剤はRANKL及びM-CSFを別々に投与するための、RANKLを含む薬剤とM-CSFを含む薬剤とからなるキットでもある。

20

## 【0066】

また、本発明の炎症性疾患の予防又は治療用組成物は、治療用として用いる場合には、炎症性疾患に罹患している患者に投与すればよい。また、予防用として用いる場合には、炎症性疾患に罹患するおそれのある患者に投与すればよい。例えば、重症感染症に罹患し、敗血症やSIRSのおそれのある患者に投与すればよい。また、手術後の感染を予防するために、侵襲的な手術前に本発明の組成物を前投与してもよい。本発明の、RANKL及び／又はM-CSFを有効成分として含む免疫抑制剤は、組織や臓器を患者に移植する際に、患者に投与すればよい。本発明の免疫抑制剤は、細胞あるいは臓器・組織移植に伴う移植片拒絶、移植片対宿主病を抑制することができる。

30

## 【0067】

本発明の炎症性疾患の予防若しくは治療用組成物又は免疫抑制剤は、種々の形態で投与することができる。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬、スプレー剤、点眼剤、経鼻投与剤、貼付剤などによる非経口投与を挙げることができる。

40

## 【0068】

本発明の炎症性疾患の予防若しくは治療用組成物又は免疫抑制剤は、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用してもよい。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。

## 【0069】

投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、経口投与では、1日約0.001mg～10

50

00mgであり、1回又は数回に分けて投与すればよい。また、非経口投与では、1回あたり、0.001mg~1000mgを静脈注射、腹腔内注射、皮下注射、筋肉注射、座薬、点眼などによって投与すればよい。RANKLとM-CSFを併用する場合、その投与量の比に限定はなく、同量を投与してもよいし、可溶性RANKL又はM-CSFを多く投与してもよい。

#### 【0070】

本発明はさらに、可溶性RANKL及び/又はM-CSFを予防又は治療を必要とする患者に投与することを含む、感染症疾患の予防若しくは治療方法、又は免疫抑制方法を包含する。

#### 【0071】

本発明はさらに、可溶性RANKL及び/又はM-CSFの感染症疾患の予防若しくは治療用組成物の製造への使用、又は免疫抑制剤の製造への使用をも包含する。

10

#### 【0072】

本発明はさらに、感染症疾患の治療のために用いられる可溶性RANKL及び/若しくはM-CSF、又は免疫抑制のために用いられる可溶性RANKL及び/若しくはM-CSFを包含する。

#### 【実施例】

#### 【0073】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【0074】

本実施例において以下の材料と方法を用いた。

#### 【0075】

20

マウス

6~10週齢のC57BL/6Jマウスはオリエンタル酵母工業より購入した。C57BL/6JバックグラウンドのOPGホモ欠損マウスとコントロールのヘテロマウスは日本クレアより購入した。C57BL/6JバックグラウンドのRANKL欠損マウス、TLR4欠損マウスは病原性微生物を除去した(SPF)環境下で繁殖・飼育した。RANKL欠損マウスには粉エサを与えた。全ての実験は慶應義塾大学医学部若しくはオリエンタル酵母工業の動物実験ガイドラインに従って行った。

#### 【0076】

M-CSF依存性マクロファージ

M-CSF依存性骨髄由来マクロファージ(MDBMs)を作るために、まず大腿骨と脛骨を10%ウシ胎児血清(FCS)と抗生物質の入ったダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で洗浄し、骨髄細胞を採取した。セルストレーナーにかけた後、骨髄細胞を一晩培養してから非接着細胞を回収した。回収した非接着細胞は10ng/ml M-CSF存在下で3~4日培養し、ウェルに接着した細胞をセルスクレーパーで採集、M-CSF依存性骨髄由来マクロファージとして24穴プレート(ファルコン)に $1 \times 10^5$ /ウェルの密度でまいた。M-CSF依存性脾臓由来マクロファージ(MDSMs)は脾臓細胞より上記と同様の方法で作った。全てのマクロファージは全実験中を通して10ng/ml M-CSF存在下で培養した。

30

#### 【0077】

腹腔マクロファージ

腹腔細胞は完全培地(10% FCSと抗生物質の入ったDMEM)で腹腔を洗浄することで採取した。採集された細胞は24穴プレート(ファルコン)に $1 \times 10^5$ /ウェルの密度でまいた。6時間の培養の後、非接着細胞を除くためにPBS洗浄を行い、新しい培地に交換した。こうして得られた接着細胞を腹腔マクロファージとして使用した。

40

#### 【0078】

in vitro トレランス実験

マクロファージの前処理は異なる濃度の可溶性RANKL(<0.10エンドトキシン単位/mg, R&D)又はLPS(リポ多糖やエンドトキシンとも呼ばれる、本実施例で使用したのはS.Minnesota Re595, Sigma)で所定の時間行った。培養細胞はその後リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で二度洗浄し、LPS、Salmonella muenchen由来のflagellin(Calbiochem)、CpGオリゴヌクレオチド(5' -TCCATgACgTTCCTgATgCT-3' ; 配列番号12)、コントロールGpCオリゴヌクレオ

50

チド(5' -TCCATgAgCTTCCTgATgCT-3'、Proligo; 配列番号13)で本文中に記載されているように刺激した。いくつかの実験においては、500U/ml GM-CSF(Pepro Tec)をLPSで刺激する3時間前に加えた。

【0079】

マウスへのLPS投与

LPS(*S. Minnesota* Re595, Sigma)は腹腔へ投与した。図23の実施例ではLPS(*E. coli* O55:B5, Sigma)を用いた。血液は心臓採血によって一定時間後採集し、凝固のため一時間放置後15000rpm、24°Cで20分遠心した。血清はサイトカイン定量まで-80°Cで保管した。

【0080】

使用細菌の系統と感染実験

感染実験のために、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium  $\chi$  3306株(以下サルモネラ)を一晩Luria-Bartani培地(LB培地)で静置培養したものを希釈して振とうした後、対数増殖期にある菌を遠心することで回収した。サルモネラはPBSで洗浄した後Hanks塩類液で希釈し、多重感染度(MOI)10でマクロファージに感染させた。37°Cで1時間培養してからマクロファージをPBSで洗浄し、細胞外のサルモネラを除去した後、25 $\mu$ g/mlのゲンタマイシンを含む完全培地で培養した。3時間後、培養上清をサイトカイン定量のために回収した。サルモネラの経口感染の際には、感染12時間前からマウスにエサと水は与えず、その後 $3.3 \times 10^7$  CFU/g体重のサルモネラを経口投与した。血液は4日後に心臓採血にて回収した。

10

【0081】

酵素免疫測定法(ELISA法)

TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12(p40)のマクロファージ培養上清中濃度はELISAセット(BD PharMingen)を用いて定量した。マウス血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度はELISAキット(R&D)を用いて定量した。

20

【0082】

PT-PCRによる解析

mRNAはマクロファージを回収しIsogen(Nippon gene)中で均質化し調製した。cDNAはEnhanced Avian HS RT-PCR kit(Sigma-Aldrich)を用いて合成した。定量PCRはABI PRISM 7000装置TaqMan Assay-on-demand(Applied Biosystems)のIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-12(p40)、Gapdhプライマーを使って行った。

30

【0083】

統計処理

データは平均±標準偏差で表現した。図23に結果を示す実施例を除く全てのデータはStudent's t-testを用いて有意差検定を行った。図23に結果を示す実施例のみgeneralized Wilcoxon testを用いて有意差検定を行った。

【0084】

以下の結果が得られた。

【0085】

(1) 菌体構成成分によるマクロファージ刺激に対するRANKLによるトレランスの惹起  
まず可溶性RANKLあるいはLPSでM-CSF依存性骨髄由来マクロファージ(MDBMs)を刺激して炎症性サイトカイン産生を定量した(図1A~C)。図1A~Cは、可溶性RANKLによるサイトカイン産生誘導の欠如を示す。MDBMsを図中に示した濃度のLPS又は可溶性RANKLで24時間刺激した。培養上清中の炎症性サイトカインのタンパク濃度はELISA法によって定量した。図中のバーは平均±標準偏差を示す(n=3、培養ウェル)。図1A~Cに示すように、LPSが有意にTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 p40といったサイトカインの産生を誘導するのに対し、可溶性RANKLは100ng/mlという高濃度であってもサイトカイン産生は検出されないことが明らかとなった。それゆえ、LPSとは異なり可溶性RANKLは炎症性サイトカインを誘導しない。

40

【0086】

次にMDBMsを段階的に濃度を上昇させた可溶性RANKLで24時間前処理し、その後LPSで6時間刺激した。上清中のTNF- $\alpha$ 、IL-6及びIL-12(p40)の濃度はELISA法によって定量した

50

。その結果、可溶性RANKLの前処理は、続くLPS刺激によるこれらサイトカインの産生を可溶性RANKL濃度依存的に抑制することが明らかとなった(図2A~C)。図2A~Cは、各炎症性サイトカインのタンパク濃度を示し、マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスが惹起されたことを示す。MDBMsは可溶性RANKLで24時間前処理し(1°)、その後100ng/mlのLPSで6時間刺激した(2°)。図2A~Cに示すように、こうした誘導性トレランスは可溶性RANKLが1ng/mlという低濃度の時にも観察された。

#### 【0087】

またLPS刺激後から6時間までのTNF- $\alpha$ 、IL-6及びIL-12(p40)のmRNAレベルも経時的に定量した。可溶性RANKL前処理をしないマクロファージと比較して、可溶性RANKL前処理をしたマクロファージでは、LPS刺激に対するこれらサイトカインmRNAの誘導は有意に抑制 10  
されていた(図3A~C)。図3A~Cは、各炎症性サイトカインのmRNAレベルを示し、マクロファージにおけるRANKL誘導性トレランスが惹起されたことを示す。MDBMsは培地単独(白ダイヤモンド)又は10ng/mlの可溶性RANKL(黒ダイヤモンド)で24時間前処理し、その後100ng/mlのLPSで6時間刺激した。細胞は図中に記載の各時間に回収し、サイトカインmRNAレベルを定量PCRによって測定した。値はGapdhで標準化した。

#### 【0088】

次に、可溶性RANKL前処理の時間を24時間、12時間、6時間と短縮した。MDBMsを1ng/mlの可溶性RANKLで図4中に記載の時間だけ前処理し(1°)、その後LPSで刺激した(2°)。その結果、前処理が6時間という短時間でも有意にLPS刺激によるTNF- $\alpha$ 産生誘導が抑制されることが明らかとなった(図4)。 20

#### 【0089】

RANKL誘導性トレランスがMDBMs以外のマクロファージでも生じるかどうかを検討するために、次に腹腔マクロファージ(PMs)、M-CSF依存性脾臓由来マクロファージ(MDSMs)を利用して実験を行った。腹腔マクロファージ(PMs)とM-CSF依存性脾臓由来マクロファージ(MDSMs)を50ng/mlの可溶性RANKLで24時間前処理し(1°)、その後LPSで刺激した(2°)。その結果、これらのマクロファージにおいてもLPS刺激に対するTNF- $\alpha$ の産生誘導は可溶性RANKLの前処理によって抑制された(図5)。

#### 【0090】

最後に、MDBMsを可溶性RANKLで24時間前処理後にflagellin、CpGオリゴヌクレオチド、サルモネラで刺激した。MDBMsを10ng/mlの可溶性RANKLで24時間前処理し(1°)、その後 30  
 $1 \times 10^{11}$  Mのflagellinか3nMのCpG DNAで6時間、あるいはサルモネラで3時間刺激した(2°)。培養上清中のサイトカインはELISA法で定量した。その結果可溶性RANKLの前処理はこうした細菌菌体成分やサルモネラ刺激に対するTNF- $\alpha$ の産生誘導を抑制することが明らかとなった(図6A~C)。図中のバーは平均±標準偏差を示す(n=3、培養ウェル)。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01白柱との比較を示す。これらの結果は可溶性RANKLがLPSや他の細菌菌体成分に対するマクロファージの応答性を低下させることを意味している。

#### 【0091】

(2) 可溶性RANKL除去及びGM-CSF処理によるRANKL誘導性トレランスの緩和

RANKL誘導性トレランスが可逆的かどうかを調べるために、MDBMsを可溶性RANKLで24時間処理した後に可溶性RANKLの入っていない培地でさらに24時間培養した。MDBMsを培地単 40  
独(Med)又は10ng/mlの可溶性RANKLで24時間処理し(Day 1)、続いて培地単独(Med)又は10ng/mlの可溶性RANKLでさらに24時間処理(Day 2)した後、100ng/mlのLPSで6時間刺激した。培養上清(n=3)はELISA法によるサイトカイン濃度測定のために回収した。対照群と比較して、TNF- $\alpha$ 、IL-6及びIL-12(p40)の産生は十分に、或いは少なくとも部分的に回復しており、RANKL誘導性トレランスは可逆的であることが示された(図7A~C)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.01黒柱との比較を示す。

#### 【0092】

GM-CSFはRANKL/RANKのシグナリングを阻害することが知られているため、次にGM-CSFのRANKL誘導性トレランスに与える影響を調べた。MDSMsを可溶性RANKLで24時間前処理したあと、可溶性RANKLを含まないGM-CSF入り培地で3時間処理した。その後細胞をLPSで刺激 50

し、TNF- $\alpha$ 濃度を定量した。具体的には、MDBMsを10ng/mlの可溶性RANKLで24時間処理し(1°)、その後500U/mlのGM-CSFで3時間刺激(2°)した後、100ng/mlのLPSで6時間刺激した(3°)。結果を図8に示す。培養上清中のTNF- $\alpha$ 濃度(n=3)はELISA法で定量した。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.01。データは3回の実験のうち代表的なものを示した。図8に示すように、GM-CSF自体はTNF- $\alpha$ の産生を誘導しないにもかかわらず、短時間のGM-CSFの処理は可溶性RANKL前処理マクロファージのTNF- $\alpha$ 産生を顕著に上昇させた。こうした結果は、GM-CSFがRANKL誘導性トレランスを緩和させることを意味している(図8)。以上より、本実施例は可溶性RANKL除去と同様、GM-CSFによる短時間処理がLPSに対するマクロファージの応答性を回復させることが判明した。

【0093】

10

(3) 血清中可溶性RANKL及びOPGレベルのLPS投与や細菌感染による動的変動

血清中の生理的及び病理的な可溶性RANKL濃度を比較するために、LPSをマウス腹腔内に注入して血清中の可溶性RANKLとOPG濃度を定量した。C57BL/6J mice (n=24)の腹腔にLPSを注入した(1 $\mu$ g/g体重)。血液は図9に記載した時間の後に回収した(n=3 マウス/各点)。血清中の可溶性RANKLとOPGの濃度はELISA法によって定量した。LPS注入前の血清中可溶性RANKL濃度は約150pg/ml、OPG濃度は約2000pg/mlであった。結果を図9A及びBに示す。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01 0hとの比較を示す。驚くべきことに、可溶性RANKL濃度はLPS注入後6時間以降で劇的に低下し、一方OPGの濃度は6時間以降で上昇した。さらに、C57BL/6Jマウス(n=6)に3.3 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/g体重のサルモネラを経口感染させた(感染)。対照マウスにはPBSを飲ませた(コントロール)。4日後、血液を採集して血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度をELISA法で測定した。結果を図10A及びBに示す。図に示すように、血清中可溶性RANKLの低下とOPGの上昇はサルモネラ経口感染後4日目にも観察された。図中のバーは平均±標準偏差を示す(n=3)。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01。これらの結果は、血清中の可溶性RANKL及びOPGレベルがLPSや細菌感染に対して動的に制御されていることを示している。

20

【0094】

(4) RANKL欠損マウスとOPG欠損マウスにおける異常なサイトカイン産生

生理的な血清中における可溶性RANKLの、LPS誘導性サイトカイン産生に対する影響をみるために、RANKLを欠損したTnfsf11<sup>-/-</sup>マウスを解析した。図11A及びBに、野生型マウスとRANKL欠損マウス(Tnfsf11<sup>-/-</sup>)における血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度をELISA法で測定した結果を示す(n=4、各遺伝子型)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01対照との比較を示す。予想された通り、血清中の可溶性RANKLはこのマウスでは検出できなかったが、OPGは野生型マウスと比べてやや高かった。

30

【0095】

さらに、腹腔内にLPS(2 $\mu$ g/g体重)を注入し、90分後の野生型マウスとTnfrsf11<sup>-/-</sup>マウスの血液を採取した。血清中サイトカインはELISA法で定量した。LPS注入後、TNF- $\alpha$ とIL-6の産生がTnfsf11<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に亢進していることが判明した(図12A~C)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01対照との比較を示す。これらの結果は、Tnfsf11<sup>-/-</sup>マウスにおいてはRANKL誘導性トレランスが欠如しており、それゆえ炎症性サイトカイン産生が亢進するであろうという予想と一致している。

40

【0096】

さらにRANKL誘導性トレランスのマウスにおける役割を調べるために、OPGを欠損したTnfrsf11b<sup>-/-</sup>マウスを解析した。図13A及びBに、野生型マウスとOPG欠損マウス(Tnfrsf11b<sup>-/-</sup>)における血清中の可溶性RANKL及びOPGの濃度をELISAで測定した結果を示す(n=5、各遺伝子型)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01対照との比較を示す。対照のOPGヘテロ欠損マウスと比較して、生理的な血清中可溶性RANKL濃度は約10倍Tnfrsf11b<sup>-/-</sup>マウスにおいて高かった。それゆえ、OPGを欠損したマウスは常に高濃度の可溶性RANKLにさらされているといえる。

【0097】

さらに、腹腔内にLPS(2 $\mu$ g/g体重)を注入し、90分後の野生型マウスとTnfrsf11b<sup>-/-</sup>マウス

50

ウスの血液を採取し、血清中サイトカインをELISA法で定量した。結果を図14A~Cに示す。図中のバーは平均±標準偏差を示す。\*, P<0.05; \*\*, P<0.01対照との比較を示す。LPS注入後IL-6の産生がTnfrsf11b<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に低下することが判明した。こうしたことから、慢性的に高い濃度の可溶性RANKLに暴露されることによりOPG欠損マウスでは炎症性サイトカイン産生が抑制されていることがわかった。

【0098】

(5) RANKL欠損マウスのLPSに対する高い感受性

RANKL欠損マウスにおける異常な炎症性サイトカイン産生の影響を解析するために、我々は高い濃度のLPSを野生型マウスとTnfsf11<sup>-/-</sup>マウスに腹腔内注入して生存率を比較した。高濃度のLPS(130 $\mu$ g/g体重)を生後6週間の野生型マウス(n=10)とTnfsf11<sup>-/-</sup>マウス(n=5)に腹腔内注入した後、生存曲線を描いた。その結果、注入後24時間後には90%の野生型マウス(n=10、白四角)が生存していたのに対して、全てのTnfsf11<sup>-/-</sup>マウス(n=5、黒四角)は24時間以内に死亡した(図15)。Tnfsf11<sup>-/-</sup>マウスはLPSに対して高感受性であった。こうした結果は、生理的な血清中の可溶性RANKLがマウスをエンドトキシンショックから保護する働きがあることを示唆している。

【0099】

(6) 可溶性RANKLによるTLR4の低下

可溶性RANKLで24時間マクロファージを処理すると、TLR4のmRNAレベルは有意に抑制される。可溶性RANKL処理後LPSで刺激し、その際のTLR4 mRNAレベルを経時的に追っても、この傾向は変わらなかった(図16A)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。また、可溶性RANKLで24時間マクロファージを処理すると細胞表面のTLR4-MD2複合体の発現が抑制されることがフローサイトメトリー解析によって明らかとなった(図16B)。TLR4はLPSの受容体であるため、こうしたTLR4の低下がRANKLトレランスのメカニズムの一端を担っていることが示唆された。

【0100】

(7) 可溶性RANKLによる抗原提示の抑制

マクロファージを可溶性RANKLで24時間処理すると、その表面のMHCII, CD80, CD86の発現が有意に低下することがフローサイトメトリー解析によって明らかとなった(図17、実線が可溶性RANKL処理群、破線グレーがコントロール群)。MHCIIは外来抗原をリンパ球に対して提示するための分子であり、その際にCD80、CD86などのco-stimulatory moleculesが不可欠であるとされる。

【0101】

従って、これらの分子の発現が低下することは、可溶性RANKLにマクロファージの抗原提示を抑制する能力があることを示唆している。

【0102】

(8) RANKLトレランスのc-Fos非依存性

破骨細胞分化におけるRANKL/RANKのシグナルが伝わるためには転写因子c-Fosが必要であり、これを欠損するマウスでは破骨細胞ができない。RANKLトレランスが生じるためにc-Fosが必要であるのか否かを調べるためc-Fos欠損マウス由来マクロファージを解析した。c-Fos欠損マウス由来マクロファージを1ng/mlのLPSで24時間前処理した後100ng/mlのLPSで刺激してLPSトレランスを見たところ、野生型と同様に生じることが明らかとなった(図18A及びB)。また、10ng/mlの可溶性RANKLで24時間前処理した後に100ng/mlのLPSで刺激してRANKLトレランスを見たところ、やはり野生型と同様に生じることが明らかとなった(図18C及びD)。図中のバーは平均±標準偏差を示す。こうしたことから、LPSトレランスやRANKLトレランスはc-Fos非依存であると結論できる。すなわち、RANKLトレランスはマクロファージが多核の破骨細胞に分化する過程における、単なる「脱マクロファージ化現象」としてとらえるべきではない。

【0103】

(9) マウス急性毒性試験

マウスは、7~8週齢C57BL/6N(雌)マウスを用いた。

## 【0104】

LPSは、Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma)を用い、10mg当たり滅菌水1.0mlを加えて溶解し用いた。M-CSFは、ロイコプロール（協和発酵工業）を用い、50 $\mu$ g当たりPBS 1.0mlを加えて溶解して用いた。

## 【0105】

## GST-RANKLの作製

ヒト型RANKL残基140~317をコードするcDNAにPCRにてSal I, Not Iサイトを付加し、これらのエンドヌクレアーゼを用いて、pGEX-4T-2 (GE healthcare; Genbank Accession Number U13854) のGlutathione S-transferaseの下流にクローニングした。ヒト型RANKL残基140~317をコードするcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を図19に示す。また、RANKL遺伝子を含むベクターの制限酵素地図を図20に示す。さらに、当該ベクターの塩基配列を図21A及び21Bに示す。図21Bの塩基配列は図21Aの塩基配列の続きである。BL21 (DE3) *Escherichia coli* (invitrogen)におけるIPTG (終濃度: 0.5mM) で媒介されたタンパク質発現の誘導後、菌体を抽出用緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1%(v/v) TritonX-100) にて懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで超音波破碎機を用いて破碎した。18000 $\times$ g, 15minで遠心後、上清を回収しGlutathione Sepharose (登録商標) カラムにかけた。続いて洗浄用緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1%(v/v) TritonX-100) にて洗浄した。その後、Glutathione溶液 (20mM還元型グルタチオン, 50mM Tris-HCl, pH8.0) で溶出した。SDS-PAGEにて精製したGST-RANKLの分子量及び純度を確認し、フィルターを過した。分子量47.0kDa、純度95%以上であった。また、リムルス変形細胞溶解物試験 (limulus amoebocyte lysate assay) によりエンドトキシン濃度を測定し、1EU/ $\mu$ g未満であることを確認した。

## 【0106】

GST-RANKL発現ベクターの作製方法を図22に示す。

## 【0107】

## LPS、RANKL及びM-CSF投与試験

10 $\mu$ g GST-RANKL、2 $\mu$ g M-CSF、2 $\mu$ g M-CSF+10 $\mu$ g GST-RANKL、コントロールとしてPBSをそれぞれC57BL/6Nマウス (各群9~10匹) に腹腔内投与し、24時間後にLPS (2.5mg/匹) を腹腔内投与した。その後の生存を144時間後まで観察した。

## 【0108】

結果を図23に示す。図23に示すように、RANKLとM-CSFを投与した場合に、生存率が有意( $P<0.03$ )に高かった。

## 【0109】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0110】

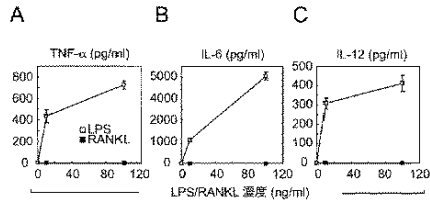
配列番号3および4 : GST-RANKL (aa127-317)

配列番号5および6 : GST-RANKL (aa140-317)

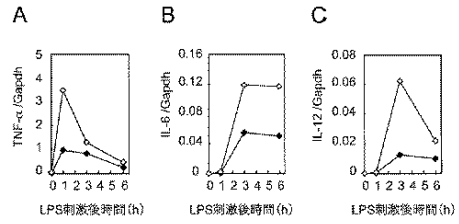
配列番号7および8 : GST-RANKL (aa159-317)

配列番号9~13 : 合成

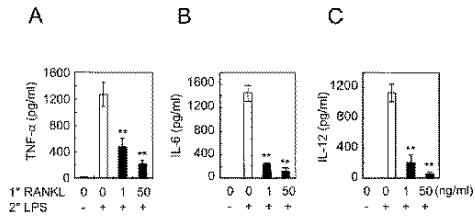
【図 1】



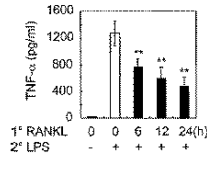
【図 3】



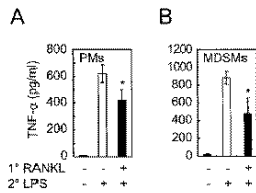
【図 2】



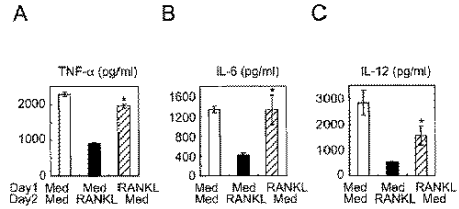
【図 4】



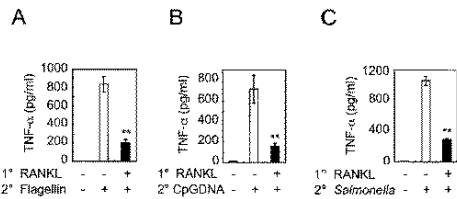
【図 5】



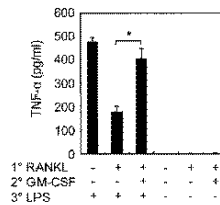
【図 7】



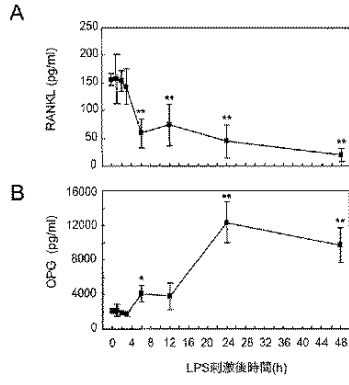
【図 6】



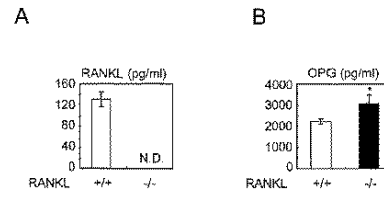
【図 8】



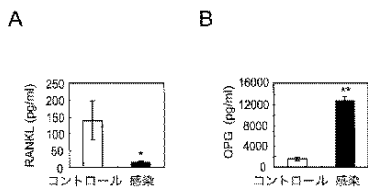
【図 9】



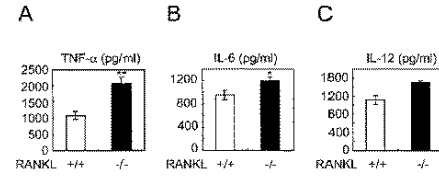
【図 11】



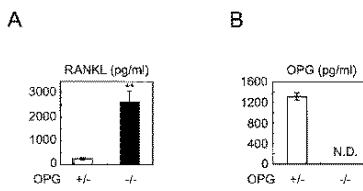
【図 10】



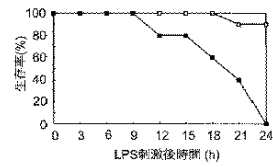
【図 12】



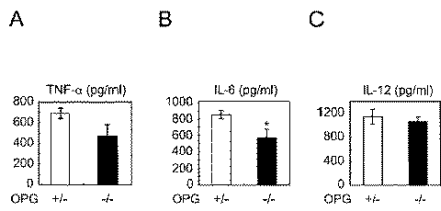
【図 13】



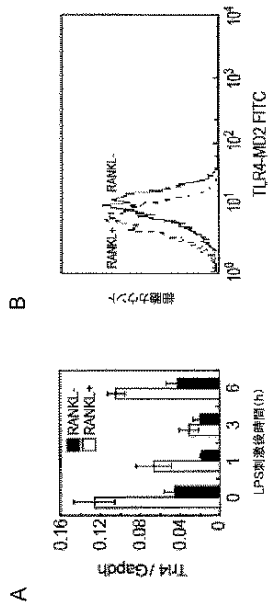
【図 15】



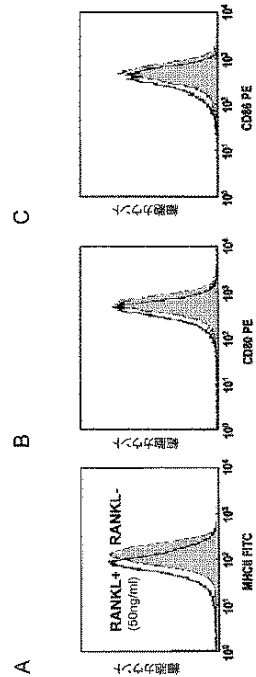
【図 14】



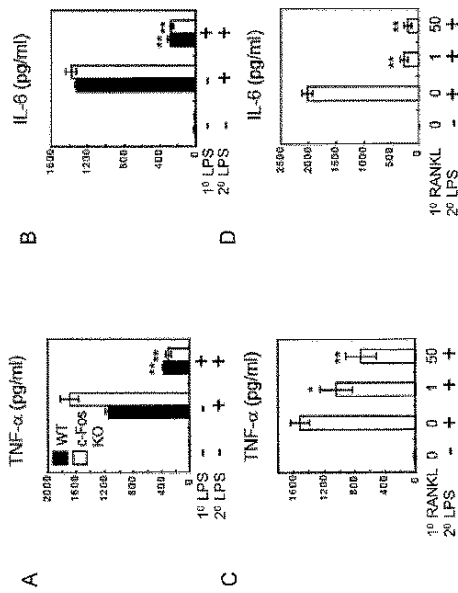
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【図 19】

```

10      20      30      40      50      60
ctcactatcagacgagaaagcagatggtgcatgctcattggttagatctggccagaggagcag
36/1 I R A E K A M Y D G S W L D L A K R S K

70      80      90      100     110     120
CTGAACTCAGCCTTTTGTCTCACTAFTASTGCCAGACATGCCATCTGGTTC
L E A Q P P A H L T I N A 7 D I P S S S

130     140     150     160     170     180
CATAAAGTGTCTGTCTCTTGGTACATGATGGGGTGGGGCCAGGACTCCAGATG
H K V S L S S W Y H D R G W A K I S N M

190     200     210     220     230     240
ACTTTAGCAATCGAAACTAATAGTTAATCAGGATGGCTTTTATTAACCTGATGCCAC
T F S N G K L I V N Q D G F Y Y L Y A N

250     260     270     280     290     300
ATTGCTTTGGACATCATGAAACTTCAGGAGACTAGCTACAGGTATCTCAACTAATG
I C F R H H E F S G D L A T E Y L Q L M

310     320     330     340     350     360
GTGACCTGCTCAAAAGCAGCATCAAAATCCCAAGTTCTCATACCTGATGAAAGGAGG
V Y Y T K Y S I K I P S S H T L W K G G

370     380     390     400     410     420
AGCACCAAGTATGGTCAGGGAATCTGATTCATTTTATTCCTAAGGTTCTGCGA
S T R Y W S G N S E F H F Y S I N V G G

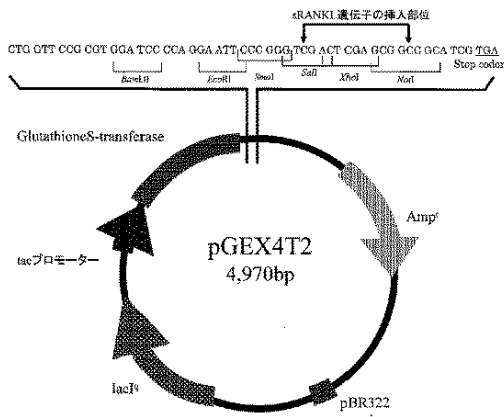
430     440     450     460     470     480
TTTTTAAGTACGGTCTGGAGGGAATCAGCATGAGGTCCTCAAGCCCTCTTACTG
F F K L R S G E E I S I E V S N P S L L

490     500     510     520     530     540
GATCCGATCAGGATGCCAATACITGGGGCTTTTAAAGTTCGAGATATAGATTGAGCC
D P D Q D A I T Y P C A F K V R D I D *

550     560     570     580
CCAGTTTTGGAGTGTATGATTTCCGGATresrescece
AoeI

```

【図 2 0】



【図 2 1 A】

```

1  ACGTATGGA CTGCACGGG CACCAATGCT TCTGGGTCG GCGAGCCATC GGAAGCTGG
61  GTAFGGCTGT SCAGGPGSTA AATCACTGCA TAATGTGRT GCGTAAGGC GCACDCCGT
121 TCTGGATAAT GTTTTGTGEG CGACATCATC AAGCGTCTG GCAATATTC TGAATGAGC
181 TGTGACASTT TAACAACGGG CTGGTAATAT GTTGGAAAT CTGAGCCGAT ACGAATTTCA
lacP *t-t-
241  CACAGGAAC AGTATTCATG TCCCTATAC TAGTATTG GAAATTAAG GCGTTGTGC
301  AAGCACTCG ATCTCTTTC GATATCTTG ABAASATA TGAAGACAT TTGATGTGC
361  CCGATGAGG TGAATATGQ QAAACAAA AATTGAAAT GCTTTGAG TTTCACACG
421  TCTCTATA TATGATGAT GATCTTAAI TAACAAGGC ATGGCCATC ATACGTATA
481  TAGCTGACA GCACAAGAT TGGGTGAT GTCAAAAGA GCGTGCAGG ATTTCAATG
541  TTAGAGAGC GPTTGTGAT ATTAGATAC GFTGTGAG AATTCATAT APTAARACT
601  TTAGACTCT CAAGTGTAT TTCTTAGCA ACTACCTGA AAGCCGAAA ATGTCGAAE
661  AIGCTTATG TCAAAAACA TATTAAATG GTAGCATCT ACCCATCTC GACTTCATG
721  TGTATGAGC TCTTGAATG GTTTTAAAC TGAACCAAT GTCCATGAT GGTTCGAAA
781  AATGATTTG TTTTAAABA GATTTGAG GATTCGCA CTATCCCA AATTCATAG TACTTCGAA
841  CCGAAAGTA TAAATATG CTTTCCGGG AGTGGAGAG CAGTTTGT GATGGAGAC
901  ATCTCTAAA AAGCATCTG GTTCCCGTG GATCCCAAG AATTCGAGG TGAATGAG
961  CCGCCGATC GTACTGACT GAGATCTGC CTGCGGCTT TCGTATAGA CCGTAAAG
1021 CTTGACACA TGAAGTCCC GAGACGGTC ACAGCTTGC TGTAAAGCA TCCCGGAGC
1081 AGACAAGCC CTCAGGCCC GTCAGCGGT GTTCCCGGT GTCCGGCCC ACCATGACC
1141 CAGTACGTA GCGATAGCG AGTGTAAAT TTTGAGAC GAAAGGCC CTGTATACG
1201 CTAATTTAT AGATAATG CHATATAA AIBGTTCI AGACTGAGG TGGACTTTT
1261 CCGSAAATG TGGCGAAC CCAATTTGT TATTTTCT AATACATC AATATGAT
1321 CCGCTATGA GACAATAAC CTGATAATG CTTCATAT ATTAAGAGG GAGAAATG
β-ガラクトシド産生ドナ
1381 AGTATTCAC ATTCGCTGT GCGCTTAT GCTTTTTC GCGCATTTG CTTCTGCTT
1441 TTTCTGACG CAGAAAGCT GGTGAAGTA AAGATGCTG AAGATCAT TGGTCCGGA
1501 GTGGTTACA TGGAACTGA TCTCAACGC GGTAGATCC TTGAGATTT TGGCCCGAA
1561 GAGCTTTTC CAATGATGAG CACTTTAAA GTTCTCTAJ GTCCCGCT ATATCCGCT
1621 GTGACGCGC GGAAGAGCA ACTCGTCCG CCAATACCT ATTCGAGA TCACTTGGT
1681 GAGTACTAC GAGTACAGA AAGACTTCT ACGATGGA TGAAGTAG AATATATG
1741 AGTGTGACA TAACTGAG TAAATACCT GCGCCACT TACTGTGAG AAGATGGA
1801 GCGAGAGAG AGTAAACCC GTTTTGGAC AGTGTGAG ATCATGAG TCGTGTGAT
1861 CTTTGGAGC GAGACTGAA TGAAGATA CAAAGAGC AGCTGAGC CAGATGCT
1921 GAGCAATGG CACCAAGCT GCGCAACTA TTAAGTCCC AACTTAC TCAAGCTTC
1981 CCGCAATAA TATAGACG GATGGAGCG GATAAGTTG CAGGACACT TCGCTGCT
2041 GCGTTCGCG GTGGTGTCT TATGTGAT AATCTGAG CCGTGTGAG TCGTGTGCG
2101 GGTATCTTG CAGCCTGGG GCGACTGCT AGGCTGCG GATCTGAT TTTTATAG
2161 ACGGAGTGC AGCAACTAT GATGAGCA ATTAGAGCA TCGTGTGAT AGCTGCTC
2221 CTGATAGAG ATGTGACT GTCAGGACA GTTACTGAT ATATCTTA GATTGATTA
β-ガラクトシド産生ドナ
2281 AACTTCAT TTTAATTA AAGGATGAG GTGAGATCC TTTTGTAA TGTCAATCC
2341 AATACCTCT AAGGTGATG TCTGTGAC TGAAGTCCG ACCCGTGA AAGATCAA
2401 GATCTTCTT GAGATCTTT TTTCTGCG GATATCTGT CTTGCAAC AAAAAGCA
2461 CCGCTACCG GGTGTGTTG TTGCGGAT CAAGGTAC CAATCTTT TCGAAGTA
2521 ACTGCTTCA GAGAGAGCA GATACCAAT ACTGTCTG TACTGTGCG GTAGTAGG
2581 CAGCACTCA AAGTCTGT AAGCCCTCT ACATGCTCG CTGTCTGAT CCGTGTGCA
2641 GTGCTGCTG CAGTGGCA TAACTGCT GTTCCGCT TGAATCAG ACGATGTA

```

【図 2 1 B】

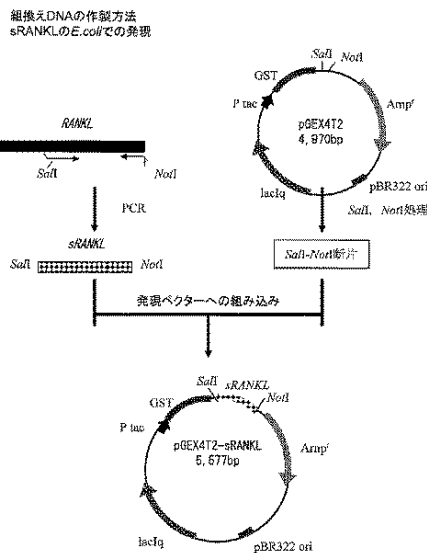
```

2701 CCGATAGG CCGACGGTC GCGCTAAGG GCGGTTGCT GCACACGCC CAGCTGGAG
2761 CCGACAGCT ACAAGAACT GAGATACCA CAGCTGAG TATGAAAAG CCGACAGCT
2821 CCGAAGGGA GAAAGGGA CAGATACG GTABGCGCA GGTGTGAG AAGAGAGCC
2881 AAGAGGAGC TTCAGGGGG AAGCGCTGG TACTTTATA GTCTGTGG GTTTGCGAC
2941 CCTGACTTG AGGCTGAT TTGTGTGCT TCTTCAAGG GCGCGAGCT ATGAAAAC
3001 GCGAGCAAG CCGGCTTTT AAGTTCCTG CCGTTTCT GCGCTTTC TCAATGCTG
3061 TTTCTGCTT TATCCCTGA TCTGTGAT AGCGTATA GCGCTTGA GTAGAGTAT
3121 AAGTGTGCT GAGAGGAG CAGCAGGCG AGCGGTGAG TGAAGAGGA AGCGAGAG
3181 CAGCTGAGC GATATTTCT CTTTADGAT GTTGTGCTA TTTGALCG CATAAATCC
3241 GACACTATG AATGTGCAA AAGCTTGG GCTATGCT GATAGGCC GAAAGAGAT
3301 CAATCAGG TGGTAAAT GAAACAGTA ACGTATAG ATGTGCGA GTATGCGGT
lacIq開始ドナ
3361 GTCTCTATC AGACGCTTC CCGCTGTGG AACCAAGCA GCGAGCTTC TCGSAAAG
3421 GCGAAGAA GCGAAGAGC GATGTGAG GATGATTA TTTCCAGCG CTTGGAGCA
3481 CAATGAGG CAGAAAGTG GTTCTGAT GCGTGTGA CCGCAATCT GCGCTGAG
3541 GCGCTGCG AATGTGCT GCGATATA TCTTGGCG ATCACTGG TCGAAGGTC
3601 GTGCTGCA TGTGAAAG AAGCGGCT GAGCGCTGA AAGCGGCT GCACATCT
3661 CTGCGCAC CCGTCACTG GCTGATCAT AAGTCCCG TGAATGCA GATTCGAT
3721 GCTGTGAG CCGCTGAG TATGTGCG GCTTATTC TGTATGCT TCAAGAGCA
3781 CCGATCACA GATATTTT TCCCATGAA GAGGTACG GACTGTGGT GAGGACTCT
3841 CTGCAATGG GTCACAGA AATGCTGCT TTAGGCGC CATTAATC TGTCTGGG
3901 GCTGTGCT TCGTGTGCT GCTTAAAT CTGAGTGA AGCAATTA GCGCTGAG
3961 GAGCGGAG CCGACTGAG TCGCTGCT GCTTCAAC AAGCATGA ATCTGAT
4021 GAGGCTAG TCGCTGCT GATGTGCT GCGCAACT AGATGCTT GCGGCTGAG
4081 CCGGATGA CCGATGCG CTTGCGCT GCTGCGATA TCTGCTGAT GCGATGAG
4141 GATGCGAG CAGCTGAT TTATTCGG CCGTAAACA CCAATGAA GATTTTGG
4201 CTGCTGGCC AAGCGGCT GAGCGCTG CTCAACTCT CTGAGGGA GCGGCTGAG
4261 GCGATCGC TGTGCGCT CTGAGTGT AAGAAAAA CCGCTGCG GCGCAATG
4321 CAGCTGCT CTGCGGCT GCTGCGAT TCAATGAG ACGCTGCG ACGCTGCT
4381 CAGTGGAA GCGGCTGAG AGCAATGCT ATATGCTG AGTATCTA CAGATGAG
lacIq終止ドナ
4441 ACCCAAGCT TACACTTA TCGTGGCG TGTATGTT TGTGAAATG TGAAGATA
4501 ACGATTCAC ACGAAGAA GCTATGACC TGAATAGCA TCACTGCG GCTCTTTAC
4561 ACGTGTGA CCGGAAAAC CTTGCGTAA CCGCACTAA TCGCTTGA GCACTGCG
4621 CTTTGGCAG GTGGGTAAT ACGAGAGG CCGCACAG TCGGCTTTC CAAGTGTG
4681 GCGGCTGA TCGGATGAG CCGTTTCT GCTTGGCG ACCAGAGG GCGGAGAA
4741 CGTGCTGA GCGGATCT CTTGAGGCG ATCTGTGCT GCTGCTTA ACGTGGAA
4801 TCGAGGTA GATGTGCG ATTCAGCA AGTAACTA TCGATTAAG GCAATGCG
4861 CTTTGTTC CAGGAGAA CCGAGGCT GTACTGCT CAGATTAI TGTGATGA
4921 GCGGCTACA GAAAGCGAG ACGGATAA TTTTCTAG CTTTGAAT

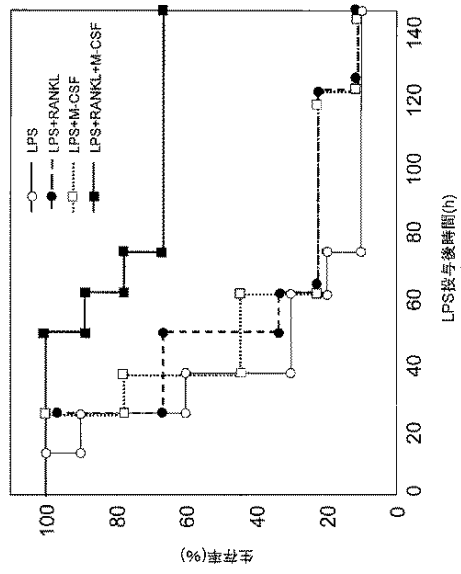
```

lacP \*t-t-の位置: 183-211  
β-ガラクトシド産生ドナ: 1,878-2,238  
lacIq遺伝子: 3,819-4,401

【図 2 2】



【図 2 3】



【配列表】

2007132512000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/309602
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12Q1/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/00, A61K38/00, A61P31/00, A61P37/00, C07K16/28, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/483, G01N33/53 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 practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDream2)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUDA, K. et al., Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. J. Immunol., 2004, Vol.172, No.4, pages 2504 to 2510	1-13
Y	MOSCHEN A.R. et al., The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. Gut., 2005, Vol.54, No.4, pages 479 to 487.	1-13
X	Naotaka YASUDA, "Hakotsu Saibo Bunka no Signal Dentatsu", Igaku no Ayumi, 2003, Vol.205, No.3, pages 187 to 189	14, 18-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 August, 2006 (09.08.06)		Date of mailing of the international search report 22 August, 2006 (22.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309602

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARUYAMA, K. et al., RANKL can induce tolerance against bacterial components., The Japanese Society for Immunology Gakujutsu Shukai Kiroku, 2005, Vol.35, page 184, (2-E-W26-13-O/P)	1-13
A	GORI F. et al., The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. Endocrinology., 2000, Vol.141, No.12, pages 4768 to 4776.	1-24
A	GRAVALLESE E.M., Bone destruction in arthritis. Ann Rheum Dis., 2002, Vol.61, Suppl.2, p.ii84-86.	1-13
A	HIRAYAMA, T. et al., Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. Rheumatology., 2002, Vol.41, No.11, pages 1232 to 1239.	14-24
A	RIVOLLIER A. et al., Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. Blood., 2004, Vol.104, No.13, pages 4029 to 4037.	14-24
A	ANANDARAJAH A. P. et al., Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: Mechanisms and potential clinical applications. J.Cell. Biochem., 2006 Feb., Vol.97, No.2, pages 226 to 232.	14-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309602

**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 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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309602

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

## Reference document:

Naotaka Yasuda, "Signal Transduction of osteoclast differentiation" in the Progress of Medicine, 2003, Vol.25, No.3, p.187-189.

In the document cited above, it is disclosed that there is a connection between RANKL and a cytokine which is a marker for an inflammation and between RANKL and rheumatoid arthritis which is an inflammatory disease. Therefore, persons skilled in the art who read the disclosure would understand that RANKL can serve as a marker of a inflammatory disease. That is, the document almost suggests that RANKL is a marker for an inflammatory disease.

Consequently, in the present application, the inventions relating to the detection of an inflammatory disease using both of RANKL and OPG of claims 1-13, the inventions relating to the detection of an inflammatory disease and the pharmaceutical composition using RANKL only of claims 1-24, the inventions relating to the detection of an inflammatory disease using OPG only of claims 1-13, the inventions relating to the pharmaceutical composition comprising both RANKL and M-CSF as active ingredients of claims 14-24 and the inventions relating to the pharmaceutical composition comprising M-CSF only as an active ingredient of claims 14-24 cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, it is considered that the present application includes five groups of inventions.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 9 6 0 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/00, A61K38/00, A61P31/00, A61P37/00, C07K16/28, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/483, G01N33/53			
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			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDream2)			
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	
Y	SUDA K, et al., Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. J Immunol., 2004, Vol.172, No.4, p.2504-2510.	1-13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「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 09.08.2006		国際調査報告の発送日 22.08.2006	
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) 小暮 道明	4B 3764
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 9 6 0 2
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
Y	MOSCHEN A R, et al., The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. Gut., 2005, Vol.54, No.4, p.479-487.	1-13
X	保田尚孝 破骨細胞分化のシグナル伝達 医学のあゆみ, 2003, Vol.205, No.3, p.187-189.	14, 18-21
X	MARUYAMA K, et al., RANKL can induce tolerance against bacterial components. 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2005, Vol.35, p.184. (2-E-W26-13-O/P)	1-13
A	GORI F, et al., The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. Endocrinology., 2000, Vol.141, No.12, p.4768-4776.	1-24
A	GRAVALLESE E M. Bone destruction in arthritis. Ann Rheum Dis., 2002, Vol.61, Suppl.2, p.ii84-86.	1-13
A	HIRAYAMA T, et al., Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. Rheumatology., 2002, Vol.41, No.11, p.1232-1239.	14-24
A	RIVOLLIER A, et al., Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. Blood., 2004, Vol.104, No.13, p.4029-4037.	14-24
A	ANANDARAJAH A P, et al., Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: Mechanisms and potential clinical applications. J Cell Biochem., 2006 Feb, Vol.97, No.2, p.226-232.	14-24

国際調査報告	国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 9 6 0 2
<b>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)</b>	
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。	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ 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、</li>   <li>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ 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、</li>   <li>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ 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。</li> </ol>	
<b>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)</b>	
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ろの国際調査機関は認めた。 特別ページ参照	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> 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。</li> <li>2. <input type="checkbox"/> 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。</li> <li>3. <input type="checkbox"/> 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。</li> <li>4. <input type="checkbox"/> 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。</li> </ol>	
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</li> <li><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。</li> </ul>	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 9 6 0 2

第 III 欄の続き

参考文献：

保田尚孝、破骨細胞分化のシグナル伝達、  
医学のあゆみ、2003, Vol.25 No.3, 2003, p.187-189

上記文献には、RANKL の炎症マーカーであるサイトカインとの関連、および、炎症性疾患である関節リウマチへの関連が記載されていることから、これらに按じた当業者であれば RANKL が炎症性疾患のマーカーとなりうると理解できると認められる。換言すれば、上記文献には RANKL が炎症性疾患のマーカーである旨が記載されているに等しいといえる。

したがって、この出願の請求の範囲 1-13 に記載された RANKL 及び OPG の両者を用いた炎症性疾患の検出に係る発明と、請求の範囲 1-24 に記載された RANKL のみを用いた炎症性疾患の検出及び医薬組成物に係る発明と、請求の範囲 1-13 に記載された OPG のみを用いた炎症性疾患の検出に係る発明と、請求の範囲 14-24 に記載された RANKL 及び M-CSF の両者を有効成分とする医薬組成物に係る発明と、請求の範囲 14-24 に記載された M-CSF のみを用いた有効成分とする医薬組成物に係る発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは言えず、この出願には 5 個の発明が含まれていると言える。

## 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 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 丸山 健太

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 松尾 光一

東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内

(72)発明者 保田 尚孝

滋賀県長浜市加納町50番地 オリエンタル酵母工業株式会社 長浜生物科学研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB25 CA25 CA26 CB01 CB03 CB11 DA36 DA77 FA37  
 FB01 FB02 FB03 FB05 FB07 FB12 FB15 JA01  
 4B024 AA11 BA80 CA02 DA06 EA04 GA11 HA15  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QR48 QR56 QS33 QX02  
 4C084 AA02 BA01 BA02 BA22 BA23 BA44 DA19 MA02 NA14 ZB082  
 ZB112 ZB132 ZB322 ZB352

(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)	用于预防或治疗炎性疾病的炎性疾病和组合物的检测		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2007132512A1</a>	公开(公告)日	2009-09-17
申请号	JP2008515400	申请日	2006-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 东方酵母工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾 东方酵母有限公司		
[标]发明人	丸山健太 松尾光一 保田尚孝		
发明人	丸山 健太 松尾 光一 保田 尚孝		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/02 A61K38/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/08 A61P37/06 A61P31/10 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/191 A61K38/193 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/10 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/566 G01N2333/70575 G01N2800/26 Y02A50/481 A61K2300/00		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.ZNA.D C12Q1/02 A61K37/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/08 A61P37/06 A61P31/10 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB11 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB322 4C084/ZB352		
其他公开文献	JP5210156B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测炎性疾病的新方法和一种用于炎性疾病的新预防或治疗组合物。一种使用生物样品中的RANKL和/或OPG作为标记物检测炎性疾病的方法，以及用于预防或治疗包含RANKL和/或M-CSF作为活性成分的炎性疾病的组合物。

【图2】

