

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 116592

(P2003 - 116592A)

(43)公開日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/02	ZNA	C 1 2 Q 1/02	ZNA 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 2 4
39/395		45/00	4 B 0 6 3
45/00		A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/10	101	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 請求項の数 210 L (全 29数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 320281(P2001 - 320281)

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(22)出願日 平成13年10月18日(2001.10.18)

(72)発明者 松澤 佑次

兵庫県宝塚市雲雀丘山手2丁目21番23号

(74)代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】血管内皮細胞における動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を探査するために必須となる、動脈硬化病態増悪因子の分泌量を効果的に分析する方法の開発。

【解決手段】動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であって、(1)血管内皮細胞に、特定なアミノ酸配列等のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質及び被験物質を接觸させる第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相關関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法等が提供可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であって、(1)血管内皮細胞に、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質及び被験物質を接触させる第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法。

<アミノ酸配列> (a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列

【請求項2】第一工程が、血管内皮細胞に前記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を接触させた後、当該処理済みの血管内皮細胞に被験物質を接触させる工程であることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項3】第一工程が、血管内皮細胞に前記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を接触させると同時に又は前に、前記血管内皮細胞に被験物質を接触させる工程であることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項4】動脈硬化病態増悪因子の量と相関関係を有する指標値が動脈硬化病態増悪因子のmRNAの、前記血管内皮細胞内の存在量であることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項5】動脈硬化病態増悪因子がM-CSFであることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

(2)
2

【請求項6】動脈硬化病態増悪因子がMCP-1であることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項7】第一工程が、血管内皮細胞に下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換血管内皮細胞に、被験物質を接触させる工程であることを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項8】請求項1記載の分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定方法。

【請求項9】異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質であることを特徴とする請求項8記載の検定方法。

【請求項10】請求項9記載の検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を選抜することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質の探索方法。

【請求項11】請求項10記載の探索方法により選抜された物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含み、該有効成分が薬学的に許容される担体に製剤化されてなることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤。

【請求項12】請求項11記載の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤が、抗動脈硬化性疾患剤であることを特徴とする治療剤。

【請求項13】選抜された物質が抗体であることを特徴とする請求項12記載の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤。

【請求項14】下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を有効成分とする特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌剤。

<アミノ酸配列> (a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列に

おける第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列

【請求項15】動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進するための、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質の使用。

<アミノ酸配列> (a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列

【請求項16】動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であって、(1)非ヒト動物に下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換非ヒト動物に、被験物質を投与する第一

工程、及び(2)前記第一工程後に、前記形質転換非ヒト動物の細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法。

【請求項17】前項16記載の分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定方法。

【請求項18】異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質であることを特徴とする請求項17記載の検定方法。

【請求項19】請求項18記載の検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を選抜することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質の探索方法。

【請求項20】請求項19記載の探索方法により選抜された物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤。

【請求項21】哺乳動物細胞に、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする外来遺伝子を、当該外来遺伝子が前記細胞で発現する位置に置かれるよう提供することによって哺乳動物細胞における動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進するための、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAの使用。

<アミノ酸配列> (a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列

配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】マクロファージコロニー刺激因子(Macrophage-Colony Stimulating Factor: M-CSF)は、単球系細胞の増殖・分化を刺激するサイトカインに位置付けられる動脈硬化病態増悪因子の一つである。当該因子が病变部で必要以上に血管内皮細胞から分泌されると、当該因子はスカベンジャー受容体の発現・活性化やマクロファージの増殖を必要以上に促進することにより、マクロファージ細胞内における脂肪蓄積量を増加させると同時に炎症部位等において多数のマクロファージを増殖させ、その結果、マクロファージ泡沫細胞の形成を導き、動脈硬化の主原因である脂肪沈着を発生させ、動脈硬化の病態を増悪させてしまう。一方、単球走化活性因子(Monocyte Chemoattractant Protein-1: MCP-1)は、単球の接着、遊走を起こすサイトカインに位置付けられる動脈硬化病態増悪因子の一つである。当該因子が必要以上に血管内皮細胞から分泌されると、当該因子はマクロファージの集積を必要以上に促進させ、その結果、血管内壁に動脈硬化巣の形成を導き、上記同様に動脈硬化の病態を増悪させてしまう。以上の知見に従えば、マクロファージコロニー刺激因子、単球走化活性因子等に代表される動脈硬化病態増悪因子の過剰な分泌を抑制することにより、動脈硬化の病態の拡大・増悪を防ぎ、動脈硬化性疾患を効果的に抑制することが可能となる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、血管内皮細胞における動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を探査するために必須となる、動脈硬化病態増悪因子の分泌量を効果的に分析する方法の開発が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況のもと鋭意検討した結果、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質の存在を見出し、当該蛋白質を利用することにより、本発明を完成するに至った。

【0005】即ち、本発明は、

1. 動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であって、(1)血管内皮細胞に、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質及び被験物質を接触させる第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法

<アミノ酸配列>(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、

(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列；

2. 第一工程が、血管内皮細胞に前記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を接触させた後、当該処理済みの血管内皮細胞に被験物質を接触させる工程であることを特徴とする前項1記載の分析方法；

3. 第一工程が、血管内皮細胞に前記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を接触させると同時に又は前に、前記血管内皮細胞に被験物質を接触させる工程であることを特徴とする前項1記載の分析方法；

4. 動脈硬化病態増悪因子の量と相関関係を有する指標値が動脈硬化病態増悪因子のmRNAの、前記血管内皮細胞内での存在量であることを特徴とする前項1記載の分析方法；

5. 動脈硬化病態増悪因子がM-CSFであることを特徴とする前項1記載の分析方法；

6. 動脈硬化病態増悪因子がMCP-1であることを特

徴とする前項1記載の分析方法；

7 . 第一工程が、血管内皮細胞に下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換血管内皮細胞に、被験物質を接触させる工程であることを特徴とする前項1記載の分析方法；

8 . 前項1記載の分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定方法；

9 . 異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質であることを特徴とする前項8記載の検定方法；

10 . 前項9記載の検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を選抜することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質の探索方法；

11 . 前項10記載の探索方法により選抜された物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含み、該有効成分が薬学的に許容される担体に製剤化されてなることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤；

12 . 前項11記載の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤が、抗動脈硬化性疾患剤であることを特徴とする治療剤；

13 . 選抜された物質が抗体であることを特徴とする前項12記載の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤；

14 . 下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質を有効成分とすることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌剤

<アミノ酸配列> (a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d) 前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(h) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列；

15 . 動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進するための、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質の使用 <アミノ酸配列> (a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d) 前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(h) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列；

16 . 動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であって、(1)非ヒト動物に下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換非ヒト動物に、被験物質を投与する第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記形質転換非ヒト動物の細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法；

17 . 前項16記載の分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相

関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定方法；

18. 異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質であることを特徴とする前項17記載の検定方法；

19. 前項18記載の検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を選抜することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質の探索方法；

20. 前項19記載の探索方法により選抜された物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤；

21. 哺乳動物細胞に、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする外来遺伝子を、当該外来遺伝子が前記細胞で発現する位置に置かれるように提供することによって哺乳動物細胞における動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進するための、下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAの使用

<アミノ酸配列> (a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列、(d) 前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列、(e) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g) 配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列；を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

本発明でいう「動脈硬化病態増悪因子」とは、血管内皮細胞から分泌されるサイトカインであって、細胞間での生理機能に関する調節をつかさどる蛋白質又は糖蛋白質であるが、必要以上に血管内皮細胞から分泌されると前記の細胞間での生理機能に関する調節が動脈硬化病態を増悪させる方向に指向してしまうような因子である。具体的には、その代表的なものとしてM-CSF、MCP-1等をあげることができる。本発明でいう「動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力（又は動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力）」とは、血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を変化させる能力（正の相関関係を示す場合には、当該指標値を増加させる能力、また負の相関関係を示す場合には、当該指標値を減少させる能力）を意味している。

【0007】本発明分析方法において用いられる「下記のいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質」とは、(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列、(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加もしくは置換されたアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(c)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列（即ち、配列番号1で示されるアミノ酸配列における第27番目から第491番目までのアミノ酸で示されるアミノ配列からなる蛋白質）、(d)前記(c)のアミノ酸配列において、そのアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列（即ち、配列番号1で示されるアミノ酸配列における第27番目から第491番目までのアミノ酸で示されるアミノ配列のアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質）、(e)配列番号1で示されるアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、(f)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列、(g)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと80%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列、及び、(h)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列を有するDNAと、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされるアミノ酸配列であって、かつ動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を有するアミノ酸配列から

なるアミノ酸群に含まれるいすれかのアミノ酸配列からなる蛋白質である（以下、本蛋白質と記すこともある。）。このような蛋白質は、SDS-PAGEでの分子量として、約4.5～8万程度の分子量であることが好ましい。

【0008】ここで、前記（b）にある「アミノ酸の欠失、付加もしくは置換」や前記（e）及び（g）にある「80%以上の配列同一性」には、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質が細胞内で受けけるプロセシング、該蛋白質が由来する生物の種差、個体差、組織間の差異等により天然に生じる変異や人為的なアミノ酸の変異等が含まれる。前記（b）にある「アミノ酸の欠失、付加もしくは置換」（以下、総じてアミノ酸の改変と記すこともある。）を人為的に行う場合の手法としては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするDNAに対して慣用の部位特異的変異導入を施し、その後このDNAを常法により発現させる手法が挙げられる。ここで部位特異的変異導入法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法（ギャップド・デュプレックス法、Nucleic Acids Res., 12, 9441-9456(1984)）、変異導入用プライマーを用いたPCRによる方法等が挙げられる。前記で改変されるアミノ酸の数については、少なくとも1残基、具体的には1若しくは数個、又はそれ以上である。かかる改変の数は、動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力を見出すことのできる範囲であれば良い。また前記欠失、付加又は置換のうち、特にアミノ酸の置換に係る改変が好ましい。当該置換は、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似した性質を有するアミノ酸への置換がより好ましい。このような置換としては、例えば、(1)グリシン、アラニン；(2)バリン、イソロイシン、ロイシン；(3)アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、(4)セリン、スレオニン；(5)リジン、アルギニン；(6)フェニルアラニン、チロシンのグループ内での置換が挙げられる。

【0009】本発明において「配列同一性」とは、2つのDNA又は蛋白質は、2つの配列の同一性及び相同性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象のDNA又は蛋白質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。このような配列同一性に関しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム（Nucleic Acid Res., 22(22):4673-4680(1994)）を利用してアラインメントを作成することにより算出することができる。尚、配列同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレスhttp://www.d 50

bj.nig.ac.jpにおいて、一般的に利用可能である。本発明における配列同一性は、80%以上であればよいが、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上である。

【0010】前記（h）にある「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」に関して、ここで使用されるハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行（Cold Spring Harbor Laboratory press）等に記載される通常の方法に準じて行うことができる。また「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、6×SSC（1.5M NaCl、0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を10×SSCとする）、50%フォルムアミドを含む溶液中で45にてハイブリッドを形成させた後、2×SSCで50にて洗浄するような条件（Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6）等を挙げることができる。洗浄ステップにおける塩濃度は、例えば、2×SSCで50の条件（低ストリンジェンシーな条件）から0.2×SSCで50までの条件（高ストリンジェンシーな条件）から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、例えば、室温（低ストリンジェンシーな条件）から65（高ストリンジェンシーな条件）から選択することができる。また、塩濃度と温度の両方を変えることもできる。

【0011】動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子は、細胞膜外へ分泌される蛋白質であることが好ましい。このような分泌性蛋白質は、特に後述するような、例えば、血管内皮細胞に動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換血管内皮細胞を利用する場合における本発明に適している。因みに、本蛋白質をコードするDNAは、前述及び後述の如く、当該DNAを外来遺伝子として、哺乳動物細胞に当該細胞で発現する位置に置かれるように提供することによって哺乳動物細胞における動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進するために利用することもできる。尚、哺乳動物細胞は、組織から分離された細胞や、同一の機能を持つ集団を形成している細胞や、哺乳動物の体内にある細胞であってもよい。

【0012】本蛋白質の調製方法について以下に説明する。まず、本蛋白質をコードする遺伝子（以下、本遺伝子と記すこともある。）、例えば、（I）配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、（II）配列番号1で示されるアミノ酸配列において、そのアミノ末端から26個のアミノ酸を欠失させた部分アミノ酸配列をコードする塩基配列（即ち、配列番号1で示されるアミノ酸配列における第27番目から第491番目までのアミノ酸で示されるアミノ配列をコードする塩基配列）、（III）前記（II）のアミノ酸配列において、そ

のアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、(IV)配列番号6で示される塩基配列における第18番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列、(V)配列番号6で示される塩基配列、(VI)配列番号6で示される塩基配列における第96番目のヌクレオチドから第1493番目までのヌクレオチドで示される塩基配列、(VII)前記(VI)の塩基配列において、その5'末端にATGが付加された塩基配列等の塩基配列、(VIII)配列番号9で示される塩基配列等の塩基配列を有する遺伝子を、通常の遺伝子工学的方法(例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版(Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行(Cold Spring Harbor Laboratory press)等に記載されている方法)に準じて取得する。次いで、得られた本遺伝子を用いることにより、通常の遺伝子工学的方法に準じて本蛋白質を製造・取得する。このようにして本蛋白質を調製することができる。

【0013】例えば、本遺伝子が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、さらに形質転換された宿主細胞(形質転換体)を培養することで得られる培養物から本蛋白質を取得すればよい。上記プラスミドとしては、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカーをもつ発現ベクターに、本蛋白質をコードする遺伝子が導入されたものを好ましく挙げることができる。尚、発現ベクターとしては、各種のものが市販されている。例えば、大腸菌での発現に使用される発現ベクターは、lacZ、trp、tacなどのプロモーターを含む発現ベクターであって、これらはファルマシア社、宝酒造等から市販されている。当該発現ベクターに本蛋白質をコードする遺伝子を導入するために用いられる制限酵素も宝酒造等から市販されている。さらなる高発現を導くことが必要な場合には、本蛋白質をコードする遺伝子の上流にリボゾーム結合領域を連結してもよい。用いられるリボゾーム結合領域としては、Guarente L.ら(Cell 20, p543)や谷口ら(Genetics of Industrial Microorganisms, p202, 講談社)による報告に記載されたものを挙げることができる。

【0014】宿主細胞としては、原核生物もしくは真核生物である微生物細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞等を挙げることができる。例えば、本蛋白質の大量調製が容易になるという観点では、大腸菌等を好ましく挙げができるが、哺乳動物細胞を用いてもよい。前記のようにして得られたプラスミドは、通常の遺伝子工学的方法により前記宿主細胞に導入することができる。哺乳動物細胞の場合には、後述する形質転換血管内皮細胞の調

製方法に従って行えばよい。

【0015】形質転換体の培養は、微生物培養、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞の培養に使用される通常の方法によって行うことができる。例えば大腸菌の場合、適当な炭素源、窒素源およびビタミン等の微量栄養物を適宜含む培地で培養を行う。培養方法としては、固体培養、液体培養のいずれの方法でもよく、好ましくは、通気搅拌培養法等の液体培養を挙げができる。

【0016】本蛋白質の取得は、一般的の蛋白質の単離・精製に通常使用される方法を組み合わせて実施すればよい。例えば、前記の培養により得られた形質転換体を遠心分離等で集め、該形質転換体を破碎または溶解せしめ、必要であれば蛋白質の可溶化を行い、イオン交換、疎水、ゲルろ過等の各種クロマトグラフィーを用いた工程を単独で、もしくは組み合わせることにより精製すればよい。また、例えば、前記の培養により得られた形質転換体を遠心分離などで除去し、培養上清から本蛋白質を前記と同様にして精製してもよい。必要であれば、精製された蛋白質の高次構造を復元する操作をさらに行つてもよい。

【0017】このようにして調製された本蛋白質の動脈硬化病態増悪因子の分泌を促進する能力を確認するには、まず(1)血管内皮細胞に、被験蛋白質(及び、必要に応じて動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能を有する物質の両者)を接触させる第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有する動脈硬化病態増悪因子分泌量の分析方法により、血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する。この際に、被験蛋白質として異なる2種以上の蛋白質を各々独立して用いた区における動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値(第一の測定量、第二の測定量)を比較することにより差異を調べる。その結果、得られる差異(第一の測定量と第二の測定量との差)に基づき前記蛋白質の動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力を評価することにより動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力の検定を行う。このようにして評価された動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌促進能を有する蛋白質であることを確認することができる。上記の方法において、前記異なる2種以上の蛋白質のうち、少なくとも一つの蛋白質が動脈硬化病態増悪因子分泌促進能を有さない蛋白質とすることで、他方の被験蛋白質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌促進能を評価してもよいし、また前記異なる2種以上の蛋白質のうち、少なくとも一つの蛋白質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌促進能を基準としながら他方の被験蛋白質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌促進能を評価してもよい。

【0018】本蛋白質は、動脈硬化病態増悪因子分泌促

進剤の有効成分として、例えば、下記に説明するような血管内皮細胞における動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を探索するために必須となる、動脈硬化病態増悪因子の分泌量を効果的に分析する方法に利用できる。

【0019】本発明分析方法は、(1)血管内皮細胞に、本蛋白質及び被験物質を接触させる第一工程、及び(2)前記第一工程後に、前記血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有する。本発明でいう血管内皮細胞とは、血管が血流と接するところにある滑らかで偏平な細胞である。また本発明分析方法において用いられる血管内皮細胞は、組織から分離された細胞や、同一の機能・形態を持つ集団を形成している細胞や、哺乳動物の体内にある細胞であってもよい。場合によっては前記細胞の抽出系でもよい。当該細胞の由来としては、例えば哺乳動物等を挙げることができ、さらに具体的にはヒト、サル、ウシ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスターなどを挙げることができる。

【0020】血管内皮細胞は、下記のようにして調製することができる。例えば、まず哺乳動物から血管を採取する。血管は、新鮮な血管であればどこから採取してもよい。血管内皮細胞は、採取した血管の太さや分枝の数によって、剥離法、酵素法等の通常の単離法の中から適した方法を選択して単離する。剥離法は、血管を切開した後に、鋭利なメスを用いて血管内皮細胞のみを剥ぎ取る方法であり、一方、酵素法は、コラゼナーゼ、トリプシン等を用いて酵素的に血管内皮細胞を単離する方法である。通常、剥離法は各種動物の大動脈等の太い血管からの血管内皮細胞の単離に適している。一方、酵素法は太い血管のほか、細い血管の血管内皮細胞の単離に適している。各方法の詳細は、例えば、新生化学実験講座10、「血管(内皮と平滑筋)」日本生化学会編、東京化学同人刊、1993年、の第4章等に記載されている。尚、得られた細胞が血管内皮細胞であることを確認するには、例えば、形態学的に单層敷石状構造を呈しているかどうか、dil-Aセチル化LDLの取り込み能力を持つか、フォンビルブランド因子の産生能力を持つかどうかを調べればよい(血管-内皮と平滑筋(新生化学実験講座10、日本生化学会編、東京化学同人刊、1993年)。得られた血管内皮細胞の培養は、通常の方法(例えば、バイオ実験イラストレイティッド(6)すくすく育て細胞培養、1996年、秀潤社刊等に記載されている方法)に準じて行うことができ、具体的には、例えば、37%、5%CO₂下で培養する方法を好ましい態様として挙げることができる。また、あらかじめ株化された血管内皮細胞を用いることもできる。このような血管内皮細胞株として、例えば、ヒト大動脈血管内皮細胞等をあげることができる。当該血管内皮細胞株は、市販されているか、又は容易に理化学研究所ジーンバンク内細胞開発

銀行(郵便番号305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1)等の細胞寄託機関から入手できる。

【0021】本発明分析方法の第一工程は、血管内皮細胞に本蛋白質を接触させた後、当該処理済みの血管内皮細胞に被験物質を接触させる方法でもよいし、また血管内皮細胞に本蛋白質を接触させると同時に又は前に、前記血管内皮細胞に被験物質を接触させる方法でもよい。即ち、血管内皮細胞に、本蛋白質及び被験物質を接触させる順序は、どちらが先であってもよく、また同時であってもよいが、好ましくは、被験物質を本蛋白質存在下に血管内皮細胞と接触させることがよい。血管内皮細胞と接触させる本蛋白質の濃度としては、通常約1ng/ml~約10μg/mlであればよく、3ng/ml~100ng/mlが好ましい。血管内皮細胞と本蛋白質とを接触させる時間は、通常10分程度~2日程度であり、数時間~1日程度が好ましい。血管内皮細胞と接触させる被験物質の濃度としては、通常約0.1μM~約100μMであればよく、1μM~50μMが好ましい。血管内皮細胞と被験物質とを接触させる時間は、通常10分以上2日程度であり、好ましくは数時間~1日程度である。血管内皮細胞に、本蛋白質及び被験物質を接触させる環境としては、血管内皮細胞の生命活動を維持させるような環境が好ましく、例えば、当該血管内皮細胞のエネルギー源が共存するような環境をあげることができる。具体的には、培地内で第一工程が行なわれることが好都合である。

【0022】さらにまた本発明分析方法の第一工程は、例えば、血管内皮細胞に本蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換血管内皮細胞に、被験物質を接触させる方法でもよい。当該工程において、本発明形質転換血管内皮細胞と接触させる被験物質の濃度は、通常約0.1μM~約100μMであればよく、1μM~50μMが好ましい。血管内皮細胞と被験物質とを接触させる時間は、通常10分以上2日程度が好ましく、より好ましくは数時間から1日程度が挙げられる。

【0023】前記本発明形質転換血管内皮細胞は、以下のようにして調製することができる。本遺伝子を、通常の遺伝子工学的手法を用いて、本遺伝子を導入する血管内皮細胞において使用可能なベクターに発現可能な形でプロモーターと接続されるように挿入することにより、プラスミドを作製する。ここで用いられるプロモーターは、本遺伝子が導入される血管内皮細胞で機能可能なものであればよく、例えば、SV40ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター(CMVプロモーター)、Raus Sarcoma Virusプロモーター(RSVプロモーター)、アクチン遺伝子プロモーター等が挙げられる。尚、このようなプロモーターをマルチクローニング部位の上流に含む市販のベクターを利用してよい。次いで、前記プラスミドを血管内皮細胞へ導入する。血管内皮細胞への導入法としては、例えば、リン酸

カルシウム法、電気導入法、D E A E デキストラン法、ミセル形成法等を挙げることができる。リン酸カルシウム法としてはGrimm, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10923-10927等に記載される方法、電気導入法及びD E A E デキストラン法としてはTing, A. T. et al., EMBO J., 15, 6189-6196等に記載される方法、ミセル形成法としてはHawkins, C. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 13786-13790等に記載される方法を挙げることができる。ミセル形成法を用いる場合には、リポフェクトアミン(ギブコ製)やフュージーン(ベーリンガー製)等の市販の試薬を利用するとよい。前記プラスミドの導入処理を施した血管内皮細胞を、例えば、当該ベクターに予め含まれる選抜マーカー遺伝子を利用し、当該選抜マーカー遺伝子に応じた選抜条件の培地で培養することにより、本発明形質転換血管内皮細胞を選抜することができる。さらに選抜を続けて、本遺伝子が染色体に導入されてなる安定形質転換体となった本発明形質転換血管内皮細胞を取得してもよい。導入された本遺伝子が血管内皮細胞中に存在する染色体上に組込まれたことを確認するには、当該細胞のゲノムDNAを通常の遺伝子工学的方法に準じて調製し、本遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプライマーとして用いるPCRや、本遺伝子の部分塩基配列を有するDNAをプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーション等の方法を利用して、ゲノムDNA中の本遺伝子の存在を検出・確認すればよい。また、本発明形質転換血管内皮細胞は、後述する形質転換非ヒト動物から前述(血管内皮細胞の調製に関する記載)のように調製してもよい。

【0024】本発明分析方法において、血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する方法としては、例えば、(1)動脈硬化病態増悪因子の量を、動脈硬化病態増悪因子を特異的に認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ(RIA)法、酵素標識抗体測定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA)、ウエスタンプロットティング等で測定する方法、(2)動脈硬化病態増悪因子の量と相関関係を有する指標値として、動脈硬化病態増悪因子のmRNAの、前記血管内皮細胞内の存在量、を測定する方法、等をあげることができる。上記(2)におけるmRNAの定量には、RT-PCR法やノザンハイブリダイゼーション等の通常の方法(例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版(Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリーフ発行(Cold Spring Harbor Laboratory press)等に記載されている方法)を用いればよい。上記のようにして本発明分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物

10
20
20
20
30
40
40

質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価する。このようにして被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定(本発明検定方法)を行うことができる。本発明検定方法において、前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質(例えば、溶媒、バッケグランドとなる試験系溶液等であってもよい。)とすることで、他方の被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよいし、また前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を基準としながら他方の被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。もちろん、動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子(即ち、本蛋白質)と被験物質との両者を接触させた後の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値(以下、測定値1と記す。)を、動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子を接触させ、かつ被験物質を接触させなかった後の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値(以下、測定値2と記す。)と比較することによって、該被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。この場合、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、前記測定値を用いて、下記の式に従って動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率として求めるよ。

動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率(%) = [(測定値2 - 測定値1) / 測定値2] × 100

【0025】動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質を探索するには、本発明検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質を選抜すればよい(本発明探索方法)。例えば、被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を表わす動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率が、統計学的に有意な値を示す物質、具体的に好ましくは、例えば、30%以上を示す物質、より好ましくは50%以上を示す物質を、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質として選抜する。尚、当該物質は、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する限り、低分子化合物、蛋白質(抗体を含む)又はペプチド等のいかなる物質であってもよい。本発明探索方法によって選抜された物質は動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有しており、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤(例えば、抗動脈硬化性疾患剤等の治療剤等)の有効成分として使用してもよい。

【0026】以下に、本蛋白質の動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力を抑制(消失も含む)する能力を有する抗体を選抜する場合(即ち、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質が抗体である場合)における本発明探索方法の具体例を述べる。まず、本蛋白質の抗体を調製する。

【0027】(1)抗原の調製

前記の方法で調製される本蛋白質を抗原として用いることができるが、例えば、本蛋白質のアミノ酸配列のうち特有な部分アミノ酸配列を含む抗原性ペプチドを高分子量化する方法、または該抗原性ペプチドを直接的またはスペーサーを介して間接的に高分子量担体分子に結合した複合体を得る方法等により抗原を作製することもできる。これらの方法は、それ自身では低分子量で抗原性が低い、すなわち不完全抗原である抗原性ペプチドを、高分子量化することで完全抗原化する方法である。抗原性ペプチドの選抜方法は、例えば、抗ペプチド抗体実験プロトコール（大海忍、辻村邦夫、稻垣昌樹著、秀潤社刊、1994年発行）に記載される蛋白質中のエピトープ予測法を用いて行うことができる。通常、10～20個のアミノ酸からなるペプチドを抗原性ペプチドとして選抜する。選抜された抗原性ペプチドは、抗ペプチド抗体実験プロトコール（大海忍、辻村邦夫、稻垣昌樹著、秀潤社刊、1994年発行）に記載された通常の合成及び精製方法に準じて調製すればよく、さらに必要に応じて高速液体クロマトグラフィー等の通常の方法により純度の高いものにすることができる。抗原性ペプチドを高分子量化する方法としては、例えば、Tamらの考案したMAP（Multiple antigen peptide）法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, p5409)を挙げることができる。抗原性ペプチドを直接的にまたはスペーサーを介して間接的に高分子量担体分子に結合した複合体を得る方法において使用される高分子量担体分子は、抗原性ペプチド及びこれらにスペーサーが結合した化合物との結合反応に利用可能な反応基を有し、かつ該不完全抗原に結合されることにより免疫原性を獲得し得るか、または既に存在する免疫原性を高められ得る巨大分子化合物であればよい。

【0028】(2) 哺乳動物の免疫感作化工程および抗体取得

(1)に記載される方法により調製した抗原を用いて、例えば、J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 1025-1027等に記載されるNewsome W. H. らによる通常の免疫感作の方法に従い、例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ等の哺乳動物を免疫する。抗原は、1回または複数回投与すればよい。抗原は、例えば、約7ないし約30日、特に約12ないし約16日間隔で、3または4回の投与等が好ましい。投与量は1回につき、例えば、抗原約0.05から2mg程度を目安とする。投与方法は、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を選択することができる。好ましくは静脈内、腹膜腔内もしくは皮下投与を挙げることができ、特に好ましくは皮下注射と腹膜腔内注射との組合せが挙げられる。そして、上記の哺乳動物を0.5ないし4ヶ月間処置せずに放置した後、該哺乳動物の血液を耳静脈等から少量サンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇したら、状況に応じて

10
20
30
40
50

抗原の投与を適当回数実施する。例えば100μgないし1mgの抗原の投与量で1回ないし5回の投与が行われる。最後の投与の1ないし2ヶ月間後に免疫感作した哺乳動物から通常の方法により血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いることによる沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって分離、精製することにより、ポリクローナル抗血清を調製する。このようにして本蛋白質の抗体を得ることができる。また、上記の免疫感作した哺乳動物から免疫適格B細胞を単離し、該免疫適格B細胞を、連続的に細胞分裂し得る腫瘍細胞と融合し、生成する融合細胞を単離する。所望の抗体を産生する融合細胞を選択し、クローン化し、該融合細胞からモノクローナル抗体を調製することにより、本蛋白質の抗体を得ることも可能である。以下にこのような抗体の取得方法について詳述する。モノクローナル抗体を産生する融合細胞の作製は通常の方法、例えば、ハイブリドーマテクニックス（コールド スプリング ハーバー ラボラトリ一発行 Cold Spring Harbor Laboratory press）又は細胞組織化学（山下ら、日本組織細胞化学学会編、1986）等に記載される方法により行うことができる。免疫動物としては、マウス、ラット、ハムスター等の哺乳動物を用いることができる。通常マウスが最も汎用され、Balb/cマウス、その他の系(strain)のマウスを用いることができる。この際、十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるように、免疫計画および抗原の濃度を選べばよい。例えばマウス1匹に0.05mgから2mgの抗原を2週間間隔で腹腔に3回免疫する。必要に応じてさらに0.05mgから2mgを静脈に投与してもよい。最終免疫の数日後に細胞融合のための脾臓を摘出する。前記のように免疫した哺乳動物の個体から脾臓を無菌的に摘出し、当該組織から細胞懸濁液状態の脾臓細胞を調製する。該脾臓細胞（抗体産生細胞）を適当な骨髄腫細胞と、適当な融合促進剤の存在下で細胞融合させる。骨髄腫細胞としては免疫動物と同種の哺乳動物に由来するものが望ましいが、ラット、ハムスター等の脾臓細胞とマウスの骨髄腫細胞とを融合させることもできる。好ましい融合の比率は約20:1～約2:1の範囲である。約10⁸個の脾臓細胞について0.5～1.5mlの融合促進剤の使用が適当である。好ましい融合促進剤としては、例えば平均分子量1000～4000ポリエチレングリコールを使用できるが、この分野で知られている他の融合促進剤、例えばセンダウイルス（別名HVJ）を用いることもできる。また、融合促進剤を使用せずに電気ショックを用いる方法により細胞融合を行ってもよい。融合細胞は、未融合の脾臓細胞、未融合の骨髄腫細胞および融合細胞の混合物を、未融合の骨髄腫細胞が生育できない選択培地で希釈

し、未融合の細胞を死滅させるのに十分な時間（約1時間）培養することにより選択する。培地は薬剤抵抗性（例えば8-アザグアニン抵抗性）かつ未融合の骨髄腫細胞が生育できない選択培地（例えばHAT培地）が使用される。該選択培地中では未融合の骨髄腫細胞は死滅する。また、未融合の脾臓細胞は非腫瘍性細胞なので、ある一定期間（例えば1週間）後に死滅する。これに対して、融合細胞は親骨髄腫細胞の腫瘍性と、親脾臓細胞の性質を併せ持つため、選択培地中で生育できる。得られた融合細胞についてスクリーニングを行い、本蛋白質と特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する融合細胞を選択する。スクリーニング方法としては、得られた抗体の特異性について、多くの検体を簡単、迅速に、感度よく検出できる方法であればよく、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素標識抗体測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay；ELISA）、マイクロウエスタンプロッティング等が挙げられる。酵素標識抗体測定法としては、さらに具体的には、ストレプトアビジンとビオチンを利用した方法、二抗体サンドイッチ法等が挙げられる。選択された融合細胞を適当な方法（例えば限界希釈法）でクローン化した後、モノクローナル抗体を得る。融合細胞を一定期間、適当な培地で培養することにより、その培養上清からモノクローナル抗体を得ることができる。また、融合細胞を免疫動物の腹腔内に注射し、一定時間後の当該免疫動物の血液および腹水からモノクローナル抗体を得ることもできる。次に抗体クラスの決定・確認を行う。抗体クラスは、通常の方法、例えばアイソタイピングキット（アマシャムファルマシア製）を用いて添付のプロトコールに基づき決定・確認することができる。さらに、抗体クラスに適した方法で、抗体を精製する。モノクローナル抗体はもともと特異性、抗体価ともに高いので、融合細胞を無血清培地で培養し、培養上清を濃縮、硫酸アンモニウムによる塩析行うことによって免疫グロブリン画分を調製すれば簡便に純度の高い抗体を得ることができる。抗体クラスがIgMの場合には、ゲル濾過により夾雜する非特異的IgGを除くことができる。また、市販のHiTrap IgMカラム（アマシャムファルマシア製）を用いて、添付のプロトコールに基づき精製してもよい。一方、IgGクラスの抗体の場合には、プロテインA又はプロテインG（アマシャムファルマシア製）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製が可能である。他の方法としては、抗原結合担体によるアフィニティークロマトグラフィーや種々の担体（例えば陰イオン交換体、陽イオン交換体、ハイドロキシアパタイト、シリカ）を用いた高速液体クロマトグラフィーを挙げることができる。

【0029】上記のようにして調製された抗体等を被験物質とした本発明分析方法により、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定す

る。ここで、抗体等の被験物質としては異なる2種以上の物質を各々独立して用いて本発明分析方法を実施するとよい。本発明分析方法により測定された、抗体等の被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価する。このようにして抗体等の被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定（本発明検定方法）を行うことができる。この場合、前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質（例えば、溶媒、バックグラウンドとなる試験系溶液等であってもよい。）とすることで、他方の被験物質（即ち、上記のようにして調製された抗体）が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよいし、また前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質（即ち、上記のようにして調製された抗体のうちの一つの抗体）が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を基準としながら他方の被験物質（即ち、前者以外の抗体）が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。もちろん、動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子と被験物質（即ち、上記のようにして調製された抗体）との両者を接触させた後の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値（以下、測定値3と記す。）を、動脈硬化病態増悪因子分泌促進因子を接触させ、かつ被験物質を接触させなかった（例えば、溶媒、バックグラウンドとなる試験系溶液等が本発明でいう被験物質となる場合に相当する。）後の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値（以下、測定値4と記す。）と比較することによって、該被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。この場合、該被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、前記測定値を用いて、下記の式に従って動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率として求めるとよい。

$$\text{動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率 (\%)} = [(\text{測定値}4 - \text{測定値}3) / \text{測定値}4] \times 100$$

【0030】動脈硬化病態増悪因子分泌抑制抗体（いわゆる中和抗体）を探索するには、本発明検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する抗体を選抜すればよい。例えば、被験物質である抗体の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を表わす動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率が、統計学的に有意な値を示す物質、具体的に好ましくは、例えば、30%以上を示す物質、より好ましくは50%以上を示す物質を、動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する抗体（いわゆる中和抗体）として選抜することができる。

【0031】本発明探索方法により選抜される物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤（以下、本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤と記す。）は、その有効量を経口的または非経口的にヒト等の哺乳動物に対し投与することができる。例えば、経口的に投与する場合には、本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤は錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の通常の形態で使用することができる。また、非経口的に投与する場合には、本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤を溶液、乳剤、懸濁液等の通常の液剤の形態で使用することができる。前記形態の本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤を非経口的に投与する方法としては、例えば注射する方法、坐剤の形で直腸に投与する方法等を挙げることができる。前記の適当な投与剤型は許容される通常の担体、賦型剤、結合剤、安定剤、希釈剤等に本発明探索方法により選抜される物質またはその薬学的に許容される塩を配合することにより製造することができる。また注射剤型で用いる場合には、許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。投与量は、投与される哺乳動物の年令、性別、体重、疾患の程度、本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常は経口の場合には成人で1日あたり有効成分量として約1mg～約2g、好ましくは有効成分量として約5mg～約1gを投与すればよく、注射の場合には成人で有効成分量として約0.1mg～約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。尚、本動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤の適用可能な疾患としては、動脈硬化性疾患等をあげることができる。

【0032】さらに本発明は、

1. 動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法であつて、(1) 非ヒト動物に本蛋白質をコードする遺伝子が導入されてなる形質転換非ヒト動物に、被験物質を投与する第一工程、及び(2) 前記第一工程後に、前記形質転換非ヒト動物の細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する第二工程を有することを特徴とする分析方法；
2. 前項1記載の分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定方法；

3. 異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質であることを特徴とする前項2記載の検定方法；
4. 前項2記載の検定方法により評価された動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力に基づき動脈硬化病態増悪因子

分泌抑制能力を有する物質を選抜することを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制物質の探索方法、及び
5. 前項4記載の探索方法により選抜された物質またはその薬学的に許容される塩を有効成分とすることを特徴とする動脈硬化病態増悪因子分泌抑制剤、等も提供する。

【0033】本蛋白質をコードする遺伝子（本遺伝子）が導入されてなる形質転換非ヒト動物は、以下のようにして構築することができる。形質転換非ヒト動物の構築に用いられる動物としては、マウス、ラット等のげっ歯類動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ等の大型哺乳動物、鳥類、魚類等が挙げられる。好ましくはマウスがよい。

【0034】以下に、一例として、形質転換非ヒト動物が形質転換マウスである場合の構築方法について詳細に説明する。形質転換マウスの作製における本遺伝子の導入法としては、例えば、マイクロインジェクション法、レトロウイルスを用いる方法、胚性未分化細胞（ES細胞）を用いる方法等を挙げができる。このうち、マイクロインジェクション法が最も汎用されている。マ

イクロインジェクション法とは、マイクロマニピュレーターを用いて、顕微鏡下で受精卵の前核内部に外来遺伝子を含んだ溶液を注入する方法である。以下にこの方法を用いる場合の本遺伝子の導入法についてさらに具体的に説明する。まず、本遺伝子を受精卵に注入する。その際、遺伝子を高い確率で染色体へ組むためには、本遺伝子の単離に用いたベクター領域を可能な限り除去すること、mRNAの不安定化に寄与するAUに富む領域を除くこと、直鎖状にすることが好ましい。また、本遺伝子に対してイントロンを予め挿入しておくことが好ましく、当該イントロンとしては、例えば、-グロビンイントロン等を挙げができる。受精卵は、目的に応じた系統のマウスから採取する。近交系のC57BL/6マウスやC3Hマウス、あるいはC57BL/6マウスと他系統のマウスとの交雑系（例えば、(C57BL/6 × DBA/2)F₁等）、非近交系のICRマウスが挙げられる。受精卵は、通常、妊娠血清ゴナドトロピンとヒト絨毛性ゴナドトロピンとの両者の腹腔内投与により過剝排卵を誘発させた雌マウスと雄マウスとを交尾させた後、前記雌マウスから採取する。尚、採取した受精卵は培養用ドロップに入れ、CO₂ガスインキュベーターで培養・維持することにより、本遺伝子の注入操作まで保管することができる。本遺伝子の注入はマイクロマニピュレーターをセットした倒立顕微鏡下で行なう。

用いられる受精卵としては、雄性前核が雌性前核より大きくなる頃から両前核が融合するまでの発達段階にあるものを用いるとよい。まず受精卵を固定し、当該受精卵の雄性前核内に本遺伝子を含有するDNA溶液を注入する。当該DNA溶液は必要に応じて複合体として調製する。複合体形成に用いられる物質としては、リポソーム、リン酸カルシウム、レトロウイルス等を挙げること

ができる。DNA溶液の注入は雄性前核が膨らむことにより確認できる。DNA注入量としては、例えば、約200～約3,000コピーの本遺伝子を含む量を挙げることができる。このようにして、本遺伝子が注入された受精卵は胚盤胞になるまで前記と同様にして培養した後、仮親の子宮に移植する。好ましくは本遺伝子の注入操作後ただちに仮親の卵管に移植するとよい。仮親としては、精管切斷手術を施した雄マウスと交尾させて偽妊娠状態にした雌マウスを用いるとよい。具体的には、まず当該雌マウス背側の腎臓付近の皮膚と筋層を切開して卵巣・卵管・子宮を引き出し、卵巣膜を破いて卵管口を探し出す。次いで本遺伝子の注入操作後に生き残った受精卵を該卵管口から移入し、卵巣・卵管・子宮を腹腔内に戻した後、筋層を縫合し、皮膚をクリップでとめる。約20日後に仔が生まれる。得られた仔の体組織の一部、例えば尾の一部、を切り取り、当該部位から抽出されたDNAのサンプルティング等により本遺伝子の存在有無を確認する。このようにして、本遺伝子が非ヒト動物に導入されたことを確認できる。あるいは他の方法、例えばPCRなどの確認方法を利用してもよい。形質転換非ヒト動物への被験物質の投与は、通常の方法を用いればよい。例えば、被験物質を飼料や飲水に混合する方法や、直接投与する方法（例えば静脈内投与や、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与）が挙げられる。また、必要に応じて、被験物質を投与する前に予備飼育を行ってもよい。投与量および投与期間は、動物の種類、週齢、採用される投与方法等により適宜選択することができるが、例えば、げっし類動物等の非ヒト動物に対する腹腔内投与の場合には通常約0.1mg/kg・体重/日～約10mg/kg・体重/日、げっし類動物等の非ヒト動物に対する経口投与の場合には約1mg/kg・体重/日～約100mg/kg・体重/日の被験物質を2～4週間程度投与すればよい。形質転換非ヒト動物の細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を測定する方法としては、例えば、形質転換非ヒト動物から血管内皮細胞を採取し、当該細胞を材料にして前述と同様な方法で測定すればよい。あるいは、形質転換非ヒト動物の血液中に分泌される動脈硬化病態増悪因子の量を測定しても良い。このようにして本発明分析方法により測定された、被験物質として異なる2種以上の物質を各々独立して用いた区における、動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値を比較することにより得られる差異に基づき前記物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価する。このようにして被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力の検定を行うことができる。上記検定方法において、前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有さない物質（例えば、溶媒、バックグラウンドとなる試験系溶液等であってもよい。）とする

ことで、他方の被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよいし、また前記異なる2種以上の物質のうち、少なくとも一つの物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を基準としながら他方の被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。もちろん、被験物質が投与された後の形質転換非ヒト動物の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値（以下、測定値5と記す。）を、被験物質が投与されなかった形質転換非ヒト動物の血管内皮細胞から分泌される動脈硬化病態増悪因子の量又はその量と相関関係を有する指標値（以下、測定値6と記す。）と比較することによって、該被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を評価してもよい。この場合、該被験物質の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、前記測定値を用いて、下記の式に従って動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率として求めるといい。動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）=[（測定値6-測定値5）/測定値6]×100

【0035】実施例

以下に本発明を実施例で説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0036】実施例1（本遺伝子の単離：配列番号1で示されるアミノ酸配列及びその部分配列からなる蛋白質をコードする遺伝子の単離）

（1-1）配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子の単離

ヒト腹腔内脂肪組織からグアニジンチオシアネート/セシウムクロライド法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) により調製された全RNA 1.0 μg を鋳型にして、これとcDNA合成キット（宝酒造社製）に添付のオリゴdTプライマーとを混合した後、1mM dNTP の存在下でMMTV逆転写酵素（宝酒造製）50ユーニットを添加し、室温で10分間、ついで42、15分間、さらに99、5分間保温することによって、1本鎖cDNAを合成した。続いて該1本鎖cDNA 2.0 μg を鋳型に用いて、配列番号2で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号3で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドの各20pmolをプライマーとして、200 μM dNTP、1.5 mM MgCl₂ 存在下でDNAポリメラーゼ（パーキンエルマー製）1ユーニットを添加し、94、1分間、さらに72、2分間の保温を1サイクルとしてこれを55サイクル行う条件下でPCR反応を行った。得られたPCR反応産物を1%アガロースゲル電気泳動に供し（泳動バッファー；トリス-硼酸緩衝液（ナカライトスク製）、約1.5kbpのDNAバンドをゲルから切り出し、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.著：「Molecular Cloning Second Edition」、Cold Spring Harbor Laboratory Press

(1989年)に記載されている方法により、プラスミドベクターpUC118(宝酒造製)のHincIIサイトにクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列を、Taq Dye Primer Cycle Sequencing KitおよびTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオシステムズ製)を用いてアプライドバイオシステムズ製の373A型のDNAシークエンサーにより決定した。該DNAは配列番号6で示される塩基配列からなり、該塩基配列は、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードしていた。このようにして配列番号1で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子を単離した。

【0037】(1-2)配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列からなる蛋白質をコードする遺伝子の単離

実施例1(1-1)でクローニングされたDNAを鋳型にして、配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号5で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、94、1分間、ついで60、1分間、さらに72、2分間の保温を1サイクルとして、これを30サイクル行う条件下でPCRを行い、配列番号6で示される塩基配列の96番目から1493番目の塩基配列を含むDNAを増幅した。このようにして配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列からなる蛋白質をコードする遺伝子を単離した。

【0038】実施例2(配列番号1で示されるアミノ酸配列及びその部分配列からなる蛋白質の発現プラスミドの調製)

実施例1(1-2)において増幅・単離されたDNAをNdeIとBamHIで消化し、得られた約1.4kbのDNAを発現ベクターpET11a(ノバジェン製)のNdeI、BamHIサイトにサブクローニングし、配列番号1のアミノ酸番号27番から491番で示されるアミノ酸配列のアミノ末端にメチオニンが付加されたアミノ酸配列を有する蛋白質を産生させるための発現プラスミドpET11a085(図1)を得た。次に、該発現プラスミドpET11a085で大腸菌DE3株(ノバジェン製)を形質転換した。一方、配列番号1で示されるアミノ酸配列における第1番目のアミノ酸から第491番目までのアミノ酸で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質を産生させるための発現プラスミドは、実施例1(1-1)において増幅・単離されたDNAを、通常の遺伝子工学的方針によって公知のベクターpCDL-SR296(Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N., Mol. Cell Biol. Jan. 1988, p466-472)に組み込みことにより調製された。このようにして調製された発現プラスミドを用いて、リポフェクトアミン(GibcoBRL製)により、サル由来のCOS1細胞(ATCC

製)を形質転換した。

【0039】実施例3(本蛋白質の調製:配列番号1で示されるアミノ酸配列及びその部分配列からなる蛋白質標品の調製)

実施例2で得られた形質転換体を、37でO.D.600が0.6になるまで培養し、終濃度1mMのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(以下、IPTGと記す。)を添加し、さらに一晩培養した。次いで、遠心分離操作により集菌し、菌体を100mMトリス-塩酸(pH7.6)、5mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(以下、EDTA·2Naと記す。)、5mMジチオスレイトール(以下、DTTと記す。)及び1mMフェニルメチルスルホニルフルオライド(以下、PMSFと記す。)を含むバッファー(以下、バッファーAと記す。)に懸濁して、超音波処理(氷冷下、5分間×3回)により菌体を破碎し、この破碎液を12,000×g、15分間、4で遠心分離し、沈殿(以下、封入体画分と記す。)を回収した。該封入体画分に、2M尿素を含むバッファーAを添加し、懸濁して、超音波処理(氷冷下、5分間×1回)を行った。前記の超音波処理後の溶液を12,000×g、15分間、4で遠心分離し、得られた沈殿に、4M尿素を含むバッファーAを添加して懸濁、超音波処理、遠心分離するという操作を前記と同様に行った。さらに、得られた沈殿に、6M尿素を含むバッファーAを添加して懸濁、超音波処理、遠心分離するという操作を前記と同様に行った。得られた沈殿を20mMトリス-塩酸(pH8.5)、2mM DTTおよび8M尿素を含むバッファーに懸濁し、該懸濁液を12,000×g、15分間、4で遠心分離し、上清を分取した。得られた上清を、HiLoad Superdex 200 pg(ファルマシア製)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供した(流速;1.0ml/分、検出波長;280nm)。45分から55分の間に溶出されるピーク画分を集めてセントリコン(グレースジャパン製、分画分子量30,000)で濃縮し、次に、モノQ HR10/10イオン交換カラム(ファルマシア製)を用いたクロマトグラフィー(流速1.0ml/分、0~1M NaClグラディエント、検出波長;280nm)に供した。約100~約200mM NaClで溶出される画分を集めて、セントリコン(グレースジャパン製、分画分子量30,000)で1mg蛋白質/mlになるように濃縮した。得られた蛋白質画分に、該画分の容量の1/3量の100mMトリス-塩酸(pH8.5)をゆるやかに攪拌しながら添加した。さらに、室温で一晩、緩やかに攪拌を続けた。次いで、18,000×g、20分間、4で遠心分離して上清を回収し、該上清に、その容量の7倍量の2M尿素、20mMトリス-塩酸(pH8.5)、4mM還元型グルタチオン及び0.4mM酸化型グルタチオンを含むバッファーを加えて緩やかに攪

拌した。得られた溶液を分画分子量が25,000の透析チューブに入れ、該溶液量の1000倍量の2M尿素、20mMトリス・塩酸(pH8.5)、4mM還元型グルタチオン及び0.4mM酸化型グルタチオンを含むバッファーに対して、4で8~16時間透析した。次に、透析チューブ内液量の1000倍量の20mMトリス・塩酸(pH8.5)、4mM還元型グルタチオン及び0.4mM酸化型グルタチオンを含むバッファーに対して、4で8~16時間透析した。さらに、透析チューブ内液量の1000倍量の20mMトリス・塩酸(pH8.5)、1mM還元型グルタチオン及び0.1mM酸化型グルタチオンを含むバッファーに対して、4

で8~16時間透析した。得られた、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列からなる蛋白質を以下、本蛋白質標品と記す。尚、本蛋白質標品について、そのSDS-PAGEでの分子量を測定したところ、49KDであった。一方、配列番号1で示されるアミノ酸配列における第1番目のアミノ酸から第491番目までのアミノ酸で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質は、実施例2で形質転換されたサル由来のCOS1細胞を、通常の細胞培養法に従って培養することにより培地中に当該蛋白質を分泌させ、さらに分泌された蛋白質を通常のカラムクロマトグラフィーによる蛋白質分離法に従って培地中から回収・精製することにより蛋白質標品として得た。当該蛋白質標品について、そのSDS-PAGEでの分子量を測定したところ、52KDであった。

【0040】実施例4（血管内皮細胞の調製）

(4-1) 血管内皮細胞の調製

ヒト大動脈血管内皮細胞は、Clonetics社から購入した。タイプIコラーゲンコートのディッシュ上で、37%、5%CO₂濃度条件下で、ハイドロコーチゾン(400ng/ml), human basic fibroblast growth factor(4ng/ml), human epidermal growth factor(10ng/ml), 5%ウシ胎児血清(Clontech社)を加えたMCDB 131 medium(Clontech社)(以下、本増殖培地と記す。)で培養した。継代数4~6の血管内皮細胞を得て、以下の試験に供した。

(4-2) 血管内皮細胞への本蛋白質標品の接觸
上記(4-1)で得られた血管内皮細胞を、タイプIコラーゲンコートの24ウエルプレートに、1ウエルあたり1×10⁵個播き込み、本増殖培地で48時間培養した。培養上清を捨てて10%ウシ胎児血清(Gibco社)、ペニシリソ(100U/ml)およびストレプトマイシン(100μg/ml)を含むmedium 199(Gibco)(以下、本試験培地と記す。)に変更後に、本蛋白質標品を3, 10, 30, 100 ng/mlの濃度で添加し、16時間培養した。

(4-3) 本蛋白質標品が有する動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力の検定

16時間後に培養上清を回収し、M-CSF濃度をEL

ISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法(R&D社)を用いて測定した(以下、測定値1と記す。)。本蛋白質標品を添加しない場合についても培養上清中に分泌されたM-CSF濃度を測定した(以下、測定値2と記す。)。両測定値から、本蛋白質標品が有する動脈硬化病態増悪因子分泌促進能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌促進率(%)として算出した。

$$\text{動脈硬化病態増悪因子分泌促進率(%)} = (\text{測定値1} / \text{測定値2}) \times 100$$

その結果、本蛋白質標品の添加濃度が、3ng/ml、10ng/ml、30ng/ml、および100ng/mlの時、算出された動脈硬化病態増悪因子分泌促進率はそれぞれ、109%、168%、285%および456%であった。同様に、16時間後に回収した培養上清中のMCP-1濃度を、ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法(R&D社)を用いて測定した。その結果、本蛋白質標品の添加濃度が、3ng/ml、10ng/ml、30ng/mlおよび100ng/mlの時、算出された動脈硬化病態増悪因子分泌促進率はそれぞれ、121%、203%、249%および261%であった。

【0041】実施例5（本発明分析方法及び本発明検定方法）

実施例(4-1)で得られた血管内皮細胞を、タイプIコラーゲンコートの24ウエルプレートに、1ウエルあたり1×10⁵個播き込み、本増殖培地で培養する。48時間後に培地を、本蛋白質標品(最終濃度として100ng/ml)及び被験物質(最終濃度として50μM)を含む本試験培地と交換し、さらに16時間培養を続ける。培養上清を回収し、回収した培養上清中のMCP-1濃度またはM-CSF濃度を、ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法(R&D社)を用いて測定する。本蛋白質標品添加・被験物質添加区における測定値(以下、測定値11と記す。)、本蛋白質標品添加・被験物質無添加区における測定値(以下、測定値12と記す。)及び本蛋白質標品無添加・被験物質無添加区における測定値(以下、測定値13と記す。)の3者から、被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌量抑制率(%)として算出する。

$$\text{動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率(%)} = [(\text{測定値12} - \text{測定値11}) / (\text{測定値12} - \text{測定値13})] \times 100$$

【0042】実施例6（モノクローナル抗体の調製）

(6-1) マウスの免疫感作

実施例3で得られた本蛋白質標品によりマウスを免疫する。マウスは7週齢の雌性Balb/cマウス(チャールズリバー(株))を5匹使用する。1週間の予備飼育の後、マウス一匹あたり100μgの本蛋白質標品を完

全フロイントアジュバント(ディフコ製)100μlと混合して腹腔内投与する。さらに2週間後に前記と同量の本蛋白質標品を不完全フロイントアジュバント(ディフコ製)100μlと混合して同様に、腹腔内投与する。さらに2週間後、および4週間後に前記と同量の本蛋白質標品/不完全フロイントアジュバント混合物を腹腔内投与する。

【0043】(6-2)細胞融合

前記(6-1)に記載される操作により抗体価の上昇したマウスから脾臓細胞を調製する。得られた脾臓細胞(10⁸細胞/m1)1m1とマウス骨髄腫細胞P3/X63A-g8U.1(2×10⁷細胞/m1)1m1を24穴プレートのウエル内で混合し、通常の方法(例えば、大河内ら、実験医学、5,1315-1319等に記載の方法)に従って、細胞融合装置(SSH-2、島津製作所製)にて電気的に融合させる。得られた融合細胞をFBS、メルカプトエタノール、ピルビン酸をそれぞれ10%、50μM、1mM含むHAT培地(GIBCO製)に懸濁し、96穴プレート(ヌンク製)に1ウエルあたり100μlずつ分注する。該細胞懸濁液が分注された96穴プレートを5%CO₂存在下、37で培養する。2日後に各ウエルから培地を除き、前記HAT培地100μlを添加する操作を繰り返しながら約10日間培養する。

【0044】(6-3)融合細胞の選択とクローニング
前記の操作により増殖可能な融合細胞を選抜する。該融合細胞の培養上清を用いて、ELISA法により本蛋白質の抗体が産生されていることを確認する。まず、本蛋白質標品を140mM NaCl、2.7mM KCl、10mMNa₂HPO₄および1.8mM KH₂PO₄(pH7.4)を含有する溶液(以下、PBS溶液と記す。)で、2μg/m1となるように希釈し、コーティング液を調製する。該コーティング液をポリスチレン製の96穴マイクロタイヤープレートに、1ウエルあたり50μlずつ分注した後、4で一晩保温する。コーティング液を除去した後、各ウエルに300μlのPBS溶液を添加し、ウエル内部を洗浄する。次にPBS溶液を除去した各ウエルにブロッキング溶液(ブロックエース、大日本製薬製)を1ウエルあたり200μl添加した後、室温で2時間保温してブロッキングを行う。ブロッキング液を除去後、各ウエルに0.05% Tween20を含有するPBS溶液(以下、洗浄液と記す。)300μl添加し、ウエル内部を洗浄する。洗浄液を除去した後、前記融合細胞の培養上清を1ウエルあたり50μl添加し、室温で1時間保温する。該抗原抗体反応液を除去した後、1ウエルあたり300μlの洗浄液を添加し、ウエル内部を洗浄する。次いで、ペルオキシダーゼで標識した抗マウスIgG(Cappel社製)を1ウエルあたり50μl添加し、室温で1時間保温する。抗マウスIgG溶液を除去し、1ウエルあたり

300μlの洗浄液を添加し、ウエル内部を洗浄する。ウエル内の洗浄液を除去し、新たな洗浄液を添加し、洗浄する操作をさらに2回繰り返す。最後に洗浄液を除去した後、オルトフェネレンジアミン/過酸化水素水溶液(オルトフェネレンジアミン10mg/25ml、30%過酸化水素水2μl/25ml)を1ウエルあたり100μl添加し、マイクロタイヤープレートをアルミホイルで被覆し、室温で20分間保温する。保温後、2N硫酸を1ウエルあたり50μl添加し、ペルオキシダ

10 ゼ反応を停止する。分光光度計を用いて、各ウエルの490nm及び595nmの吸光度を測定し、両者の差を算出する(以下、490-595nmと記す。)。融合細胞の培養上清を種々の倍率で希釈した溶液を用いて上記のELISA法を行い、同一希釈率で大きい490-595nmを示す抗体を産生する融合細胞クローン、又は抗体産生能力の高い融合細胞クローンを得る。上記のようにして得られた融合細胞クローンに対して限界希釈法(例えば、黒木ら、実験医学「細胞工学ハンドブック」、羊土社刊等に記載されている方法)によるクローニングを行う。

【0045】(6-4)抗体の精製

上記の方法で選抜した融合細胞クローンを、FBS、ピルビン酸ナトリウム、メルカプトエタノール、ペニシリソ、ストレプトマイシン(GIBCO製)をそれぞれ終濃度10%、1mM、5×10⁻⁵M、100ユニット/ml、100μg/mlとなるように添加したRPMI-1640培地(GIBCO製)(以下、血清培地と記す。)に5×10⁵~1×10⁶細胞/mlになるように懸濁して、5%CO₂存在下、37で培養する。2~3日ごとに培地を除去し、新たな血清培地を添加する操作を繰り返しながら、細胞濃度が5×10⁶~1×10⁷細胞/ml程度まで増殖させた後、培養液を1,500rpm、3分間、4で遠心分離して沈査を回収する。回収した沈査をペニシリソ、ストレプトマイシンをそれぞれ終濃度100ユニット/ml、100μg/mlとなるように添加したCDハイブリドーマ(GIBCO製)(以下、無血清培地と記す。)に、5×10⁵~1×10⁶細胞/mlになるように懸濁して、5%CO₂存在下、37で培養する。培地を除去し、新たな血清培地を添加し、培養する操作を2~3日ごとに繰り返しながら、融合細胞濃度が5×10⁶~1×10⁷細胞/ml程度まで増殖させた後、培養液を1,500rpm、3分間、4で遠心して上清を回収する。回収された上清(融合細胞上清)を0.22μmのフィルターで濾過して濾液を得る。該濾液を用いてアイソタイピングキット(アマシャムファルマシア製)により添付のプロトコールに従って、当該濾液中に含まれる抗体の抗体クラスを確認する。前記濾液から、モノクローナル抗体トラップキット(アマシャムファルマシア製)を用いてIgGを精製する。具体的には、蒸留水5mlとキットに添付の

結合バッファー 5 ml で予め洗浄、平衡化した Hi Trap Protein G カラム（ベッド体積 1 ml）に、結合バッファーで 2 倍に希釈した前記濾液を供する。さらに結合バッファー 7 ml でカラムを洗浄した後、溶出バッファー 6 ml をカラムに供する。あらかじめキットの中和液 7.5 μl が入ったチューブに溶出液を 1 ml ずつ分取する。各チューブの溶液の 280 nm における吸光度を測定し（以下、測定値 16 と記す。）、IgG のモル吸光係数 = 1.35 から下記の式に従って IgG の回収量を算出する。

IgG 回収量 (mg) = 測定値 16 / 1.35 × 1
また、前記濾液から、Hi Trap IgM purification カラム（アマシャムファルマシア製）を用いて、添付のプロトコールに従って IgM を精製する。IgG の場合と同様にして、IgM の回収率を算出する。

【0046】実施例 7（本発明探索方法）

実施例 6 で得られるモノクローナル抗体（被験物質）の動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を測定する。実施例（4-1）で得られた血管内皮細胞を、本増殖培地中で培養する。48 時間後に培地を、本蛋白質標品（最終濃度として 100 ng/ml）及び前記モノクローナル抗体（最終濃度として 0.02~2 μM）を含む本試験培地と交換し、さらに 16 時間培養を続ける。培養上清を回収し、回収した培養上清中の MCP-1 濃度または M-CSF 濃度を、ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）法（R&D 社）を用いて測定する。本蛋白質標品添加・モノクローナル抗体添加区における測定値（以下、測定値 17 と記す。）、本蛋白質標品添加・モノクローナル抗体無添加区における測定値（以下、測定値 18 と記す。）及び本蛋白質標品無添加・モノクローナル抗体無添加区における測定値（以下、測定値 19 と記す。）の 3 者から、モノクローナル抗体が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）として算出する。

動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%） = [(測定値 18 - 測定値 17) / (測定値 18 - 測定値 19)] × 100

その結果、当該モノクローナル抗体が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を表わす動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率が、30% 以上である場合には、そのモノクローナル抗体は動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を有する物質として選抜される。

【0047】実施例 8（本発明形質転換血管内皮細胞の調製）

実施例 2 で調製した、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における第 1 番目のアミノ酸から第 491 番目のアミノ酸で示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子をベクター pCDL-SR 296 (Takebe, Y., Seiki, M., 50

Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N., Mol. Cell Biol. Jan. 1988, p 466-472 のマルチクローニングサイト中に挿入し、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における第 1 番目のアミノ酸から第 491 番目のアミノ酸で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の発現プラスミド（以下、本発明プラスミド）を作製し、本発明プラスミドにより、血管内皮細胞を形質転換する。実施例（4-1）で得られた血管内皮細胞を、タイプ I コラーゲンコートの 96 ウエルプレートに、1 ウエルあたり 100 μl の本増殖培地に 1~2 × 10⁴ 個となるように播き込み、5% CO₂ 存在下、37℃ にてあらかじめ培養しておく。一方、フェージーン試薬（ベーリンガー製）約 14 μl と OPTI-MEM I 培地（GIBCO 製）約 600 μl を混合する。室温で 5 分間保温後、これに本発明プラスミド約 6 μg を含む溶液を約 60 μl 添加し、さらに室温で 15 分間保温し、プラスミド混液とする。該プラスミド混液を、前記の細胞懸濁液に 1 ウエルあたり約 7 μl ずつ添加し、翌日、本増殖培地と交換し、本発明形質転換血管内皮細胞を得る。

【0048】実施例 9（本発明形質転換血管内皮細胞を用いた、動脈硬化病態増悪因子量又はその量と相関関係を有する指標値の分析方法及びその利用）

実施例 8 で得られた本発明形質転換血管内皮細胞を、実施例 5 で用いられた血管内皮細胞に代えて用いる以外は実施例 5 と同様な方法により、培養上清中に分泌された MCP-1 又は M-CSF の濃度を、ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）法を用いて測定する（以下、この場合における測定値を測定値 20 と記す。）。被験物質を添加しない場合についても培養上清中に分泌された MCP-1 又は M-CSF の濃度を測定する（以下、この場合における測定値を測定値 21 と記す。）。これらの測定値から、被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）として算出する。

動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%） = [(測定値 21 - 測定値 20) / (測定値 21)] × 100

【0049】実施例 10（形質転換非ヒト動物の作製：形質転換マウスの作製）

（10-1）導入遺伝子断片の調製

配列番号 7 と配列番号 8 で示される塩基配列からなる DNA 各 10 pmol をプライマーとして、マウス肝臓 cDNA ライブライアリ（クローンテック製）から、配列番号 9 で示される塩基配列を含む DNA を増幅する。すなわち、Ex Taq ポリメラーゼ 2.5 ユニット（宝酒造製）を用いて、94℃ で 2 分間、58℃ で 2 分間、72℃ で 2 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 1 サイクル、次に 94℃ で 1 分間、58℃ で 1 分間、72℃ で 1 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 55 サイクル、最

後に72で5分間保温の条件でPCR反応を行う。増幅されたDNAをBamHIとEcoRIで消化し、得られた約1.5kbの断片をpBluescriptSK(+)（東洋紡製）のBamHI、EcoRI部位に挿入し、プラスミドpBluesK/m085（図2）を得る。pBluesK/m085のEcoRI、SalI部位に、プラスミドpEE6（Nuc. Acid.Res., 17, 7110）をEcoRIとSalIで消化して得られる約0.5kbの断片を挿入し、プラスミドpBluesK/m085/polyA（図3）を得る。次に、pBluesK/m085/polyAから、配列番号9で示される塩基配列を含むDNAおよびSV40EポリAを含むBamHI断片（約1.7kbp）を取得する。得られる約1.7kbの断片を、プラスミドpcDL-SR 296（Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N., Mol. Cell Biol. Jan. 1988, p466-472）のBamHIサイトに挿入し、プラスミドpcDL-SR 296/m085/polyAを得る。pcDL-SR 296/m085/polyAを制限酵素で消化し、プロモーター領域、配列番号9で示される塩基配列を含むDNAおよびSV40EポリAを含む断片を約5μg取得する（以下、本導入遺伝子と記す。）。本導入遺伝子を10mMトリス・塩酸（pH8.5）、1mM EDTA・2Na（pH8.5）で0.1μg/μlとなるように調製することで本導入遺伝子調製液を得る。

【0050】(10-2)受精卵の採取

C57BL/6J系の雌性および雄性のマウス（8週齢以上）を用い、5単位の妊娠血清性ゴナドトロピンとヒト織毛性ゴナドトロピンとの両者の腹腔内投与により過剰排卵を惹起し、体外受精によって前核期受精卵を得る。該受精卵は、卵丘細胞などを除去するために、mWM培地（5.14g/L NaCl、0.36g/L KCl、0.16g/L KH₂PO₄、0.53g/L 乳酸Ca・5H₂O、0.29g/L MgSO₄/7H₂O、0.19g/L NaHCO₃、37mg/L EDTA/2Na、1g/L グルコース、3.7ml/L 乳酸Na、35mg/L ピルビン酸Na、3g/L ウシ血清アルブミン、80mg/L ベニシリン、50mg/L ストレプトマイシン、5mg/L フェノールレッド）で洗浄する。

【0051】(10-3)受精卵への本導入遺伝子の注入

マイクロインジェクションシステムは、マイクロマニピュレーター装置（ライカ製）とホフマン倒立型顕微鏡（ツァイス製）から構成される。前項（10-1）に記載される本導入遺伝子調製液を約500～約1000コピー/μlに調製し、13,000rpm×3分間遠心分離することにより得られた上清を導入本遺伝子溶液とする。マイクロマニピュレーターのインジェクションチ

ヤンバー内で、前項（10-2）に記載される受精卵を支持ピペットで固定し、注入用ピペットに入れた前記の本導入遺伝子調製液を雄性前核に約2μl注入する。注入後、mWM培地で5%CO₂存在下、37で12～16時間培養する。2細胞期に発生した胚を仮親の卵管に移植する。

【0052】(10-4)受精卵の仮親への移植

前項（10-3）に記載される胚を、予め、移植用に準備した同系の偽妊娠状態の雌性マウスの左右の卵管に1匹あたり20～25個注入する。

【0053】(10-5)形質転換マウスの選抜

受精卵を移植した雌マウスから、約3週間後に仔を得る。仔が6週齢程度になったら尾の一部を切り取って染色体DNAを抽出し、抽出されたDNA中に本導入遺伝子由来の断片が存在するかについてPCR法により調べる。染色体DNAは通常の方法（例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行（Cold Spring Harbor Laboratory press）等に記載されている方法）により抽出する。得られた染色体DNA 5ngを鋳型として、SRプロモーター領域から選んだ塩基配列と、配列番号9で示される塩基配列中から選んだ塩基配列からなるDNA各10pmolをプライマーとして、ExTaqポリメラーゼ2.5ユニット（宝酒造製）を用いて、94で2分間、58で2分間、72

で2分間の保温を1サイクルとしてこれを1サイクル、次に94で1分間、58で1分間、72で1分間の保温を1サイクルとしてこれを55サイクル、最後に72で5分間保温の条件でPCR反応を行う。当該反応により得られるPCR反応産物をアガロースゲル電気泳動に供する。増幅断片が確認された個体を、染色体中に本導入遺伝子が挿入された形質転換マウス（以下、本形質転換マウスと記す。）であると判断する。

【0054】(10-6)本導入遺伝子コピー数の解析

次に、本形質転換マウスにおける本導入遺伝子のコピー数について、通常のサザン blotting法（例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行（Cold Spring Harbor Laboratory press）等に記載されている方法）により調べる。前項（10-1）で得られたプラスミドpcDL-SR 296/m085/polyAをBamHIで消化する。得られる約1.5kbの断片を市販の放射能標識キット（Random Prime Labeling Kit、ベーリングーマンハイム製）を用いて添付のプロトコールに従って³²P標識し、検出プローブとして使用する（以下、本検出プローブと記す。）。本検出プローブは100で10分加熱した後に急冷して使用する。前項（10-5）に記載

される方法に従って抽出した染色体DNAをEco R I、Bam HI、Hind IIIなどの制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動する。電気泳動後のゲルを1.5M NaCl、0.15Mクエン酸三ナトリウムを含む溶液（以下、10×SSCと記す。）で洗浄した後、市販のナイロンメンプランHybond-N（アマシャムファルマシア製）にキャピラリー法でプロッティングする。該メンプランをポリエチレン袋に入れ、変性サケ精子DNAを100μg/mlとなるように添加したDIG EASY Hyb溶液（ベーリングermanハイム製）を加えて、50℃で2時間保温する。袋内の溶液を除去し、新たに、変性サケ精子DNAを100μg/mlとなるように添加したDIG EASY Hyb溶液2~3mlを注入する。さらに、本検出プローブ1ml以下を添加し、50℃で約15時間保温する。保温後、メンプランを取り出して、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム（以下、SDSと記す。）を含む、10×SSCを5倍に希釈した溶液中で室温下15分間保温する。メンプランを取り出し、新たに10×SSCを5倍に希釈した溶液中で保温する操作をさらに1~2回繰り返す。さらに、0.1%SDSを含む、10×SSCを100倍に希釈した溶液中で、50~68℃、30分間保温する。メンプランを取り出し、余分な水分を除去した後、イメージングプレート（BAS3-2040。富士フィルム製）を露光させる。露光後のイメージングプレートをイメージアナライザー（フジフィルム製）で分析し、メンプラン上のシグナルを検出する。本導入遺伝子を導入しないマウス（以下、本野生型マウスと記す。）の染色体DNAを用いること以外は前記と同様にサザンプロッティング法を行い、メンブレン上のシグナルを検出する。本形質転換マウスと本野生型マウスのシグナルを比較し、本形質転換マウスにのみ検出されるシグナルの強度から、本遺伝子の導入コピー数の多少を評価する。

【0055】実施例11（形質転換非ヒト動物を用いた動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法及びその利用：形質転換マウスを用いた動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法及びその利用）

実施例10に記載された方法により構築された本形質転換マウス（雄性）10匹を1群とする。これに、被験物質のポリエチレングリコール溶液を、被験物質純分で10~30mg/kg-体重/日になるように、4週間経口投与する。4週間後に本トランスジェニックマウスから血管内皮細胞を採取する。採取された血管内皮細胞を、実施例5で用いられた血管内皮細胞に代えて用いる以外は実施例5と同様な方法により、培養上清中に分泌されたMCP-1又はM-CSFの濃度を、ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）法を用いて測定する（以下、この場合における測定値を測定値22と記す。）。被験物質

を添加しない場合についても培養上清中に分泌されたMCP-1又はM-CSFの濃度を測定する（以下、この場合における測定値を測定値23と記す。）。これらの測定値から、被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）として算出する。

$$\text{動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）} = [(\text{測定値}23 - \text{測定値}22) / (\text{測定値}23)] \times 100$$

実施例12（形質転換非ヒト動物を用いた動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法及びその利用：形質転換マウスを用いた動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法及びその利用）

実施例10に記載された方法により構築された本形質転換マウス（雄性）10匹を1群とする。これに、被験物質のポリエチレングリコール溶液を、被験物質純分で10~30mg/kg-体重/日になるように、4週間経口投与する。4週間後に本トランスジェニックマウスの血液を採取し、血液中に分泌されたMCP-1又はM-CSFの濃度を、ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）法を用いて測定する（以下、この場合における測定値を測定値24と記す。）。被験物質を添加しない場合についても培養上清中に分泌されたMCP-1又はM-CSFの濃度を測定する（以下、この場合における測定値を測定値25と記す。）。これらの測定値から、被験物質が有する動脈硬化病態増悪因子分泌抑制能力を、下記式で示される動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）として算出する。

$$\text{動脈硬化病態増悪因子分泌抑制率（%）} = [(\text{測定値}25 - \text{測定値}24) / (\text{測定値}25)] \times 100$$

【0056】

【発明の効果】本発明により、血管内皮細胞における動脈硬化病態増悪因子の分泌量の分析方法等が提供可能となった。

[配列表フリーテキスト]

配列番号2

遺伝子を增幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号3

遺伝子を增幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号4

遺伝子を增幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号5

遺伝子を增幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号7

遺伝子を增幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号8

【0057】

遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチド

【配列表】

プライマー

<110> Sumitomo Chemical Co., Lt

d.

<120> A method for analyzing NF
kappa B activity

<130> P151842

<150> JP 2000-236759

<151> 2000-08-04

<160> 6

<210> 1

<211> 491

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn

Ile Leu Leu Ala Thr Asp

1 5 10

15

Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr

Pro Pro Asn Thr Ser Lys

20 25

30

Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys

Lys Thr Glu Asn Ser Lys

35 40

45

Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val

Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr

50 55

60

Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val

Val Thr Lys Glu Lys Ile

65 70 75

80

Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His

Phe Gln Asp Asp Val Phe

85 90

95

Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu

Lys Tyr Asp Gly His Leu

100 105

110

Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly

Phe Val Ile Pro Arg Gly

115 120 125

Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp

Pro Glu Cys Tyr Trp Leu

130 135 140

145

Thr Asn Trp Ile Glu Thr Ile Leu Val Gln

Ser Trp Tyr Pro Ile Thr

145 150 155

1

60

Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys

Ile Leu Ala Lys Tyr Leu

260	265	270
Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp		
Ile Tyr Asn Ala Cys Glu		
275	280	285
Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu		
Ile Val Ser Arg Ser Thr		
290	295	300
Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser		
Gly Asn Pro Leu Asp Thr		
305	310	315
		3
20		
Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys		
Lys Phe Pro Val Thr Glu		
325	330	335
Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro		
Tyr Leu Arg Val Ile Gln		
340	345	350
Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln		
Glu Ile Val Glu Gly Met		
355	360	365
Lys Gln Lys Met Trp Ser Ile Glu Asn Ile		
Ala Phe Gly Ser Gly Gly		
370	375	380
Gly Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp Leu		
Leu Asn Cys Ser Phe Lys		
385	390	395
		4
00		
Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu Gly		
Ile Asn Val Phe Lys Asp		
405	410	415
Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser Lys		
Lys Gly Arg Leu Ser Leu		
420	425	430
His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val Thr		
Leu Glu Glu Gly Lys Gly		
435	440	445
Asp Leu Glu Glu Tyr Gly Gln Asp Leu Leu		
His Thr Val Phe Lys Asn		
450	455	460
Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe Asp		
Glu Ile Arg Lys Asn Ala		
465	470	475
		4
80		
Gln Leu Asn Ile Glu Leu Glu Ala Ala His		
His		
485	490	

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

cacaacacac acccagtcat aaaggctaat 30

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide
 primer for PCR

<400> 4
 tataaacata tgccacccaa cacaagg 27

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide
 primer for PCR

<400> 5
 cagtcaggat ccctaattgtat gtgctg 26

<210> 6
 <211> 1518
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (18)..(1493)

<400> 6
 ctgtccctcg gcccgag atg aat cct gcg gca
 gaa gcc gag ttc aac atc 50
 Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala G
 Iu Phe Asn Ile

1	5	10
---	---	----

ctc ctg gcc acc gac tcc tac aag gtt act

cac tat aaa caa tat cca 98

Leu Leu Ala Thr Asp Ser Tyr Lys Val Thr

His Tyr Lys Gln Tyr Pro

15	20	25
----	----	----

ccc aac aca agc aaa gtt tat tcc tac ttt

gaa tgc cgt gaa aag aag 146

Pro Asn Thr Ser Lys Val Tyr Ser Tyr Phe

Glu Cys Arg Glu Lys Lys

acc aaa gag aaa atc cag gaa gcc aaa gat
 gtc tac aaa gaa cat ttc 290
 Thr Lys Glu Lys Ile Gln Glu Ala Lys Asp
 Val Tyr Lys Glu His Phe
 80 85 90
 caa gat gat gtc ttt aat gaa aag gga tgg
 aac tac att ctt gag aag 338
 Gln Asp Asp Val Phe Asn Glu Lys Gly Trp
 Asn Tyr Ile Leu Glu Lys
 95 100 105
 tat gat ggg cat ctt cca ata gaa ata aaa
 gct gtt cct gag ggc ttt 386
 Tyr Asp Gly His Leu Pro Ile Glu Ile Lys
 Ala Val Pro Glu Gly Phe
 110 115 120
 gtc att ccc aga gga aat gtt ctc ttc acg
 gtg gaa aac aca gat cca 434
 Val Ile Pro Arg Gly Asn Val Leu Phe Thr
 Val Glu Asn Thr Asp Pro
 125 130 135
 gag tgt tac tgg ctt aca aat tgg att gag
 act att ctt gtt cag tcc 482
 Glu Cys Tyr Trp Leu Thr Asn Trp Ile Glu
 Thr Ile Leu Val Gln Ser
 140 145 150 1
 55
 tgg tat cca atc aca gtg gcc aca aat tct
 aga gag cag aag aaa ata 530
 Trp Tyr Pro Ile Thr Val Ala Thr Asn Ser
 Arg Glu Gln Lys Lys Ile
 160 165 170
 ttg gcc aaa tat ttg tta gaa act tct ggt
 aac tta gat ggt ctg gaa 578
 Leu Ala Lys Tyr Leu Leu Glu Thr Ser Gly
 Asn Leu Asp Gly Leu Glu
 175 180 185
 tac aag tta cat gat ttt ggc tac aga gga
 gtc tct tcc caa gag act 626
 Tyr Lys Leu His Asp Phe Gly Tyr Arg Gly
 Val Ser Ser Gln Glu Thr
 190 195 200
 gct ggc ata gga gca tct gct cac ttg gtt
 aac ttc aaa gga aca gat 674
 Ala Gly Ile Gly Ala Ser Ala His Leu Val
 Asn Phe Lys Gly Thr Asp
 205 210 215
 aca gta gca gga ctt gct cta att aaa aaa
 tat tat gga acg aaa gat 722
 Thr Val Ala Gly Leu Ala Leu Ile Lys Lys
 Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp
 220 225 230 2
 35
 cct gtt cca ggc tat tct gtt cca gca gca

335	340	345
ctt aga gtt att caa ggg gat gga gta gat		
att aat acc tta caa gag	1106	
Leu Arg Val Ile Gln Gly Asp Gly Val Asp		
Ile Asn Thr Leu Gln Glu		
350	355	360
att gta gaa ggc atg aaa caa aaa atg tgg		
agt att gaa aat att gcc	1154	
Ile Val Glu Gly Met Lys Gln Lys Met Trp		
Ser Ile Glu Asn Ile Ala		
365	370	375
ttc ggt tct ggt gga ggt ttg cta cag aag		
ttg aca aga gat ctc ttg	1202	
Phe Gly Ser Gly Gly Leu Leu Gln Lys		
Leu Thr Arg Asp Leu Leu		
380	385	390
aat tgt tcc ttc aag tgt agc tat gtt gta		3
act aat ggc ctt ggg att	1250	
Asn Cys Ser Phe Lys Cys Ser Tyr Val Val		
Thr Asn Gly Leu Gly Ile		
400	405	410
aac gtc ttc aag gac cca gtt gct gat ccc		
aac aaa agg tcc aaa aag	1298	
Asn Val Phe Lys Asp Pro Val Ala Asp Pro		
Asn Lys Arg Ser Lys Lys		
415	420	425
ggc cga tta tct tta cat agg acg cca gca		
ggg aat ttt gtt aca ctg	1346	
Gly Arg Leu Ser Leu His Arg Thr Pro Ala		
Gly Asn Phe Val Thr Leu		
430	435	440
gag gaa gga aaa gga gac ctt gag gaa tat		
ggt cag gat ctt ctc cat	1394	
Glu Glu Gly Lys Gly Asp Leu Glu Glu Tyr		
Gly Gln Asp Leu Leu His		
445	450	455
act gtc ttc aag aat ggc aag gtg aca aaa		
agc tat tca ttt gat gaa	1442	
Thr Val Phe Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys		
Ser Tyr Ser Phe Asp Glu		
460	465	470
ata aga aaa aat gca cag ctg aat att gaa		4
ctg gaa gca gca cat cat	1490	
Ile Arg Lys Asn Ala Gln Leu Asn Ile Glu		
Leu Glu Ala Ala His His		
480	485	490
tag gcttatgac tgggtgtgtg ttgtg		
1518		
<210> 7		
<211> 30		
<212> DNA		

<210> 9

<211> 1476

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1476)

<400> 9

atg aat gct gcg gca gaa gcc gag ttc aac

atc ctg ctg gcc acc gac 48

Met Asn Ala Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn

Ile Leu Leu Ala Thr Asp

1 5 10

15

tcg tac aag gtt act cac tat aaa caa tac

cca ccc aac aca agc aaa 96

Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr

Pro Pro Asn Thr Ser Lys

20 25

30

gtt tat tcc tac ttt gaa tgc cgt gaa aag

aag aca gaa aac tcc aaa 144

Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys

Lys Thr Glu Asn Ser Lys

35 40

45

gta agg aag gtg aaa tac gag gaa aca gta

ttt tat ggg ttg cag tac 192

Val Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val

Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr

50 55

60

att ctt aat aag tac tta aaa ggt aaa gta

gtg acc aaa gag aaa atc 240

Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val

Val Thr Lys Glu Lys Ile

65 70

75

80

cag gag gcc aaa gaa gtg tac aga gaa cat

ttc caa gat gat gtc ttt 288

Gln Glu Ala Lys Glu Val Tyr Arg Glu His

Phe Gln Asp Asp Val Phe

85 90

95

aac gaa aga gga tgg aac tac atc ctt gag

aaa tac gat ggt cat ctc 336

Asn Glu Arg Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu

Lys Tyr Asp Gly His Leu

100 105

110

ccg att gaa gta aag gct gtt ccc gag ggc

tct gtc atc ccc aga ggg 384

Pro Ile Glu Val Lys Ala Val Pro Glu Gly

Ser Val Ile Pro Arg Gly

115 120

125

Ser Ala His Leu Val Asn Leu Lys Gly Thr
 Asp Thr Val Ala Gly Ile
 210 215 220

 gct cta att aaa aaa tac tat ggg aca aaa
 gat cct gtt cca ggc tat 720
 Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys
 Asp Pro Val Pro Gly Tyr
 225 230 235 2
 40
 tct gtt cca gca gca gag cac agt acc ata
 acg gct tgg ggg aaa gac 768
 Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile
 Thr Ala Trp Gly Lys Asp
 245 250 255

 cat gag aaa gat gct ttt gaa cac ata gta
 aca cag ttc tca tca gtg 816
 His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val
 Thr Gln Phe Ser Ser Val
 260 265 270

 cct gtg tct gtg gtc agc gat agc tat gac
 att tat aat gcg tgt gag 864
 Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp
 Ile Tyr Asn Ala Cys Glu
 275 280 285

 aaa ata tgg ggt gaa gac ctg aga cat ctg
 ata gta tcg aga agt aca 912
 Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu
 Ile Val Ser Arg Ser Thr
 290 295 300

 gag gca cca cta atc atc aga cct gac tct
 gga aat cct ctt gac act 960
 Glu Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser
 Gly Asn Pro Leu Asp Thr
 305 310 315 3
 20
 gta ttg aag gtc tta gat att tta ggc aag
 aag ttt cct gtt act gag 1008
 Val Leu Lys Val Leu Asp Ile Leu Gly Lys
 Lys Phe Pro Val Thr Glu
 325 330 335

 aac tca aaa ggc tac aag ttg ctg cca cct
 tat ctt aga gtc att caa 1056
 Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro
 Tyr Leu Arg Val Ile Gln
 340 345 350

 gga gat ggc gtg gat atc aat act tta caa

cag ctg aac atc gag cag gac gtg gca cct
 cat tag 1476
 Gln Leu Asn Ile Glu Gln Asp Val Ala Pro

42

【図面の簡単な説明】
is

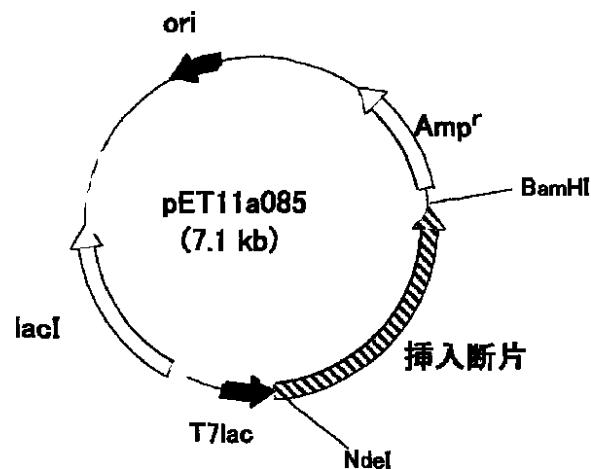
【図1】図1は、プラスミド pET11a085 の構造を示す。図中、斜線部分は、挿入された配列番号6で示される塩基配列の96番目から1493番目の塩基配列を含むDNAを示す。

【図2】図2は、プラスミド pBlueSK/m085

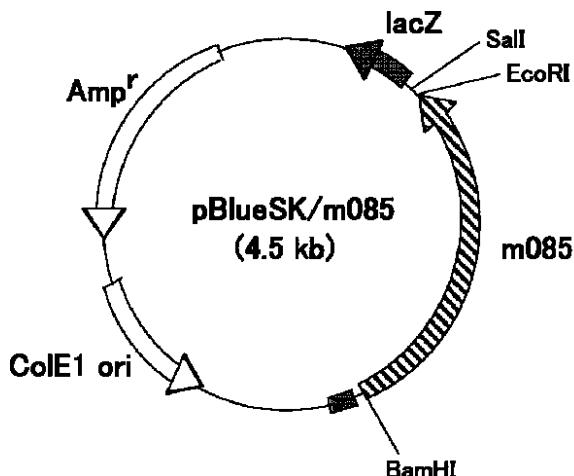
*5の構造を示す。図中、斜線部分は、挿入された配列番号6で示される塩基配列を含むDNAを示す。

【図3】図3は、プラスミド pBlueSK/m085/polyA の構造を示す。図中、斜線部分は、挿入された配列番号9で示される塩基配列を含むDNAを示す。

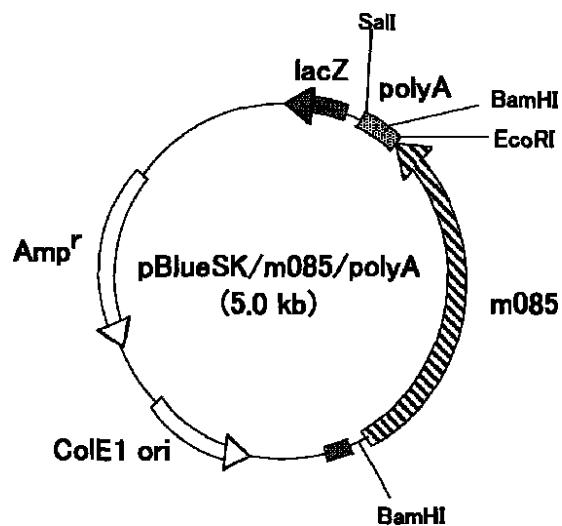
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷
 C 07K 14/47
 C 12Q 1/68
 G 01N 33/15

識別記号

F I
 C 12Q 1/68
 G 01N 33/15
 33/50

テ-マコト[®] (参考)
 A 4H045
 Z
 Z

33/50	33/53
33/53	M
33/566	33/566
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02 C 1 2 N 15/00 A

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50
DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
4B024 AA11 CA04 CA09 DA02 EA04
GA11 GA18
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ53
QQ79 QR55 QR59 QR62 QR77
QR80 QS24 QS25 QS28 QS34
4C084 AA01 AA16 NA14 ZA45
4C085 AA14 DD61
4H045 AA10 BA10 CA40 EA50 FA74

专利名称(译)	分析动脉硬化病原性恶化因子分泌量的方法		
公开(公告)号	JP2003116592A	公开(公告)日	2003-04-22
申请号	JP2001320281	申请日	2001-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	住友化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	住友化学工业株式会社		
[标]发明人	松澤佑次		
发明人	松澤 佑次		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/10 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/10.101 C07K14/47 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53 G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02 C12N15/00.A A61K38/00		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4C084/AA01 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZA45 4C085/AA14 4C085/DD61 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 解决的问题：开发一种有效地分析动脉硬化加重因子的分泌量的方法，该方法对于寻找具有抑制血管内皮细胞中的动脉硬化加重因子的分泌的物质是必不可少的。解决方案：分析动脉硬化恶化因子分泌量的方法，该方法包括：(1)使血管内皮细胞与由任何氨基酸序列(例如特定氨基酸序列)和测试物质组成的蛋白质接触。(2)在第一步之后，分析包括第二步，该第二步测量从血管内皮细胞分泌的动脉硬化加剧因子的量或与其量相关的指标值。现在可以提供方法等。

【図2】

