

(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2001 - 17188

(P2001 - 17188A)

(43)公開日 平成13年1月23日(2001.1.23)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		C 1 2 N 15/00	ZNA A
A 0 1 K 67/027			A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 31/711			A 6 1 K 31/711	
	38/22			D
	39/395		39/395	
			48/00	

審査請求 未請求 請求項の数 66 O L ( 全 52数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 122994(P2000 - 122994)

(22)出願日 平成12年4月24日(2000.4.24)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 115516

(32)優先日 平成11年4月22日(1999.4.22)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(71)出願人 597059742

株式会社ヘリックス研究所

千葉県木更津市矢那1532番地3

(72)発明者 設楽 研也

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工

業株式会社東京研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 ( 外 2 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な V E G F / P D G F 様因子

(57)【要約】 ( 修正有 )

【解決手段】 特定な配列で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質、及びそれをコードするDNAを提供する。

【効果】 本発明によれば、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治癒の遅延を伴う疾患等の治療薬の探索及び開発に有用な増殖因子としての活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、及びこれらの利用方法を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項2】 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【請求項3】 配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【請求項4】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【請求項5】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【請求項6】 配列番号1で示されるアミノ酸配列においてN末から少なくとも226番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【請求項7】 配列番号32で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項8】 配列番号33で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項9】 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である請求項1～8のいずれか一項に記載の蛋白質。

【請求項10】 平滑筋細胞が、ラット由来である請求項9に記載の蛋白質。

【請求項11】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質。

【請求項12】 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質。

【請求項13】 請求項1～10のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項14】 請求項11又は12記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項15】 配列番号2で示される塩基配列を含むDNA。

【請求項16】 請求項13又は15記載のDNAとス

トリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項17】 請求項14記載のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項18】 *Escherichia coli* DH10B/NT2RP4000328 (FERM BP-6686) 及び *Escherichia coli* DH10B/OVARC1001401 (FERM BP-6687) に含有されるプラスミドに含まれ、かつ請求項1記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項19】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを含有してなる組換えベクター。

【請求項20】 請求項19記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項21】 請求項20記載の形質転換体を培地に培養することにより培養物中に請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質を生産蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項22】 請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項23】 抗体が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識する請求項22記載の抗体。

【請求項24】 抗体がハイブリドーマKM2676 (FERM BP-7137) により生産される抗体である請求項22又は23記載の抗体。

【請求項25】 請求項24記載の抗体を生産するハイブリドーマKM2676 (FERM BP-7137)。

【請求項26】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基からなる配列を含むオリゴヌクレオチド又は該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項27】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを用いるハイブリダイゼーション法により、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項28】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応により、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

【請求項29】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを用いるハイブリダイゼーション法により、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項30】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応により、請求項1～12

のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項31】 請求項27～30のいずれか一項に記載の方法を用いて、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患を検出する方法。

【請求項32】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項31記載の方法。

【請求項33】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を抑制する方法。

【請求項34】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を抑制する方法。

【請求項35】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項36】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項37】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を取得する方法。

【請求項38】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を取得する方法。

【請求項39】 請求項13～18のいずれか一項に記載のDNAを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも一種の疾患の診断薬。

【請求項40】 請求項26記載のオリゴヌクレオチドを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも一種の疾患の診断薬。

【請求項41】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項39記載の診断薬。

【請求項42】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過

敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項 40 記載の診断薬。

【請求項 43】 請求項 13～18 のいずれか一項に記載の DNA を含有する医薬。

【請求項 44】 請求項 26 記載のオリゴヌクレオチドを含有する医薬。

【請求項 45】 請求項 13～18 のいずれか一項に記載の DNA を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも 1 種の疾患の治療薬。

【請求項 46】 請求項 26 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも 1 種の疾患の治療薬。

【請求項 47】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse 症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性

下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項 45 記載の治療薬。

【請求項 48】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse 症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項 46 記載の治療薬。

【請求項 49】 請求項 1～12 のいずれか一項に記載の蛋白質を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも 1 種の疾患の診断薬。

【請求項 50】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse 症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項 49 記載の診断薬。

【請求項 51】 請求項 1～12 のいずれか一項に記載の蛋白質を含有する医薬。

【請求項52】 請求項1～10のいずれか一項に記載の蛋白質を含有する、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、脾臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【請求項53】 請求項11又は12記載の蛋白質を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患及び腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【請求項54】 血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、脾臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項52記載の治療薬。

【請求項55】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である請求項53記載の治療薬。

【請求項56】 請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質を用いることを特徴とする、該蛋白質と特異的に結合する受容体のスクリーニング方法。

【請求項57】 請求項56記載の方法により取得される受容体。

【請求項58】 請求項22～25のいずれか一項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質の免疫学的検出法。

【請求項59】 請求項22～25のいずれか一項に記載の抗体を用いて請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質を検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【請求項60】 請求項22～25のいずれか一項に記載の抗体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を

伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、脾臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の診断薬。

【請求項61】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、脾臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される請求項60記載の診断薬。

【請求項62】 請求項22～25のいずれか一項に記載の抗体を含有する医薬。

【請求項63】 請求項22～25のいずれか一項に記載の抗体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【請求項64】 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である請求項63記載の治療薬。

【請求項65】 請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が部分的に又は完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

【請求項66】 請求項1～12のいずれか一項に記載の蛋白質の有する活性が部分的に又は完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な蛋白質、該蛋白質をコードするDNA及び該蛋白質を認識する抗体、並びにそれらを用いる診断薬、医薬及び治療薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血管形成、血管新生活性を有する血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor、以下「VEGF」という) 及び平滑筋細胞の分化、増殖活性を有する血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor、以下「PDGF」という) は構造が類似しており、類縁因子であるPlGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-Eを含めてVEGF/PDGFスーパーファミリーの増殖因子と分類されている。

【0003】血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体 (雌) においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している (J. Folkmanら; J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992)。

【0004】血管新生は、血管新生因子が分泌される過程、これが引き金となって近傍にある既存の血管の内皮細胞からプロテアーゼが分泌される過程、該プロテアーゼにより基底膜及び間質が破壊される過程、続いて血管内皮細胞の遊走及び増殖がはじまる過程、並びに、管腔が形成されることにより血管が新生される過程よりなる (J. Folkmanら; J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992)。血管新生を誘導する因子としては多くの因子の関与が報告されているが、中でも血管透過性因子 (Vascular permeability factor、以下「VPF」という) / VEGFが上記発生段階における血管新生及び病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている (M. Shibuya; Advances in Cancer Research, Vol. 167, 281, 1995)。VPF/VEGFはホモダイマーよりなる分子量約4万の蛋白質であり、1983年にVPFとして (D.R. Sengerら; Science, 219, 983, 1983)、1989年にVEGFとして独立した分子として報告されたが (N. Ferraraら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989)、cDNAクローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった (D.W. Leungら; Science, 246, 1306, 1989; P.J. Keckら; Science, 246, 1309, 1989) (以下、「VEGF」と記載する)。VEGFの活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対しては増殖促進活性 (ED50 = 2-3pM) (N. Ferraraら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989)、遊走促進活性 (A.E. Kochら; J. Immunology, 152, 4149, 1994)

4)、メタロプロテアーゼ分泌促進活性 (E.N. Unemoriら; J. Cell Physiol., 153, 557, 1992)、ウロキナーゼ、tPA分泌促進活性 (M.S. Pepperら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902, 1991)、転写因子ETS-1の発現促進 (C. Iwasakaら; J. Cell Physiol., 169, 522, 1996)、インテグリン  $\alpha_3$  の発現上昇 (D.R. Sengerら; American J. Pathology, 149, 293, 1996) 等が報告され、in vivoにおいては血管新生促進活性 (T. Asaharaら; Circulation, 92 suppl II, 365, 1995)、血管透過性促進活性 (D.R. Sengerら; Science 219, 983, 1983) 等が報告されている。VEGFは血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であることが報告されている (N. Ferraraら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989)。

【0005】ヒトVEGFには、選択的スプライシングにより長さの異なる4種類の蛋白質 (それぞれ121、165、189、206アミノ酸残基よりなるVEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>189</sub>、VEGF<sub>206</sub>) が存在することが報告されている (K.A. Houckら; J. Biol. Chem., 267, 26031, 1991)。最も短い長さのVEGF<sub>121</sub>についても血管新生促進活性、血管透過性亢進活性が報告されている (S. Kondoら; Biochimica et Biophysica Acta, 1243, 195-202, 1995)。VEGF<sub>165</sub>をプラスミンで分解して得られるN末アミノ酸1番目から110番目よりなるVEGF部分フラグメントはVEGF<sub>165</sub>と同等の受容体結合活性を有するが、血管内皮細胞の増殖促進活性が100倍低下することが報告されている (B.A. Keytら; Journal of Biological Chemistry, 271, 7788-7795, 1996)。これらの結果は、受容体結合活性には、1番目から110番目のアミノ酸が関与するが、内皮細胞の充分な活性化にはさらに111番目から165番目のアミノ酸が必要であることを示している。

【0006】VEGFには、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び、活性発現に重要な8個のシステイン残基の存在が報告されている (Journal of Biological Chemistry, 269, 32879-32885, 1994)。これら8個のシステイン残基は、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている (C. Betsholdsら; Nature, 320, 695-699, 1986)。VEGFのアミノ酸残基の改変によりVEGF結合阻害剤を作製することが試みられ、VEGFのループIIの変異体とループIIIの変異体のヘテロダイマーはVEGF結合阻害、血管内皮細胞増殖促進阻害活性を示すことが報告されている (Siemeister, G.ら; Proceeding of National Academy of Science USA, 95, 4625-4629, 1998)。

【0007】ヒトのVEGF受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第1の受容体であるFlt-1 (fms-like tyrosine kinase) (M. Shibuyaら; Oncogene, 5, 519, 1990; C. Vriesら; Scienc

e, 255, 989, 1992) 及び第2の受容体であるKDR (kinase insert domain-containing receptor) (B.I.Termanら; WO92/14748, B.I.Termanら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579, 1992) の2種が報告されている。ヒト型VEGF受容体KDRのマウス型ホモログはFlk-1 (W.Matthewsら; Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026, 1991; A.Ullrichら; WO94/11499 Priority No v. 13, 1992; B.Millauerら; Cell, 72, 835, 1993) と命名されている。Flt-1遺伝子はもともと癌遺伝子fmsと相同性を示す機能未知な新規遺伝子として発見されたが(M.Shibuyaら; Oncogene, 5, 519, 1990)、VEGF蛋白質を用いた発現クローニングによりVEGF受容体遺伝子のクローン化が試みられた結果取得された遺伝子と一致し、Flt-1はVEGF受容体であることが示された(C.Vriesら; Science, 255, 989, 1992)。

【0008】Flt-1及びKDR/Flk-1の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインを有する分子量180~200キロダルトンの膜蛋白質である。VEGFは、Flt-1及びKDR/Flk-1にそれぞれ20pM及び75 pMのKD値で特異的に結合する。また、Flt-1及びKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている(T.P.Quinnら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533, 1993; R.L.Kendallら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915, 1993)。

【0009】血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症及び慢性関節リュウマチの病態形成にVEGFが深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに、腎癌(A.Takahashiら; Cancer Research, 54, 4233, 1994)、乳癌(L.F.Brownら; Human Pathology, 26, 86, 1995)、脳腫瘍(R.A.Berkmanら; J. Clinical Investigation, 91, 153, 1993)、消化器癌(L.F.Brownら; Cancer Research, 53, 4727, 1993)、卵巣癌(T.A.Olsonら; Cancer Research, 54, 276, 1994)などの多くのヒト腫瘍組織においてVEGFが産生されていることが報告されている。乳癌についてVEGFと患者の予後との関係が検討された結果、VEGF高発現腫瘍は、低発現腫瘍に比べて腫瘍血管新生が盛んであり、生存率が低いことが明らかとなっている(M.Toiら; Japanese J. Cancer Research, 85, 1045, 1994)。

【0010】VEGFを認識する抗体は、該抗体を用いた、免疫組織染色による腫瘍組織で発現されるVEGFの解析(T. Shibuyaら; Clinical Cancer Research, 4, 1483-1487, 1998; Y. Kitadaiら; Clinical Cancer Research, 4, 2195-2200, 1998)、免疫学的検出法であるELISA法による腫瘍組織又は血清中のVEGF測定(G. Gaspariniら; Journal of National Cancer Institute, 89, 139-147, 1997; S.Kondoら; Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211-214, 1994)等に用いる

ことができるため、組織診断等の診断に重要であると考えられている。

【0011】ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗VEGFモノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている(J.K.Kimら; Nature, 362, 841, 1993)。また、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗VEGFモノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている(O.Melnikら; Cancer Research, 56, 921, 1996)。

【0012】さらに、VEGFをコードするDNAのアンチセンスDNAを用い、ヌードマウス移植腫瘍モデルの腫瘍増殖が抑制できることが報告されている(M.Salehら; Cancer Research, 56, 393-401, 1996)。従って、VEGF活性を抑制することができれば、癌患者における腫瘍の増殖又は転移形成を抑制できるものと期待される。

【0013】VEGFは、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度のVEGFが検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示されている(S.Kondoら; Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211, 1994)。マウスモデルにおいて、抗VEGF抗体によりVEGFをブロックすることで癌性腹水の貯留を防止できることが示されている(J.C.Luoら; Cancer Research, 58, 2594-2600, 1998)。

【0014】糖尿病性網膜症においては、異常な血管新生により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内のVEGFレベルが正相関することが報告されている(L.P.Aielloら; New England J. Medicine, 331, 1480, 1994)。また、サルメタゾールの網膜症モデルにおいて、抗VEGF中和モノクローナル抗体A4.6.1の眼内投与によりVEGF活性を抑制すると、血管新生が抑制されることが報告されている(A.P.Adamisら; Arch Ophthalmol., 114, 66, 1996)。従って、過剰に産生されるVEGF活性を抑制することで糖尿病性網膜症における血管新生を抑制できることが期待される。

【0015】慢性関節リュウマチの関節炎の病態の進展(骨、軟骨の破壊)は血管新生を伴うが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中にはVEGFが高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージがVEGFを産生することが報告されている(A.E.Kochら; Journal of Immunology, 152, 4149, 1994; R.A.Favaら; J. Experimental Medicine, 180, 341, 1994)。過剰に産生されるVEGF活性を抑制することで関節炎における血管新生を抑制できることが期待される。

【0016】また、VEGFはCrow-Fukase症候群(O.Watanabeら; Lancet, 347, 702, 1996)、卵巣過機能症候群(E.R.Levin, Journal of Clinical Investigation, 102, 1978-1985, 1998)、乾せん等の皮

下疾患 (Journal of Experimental Medicine, 180, 114-1146, 1994; Journal of Immunology, 154, 2801-2807, 1995)、動脈硬化 (Inoue, M. et al, Circulation, 98, 2108-2116, 1998) 等の疾患の発症、進展に関与することが報告されている。

【0017】脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症などの虚血性疾患においては、側副血行路の発達を促進させることにより、虚血を解除して疾患を治療する血管新生療法が試みられている。ウサギ大腿動脈慢性虚血肢モデルにおいてVEGF蛋白質を投与すると、虚血部位に側副血行路が形成され、下肢血圧の上昇や血流量の増加などの治療効果が認められたと報告されている (S. Take-shita, Journal of Clinical Investigation, 93, 662-670, 1994)。下肢が動脈閉塞した患者に対し、カテーテルを用いたVEGFのcDNAの動脈内投与、又は下肢の筋注を行うことにより側副血行路の再建が確認されたと報告されている (I. Baumgartnerら, Circulation, 97, 1114, 1998)。

【0018】血管内皮細胞及び血液細胞は、共通の前駆細胞である血管血液幹細胞より別れて分化することが示されている。血管血液幹細胞にはVEGF受容体であるKDR/FIk-1が発現することから、VEGFは、血管血液幹細胞から血管内皮前駆細胞及び血液前駆細胞への分化に必須な因子である可能性が指摘されている (S. Nishikawaら, Development, 125, 1747-1757, 1998)。血管血液幹細胞を虚血モデル動物に投与すると、該細胞が虚血部位の血管新生に利用されることが報告されている (T. Asaharaら, Science, 275, 964-967, 1997)。

【0019】VEGFは血管内皮細胞に極めて高い特異性を示すが、一部の血球細胞、骨芽細胞、脾臓細胞に対する作用も報告されている。ヒト単球細胞にはVEGF受容体Flt-1が発現しており、VEGFは単球の遊走促進活性を有することが報告されている (B. Barleonら, Blood, 87, 3336-3343, 1996)。抗原提示細胞として重要なヒト樹状細胞にはVEGF受容体Flt-1が発現しており、VEGFは樹状細胞の成熟化を阻害する活性を有することが報告されている。樹状細胞の活性化は免疫による腫瘍破壊において重要なステップであるので、腫瘍細胞より産生されるVEGFは、腫瘍免疫抑制により腫瘍増殖を促進していると推測されている (D. M. Garb ilovichら, Nature Medicine, 2, 1096-1103, 1996)。VEGFは骨芽細胞に作用し、遊走及び分化を促進することが報告されている (V. Midyら, Biochemical and Biophysical Research Communications, 199, 380-386, 1994)。また、脾臓の細胞にVEGF受容体KDR/FIk-1が発現しており、VEGFが細胞の分化に関わっている可能性が示されている (C. Obergら, Growth Factors, 10, 115-126, 1994)。

【0020】VEGFの類縁因子としては、これまでにPlGF (Placental growth factor) (D, Maglione,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9267-9271, 1991), VEGF-B (B. Qlofssonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2576-2581, 1996), VEGF-C (J. Leeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1988-1992, 1996), VEGF-D (M. G. Achen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 548-553, 1998), Pox Orf VEGF (NZ2 and NZ7) (D. J. Lyttle, Journal of Virology, 68, 84-92, 1994), PDGF-A (C. Betsholtzら, Nature, 320, 695-699, 1986), PDGF-B (T. Collinsら, Nature, 316, 748-750, 1985)が単離されている。

【0021】PDGFは血小板中に存在し、主として間葉系細胞に対する遊走・増殖刺激活性を有する因子として1979年に精製された (Heldin. C. H. ら, Proceeding of National Academy of Science USA, 76, 3722-3726, 1979)。PDGFは、A鎖及びB鎖と呼ばれる2種類のポリペプチド鎖 (各々の分子量は約3万) がジスルフィド結合により二量体化した構造をとり、3種のアイソフォームPDGF-AA, AB, BBの存在が報告されている。A鎖 (Betsholtz, C. ら, Nature, 320, 695-699, 1986) 及びB鎖 (Collins, T. ら, Nature, 316, 748-750, 1985) のcDNAが単離され、これらの成熟型蛋白質では60%のアミノ酸相同性があり、構造及び活性の保持に必要な8個のシステイン残基の位置は保存されている (Claesson-Welsh, L., Journal of Biological Chemistry, 269, 32023-32026, 1994)。PDGFは、生合成の際、前駆体蛋白質よりA鎖はN末端部分、B鎖はN末端及びC末端部分の切断を受け、成熟型蛋白質となる (Claesson-Welsh, L., Journal of Biological Chemistry, 269, 32023-32026, 1994)。PDGFの断片化、アミノ酸残基の改変等によりPDGF阻害剤を作製することが試みられ、PDGF-Bについては、116121及び157163に対応する13残基よりなるペプチドが、PDGF-BのPDGF受容体への結合を阻害する活性を有することが報告されている (Engstrom, U. ら, Journal of Biological Chemistry, 267, 16581-16587, 1992)。

【0022】PDGFは創傷治癒に関係する細胞群、すなわち、血小板のみならず、マクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、繊維芽細胞などからも分泌されること、また細胞遊走・増殖刺激活性に加え、コラーゲンなどの細胞外マトリクスの産生、リモデリングに働く酵素の産生を促進することから、創傷治癒過程において重要な働きをしていると考えられている (Ross, R. ら, Cell, 46, 155-169, 1986)。ウサギモデルにおいては、PDGF投与により、皮膚の損傷の修復が促進されることが報告されている (Pierceら, Journal of Cellular Biochemistry, 45, 319-326, 1991)。現在、PDGFは、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の、創傷治癒が遅延することにより生じる病態の治療薬として注目されてい

る。

【0023】動脈硬化病変形成初期では、損傷を受けた動脈の内膜に集まった血小板及びマクロファージなどから分泌されたPDGFが、中膜平滑筋細胞の内膜側への遊走及び内膜での増殖を惹起し、病変を進展させると考えられている(Ross, R.ら, Science, 248, 1009-1012, 1990)。さらに、PDGF抗体投与により、ラット動脈硬化モデルで病態を抑制できたことが報告されている(Ferns G.A.ら, Science, 253, 1129-1132, 1991)。

【0024】糸球体腎炎の発症・進展において、メサンギウム細胞は中心的役割を担っている。ヒトの糸球体腎炎においてPDGFの発現が上昇していること(Matsuda, M.ら, American Journal of Nephrology, 17, 25-31, 1997)、ラット腎炎モデルにPDGF中和抗体を投与すると治療効果が認められること(Johnson, R.J.ら, Journal of Experimental Medicine, 175, 1413-1416, 1992)が報告されている。

【0025】PDGF-B鎖はサル肉腫ウイルスv-sisのプロトオンコジーンであることが判明し(Waterfield, M.D.ら, Nature, 304, 35-39, 1983)、発ガン研究の面からも注目されている。PDGFは26種の異なるヒト腫瘍由来の168種の細胞株がPDGFを発現していること、及びこれら癌細胞のオートクライン、パラクライン増殖因子である可能性があることが報告されている(Potapova, O.ら, International Journal of Cancer, 66, 669-677, 1996.)。

【0026】以上のように、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子は、固形腫瘍、腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患に与ることが示されている。また、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子の活性を阻害できる抗体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukus 50

e症候群、卵巣過敏症症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を治療する活性が示されている。さらに、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子は、蛋白質又はそれをコードする遺伝子投与により、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患に対する血管新生療法、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の疾患に対する創傷治癒促進療法に有効であることが示されている。また、VEGF受容体は、血液幹細胞、骨芽細胞、膵臓細胞に発現し、それら細胞の増殖分化に与る可能性が報告されており、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患に対する治療薬になる可能性が示唆されている。従って、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子は有用な新薬開発のターゲットとして非常に注目されている。VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する新規な因子が存在する可能性も想起される。

#### 【0027】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患等の治療薬の探索・開発に有用な、増殖因子としての活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、及びこれらの利用方法を提供することにある。

#### 【0028】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、新規なVEGF/PDGF様因子及び該因子をコードするDNAを取得することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0029】すなわち、本発明は、以下の(1)~(58)に関する。

(1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1

以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

(3) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

(4) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

(5) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

【0030】(6) 配列番号1で示されるアミノ酸配列においてN末から少なくとも226番目までのアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質。

(7) 配列番号32で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(8) 配列番号33で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

(9) 蛋白質の有する増殖因子としての活性が平滑筋細胞に対する増殖促進活性である(1)~(8)のいずれか一つに記載の蛋白質。

(10) 平滑筋細胞が、ラット由来である(9)に記載の蛋白質。

【0031】(11) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質。

(12) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質。

(13) (1)~(10)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするDNA。

(14) (11)又は(12)記載の蛋白質をコードするDNA。

(15) 配列番号2で示される塩基配列を含むDNA。

【0032】(16) (13)又は(15)記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(17) (14)記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(18) *Escherichia coli* DH10B/NT2RP4000328 (FERM BP-6686)及び*Escherichia coli* DH10B/OVARC1001401 (FERM BP-6687)に含有されるプラスミドに含まれ、かつ(1)記載の蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(19) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを含有してなる組換えベクター。

(20) (19)記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【0033】(21) (20)記載の形質転換体を培地に培養することにより培養物中に(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質を生産蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする蛋白質の製造方法。

(22) (1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質、好ましくは(1)~(10)のいずれか一つに記載の蛋白質、を認識する抗体。

(23) 抗体が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識する(22)記載の抗体。

(24) 抗体がハイブリドーマKM2676 (FERM BP-7137)により生産される抗体である(22)又は(23)記載の抗体。

(25) (24)記載の抗体を生産するハイブリドーマKM2676 (FERM BP-7137)。

【0034】(26) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を含むオリゴヌクレオチド又は該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド。

(27) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを用いるハイブリダイゼーション法により、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

(28) (26)記載のオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応により、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する方法。

(29) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを用いるハイブリダイゼーション法により、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

(30) (26)記載のオリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応により、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【0035】(31) (27)~(30)のいずれか一つに記載の方法を用いて、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患を検出する10方法。

【0036】(32) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の20分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(31)記載の方法。

【0037】(33) (13)~(18)のいずれか30一つに記載のDNAを用いることを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を抑制する方法。

(34) (26)記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を抑制する方法。

(35) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを用いることを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするmRNAの40翻訳を抑制する方法。

(36) (26)記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

(37) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを用いることを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を取得する方法。

(38) (26)記載のオリゴヌクレオチドを用いる50

ことを特徴とする、(1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を取得する方法。

【0038】(39) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも一種の疾患の診断薬。

【0039】(40) (26)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも一種の疾患の診断薬。

【0040】(41) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(39)記載の診断薬。

【0041】(42) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵

巢過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(40)記載の診断薬。

【0042】(43) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを含有する医薬。

(44) (26)記載のオリゴヌクレオチドを含有する医薬。

(45) (13)~(18)のいずれか一つに記載のDNAを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【0043】(46) (26)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【0044】(47) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患

が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(45)記載の治療薬。

【0045】(48) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(46)記載の治療薬。

【0046】(49) (1)~(12)のいずれか一つに記載の蛋白質を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の診断薬。

【0047】(50) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(49)記載の診断薬。

【0048】(51) (1)~(12)のいずれか一

つに記載の蛋白質を含有する医薬。

(52) (1) ~ (10) のいずれか一つに記載の蛋白質を含有する、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

(53) (11) 又は(12) 記載の蛋白質を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患及び腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【0049】(54) 血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(52) 記載の治療薬。

(55) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である(53) 記載の治療薬。

【0050】(56) (1) ~ (12) のいずれか一つに記載の蛋白質を用いることを特徴とする、該蛋白質と特異的に結合する受容体のスクリーニング方法。

(57) (56) 記載の方法により取得される受容体。

(58) (22) ~ (25) のいずれか一つに記載の抗体を用いることを特徴とする、(1) ~ (12) のいずれか一つに記載の蛋白質の免疫学的検出法。

(59) (22) ~ (25) のいずれか一つに記載の抗体を用いて(1) ~ (12) のいずれか一つに記載の蛋白質を検出することを特徴とする免疫組織染色法。

【0051】(60) (22) ~ (25) のいずれか一つに記載の抗体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増

殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患及び創傷治癒の遅延を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の診断薬。

【0052】(61) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎であり、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患が貧血であり、骨芽細胞の異常に基づく疾患が骨粗鬆症であり、膵臓細胞の異常に基づく疾患が糖尿病であり、虚血性疾患が動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞及び末梢動脈閉塞症からなる群より選択され、創傷治癒の遅延を伴う疾患が神経性下肢潰瘍及び糖尿病性下肢潰瘍からなる群より選択される(60) 記載の診断薬。

【0053】(62) (22) ~ (25) のいずれか一つに記載の抗体を含有する医薬。

(63) (22) ~ (25) のいずれか一つに記載の抗体を含有する、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患からなる群より選択される少なくとも1種の疾患の治療薬。

【0054】(64) 異常な血管新生の亢進を伴う疾患が固形腫瘍及び腫瘍転移からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく眼の疾患が糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症及び血管新生緑内症からなる群より選択され、異常な血管新生に基づく関節炎が慢性関節リュウマチであり、異常な血管新生を伴う皮膚疾患が乾せんであり、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患が腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群及び卵巣過敏症候群からなる群より選択され、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患が動脈硬化であり、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患が糸球体腎炎である(63) 記載の治療薬。

(65) (1) ~ (12) のいずれか一つに記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が部分的に又は完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

(66) (1) ~ (12) のいずれか一つに記載の蛋白質の有する活性が部分的に又は完全に抑制されたノッ

クアウト非ヒト動物。

【0055】

【発明の実施の形態】本発明の蛋白質としては、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む蛋白質である新規な VEGF/PDGF 様因子 (Novel VEGF/PDGF-Like Factor、以下「VPLF」という)、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質、並びに配列番号1で示されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を挙げることができる。

【0056】本発明の蛋白質としては、さらに、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ上記VPLFの有する増殖因子としての活性を有する蛋白質、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含み、かつ上記VPLFの有する増殖因子としての活性を有する蛋白質を挙げることができる。上記部分配列としては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列においてN末端配列が欠失したアミノ酸配列を挙げることができ、より具体的には、配列番号1で示されるアミノ酸配列において227番目のフェニルアラニンから345番目のグリシンまでのアミノ酸配列を挙げることができる。また、このような蛋白質としては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列において227番目のフェニルアラニンから345番目のグリシンまでのアミノ酸配列を含み、N末端に4アミノ酸 (Asp-Pro-Ser-Pro: 配列番号34) が付加されたアミノ酸配列 (配列番号32) を有する蛋白質、または、2アミノ酸 (Ser-Pro) が付加されたアミノ酸配列 (配列番号33) を有する蛋白質を挙げることができる。

【0057】本発明の蛋白質は、増殖因子としての活性を有することを特徴とする蛋白質である。本発明の蛋白質は、血管内皮細胞の増殖促進活性、遊走促進活性、チューブ形成促進活性、プロテアーゼ産生促進活性、血管新生促進活性、血管透過性亢進活性、血管血液幹細胞の分化・増殖促進活性、単球の遊走促進活性、樹状細胞の成熟阻害活性、平滑筋細胞を含む間葉系細胞に対する遊走・増殖促進活性等の増殖因子としての活性を有し、特に好ましくは、平滑筋細胞に対する増殖促進活性を有する。

【0058】配列番号1で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ該蛋白質の有する増殖因子としての

活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、「モレキュラー・クローニング第2版」という)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」という)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、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 (以下「配列番号1のVPLF」という) をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換又は付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。また、本発明の蛋白質が増殖因子としての機能を有するためには、配列番号1記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有することが好ましく、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する。さらに、このようなアミノ酸の欠失、置換又は付加を導入した場合においても、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されている8個のシステイン残基を含んでいることが好ましい。

【0059】配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列を含む蛋白質は、当業者に公知の方法によって作製することができる。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の一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、こうして作製される蛋白質又はDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号1で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含む蛋白質を得ることができる。

【0060】本発明のDNAは本発明の蛋白質をコードするDNAであり、例えば配列番号1のVPLFをコードするDNAとして、配列番号2で示される塩基配列を有するDNAが挙げられるが、これに限定されない。一般に1つのアミノ酸に対して複数種の遺伝暗号が存在するため、配列番号2とは異なる塩基配列を有するDNAであっても、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするものであれば本発明のDNAに含まれる。さらに、本発明の蛋白質のアミノ酸配列は、上述のような配列番号1以外ののものであってもよい。それらの蛋白質をコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードするDNA、配列番号2で示される塩基配列を有するDNA、及び該DNAとストリンジントな条件下でハイブリダ

イズするDNAを挙げることができる。

【0061】ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号2で示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニー又はブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~210倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。より具体的には、ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号2で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

【0062】本明細書において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会(IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)の勧告[European Journal of Biochemistry, 138, p.9, 1984]に従った。

【0063】次に示す略号は、特に断わらない限り対応する次のアミノ酸を表す; Ala: L-アラニン; Arg: L-アルギニン; Asn: L-アスパラギン; Asp: L-アスパラギン酸; Asx: L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン; Cys: L-システイン; Gln: L-グルタミン; Glu: L-グルタミン酸; Glx: L-グルタミン酸又はL-グルタミン; Gly: グリシン; Ile: L-イソロイシン; Leu: L-ロイシン; Lys: L-リジン; Phe: L-フェニルアラニン; Pro: L-プロリン; Ser: L-セリン; Thr: L-スレオニン; Trp: L-トリプトファン。

【0064】また、次に示す略号は、対応する次のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す; Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル; tBu: t-ブチル; Trt: トリチル; Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル; Boc: t-ブチルオキシカルボニル; Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>9</sup>-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン; Fmoc-Asn(Trt)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>9</sup>-トリチル-L-アスパラギン; Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメ

チルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-t-ブチルエステル; Fmoc-Cys(Trt)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン; Fmoc-Gln(Trt)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>9</sup>-トリチル-L-グルタミン; Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-グルタミン酸-t-ブチルエステル; Fmoc-Lys(Boc)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>9</sup>-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン; Fmoc-Ser(tBu)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン; Fmoc-Thr(tBu)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン; Fmoc-Trp(Boc)-OH: N<sup>9</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>9</sup>-t-ブチルオキシカルボニル-L-トリプトファン。

【0065】さらに、次に示す略号は、対応する次の反応溶媒、反応試薬等を表す; HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート; DIPIC: N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド; HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール; DMF: N,N-ジメチルホルムアミド; NMP: N-メチルピロリドン; TFA: トリフルオロ酢酸; DIEA: ジイソプロピルエチルアミン。

【0066】本明細書に記載される相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、好ましくはBLASTにおいてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出される数値、アミノ酸配列については、好ましくはBLAST2においてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出される数値である。

【0067】以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. 本発明のDNAの調製

本発明のDNAは、ヒト卵巣又は精巣由来のmRNAを単離し、そのcDNAライブラリーを作製し、次いで該cDNAライブラリーをスクリーニングして目的のクローンを得ることにより調製することができる。

【0068】ヒト卵巣又は精巣mRNAは、市販のもの(例えば、Clontech社製)を用いてもよいし、以下のごとくヒト卵巣若しくは卵巣癌組織(以下、「卵巣由来組織」という)又はヒト精巣若しくはヒト胎児精巣由来テラトカルシノーマ(以下、「精巣由来組織」という)から調製してもよい。後者の場合には、まず卵巣由来組織又は精巣由来組織から全RNAを調製し、該全RNAからmRNAを単離することができる。

【0069】卵巣由来組織又は精巣由来組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[Methods in Enzymology, 154,3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法[Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学, 9, 1937 (199

1) ]等が挙げられる。全RNAからpoly(A)<sup>+</sup>RNAとしてmRNAを単離する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クロニング第2版)等が挙げられる。あるいは、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社)等のキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0070】調製したヒト卵巣由来組織又は精巣由来組織mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)等に記載された方法、又は市販のキット、例えば、SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)等を用いる方法などが挙げられる。

【0071】cDNAライブラリーを作製するためのクロニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等、いずれのものでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、gt10、gt11 [DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、TriplEx (Clontech社)、ExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]及びpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]等を挙げることができる。

【0072】宿主微生物としては、エシェリヒア属 (*Escherichia*) に属する微生物、特にエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*、以下「大腸菌」という) に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、大腸菌 XL1-Blue MRF' [STRATAGENE社、Strategies, 5, 81 (1992)]、大腸菌 C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、大腸菌 Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、大腸菌 Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、大腸菌 NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、大腸菌 K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]及び大腸菌 JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等が用いられる。

【0073】このcDNAライブラリーを、そのまま以降のスクリーニングに用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、完全長cDNAをできるだけ効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [Gene, 138, 171 (1994); Gene, 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング、羊土社 (1996); 遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社 (1994)]を用いて調製したcDNAライブラリーを以下のスクリーニングに用いてもよい。

【0074】cDNAライブラリーのスクリーニングは、まず該ライブラリーに含まれる全クローンの塩基配列決定を行い、次いでそれぞれの塩基配列を既知の配列と比較することにより行う。上記全クローンの塩基配列決定は、上述のようにして作製したcDNAライブラリーから各クローンを単離し、それぞれのクローンについてcDNAの塩基配列を末端から決定することにより行うことができる。cDNAライブラリーからの各クローンの単離は、当業者に公知の方法、例えば、単一コロニー単離法(モレキュラー・クロニング第2版)等により行うことができる。また、各クローンの塩基配列決定は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばSangerらのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]により、又はABI PRISM 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより行うことができる。

【0075】次いで、各クローンの塩基配列を既知の配列と比較する。それぞれのcDNAの塩基配列が新規な配列かどうかは、BLAST等の同源性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL及びDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の既存の遺伝子の塩基配列と一致すると考えられるような明らかな同源性を示す塩基配列がないことにより確認できる。このような方法で得られる新規なDNAの塩基配列として、例えば、配列番号2で示される塩基配列が挙げられる。

【0076】配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを翻訳して得られるVPLFのアミノ酸配列(配列番号1)は、BLAST2を用いた同源性解析において、VEGFファミリーに属するヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D及びヒトPLGFのアミノ酸配列、並びにPDGFファミリーに属するヒトPDGF-A及びヒトPDGF-Bのアミノ酸配列と、それぞれ29%、29%、25%、29%、26%、36%及び28%の同源性を有する。また、同じVEGF/PDGFスーパーファミリーに属するOrfウイルスのNZ2及びNZ7のアミノ酸配列とも、それぞれ29%及び30%の同源性を有する。

【0077】VEGF/PDGFスーパーファミリーにおいては、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び活性発現に重要な8個のシステイン残基が存在し (Journal of Biological Chemistry, 269, 32879-32885, 1994)、これら8個のシステイン残基は、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されていることが知られている。配列番号1で示されるアミノ酸配列においても、該モチーフを形成するために必須なシステイン残基の位置と数が完全に保存されている。従って、配列番号1のVPLFがVEGF/PDGFスーパーファミリーに属

する増殖因子としての活性を有することは明白である。

【0078】VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子は、固形腫瘍、腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、系球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患に關与することが示されている。また、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子の活性を阻害できる抗体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、系球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を治療する活性が示されている。さらに、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子は、蛋白質又はそれをコードする遺伝子投与により、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患に対する血管新生療法、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の疾患に対する創傷治癒促進療法に有効であることが示されている。また、VEGF受容体は、血液幹細胞、骨芽細胞、膵臓細胞に発現し、それら細胞の増殖分化に關与する可能性が報告されており、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患に対する治療薬になる可能性が示唆されている。従って、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属するVPLFは、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、系球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の

分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患の診断薬になりうる。また、VPLFの増殖因子の活性を阻害できる抗体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、系球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患の治療薬となりうる。さらに、VPLF蛋白質あるいはコードする遺伝子投与により、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患の治療薬となりうる。

【0079】配列番号2で示される塩基配列からなるDNAが一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5'端及び3'端の塩基配列に基づいて設計したプライマーを調製し、ヒト又は非ヒト動物の卵巣、精巣等の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNA又はcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法[PCR Protocols, Academic Press (1990)]を用いてDNAの増幅を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

【0080】また、配列番号2で示されるDNAの全長又は一部をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の卵巣、精巣等の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNA又はcDNAライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニング第2版)等を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。

【0081】あるいは、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、ホスホアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、本発明のDNAを取得することもできる。

【0082】取得したDNAについて、該DNAを含む組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体を用いて蛋白質を発現させることにより、又は該DNAがコードするアミノ酸配列とVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-A、PD

GF-B、PlGF、NZ2若しくはNZ7のアミノ酸配列との相同性を比較することにより、該DNAが増殖因子としての活性を有する蛋白質をコードするDNAであることを確認することができる。

【0083】上記DNA又はDNAの一部断片の塩基配列に関する情報に基づき、常法又はDNA合成機を用いることにより、本発明のDNAの塩基配列、例えば配列番号2で示される塩基配列のうち、連続した5～60塩基、好ましくは10～40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチド又は該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（以下、「アンチセンス・オリゴヌクレオチド」という）を調製することができる。

【0084】本発明のオリゴヌクレオチドとしては、オリゴDNA、オリゴRNA等のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、「誘導体オリゴヌクレオチド」という）等が挙げられる。

【0085】該オリゴヌクレオチド又はアンチセンス・オリゴヌクレオチドとして、例えば、検出したいmRNAの一部の塩基配列において、5'末端側の塩基配列に相当するセンスプライマー、3'末端側の塩基配列と相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマー等を挙げる  
ことができる。この場合において、mRNAにおいてウラシルに相当する塩基は、オリゴヌクレオチドプライマーにおいてはチミンとなる。

【0086】センスプライマー及びアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度（ $T_m$ ）及び塩基数が極端に変わることのないオリゴヌクレオチドで、塩基数が5～60塩基、好ましくは10～50塩基のものが挙げられる。

【0087】誘導体オリゴヌクレオチドとしては、例えば、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドが挙げられ

る〔細胞工学、16,1463 (1997)〕。

【0088】2. 本発明の蛋白質の製造

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0089】まず、全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。この際、もし必要であれば、全長cDNAをもとにして本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、上記全長cDNAの代わりに該DNA断片を使用してもよい。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

【0090】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自立複製可能又は染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0091】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有してなる組換えベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0092】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社）、pSE280（Invitrogen社）、pGEMEX-1（Promega社）、pQE-8（QIAGEN社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（Stratagene社）、pTrs30〔大腸菌JM109/pTrs30（FERM BP-5407）より調製〕、pTrs32〔大腸菌JM109/pTrs32（FERM BP-5408）より調製〕、pGHA2〔大腸菌IGHA2（FERM BP-400）より調製、特開昭60-221091〕、pGKA2〔大腸菌IGKA2（FERM BP-6798）より調製、特開昭60-221091〕、pTerm2（US4686191、US4939094、US5160735）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)〕、pGEX（Pharmacia社）、pETシステム（Novagen社）、pSupex等を挙げる  
ことができる。

【0093】プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよ

い。例えば、*trp*プロモーター ( $P_{trp}$ )、*lac*プロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを挙げることができる。また、 $P_{trp}$ を2つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、*tac*プロモーター、*lacT7*プロモーター、*let 1*プロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

【0094】また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガルノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間に適当な距離 (例えば 6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明のDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。さらに、本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0095】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、大腸菌 XL1-Blue、大腸菌 XL2-Blue、大腸菌 DH1、大腸菌 MC1000、大腸菌 KY3276、大腸菌 W1485、大腸菌 JM109、大腸菌 HB101、大腸菌 No.49、大腸菌 W3110、大腸菌 NY49、セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンチコラ (*S. fonticola*)、セラチア・リクエファシエンス (*S. liquefaciens*)、セラチア・マルセセンス (*S. marcescens*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、ブレヴィバクテリウム・インマリオフィルムATCC14068 (*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068)、ブレヴィバクテリウム・サッカロリチカムATCC14066 (*B. saccharolyticum* ATCC14066)、ブレヴィバクテリウム・フラブムATCC14067 (*B. flavum* ATCC14067)、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869 (*B. lactofermentum* ATCC13869)、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルムATCC13870 (*C. acetoacidophilum* ATCC13870)、マイクロバクテリウム・アンモニアフィルムATCC15354 (*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354)、シュドモナスsp. D-0110 (*Pseudomonas* sp. D-0110)等を挙げることができる。

【0096】組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1 50

979)に記載の方法等を挙げることができる。酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)等を挙げることができる。

【0097】プロモーターとしては、酵母菌株中で機能を発揮できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF1プロモーター、CUP1プロモーター等を挙げることができる。

【0098】宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)等を挙げることができる。

【0099】組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等を挙げることができる。

【0100】動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210等を挙げることができる。

【0101】プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0102】宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)等を挙げることができる。組換えベク

ターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げることができる。

【0103】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。即ち、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0104】該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac11 (ともにInvitrogen社) 等を挙げることができる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドrosis・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0105】昆虫細胞としては、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) の卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、トリチヨプルシア・ニ (Trichoplusia ni) の卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

【0106】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げることができる。植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等を挙げることができる。

【0107】プロモーターとしては、植物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等を挙げることができる。宿主細胞としては、例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞を挙げることができる。

【0108】組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いるこ

とができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/0097)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等を挙げることができる。

【0109】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞又は植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0110】以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0111】大腸菌等の原核生物又は酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地及び合成培地のいずれを用いてもよい。

【0112】炭素源としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプン、デンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類などを用いることができる。

【0113】窒素源としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等を用いることができる。

【0114】無機塩類としては、該生物が資化し得るものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0115】培養は、通常振盪培養又は深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15~40がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生

物質を培地に添加してもよい。

【0116】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0117】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]又はこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0118】培養は、通常pH6~8、30~40、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1~7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

【0119】培養は、通常pH6~7、25~30等の条件下で、1~5日間行う。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として又は植物の細胞若しくは器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホホワイト(White)培地、又はこれらの培地にオーキシン、サイトカイニンその他の植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0120】培養は、通常pH5~9、20~40の条件下で3~60日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞又は植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0121】遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されてい

る方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

【0122】本発明の蛋白質が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Development, 4, 1288 (1990)]、又は特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0123】すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質のN末端側にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0124】さらに、遺伝子導入した動物又は植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)又は植物個体(トランスジェニック植物)を作製し、これらの個体を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。形質転換体が動物個体又は植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育又は栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体又は植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0125】動物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)]に準じて遺伝子を導入して作製した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法が挙げられる。

【0126】動物個体を用いる場合には、例えば、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク(特開昭63-309192)、卵等を挙げることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0127】植物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養、20(1994)、組織培養、21(1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45(1997)〕に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法が挙げられる。

【0128】本発明の形質転換体により製造された蛋白質は、例えば、以下のようにして単離・精製することができる。本発明の蛋白質が細胞内に溶解状態で発現した場合 10 には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル( DEAE ) - セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社)等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0129】また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離 30 を行うことにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。回収した蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該蛋白質を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得ることができる。

【0130】本発明の蛋白質又はその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該蛋白質又はその糖修飾体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法 40 により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。このようにして取得される蛋白質として、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を挙げることができる。

【0131】また、本発明の蛋白質は、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Te 50

chnology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0132】3. 本発明の蛋白質を認識する抗体の調製  
本発明の蛋白質若しくは該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品、又は本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用いることにより、本発明の蛋白質を認識するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等の抗体を作製することができる。こうして作製される本発明の抗体は、本発明の蛋白質を認識するものであればよいが、好ましくは該蛋白質に特異的に結合するものである。また、本発明の抗体は、増殖因子としての活性を有する本発明の蛋白質を認識するものであっても、増殖因子としての活性を阻害する活性を有する本発明の蛋白質を認識するものであってもよいが、好ましくは、増殖因子としての活性を有する本発明の蛋白質を認識するものである。

【0133】(1) ポリクローナル抗体の作製  
本発明の蛋白質若しくは該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品、又は本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、これを動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~20週齢のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100µgが好ましい。

【0134】ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0135】該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離・精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0136】分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、又はDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA若しくはプロテインG-カラム、ゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独又は組み合わせて処理する方法が挙げられる。

【0137】(2) モノクローナル抗体の作製

## (a)抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

## 【0138】(b)骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウス又はラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、「P3-U1」という)[Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地[RPMI-1640培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール( $5 \times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン(10 $\mu$ g/ml)及び牛胎児血清(FCS)(CSL社製、10%)を加えた培地(以下、「正常培地」という)に、さらに8-アザグアニン(15 $\mu$ g/ml)を加えた培地]で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を $2 \times 10^7$ 個以上用いる。

## 【0139】(c)ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髄腫細胞をMEM培地又はPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞:骨髄腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0140】得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 $10^6$ 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000(PEG-1000)2g、MEM2ml及びジメチルスルホキシド(DMSO)0.7mlを混合した溶液を0.2～1ml添加し、さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地[正常培地にヒポキサンチン( $10^{-4}$ M)、チミジン(1.5 $\times$

$10^{-5}$ M)及びアミノプテリン( $4 \times 10^{-7}$ M)を加えた培地]100ml中に懸濁する。

【0141】該懸濁液を96穴培養用プレートに100 $\mu$ l/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりアンチボディーズ[Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)]等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0142】酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法を挙げる事ができる。免疫の際に抗原として用いた本発明の蛋白質の部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清又は後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質又は放射性化合物等で標識した抗ラット又は抗マウスIgGグロブリン抗体を反応させた後に、標識物質に応じた検出反応を行ない、本発明の蛋白質に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0143】該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す[1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

## 【0144】(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8～10週齢のマウス又はヌードマウスに、(c)で取得した本発明の蛋白質に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。その後10～21日間飼育すると、ハイブリドーマは腹水癌化する。

【0145】該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体の精製で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製・取得することができる。抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキット又はラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法又は280nmでの吸光度より算出する。

## 【0146】4.本発明のDNA、蛋白質又は抗体の利用

(1)本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法、又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により遺伝子の発現を検出する方法本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイ

ブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)、PCR法及びRT(reverse-transcribed)-PCR法[ともにPCR Protocols、Academic Press(1990)]等を行うことにより、本発明の蛋白質をコードするmRNAの発現を検出することができる。このうち、RT-PCR法は簡便な方法であるため、検出方法として特に有用である。該検出方法は、遺伝子の発現量の定量にも用いられ、また異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治癒の遅延を伴う疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現変化が原因となっている疾患の診断に利用することができる。

【0147】(2)本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法又はPCR法により本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)、PCR法等を行うことにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出することができる。該検出方法は、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、膵臓細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治癒の遅延を伴う疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異が原因となっている疾患の診断に利用することができる。

【0148】(3)本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを用いて本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写又は翻訳を抑制する方法

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術[バイオサイエンスとインダストリー、50、322(1992)、化学、46、681(1991)、Biotechnology、9、358(1992)、Trends in Biotechnology、10、87(1992)、Trends in Biotechnology、10、152(1992)、細胞工学、16、1463(1997)、トリプル・ヘリックス技術[Trends in Biotechnology、10、132(1992)]等を用い、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写又は翻訳を抑制することができる。

【0149】例えば、本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを投与することにより、本発明の蛋白質の生産を抑制することができる。すなわち、本発明のDNA又は

オリゴヌクレオチドを用いることにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写、又は本発明の蛋白質をコードするmRNAの翻訳を、それぞれ抑制できる。

【0150】該抑制方法は、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異が原因となっている疾患の治療又は予防に利用することができる。

【0151】本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異が原因となっている疾患の治療方法としては、患者から取り出した細胞に、遺伝子治療用に適切に調製した本発明の組換えベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、また適当なレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに乗せて生体に投与することにより、さらにリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して生体に投与することにより、本発明の蛋白質を患者の生体内で発現させる方法が用いられる。

(4)本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドを用いて本発明の蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を取得する方法

本発明のDNA又はオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法[東京大学医科学研究所制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社(1993年)]を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

【0152】プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写に關与するすべてのプロモーター領域が挙げられる。例えば、ヒトの卵巣、前立腺、子宮、精巣、甲状腺上皮、耳、腎臓、大腸又は肺、特に卵巣又は精巣で、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写に關与するプロモーター領域を挙げることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング方法に利用することができる。

【0153】(5)本発明の蛋白質を含有する医薬本発明の蛋白質、例えば配列番号1のVPLFはVEGFと高い相同性を示すが、VEGFは動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患を治療できることが報告されていることから、本発明の蛋白質、特に配列番号1のVPLFは動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患に対する治療薬になり得る。また、VEGF受容体は血液幹細胞、骨芽細胞、膵臓細胞に発現し、それら細胞の分化増殖にVEGFが關与する可能性が報告されていることから、本発明の蛋白質、特に配列番号1のVPLFは貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞

の異常に基づく疾患に対する治療薬になり得る。さらに、本発明の蛋白質、例えば配列番号 1 の V P L F は P D G F と高い相同性を示すが、P D G F は神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒が遅延する疾患の治療できることが報告されていることから、本発明の蛋白質、特に配列番号 1 の V P L F は神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒が遅延する疾患の治療薬となり得る。

【0154】本発明の蛋白質を含有する治療薬は、有効成分として該蛋白質のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される 1 以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0155】該治療薬の投与方法としては、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、又は口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、静脈内等の非経口投与による方法を挙げることができる。該治療薬の剤形としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏剤、テープ剤等が挙げられる。

【0156】経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。例えば、乳剤及びシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p - ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0157】非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液又は両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤は、カカオ脂、水素化脂肪、カルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は、該抗体そのもの、又は受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させて吸入を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体としては、例えば、乳糖、グリセリン等が挙げられる。該抗体及び使用する担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤とすることができる。また、これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。投与量又は投回数、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人 1 日当たり 10  $\mu$ g/kg ~ 8 mg/kg

である。

【0158】(6) 本発明の蛋白質を用いて該蛋白質と特異的に結合する受容体をスクリーニングする方法  
本発明の蛋白質と直接結合する物質を同定する等の方法を用いることにより、該蛋白質と特異的に結合する受容体をスクリーニングすることができる。このような方法の一例として、C.Vriesら が V E G F 蛋白質を用い、V E G F 受容体を同定した発現クローニング法が挙げられる (C.Vriesら ; Science, 255, 989, 1992)。 該受容体は本発明の蛋白質が関与する疾患の治療薬、又は本発明の蛋白質が関与する情報伝達系や生体機能に関する研究に利用することができる。

【0159】(7) 本発明の形質転換体を用いて本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現を解析する方法  
本発明の形質転換体を種々の被験物質と共存させ、該形質転換体における遺伝子の発現レベルを解析することにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写を制御する物質、本発明の蛋白質による転写制御機能に関与する物質、又は本発明の蛋白質により転写制御を受ける遺伝子をスクリーニングすることができる。

【0160】(8) 本発明の抗体を用いて本発明の蛋白質を免疫学的に検出する方法  
本発明の抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明の蛋白質又は該蛋白質を含む組織を免疫学的に検出することができる。該検出法は、異常な血管新生の亢進を伴う疾患、異常な血管新生に基づく眼の疾患、異常な血管新生に基づく関節炎、異常な血管新生を伴う皮膚疾患、異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨芽細胞の異常に基づく疾患、脾臓 細胞の異常に基づく疾患、虚血性疾患、創傷治癒の遅延を伴う疾患等、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異が原因となっている疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、蛋白質の定量にも用いられる。

【0161】免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイプレートを用いる E L I S A 法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等が挙げられる。また、免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明の蛋白質と反応する抗体のうちエピトープが異なる 2 種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A 法、<sup>125</sup>I 等の放射性同位体で標識した本発明の蛋白質と本発明の蛋白質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等が挙げられる。

【0162】(9) 本発明の抗体を含有する医薬  
本発明の蛋白質、例えば配列番号 1 の V P L F は V E G F と高い相同性を示すが、V E G F は固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマ

チ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患を進展・増悪させることが報告され、VEGF抗体はこれら疾患の治療に有用であることが報告されていることから、本発明の抗体、特に配列番号1のVPLFに対する抗体は、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse症候群、卵巣過敏症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患の治療薬になり得る。

【0163】また、本発明の蛋白質、例えば配列番号1のVPLFはPDGFと高い相同性を示すが、PDGFは、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患を進展・増悪させることが報告され、PDGF抗体はこれら疾患の治療に有用であることが報告されていることから、本発明の抗体、特に配列番号1のVPLFに対する抗体は、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患の治療薬になり得る。

【0164】本発明の抗体を含有する治療薬は、有効成分としての該抗体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。該治療薬の調製、投与は前記(5)の本発明の蛋白質を含有する医薬に準じて行うことができる。

【0165】(10)本発明のDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有してなる組換えベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法[例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等]により不活化するか、又は任意の配列と置換した変異クローンを作製する[例えば、Nature, 350, 6315, 243 (1991)]。胚性幹細胞の変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法又は集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上に存在する本発明の蛋白質をコードする遺伝子に任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入ったホモ個体の中から、本発明の蛋白質を

コードする遺伝子の発現が部分的に又は完全に抑制された個体としてノックアウト非ヒト動物を得ることができる。

【0166】また、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子の任意の位置へ変異を導入することにより、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能である。例えば、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子の翻訳領域中へ、塩基を置換、欠失、挿入等させて変異を導入することにより、その遺伝子産物の活性を改変させることも可能である。また、その発現制御領域への同様な変異を導入することにより、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモーターを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例[Cell, 87, 7, 1317 (1996)]やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例[Science, 278, 5335, (1997)]が知られている。

【0167】従って、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子についても、このように任意の時期や組織で発現を制御でき、また、任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や発現制御領域に有する、ノックアウト非ヒト動物を作製することができる。ノックアウト非ヒト動物は、任意の時期、任意の程度又は任意の部位で、本発明の蛋白質に起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。このように、本発明のノックアウト非ヒト動物は、本発明の蛋白質に起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0168】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

〔実施例1〕ヒト神経前駆細胞NT-2及びヒト卵巣癌組織由来cDNAライブラリーの作製

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞であって、レチノイン酸処理により神経細胞に分化可能なNT-2神経前駆細胞(Stratagene社より購入)を用いた。添付マニユアルに従って、NT-2細胞を培養後、レチノイン酸を添加して、さらに2週間培養した。その培養細胞を集めて、文献(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press 1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA(+)RNAを精製した。

【0169】同様に、ヒト卵巣癌組織より、文献(J. S

ambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA(+)RNAを精製した。

【0170】それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャプ法[M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号: 3) 及びOligo dT primer (配列番号: 4) を用いて文献[鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzukiら, Gene, 200: 149-156 (1997)]に記載の方法に従ってBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、5'末端側のセンスプライマー (配列番号: 5) と3'末端側のアンチセンスプライマー (配列番号: 6) の2種のPCRプライマーを用いるPCR (polymerase chain reaction) により二本鎖cDNAに変換し、SfiIで切断した。なお、このPCRは市販のキット: GeneAmp XLPCRキット (Perkin Elmer社製) を使用して、95 で5分間熱処理後、95 で1分間、58 で1分間及び72 で10分間の反応サイクルを12回繰り返す、その後4 で保持することにより行った。次いで、DraIIIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864、発現ベクター、3392 bp) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。これらより得たクローンのプラスミドDNAについて、cDNAの5'端と3'端の塩基配列を、DNAシーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit 又はBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応を行った後、DNAシーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems社製) を用いて決定した。

【0171】〔実施例2〕VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する新規増殖因子の同定  
作製したcDNAライブラリーの各クローンの塩基配列について、蛋白質アミノ酸配列データベースSWISS PROTあるいは塩基配列データベースGenBankに登録されているVEGF/PDGFスーパーファミリーに属する既知蛋白質として、ヒトVEGF (SWISS PROTアクセッションナンバー: P15692)、ヒトVEGF-B (SWISS PROTアクセッションナンバー: P49765)、ヒトVEGF-C (SWISS PROTアクセッションナンバー: P49767)、ヒトVEGF-D (GenBankアクセッションナンバー: AJ000185)、ヒトPLGF (SWISS PROTアクセッションナンバー: P49

763)、ヒトPDGF-A (SWISS PROTアクセッションナンバー: P04085) 及びヒトPDGF-B (SWISS PROTアクセッションナンバー: P01127) の7分子を用い、これら分子のアミノ酸配列と相同性をもつcDNAクローンを選択し、そのクローンにコードされる蛋白質をVPLFとした。配列番号1にVPLFのアミノ酸配列を配列番号2にその塩基配列を示す。

【0172】VPLFは、BLAST2を用いた相同性解析において、血管内皮増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D及び血小板由来増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトPDGF-A、ヒトPDGF-Bと、それぞれP値0.0022で29%、P値0.0014で29%、P値0.00022で25%、P値 $1.8 \times 10^{-7}$ で29%、P値0.0016で36%、P値0.00059で28%の有意な相同性を示した。また、同じVEGF/PDGFスーパーファミリーに属するOrfウイルスのNZ2 (SWISS PROTアクセッションナンバー: P52584) 及びNZ7 (SWISS PROTアクセッションナンバー: P52585) とも、それぞれP値 $4.7 \times 10^{-5}$ で29%、P値 $7.7 \times 10^{-7}$ で30%と有意な相同性を示した。血管内皮増殖因子ファミリーに属する蛋白質ヒトPLGFとは、P値0.94で26%の相同性を示した。VEGF/PDGFスーパーファミリーにおいては、ダイマー間のジスルフィド結合形成、蛋白質分子内のジスルフィド結合形成、及び、活性発現に重要な8個のシステイン残基が存在し (Journal of Biological Chemistry, 269, 32879-32885, 1994)、これら8個のシステイン残基は、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子間で保存されていることが知られている。VPLFのアミノ酸配列をアライメントプログラムCLUSTAL W (Nucleic Acids Reserch, 22, 4673-4680) を用いて既知VEGF/PDGFスーパーファミリー分子と比較してみると、配列番号1で示されるアミノ酸配列においても該モチーフを形成するために必須なシステイン残基の位置と数が完全に保存されていることが分かった (図1)。従って、VPLFがVEGF/PDGFスーパーファミリーに属する増殖因子としての活性を有することは明白である。なお、図1中のVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF-A、PDGF-B及びPLGFは、それぞれヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D、ヒトPDGF-A、ヒトPDGF-B及びヒトPLGFを指す。また、VPLFとファミリー分子間で保存されている配列を白抜きで示し、すべてのファミリー分子で保存されているシステイン残基に\*印を、その他のアミノ酸残基に#印を記した。

【0173】配列番号2に示した塩基配列をもとに、塩

基配列データベースGenBank/EMBL/DDBJを、BLAST2を用いて検索したところ、同一遺伝子由来のESTと考えられる塩基配列3個と一致していることが分かった(平成11年2月5日現在)。これらESTのGenBankアクセションナンバーは、W21436、AI024617、AA759138であり、VPLF塩基配列との関係を図2に示す。これらEST塩基配列はVPLFの完全長をカバーしていない。それぞれのESTの塩基配列と同一性を示す遺伝子をGenBank、EMBL及びDDBJの各データベースよりBLAST2を用いて検索したが、有意な同一性を示す遺伝子はどのESTにおいても選択されなかった。従って、VPLFは本発明により初めて取得された新規な遺伝子であることが分かった。

【0174】VPLFをコードするcDNA(配列番号2の全塩基配列)を含有するプラスミドNT2RP4000328を含む大腸菌: *Escherichia coli* DH10B/NT2RP4000328及びその部分配列cDNA(配列番号2のうち、塩基第576番~第1328番)を含有するプラスミドOVARC1001401を含む大腸菌: *Escherichia coli* DH10B/OVARC1001401は、それぞれFERMBP-6686及びFERMBP-6687として、平成11年4月1日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号:郵便番号305-8566)に寄託されている。

【0175】〔実施例3〕VPLFの塩基配列の解析配列番号2に示したVPLFの塩基配列をもとに、蛋白質の開始コドン予測プログラムATGPr(Bioinformatics, 14, 384-390, 1998)を用いて開始コドン周辺配列を解析した。5'末端側から94~96番目に位置するATGが開始コドン、1129~1131番目に位置するTAGが終止コドンと特定され、ORFにコードされる蛋白質は345アミノ酸から構成されると推定された。さらに、配列番号1に示したVPLFのアミノ酸配列をもとに、蛋白質の細胞内局在性部位予測プログラムPSORT(Genomics, 14, 897-911, 1992)を用い、分泌蛋白質としての特徴を有するかどうかについて解析を行った。VPLFのN末端14残基のアミノ酸配列部分は、分泌蛋白質に見られるシグナルペプチド配列の特徴を有しており、VPLFは分泌蛋白質に分類された。また、GENETYX-MAC7.3(SOFTWARE DEVELOPMENT CO.,LTD製)を用いて疎水性プロットを作製した結果を図3に示す。VPLFのN末端部分には分泌蛋白質に特徴的な疎水性の高い領域が存在する。

【0176】〔実施例4〕VPLFを発現している臓器VPLFの塩基配列の一部と一致した3個のEST、W21436、AI024617、AA759138は、それぞれ肺、精巣、精巣から単離された。また、VPLFをコードするcDNAクローンの3'末端非翻訳領域の塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenB

ank、EMBL、DDBJをBLAST2を用いて検索したところ、同一遺伝子由来のESTと考えられる塩基配列16個と一致していることが分かった(平成11年2月5日現在)。これらESTのGenBankアクセションナンバーは、AA631149、AA039965、AA039880、AI128937、N89807、AA613059、AA868252、C02066、AI051824、AA594888、N66753、AI193332、AI243165、AI262908、AI284795及びN22076であり、UniGeneHs.43080として登録されている。これら16個のESTは、大腸、耳、肺、腎臓、卵巣、甲状腺上皮、前立腺、子宮から単離された。従って、VPLFが大腸、耳、肺、腎臓、卵巣、甲状腺上皮、前立腺、精巣、子宮で発現していることが示された。

【0177】〔実施例5〕RT-PCR法を用いたVPLFをコードするDNAの発現解析Clontech社より購入したヒト臓器polyA<sup>+</sup>RNA4μg、および癌細胞株からAGPC法[Analytical Biochemistry, 162, 156(1987)、実験医学、9, 1937(1991)]にて調製した全RNA4μgを鋳型とし、市販のSUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis(GIBCO BRL社製)を用い、添付マニュアルに従ってcDNAを合成した。

【0178】ヒト臓器polyA<sup>+</sup>RNAとしては、副腎、脳、小脳、脳下垂体、腎臓、膵臓、小腸、骨髄、心臓、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、子宮由来のpolyA<sup>+</sup>RNAを用いた(図4において、それぞれ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25と略した)。

【0179】癌細胞株としては、T細胞株(Jurkat、Molt-3、Molt-4、HUT78;図5において、それぞれ1、2、3、4と略した)、B細胞株(Namalwa KJM-1、Daudi、Raji;図5において、それぞれ5、6、7と略した)、顆粒球/単球系細胞株(HL-60、U-937、THP-1;図5において、それぞれ8、9、10と略した)、血管内皮細胞株(IVEC、HUVEC;図5において、それぞれ11、12と略した)、メラノーマ細胞株(WM266-4、WM15;図5において、それぞれ13、14と略した)、神経芽細胞腫細胞株(SK-N-MC;図5において15と略した)、肺癌細胞株(PC-9、HLC-1、QG90;図5において、それぞれ16、17、18と略した)、前立腺癌細胞株(PC-3;図5において19と略した)、胃癌細胞株(KATOIII;図5において20と略した)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2;図5において、それぞれ21、22と略した)、大腸癌細胞株(Colo205、SW1116、LS180;図5において、それぞれ23、24、25と略した)を用い

た。Jurkat、QG90およびSW1116は愛知癌センターより入手した。HLC-1は大阪大学癌研究所より入手した。KAT0111およびPC-9は免疫生物研究所より入手した。HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) はクラボウ社より入手した。IVEC [J. Cell. Physiol., 157, 41 (1993)] はN.T.L.FRANCE社より入手した。Molt-4、DaudiはJapanese Collection of Research Bioresources (JCRB) cell bank [インターネットアドレス <http://cellbank.nihs.go.jp/>] より入手した。それ以外の細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) より入手した。

【0180】次いで、合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った。すなわち、下記に示すヒトVPLF、ヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF-C、ヒトVEGF-D、ヒトPDGF-A、ヒトPDGF-B、ヒトPLGF、あるいはヒトアクチンに特異的な塩基配列を含むプライマーを用い、合成したcDNAを滅菌水を用いて50倍に希釈した溶液を材料にして常法により反応液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.001% (w/v) gelatin, 0.2μM 遺伝子特異的プライマー, 1 unit recombinant Taq polymerase (Takara社製)] を調製後、94℃で3分間反応させ、次いで94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間のサイクルを30あるいは35サイクル反復し、最後に72℃で7分間反応させ、4℃で一晩保存する条件でPCRを行った。

【0181】該PCRでは、配列番号7及び配列番号8に示したオリゴヌクレオチドをヒトVPLFに特異的なプライマーとして、配列番号9及び配列番号10に示したオリゴヌクレオチドをヒトVEGFに特異的なプライマーとして、配列番号11及び配列番号12に示したオリゴヌクレオチドをヒトVEGF-Bに特異的なプライマーとして、配列番号13及び配列番号14に示したオリゴヌクレオチドをヒトVEGF-Cに特異的なプライマーとして、配列番号15及び配列番号16に示したオリゴヌクレオチドをヒトVEGF-Dに特異的なプライマーとして、配列番号17及び配列番号18に示したオリゴヌクレオチドをヒトPLGFに特異的なプライマーとして、配列番号19及び配列番号20に示したオリゴヌクレオチドをヒトPDGF-Aに特異的なプライマーとして、配列番号21及び配列番号22に示したオリゴヌクレオチドをヒトPDGF-Bに特異的なプライマーとして、配列番号23及び配列番号24に示したオリゴヌクレオチドをヒトアクチンに特異的なプライマーとして用いた。

【0182】該PCR反応液をアガロースゲル電気泳動により分析したところ、それぞれのプライマーに特異的なDNAのバンドが観察され、その大きさは、ヒトVPLF、ヒトVEGF、ヒトVEGF-B、ヒトVEGF

-C、ヒトVEGF-D、ヒトPDGF-A、ヒトPDGF-B、ヒトPLGF、ヒトアクチンでそれぞれ、約1,000bp、350bp、300bp、520bp、500bp、420bp、430bp、360bp、800bpであった。

【0183】これらのバンドの濃さを比較することで、各種因子の発現量の半定量的な比較を行った。ヒト臓器より調製したcDNAを材料にした場合の結果を図4に、癌細胞株から調製したcDNAを材料にした場合の結果を図5に示した。図4及び図5により、VPLFは、正常組織よりも癌化した細胞での発現が高いこと、癌細胞株の中でも上皮系の細胞で強く発現し、血球系での発現は低いことが分かった。

【0184】〔実験例6〕昆虫細胞を宿主とした、全長型VPLF及びVPLF-N (配列番号1の1~226番目のアミノ酸が欠失したN未欠失体) の発現昆虫細胞による組換え蛋白質の生産には目的DNAを組み込んだ組換えウイルスの作製が必要であるが、その作製には、(1)目的の蛋白質をコードするcDNAを含む特殊なベクター (トランスファーベクター) を作製する過程、(2)バキュロウイルスDNAとトランスファーベクターとを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組換えにより組換えウイルスを作製し、さらに増殖させる過程、及び(3)組換えウイルスを細胞に感染させ、目的の蛋白質を発現させる過程が含まれる。具体的には、以下のようにして組換えウイルスを作製し、目的蛋白質を生産した。

【0185】(1)トランスファーベクターの作製  
(i) pVL-VPLF: VPLFの全長 (配列番号1の1~345番目のアミノ酸配列) をコードするDNAを運ぶベクター、pVL-VPLFを以下のように作製した (図6)。実施例2に記載のプラスミドNT2RP4000328 (以下「pME-VPLF」という) のSacI-BglII断片 (0.66 kb) をベクターpET21a (+) (ノバジェン社製) のSacI-BglII部位へ挿入することにより、プラスミドpET21-VPLF (5') を作製した。本プラスミドをNotI-BglIIで切断し、0.68 kbの断片 (断片A) を調製した。

【0186】pME-VPLFを鋳型とし、配列番号25及び配列番号26に示したDNAをプライマーとして用いてPCRを行った。増幅したDNA断片をBglII及びEcoRIで切断し、0.4 kbの断片 (断片B) を調製した。断片A及び断片Bを、昆虫細胞トランスファーベクターpVL1392 (ファーマンジェン社製) のNotI-EcoRI部位に挿入し、pVL-VPLFを作製した。本プラスミドには、VPLFの第1番目のMetから第345番目のGlyまでをコードするDNAが含まれていた。

【0187】(ii) pVL-VPLF-N: VPLFの、C末端側の部分ペプチド (配列番号1の227~345番目のアミノ酸配列) をコードするDNAを含むベクター、pVL-VPLF-Nを以下のように作製した

(図7)。昆虫由来の分泌蛋白質メリチンのシグナルペプチドDNAを運ぶプラスミドpMbac(ストラタジーン社製)をNheIで切断した後、クレノウフラグメント(Klenow Fragment)で処理し、NotIリンカー(5'-GCGGCCGC-3')を連結させてプラスミドpMbac(NotI)を作製した。本プラスミドをNotI及びSmaIで切断し、85bpの断片を調製した(断片C)。

【0188】pME-VPLFを鋳型とし、配列番号26及び配列番号27に示したDNAをプライマーとして用いてPCRを行った。増幅した断片をSspI及びEcoRIで切断し、0.36 kbの断片を調製した(断片D)。断片C及び断片Dを、ベクターpVL1392のNotI-EcoRI部位に挿入し、pVL-VPLF Nを作製した。本プラスミドには、メリチン由来のシグナルペプチド、メリチン由来のペプチド(Asp-Pro-Ser-Pro:配列番号34)、及びVPLFの227番目のPheから345番目のGlyまでをコードするDNAが含まれていた。

【0189】(2)組換えウイルスの作製  
ESF921培地(プロテインエクプレッション社製)にて培養した昆虫細胞Sf9(岩城硝子社製)に、線状バキュロウイルスDNA[バキュロゴールド・バキュロウイルスDNA;ファーマンジェン社製]及び上記(1)で作製したトランスファーベクターをリポフェクション法[蛋白質核酸酵素、37、2701(1992)]にて導入することによって、組換えバキュロウイルスを作製した。これは、具体的には以下のようにして行った。

【0190】4µgのpVL-VPLF又はpVL-VPLF Nと、15ngの線状バキュロウイルスDNAとを12mlの滅菌蒸留水に溶解し、さらに、リポフェクション6mlと滅菌蒸留水6mlとを混和したものを添加し、室温で15分間放置した。一方、Sf9細胞 $1 \times 10^6$ 個を2mlのESF921培地に懸濁し、直径50mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに、上記のプラスミドDNA、線状バキュロウイルスDNA、及びリポフェクション混和溶液全量を加え、27で3日間培養後、組換えウイルスを含む培養上清1mlを採取した。シャーレには新たにESF921培地1mlを添加し、さらに27で3日間培養して、組換えウイルスを含む培養上清をさらに1.5ml取得した。

【0191】次に、VPLFをコードするDNAまたはVPLF NをコードするDNAを含む組換えウイルスをそれぞれ、以下の手順で増殖させた。Sf9細胞を $5 \times 10^5$ /mlとなるように50mlのESF921培地中で、125ml容三角フラスコを用い、27にて125rpmで振とう培養した。細胞が $2 \times 10^6$ /mlにまで増殖した時点で、組換えウイルスをMOI(感染多重度)=10となるように感染させ、さらに3日間培養した。培養液を1,200×gで10分間遠心分離して細胞を除去し、蛋白質発現に使用する組換えウイルス溶液を得た。

【0192】なお、組換えウイルス溶液の力価は以下に示す方法で測定した。Sf9細胞 $6 \times 10^5$ 個を4mlのESF921培地に懸濁し、直径50mmの細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で1時間放置して細胞をシャーレに付着させた。上清を除き、ESF921培地400mlとESF921培地で希釈した上記組換えウイルス溶液100mlを加え、室温で1時間放置した後、培地を除き、5mlの1%低融点アガロース[アガーブランク・アガロース;ファーマンジェン社製]を含む培地[滅菌した、1mlの5%アガーブランクプラス・アガロース水溶液と4mlのTMN-FHインセクトメディウム(ファーマンジェン社製)を混和し、42に保温したもの]を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためにピニルテープをシャーレに巻き、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27で5日間培養した。該シャーレに0.01%のニュートラルレッドを含むPBSを1ml加え、さらに1日間培養した後、出現したプラーク数を数えた。その結果、 $0.5 \sim 2 \times 10^8$ /mlの組換えウイルス溶液を調製することができた。

【0193】(3)蛋白質の発現  
High5細胞(インビトロジェン社製)を $5 \times 10^5$ /mlとなるように100mlのESF921培地中で、250ml容三角フラスコを用い、27にて125rpmで振とう培養した。細胞が $3 \sim 4 \times 10^6$ /mlにまで増殖した時点で、 $3 \times 10^7$ 個になるように、25mlのESF921培地をあらかじめ添加してある底面積182cm<sup>2</sup>のフラスコに継代した。室温で1時間放置して細胞を付着させた後、培地を除去し、VPLFをコードするDNA又はVPLF NをコードするDNAを含む組換えウイルスをMOI=5になるように添加し、さらにESF921培地を添加して10mlとし、室温で1時間感染させた。ESF921培地を20ml添加し、27で3日間培養し、目的の組換え蛋白質を発現させた。

【0194】VPLFをコードするDNAまたはVPLF NをコードするDNAを含む組換えウイルスを感染させた細胞の培養上清それぞれに、ヘパリンセルロファイン樹脂を添加して4にて一晚反応させた後、樹脂を回収して20mMリン酸ナトリウム(pH7.2)で洗浄し、1MNaClを含む同緩衝液で溶出させた。培養上清1ml相当分の溶出液を試料として、実施例13で得られた抗VPLFペプチド抗体(KM2676)を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、VPLFをコードするDNAを感染させた場合には分子量約40kDa付近のバンドが、VPLF NをコードするDNAを含む組換えウイルスを感染させた場合には分子量約20kDa付近のバンドが検出された。

【0195】〔実施例7〕VPLF Nの精製  
VPLF Nを発現させたHigh5細胞の培養上清4

0.0 mlに、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) で平衡化したヘパリンセルロファイン樹脂 (チッソ社製) を4 ml添加し、4 で12時間静かに攪拌することによって、蛋白質を樹脂に吸着させた。樹脂をカラムに詰め、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) 10 mlで洗浄した後、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 0.75 M NaCl溶液10 mlで溶出した。20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 0.2 M NaCl溶液に対して透析した後、8,000 × gで5分間遠心分離し、上清を、20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 0.2 M NaCl溶液で平衡化した、10 mlのSPセファロース (ファルマシアバイオテック社製) カラムに通塔した。20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) / 0.2 M NaCl溶液40 mlで洗浄した後、0.2 ~ 1 M NaClのリニアグラジエント40 mlで溶出させた。さらに、20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 1 M NaCl溶液10 mlで溶出させた。溶出条件は、1 ml / 分、2 ml / 画分で行った。VPLF Nが多く含まれる画分を回収し、3 M NaClになるように20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 4 M NaCl 20 溶液を添加した。次に、20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 3 M NaCl溶液で平衡化したブチルセファロース (ファルマシアバイオテック社製) カラム1.57 mlに通塔し、20 mMリン酸ナトリウム (pH 7.2) / 3 M NaCl溶液10 mlで洗浄した後、3 ~ 0 M NaClのリニアグラジエント20 mlで溶出させた。溶出条件は、0.2 ml / 分、1 ml / 画分で行った。VPLF Nを含む画分を回収し、セントリコン-10 (アミコン製) を用いて濃縮した。

【0196】得られた濃縮液を試料として、5 ~ 20% 30 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー R250を用いたゲル染色によって解析した結果、精製純度は約85%であった。精製蛋白質のN末端アミノ酸配列を解析した結果、Asp-Pro-Ser-Pro-Phe-Val (配列番号35) 及びSer-Pro-Phe-Val-Phe-Gly (配列番号36) であったので、本精製蛋白質は、VPLFの227番目のPheから345番目のGlyのN末端に、メリチン成熟体由来の4アミノ酸 (Asp-Pro-Ser-Pro: 配列番号34) が付加した蛋白質 (配列番号32) と2アミノ酸 (Ser-Pro) が付加した蛋白質 (配列番号 40 33) の混合物であることが明らかとなった。

【0197】次に、精製したVPLF N 2 µgを試料とし、還元条件下及び非還元条件下でSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、VPLF Nの移動度の変化を調べた。検出は、クマシーブリリアントブルー R250での染色によって行った。その結果、還元条件下では分子量約20 kDaに相当する移動度を示していたバンドが、非還元条件下では、移動度が低下し、分子量約30 kDaに相当する位置にバンドが検出された (図8)。したがって、VPLF NはS-S結合を介 50

した二量体を形成していることが示唆された。

【0198】次にN型糖鎖の有無を調べた。0.5% SDS及び50 mM β-メルカプトエタノールの存在下で、2 µgのVPLF Nを100 で5分間処理した後、2.5%になるようにNonidet P-40 (ナカライ社製) を添加し、0.3 UのN-glycosidase F (宝酒造社製) を添加して反応させた。37 で20時間反応させた後、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色でVPLF Nを検出した。その結果、N-glycosidase Fによる処理で分子量が低下したことから、VPLF NにはN型糖鎖が付加されていることが示された。

【0199】〔実施例8〕動物細胞を宿主としたVPLFの発現

(1) 組換えベクターの作製:

(i) pIRES-VPLF: pIRESneo (クオンテック社製) のNotI-EcoRI部位に、pVL-VPLFのNotI-EcoRI (1 kb) 断片を挿入し、pIRES-VPLFを作製した (図9)。

(ii) pAGE248-VPLF及びpAGE210-VPLF: pVL-VPLFのNotI-EcoRI (1 kb) 断片を、ベクターpBluescriptIIのNotI-EcoRI に挿入し、pBS-VPLFを作製した。pBS-VPLFをNotIで切断し、Klenowで処理した後、BamHIリンカー (5'-CGGATCCG-3') を挿入し、pBS-VPLF (B)を作製した。pBS-VPLF (B)のBamHI-KpnI (1 kb) をpAGE210又はpAGE248 [Sasaki, K., et al., J. Biol. Chem., 269.14730-14737(1994)] のBamHI-KpnI部位に挿入し、pAGE210-VPLF及びpAGE248-VPLFを作製した (図10)。

【0200】(2) 細胞への組換えベクターの導入

(i) PC-9細胞への導入: プラスミドpIRES-VPLF 1 µgを含むRPMI 1640培地 (0.2%炭酸ナトリウム、2 mM L-グルタミンを含む) 50 mlと、2 mlのLipofectAMINE™ 2000 (GIBCO BRL社製) を含むRPMI 1640培地50 mlとを混合し、室温で20分間放置した。PC-9細胞をRPMI 1640培地に懸濁し、24ウェルプレートに添加した0.5 mlのRPMI 1640培地中へ、3 × 10<sup>5</sup>個の細胞を播種した。本細胞培養液へ上記の混合液を添加し、37 で一日培養した。0.3 mg/mlのG418及び5% dFCS (ギブコ社製) を含むRPMI 1640培地で培養し、耐性株 (以下「PC-9/VPLF株」という) を取得した。

【0201】(ii) CHO (DG44株) 細胞への導入: 8 × 10<sup>6</sup>細胞/mlになるようにK-PBS溶液 (10.2 g KCl, 0.16 g NaCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.81 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) に懸濁した細胞懸濁液200 mlに、pAGE248-VPLF又はpAGE210-VPLFを4 µg添加し、Gene-Pulser 2 (Bi

oRad社製)を用いて、エレクトロポレーション法(0.35 kV, 250 mF)にて組換えベクターを細胞に導入した。組換えベクターを導入した細胞を5%のdFCS(GIBCO社製)を含むEXCELL302培地(ニチレイ社製)で1日間培養後、0.3 mg/mlになるようにハイグロマイシンを添加し耐性株を選択した。さらに、100 nMまたは500 nMになるようにメトトレキサート(MTX)を添加し耐性株を選択した(以下、pAGE 248-VPLF、pAGE 210-VPLFを導入して作製した耐性株を、それぞれ「DG44/pAGE 248-VPLF株」、「DG44/pAGE 210-VPLF株」といい、2種類の株を「DG44/VPLF株」と総称する)。

#### 【0202】(3)発現の確認

上記(2)(i)で作製したPC-9/VPLF株、及び(ii)で作製したDG44/VPLF株を、それぞれRPMI 1640培地(0.2%炭酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、10%FCS及び0.3 mg/ml G418を含む)及び、EXCELL302(5%FCS、0.3 mg/mlハイグロマイシン、及び100 nM若しくは500 nM MTXを含む)中で、コ

ンフルエントになるまで培養し、培養上清を得た。この培養上清に、それぞれ、ヘパリンセルロース樹脂(チッソ社製)を添加して4 にて一晩反応させた後、樹脂を回収して20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.2)で洗浄し、1 M NaClを含む同緩衝液で溶出させた。培養上清1 ml相当分の溶出液を試料として、下記の実施例13で取得される抗VPLFペプチド抗体(KM2676)を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果を図11に示した。図11において、PC-9/VPLF株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンをCMV-VPLF、DG44/pAGE 248-VPLF株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンをSV40-VPLF、DG44/pAGE 210-VPLF株の培養上清から調製した溶出液を泳動したレーンをMo-VPLFとして示した。

【0203】ウェスタンブロッティングによる解析の結果、動物細胞で発現させた培養上清中から、分子量約45 kDa及び約20 kDaの2本のバンドが検出された。約20 kDaのバンドは、昆虫細胞を宿主として発現させたVPLF Nとほぼ同じ移動度を示した。したがって、VPLFは動物細胞においてプロセッシングを受けたフォームで発現することが分かった。

#### 【0204】〔実施例9〕VPLFのヒト未分化造血細胞に及ぼす効果

実施例7で得られたVPLF Nのヒト未分化造血細胞に及ぼす効果を以下のようにして調べた。ヒト未分化造血細胞として、CD34陽性ヒト骨髓細胞(BIOWHITTAKER社製)を用いた。IMDM培地(STEMCELL TECHNOLOGIES社製)中に $1 \times 10^5$ 個/mlの細胞密度で懸濁したCD34陽性ヒト骨髓細胞を100  $\mu$ l/ウェルで細胞

培養用96ウェルプレート(住友ベークライト社製)に播種し、終濃度500 ng/mlになるようにVPLF N又は幹細胞因子SCF(Genzyme社製)を加え、5%CO<sub>2</sub>条件下、37 度で48時間培養した。48時間後、0.25  $\mu$ Cy<sup>3</sup>の[6-<sup>3</sup>H]-Thymidine(以下「<sup>3</sup>H-TdR」と略す)(NEN社製)を加え更に12時間培養し、セルハーベスターを用いてガラスフィルター上に細胞を回収した。回収した細胞内に取り込まれた放射活性を放射線カウンターマトリックス96(パッカー社製)を用いて測定した。ボランティア二人のCD34陽性ヒト骨髓細胞ロット番号9F0329(19歳、アジア人、男性、CD34陽性率96.4%)とロット番号9F1809(29歳、白人、男性、CD34陽性率96.1%)を用い、独立に上述の実験を繰り返したが、いずれの場合も同じ結果が得られた。ロット番号9F0329を用いた実験の結果を図12に示した。SCFのヒトCD34陽性骨髓細胞に対する増殖促進活性は観察されたが、VPLF Nの効果としては当該増殖促進活性は観察されなかった。

#### 【0205】〔実施例10〕VPLFの平滑筋細胞に及ぼす効果

実施例7で得られたVPLF Nの平滑筋細胞に対する生物活性を、以下のようにして確認した。96ウェルコラーゲンコートプレート(IWAKI社製)に、10%牛胎児血清(FBS)、ペニシリン(GIBCO BRL社製)100 unit/ml、ストレプトマイシン(GIBCO BRL社製)100  $\mu$ g/mlを添加したM-199培地(GIBCO BRL社製)に浮遊させたラット由来平滑筋細胞(RSMC)[FEBS Letters, 425, 123, (1998)]を3000個/200  $\mu$ l/ウェルとなるように加え、37 度のCO<sub>2</sub>インキュベーター中で1日間培養した。培養後、培養上清を除去し、各ウェルに100  $\mu$ lずつOpti-MEM培地(GIBCO BRL社製)を加え、37 度で3時間培養した。培養後、各ウェルにOpti-MEM培地で希釈したヒトVEGF165(R&D社製)、ヒトIL-5(R&D社製)、ヒトPDGF BB(R&D社製)又はVPLF Nをそれぞれ100  $\mu$ l/ウェル(終濃度160pg/mlから500ng/ml)添加し、37 度のCO<sub>2</sub>インキュベーター中で2日間培養した。培養終了後、各ウェルに100  $\mu$ lずつMTT反応試薬[Cell Proliferation Kit I; ベーリンガーマンハイム社製]を添加し、37 度のCO<sub>2</sub>インキュベーター中で4時間培養した。培養終了後、各ウェルに100  $\mu$ lずつ溶解試薬を加えた後、37 度でインキュベーター中で一晩溶解した。溶解終了後、OD650 nmを対象波長としてOD590 nmにおける各ウェルの吸光値を測定した。

【0206】結果を図13に示す。ヒトVPLF Nは濃度依存的に、RSMCに対する増殖促進活性を示した。陽性コントロールのヒトPDGF BBの増殖活性は50~100倍低い濃度でRSMCに対する増殖促進

活性を示した。これに対してヒトVEGF165およびコントロールとして用いたヒトIL-5はRSMCに対する増殖活性を示さなかった。

【0207】〔実施例11〕 VPLFの内皮細胞に及ぼす効果

実施例7で得られたVPLF Nの内皮細胞に対する生物活性を、以下のようにして確認した。96ウェルコラーゲンコートマイクロタイタープレート (IWAKI社製) に、E-BM培地に2%牛胎児血清 (FBS)、ヒト組換え型上皮成長因子 (rEGF) 10 ng/ml、ハイドロコルチゾン 1 µg/ml、ゲンタマイシン 50 µg/ml、アンファテリシン B 50 ng/ml を添加した培地 (クラボウ社製) に浮遊させたヒト皮膚由来微小血管内皮細胞HUVEC (クラボウ社製) を3000個/100 µl/ウエルになるように加えた。次に、上記培地で希釈したヒトVEGF165 (R&D社製)、ヒトIL-5 (R&D社製)、ヒトPDGF BB (R&D社製) 又はVPLF Nをそれぞれ100 µl/ウエル (終濃度10 pg/mlから100 ng/ml) 添加し、37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベーター中で5日間培養した。培養終了後、各ウエルに200 µlの細胞発色用試薬 [Cell Counting Kit; 同仁化学社製] を加え、37 °Cで1~2時間培養した。培養終了後、OD450 nmを対象波長としてOD650 nmにおける各ウエルの吸光値を測定した。

【0208】結果を図14に示す。ヒトVEGF165は濃度依存的にHUVECに対する増殖活性を示したが、ヒトVPLF N、ヒトPDGF BBは増殖活性を示さなかった。また、コントロールとして使用したヒトIL-5は増殖活性を示さなかった。

【0209】〔実施例12〕 VPLF抗体作製の抗原の調製

VPLFの蛋白配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1~4 (配列番号28~31) を選択した。以下の実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。質量分析は、日本電子JMS-HX110Aを用いるFAB-MS法により行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen, S. A.) らの方法 [Analytical Biochemistry, 222, 19 (1994)] により行った。加水分解は塩酸蒸気中110 °Cで20時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・アキュ・タグ (Waters AccQ-Tag) アミノ酸分析計 (Waters社製) を用いて分析した。

【0210】(1) 化合物1 (配列番号28) (H-Cys-Thr-Gln-Ala-Glu-Ser-Asn-Leu-Ser-Ser-Lys-Phe-Gln-Phe-Ser-Ser-Asn-Lys-Glu-Gln-Asn-Gly-NH<sub>2</sub>) の合成

16.5 µmolのFmoc-NHが結合した担体樹脂 [Rink amide MBHA resin樹脂; ノババイオケム社製] 30 mgを

自動合成機 (島津製作所製) の反応容器に入れ、858 µlのDMFを加えて1分間攪拌して溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従って次の操作を行った。

(a) 30%ピペリジン-DMF溶液734 µlを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

(b) 担体樹脂を500 µlのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

(c) Fmoc-Gly-OH (165 µmol)、HBTU (165 µmol)、HOBT 1水和物 (165 µmol) およびDIEA (330 µmol) をDMF (858 µl) 中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を30分間攪拌し、溶液を排出した。

(d) 担体樹脂を858 µlのDMFで1分間洗浄後、溶液を排出し、これを5回繰り返した。

【0211】こうして、Fmoc-Gly-NHが担体上に合成された。次に、(a) 及び (b) の工程の後、(c) の工程でFmoc-Asn(Trt)-OHを用いて縮合反応を行い、(d) の洗浄工程を経て、Fmoc-Asn(Trt)-Gly-NHが担体上に合成された。

【0212】以下、工程(c)において、Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次用いて、(a) ~ (d) の工程を繰り返した。その後、(a) 及び (b) の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下で12時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。ただし、Fmoc-Phe-OHの縮合時には、858 µlのDMFの代わりに198 µlのNMPと660 µlのDMFの混合溶媒を用いた。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%)、および1,2-エタンジチオール (5%) からなる混合溶液1 mlを加えて室温で2時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10 mlを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして37.9 mgを取得した。この粗生成物を、1 mlの90%酢酸、4 mlのDMF、1 mlのトリフルオロエタノールに溶解した上清を逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. X 25mm) を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220 nmで検出し、化合物1を含む画分を得た。さらに粗ペプチド溶解時の沈殿に30 mgのジチオスレイトールと1 mlの

8 M尿素を加えて溶解し、3 mlの2 M酢酸で希釈して、上記と同様に逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物1を含む画分を得た。これらの画分を凍結乾燥して、化合物1を8.6 mg得た。

質量分析 [FABMS] :  $m/z = 2434.0 (M+H^+)$  ;

アミノ酸分析 : Asx3.1(3), Ser4.6(5), Glx5.1(5), Gly1.1(1), Thr0.9(1), Ala1.0(1), Cys1.3(1), Lys2.0(2), Leu1.0(1), Phe2.0(2)

【0213】(2) 化合物2 (配列番号29) (H-Cys-Ser-Ile-Arg-Glu-Glu-Leu-Lys-Arg-Thr-Asp-Thr-Ile-Phe-Trp-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) の合成

16.5 μmolのFmoc-NHが結合した担体樹脂 [Rink Amide MBHA樹脂、ノババイオケム社製] 30 mgを出発物質として、上記(1)と同様にして、Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに5 mg/mLの濃度で2-メチルインドールを含むTFA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1 mlを加えて室温で6時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。上記(1)と同様にして、粗ペプチド41.4 mgを取得し、酢酸水溶液に溶解後、逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物2を7.1 mg得た。

質量分析 [FABMS] :  $m/z = 2051.2 (M+H^+)$  ;  
アミノ酸分析 : Asx1.1(1), Ser1.0(1), Glx2.1(2), Gly1.3(1), Arg1.5(2), Thr1.9(2), Pro1.1(1), Cys1.2(1), Lys1.0(1), Ile1.8(2), Leu1.1(1), Phe0.9(1) (Trpは分析せず)

【0214】(3) 化合物3 (配列番号30) (Ac-Thr-Phe-Asp-Glu-Arg-Phe-Gly-Leu-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp-Ile-Cys-Lys-NH<sub>2</sub>) の合成

16.5 μmolのFmoc-NHが結合した担体樹脂 [Rink Amide MBHA樹脂、ノババイオケム社製] 30 mgを出発物質として、上記(1)と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去し、31 μlの無水酢酸を含む500 μlのDMFを加えて30分間攪拌した。溶液を排出後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これにT

FA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1 mlを加えて室温で8時間放置し、側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行った。上記(1)と同様にして粗ペプチド40.7 mgを取得し、酢酸水溶液に溶解後、逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物3を18.3 mg得た。

質量分析 [FABMS] :  $m/z = 2071.6 (M+H^+)$  ;

アミノ酸分析 : Asx4.0(4), Glx3.1(3), Gly1.0(1), Arg0.9(1), Thr1.0(1), Pro1.0(1), Cys1.3(1), Lys1.0(1), Ile0.9(1), Leu1.0(1), Phe2.0(2)

【0215】(4) 化合物4 (配列番号31) (H-Cys-Arg-Gly-Ser-Thr-Gly-Gly-OH) の合成

24.0 μmolのFmoc-Glyが結合した担体樹脂 [Wang樹脂、ノババイオケム社製] 30 mgを出発物質として、上記(1)と同様にして、Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去し、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これにTFA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1 mlを加えて室温で8時間放置し、側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行った。上記(1)と同様にして粗ペプチド21.1 mgを取得し、0.1% TFA水溶液に溶解後、逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物4を3.6 mg得た。

質量分析 [FABMS] :  $m/z = 637.2 (M+H^+)$  ;

アミノ酸分析 : Ser0.9(1), Gly3.1(3), Arg0.9(1), Thr0.9(1), Cys1.1(1)

【0216】〔実施例13〕VPLFを認識するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

実施例12で得られた化合物1~4は、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH(カルビオケム社製)とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解して10 mg/mLに調整し、1/10容量の25 mg/mL MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)succinimide; ナカライテスク社製] を滴下して30分攪拌反応させた。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG-25カラムなどのゲルろ過カラムでフリーのMBSを除いて得られたKLH-MB2.5 mgを0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (PH7.0) に溶解したペプチド1 mgと混合し、室温で3時間、攪拌反応させた。反応後、PBSで透析したものを免疫原として用いた。

【0217】(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製  
上記(1)で調製した化合物1~4のKLHコンジュゲ

ート100 $\mu$ gをそれぞれ水酸化アルミニウムアジュバント (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988) 2mgおよび百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$ 細胞とともに5週令雌SDラット各3匹に投与した。投与2週間後より、各KLHコンジュゲート100 $\mu$ gを1週間に1回、計4回投与した。該ラットの心臓より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

【0218】脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (250 $\times$ g、5分間) した。得られた沈殿画分にトリス - 塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

【0219】(3) 酵素免疫測定法 (バインディングELISA)

アッセイ用の抗原には実施例12で得られた各化合物をサイログロブリン (以下「THY」という) とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は、架橋剤にMBSの代わりにSMCC [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社] を用いる以外は上記(1)と同様に行った。96ウェルのEIA用プレート (グライナー社) に、上記のように調製したコンジュゲート (10 $\mu$ g/ml) を50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) / ダルバッコリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) を100ml/ウェル加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

【0220】放置後、1%BSA/PBSを捨て、該プレートに被免疫ラット抗血清、モノクローナル抗体の培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を50ml/ウェル分注し、2時間放置した。該プレートを0.05%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [商品名: スパン20 (ICI社商標Tween 20相当品: 和光純薬社製)] / PBS (以下「Tween-PBS」という) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリンを50ml/ウェル加え、室温で1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 (2,2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム、1mMABTS / 0.1Mクエン酸バッファー (pH4.2)) を添加し、発色させてOD415nmの吸光度をプレートリーダー [Emax; Molecular Devices社] を用いて測定した。

【0221】(4) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1 [P3-U1: ATCCより購入] を正常培地 (10%

ウシ胎児血清添加RPMI培地) で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$ 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

【0222】(5) ハイブリドーマの作製

上記(2)で得られたラット脾細胞と上記(4)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離 (250 $\times$ g、5分間) した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液を  $10^8$ 個のマウス脾細胞あたり0.5ml加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。

【0223】該懸濁液を遠心分離 (900rpm、5分間) し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地 [10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement (ペーリンガー・マンハイム社製) を加えた培地] 100ml中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200ml/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37で10~14日間培養した。

【0224】培養後、培養上清を上記(3)に記載した酵素免疫測定法で調べ、抗原ペプチドに反応してコントロールペプチドに反応しないウエルを選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返して、抗ヒトVPLFモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。その結果、化合物2を抗原に用いて抗ヒトVPLFモノクローナル抗体KM2676を取得した。図15に示すように、KM2676は化合物2に特異的な反応性を示した (図15において、化合物2をコートしたウエルをVPLF2ペプチドとして示した)。

【0225】なお、抗ヒトVPLFモノクローナル抗体KM2676を産生するハイブリドーマKM2676は、平成12年4月18日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号: 郵便番号305-8566) にFERMBP-7137として寄託されている。

【0226】(6) モノクローナル抗体の精製  
プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (BALB/c) に上記(5)で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1~8ml/匹) した。

【0227】該腹水を遠心分離 (1200 $\times$ g、5分間) し、固形分を除去した。精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 (Antibodies - A Laboratory Ma

nual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いた ELISA 法により IgG2b と決定された。

【0228】〔実施例 14〕抗ヒト VPLF モノクローナル抗体を用いたヒト VPLF の検出 (ウェスタンブロットニング) 実施例 7 で得られた VPLF-N を 100 ng / レーンで SDS-PAGE (5-20% グラジエントゲル、アトー社製) (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) にて分画した後、PVDF 膜 (ミリポア社製) にブロットニングした。

【0229】該膜を 1% BSA-PBS でブロッキング後、該膜に抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM2676 の培養上清を原液で添加し、室温で 2 時間放置した。該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、第二抗体として 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン抗体 (ダコ社製) を添加し、室温で 1 時間放置した。

【0230】該膜を Tween-PBS でよく洗浄した後、ECL kit (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を用いて検出した (図 16)。図 16 に示すように、抗ヒト VPLF モノクローナル抗体 KM2676 \*

\*は、ヒト VPLF (N 末欠失体) の分子量に相当する 20 kDa 付近のバンドに特異的に反応した。

【0231】

【発明の効果】本発明によれば、固形腫瘍や腫瘍転移等の異常な血管新生の亢進を伴う疾患、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、血管新生緑内障等の異常な血管新生に基づく眼の疾患、慢性関節リュウマチ等の異常な血管新生に基づく関節炎、乾せん等の異常な血管新生を伴う皮膚疾患、腹水癌、胸水癌、Crow-Fukuse 症候群、卵巣過敏症症候群等の異常な血管透過性の亢進を伴う疾患、動脈硬化等の平滑筋細胞の分化増殖異常を伴う疾患、糸球体腎炎等の腎メザンギウム細胞の分化増殖異常を伴う疾患、貧血等の血液幹細胞の分化増殖異常を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨芽細胞の異常に基づく疾患、糖尿病等の膵臓細胞の異常に基づく疾患、動脈硬化、脳梗塞、急性心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等の虚血性疾患、神経性下肢潰瘍、糖尿病性下肢潰瘍等の創傷治癒の遅延を伴う疾患等の治療薬の探索、開発に有用な増殖因子としての活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードする DNA、該蛋白質を認識する抗体、及びこれらの利用方法を提供することができる。

【0232】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

HELIX RESEARCH INSTITUTE, INC.

<120> Novel VEGF/PDGF-Like Fact

or

<130> H12-0711J5

<150> JP 11-115516

<151> 1999-04-22

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu Leu Thr

Ser Ala Leu Ala Gly Gln

1

5

10

15

Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu

Ser Ser Lys Phe Gln Phe

20

25

30

Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln

Asp Pro Gln His Glu Arg

35

40

45

Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn Gly Ser Ile

His Ser Pro Arg Phe Pro

50

55

60

His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr Val Leu Val

Trp Arg Leu Val Ala Val

100 105 110  
 Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile Leu Gly Arg  
 Trp Cys Gly Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser Lys Gly Asn  
 Gln Ile Arg Ile Arg Phe  
 130 135 140  
 Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser Glu Pro  
 Gly Phe Cys Ile His Tyr  
 145 150 155 1  
 60  
 Asn Ile Val Met Pro Gln Phe Thr Glu Ala  
 Val Ser Pro Ser Val Leu  
 165 170 175  
 Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu  
 Asn Asn Ala Ile Thr Ala  
 180 185 190  
 Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu Ile Arg Tyr  
 Leu Glu Pro Glu Arg Trp  
 195 200 205  
 Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu Tyr Arg Pro  
 Thr Trp Gln Leu Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg  
 Val Val Asp Leu Asn Leu  
 225 230 235 2  
 40  
 Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys  
 Thr Pro Arg Asn Phe Ser  
 245 250 255  
 Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr  
 Asp Thr Ile Phe Trp Pro  
 260 265 270  
 Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly  
 Asn Cys Ala Cys Cys Leu  
 275 280 285  
 His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro  
 Ser Lys Val Thr Lys Lys  
 290 295 300  
 Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys  
 Thr Gly Val Arg Gly Leu  
 305 310 315 3  
 20  
 His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu  
 His His Glu Glu Cys Asp  
 325 330 335  
 Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly  
 340 345

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1328

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

gga gta caa gat cct cag cat gag aga att  
 att act gtg tct act aat 258  
 Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile  
 Ile Thr Val Ser Thr Asn  
 40 45 50 55

gga agt att cac agc cca agg ttt cct cat  
 act tat cca aga aat acg 306  
 Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His  
 Thr Tyr Pro Arg Asn Thr  
 60 65 70

gtc ttg gta tgg aga tta gta gca gta gag  
 gaa aat gta tgg ata caa 354  
 Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu  
 Glu Asn Val Trp Ile Gln  
 75 80 85

ctt acg ttt gat gaa aga ttt ggg ctt gaa  
 gac cca gaa gat gac ata 402  
 Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu  
 Asp Pro Glu Asp Asp Ile  
 90 95 100

tgc aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gaa  
 ccc agt gat gga act ata 450  
 Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu  
 Pro Ser Asp Gly Thr Ile  
 105 110 115

tta ggg cgc tgg tgt ggt tct ggt act gta  
 cca gga aaa cag att tct 498  
 Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val  
 Pro Gly Lys Gln Ile Ser  
 120 125 130 1

35  
 aaa gga aat caa att agg ata aga ttt gta  
 tct gat gaa tat ttt cct 546  
 Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val  
 Ser Asp Glu Tyr Phe Pro  
 140 145 150

tct gaa cca ggg ttc tgc atc cac tac aac  
 att gtc atg cca caa ttc 594  
 Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn  
 Ile Val Met Pro Gln Phe  
 155 160 165

aca gaa gct gtg agt cct tca gtg cta ccc  
 cct tca gct ttg cca ctg 642  
 Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro  
 Pro Ser Ala Leu Pro Leu  
 170 175 180

gac ctg ctt aat aat gct ata act gcc ttt  
 agt acc ttg gaa gac ctt 690  
 Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe  
 Ser Thr Leu Glu Asp Leu  
 185 190 195

att cga tat ctt gaa cca gag aga tgg cag

Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr  
 His Glu Val Leu Gln Leu  
 300 305 310  
 aga cca aag acc ggt gtc agg gga ttg cac  
 aaa tca ctc acc gac gtg 1074  
 Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His  
 Lys Ser Leu Thr Asp Val  
 315 320 325  
 gcc ctg gag cac cat gag gag tgt gac tgt  
 gtg tgc aga ggg agc aca 1122  
 Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys  
 Val Cys Arg Gly Ser Thr  
 330 335 340  
 gga gga tagccgcatc accaccagca gctcttg  
 ccc agagctgtgc agtgcagtgg 1178  
 Gly Gly  
 345  
 ctgattctat tagagaacgt atgcgttacc tcca  
 tcctta atctcagttg ttgcttcaa 1238  
 ggacctttca tcttcaggat ttacagtca ttct  
 gaaaga ggagacatca aacagaatta 1298  
 ggagttgtgc aacagctctt ttgagaagga  
 1328  
 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:an artificially  
 synthesized oligo-cap linker seque  
 nce  
 <400> 3  
 agcaucgagu cgccuuguu ggccuacugg  
 30  
 <210> 4  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:an artificially  
 synthesized oligo(dT) primer seque  
 nce  
 <400> 4  
 gcggtgaag acggcctatg tggcctttt tttt  
 tttttt tt 42  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial

<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 7  
tcttcgggct tctcctgctg acatctgccc  
30

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 8  
gcacacacag tcacactcct catggtgctc  
30

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 9  
tgggtgcatt ggagcctcgc cttgctgctc  
30

<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 10  
ctgtaggaag ctcactctc ctatgtgctg  
30

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 11

<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 12  
ccgagcagtc agctggggga gatgtccctg  
30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13  
gccttcgagt ccggactcga cctctcgac  
30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14  
caggacatc tccccagct gactgctcg  
30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 15  
cagggtcca gtaatgaaca tggaccagt  
30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16  
ggcaacttta acaggcacta attcaggtac  
30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 18  
agagaacgtc agctccacgt aggaggccg  
30

<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 19  
ctcgcccatg ttctggccga ggaagccgag  
30

<210> 20  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 20  
ggccaccttg acgctgCGgt ggtggacgCG  
30

<210> 21  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 21  
ctctgctgct acctgCGtct ggtcagCGcc  
30

<210> 22  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial  
Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence  
<400> 22  
tctcacctgg acaggtCGca gctgCGcctg

synthesized primer sequence

<400> 23

gatatcgccg cgctcgtcgt cgac

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 24

caggaaggaa ggctggaaga gtgc

24

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 25

accagagaga tggcagttgg acttaga

27

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 26

gagctgctgg tggattctt actatcctcc

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial

Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 27

acttcttggc aaaatatttg tttttggaag

30

<210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 28  
 Cys Thr Gln Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser  
 Lys Phe Gln Phe Ser Ser  
           1                  5                  10                  15  
 Asn Lys Glu Gln Asn Gly  
                           20

<210> 29  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
       Sequence:Synthetic peptide  
 <220>  
 <221> MOD RES  
 <222> (17)  
 <223> AMIDATION

<400> 29  
 Cys Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr  
 Asp Thr Ile Phe Trp Pro  
           1                  5                  10                  15  
 Gly

<210> 30  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
       Sequence:Synthetic peptide  
 <220>  
 <221> MOD RES  
 <222> (1)  
 <223> ACETYLTATION

<220>  
 <221> MOD RES  
 <222> (17)  
 <223> AMIDATION

<400> 30  
 Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp  
 Pro Glu Asp Asp Ile Cys  
           1                  5                  10                  15  
 Lys

<210> 31  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
       Sequence:Synthetic peptide  
 <400> 31  
 Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly  
           1                  5  
 <210> 32

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial

Sequence:Synthetic peptide

&lt;400&gt; 32

Asp Pro Ser Pro Phe Val Phe Gly Arg Lys

Ser Arg Val Val Asp Leu

1 5 10 15

Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr

Ser Cys Thr Pro Arg Asn

20 25 30

Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys

Arg Thr Asp Thr Ile Phe

35 40 45

Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys

Gly Gly Asn Cys Ala Cys

50 55 60

Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys

Val Pro Ser Lys Val Thr

65 70 75 80

Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg

Pro Lys Thr Gly Val Arg

85 90 95

Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala

Leu Glu His His Glu Glu

100 105 110

Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly

Gly

115 120

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial

Sequence:Synthetic peptide

&lt;400&gt; 33

Ser Pro Phe Val Phe Gly Arg Lys Ser Arg

Val Val Asp Leu Asn Leu

1 5 10 15

Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu Tyr Ser Cys

Thr Pro Arg Asn Phe Ser

20 25 30

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr

Asp Thr Ile Phe Trp Pro

35 40 45

Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly

Asn Cys Ala Cys Cys Leu

50 55 60

His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro

Ser Lys Val Thr Lys Lys

65 70 75 80

<400> 34  
 Asp Pro Ser Pro  
 1  
 <210> 35  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:N-terminus sequence of  
 synthetic peptide of SEQ ID NO: 32  
 <400> 35  
 Asp Pro Ser Pro Phe Val  
 1 5  
 <210> 36  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:N-terminus sequence of  
 synthetic peptide of SEQ ID NO: 33  
 <400> 36 71

72

【0233】 Ser Pro Phe Val Phe Gly  
 【配列表フリーテキスト】配列番号3：人工的に合成したオリゴキャップリンカー配列

配列番号4：人工的に合成したオリゴ(dT)プライマー配列

配列番号5～27：人工的に合成したプライマー配列

配列番号28～31：人工的に合成したペプチド配列

配列番号32及び33：人工的な融合ポリペプチド配列

配列番号34：市販のプラスミドpMbac (STRATAGENE社製)に含まれる部分配列

配列番号35：配列番号32の合成ペプチドのN末端配列

配列番号36：配列番号33の合成ペプチドのN末端配列

【図面の簡単な説明】

【図1】VPLFとVEGF/PDGFファミリーとのアミノ酸配列の比較を示す図である。

【図2】VPLFとESTクローンの関係を示す図である。

【図3】VPLFの疎水性プロットを示す図である。

【図4】RT-PCR法による、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子のヒト組織における発現を解析した結果を示す。

【図5】RT-PCR法による、VEGF/PDGFスーパーファミリーに属する因子の癌細胞における発現を解

析した結果を示す。

【図6】プラスミドpVL-VPLFの構築の手順を示す。

【図7】プラスミドpVL-VPLF Nの構築の手順を示す。

【図8】精製したVPLF Nの還元及び非還元条件下でのSDS-PAGE電気泳動の結果を示す。

【図9】プラスミドpIRES-VPLFの構築の手順を示す。

10 【図10】プラスミドpAGE248-VPLF及びpAGE210-VPLFの構築の手順を示す。

【図11】動物細胞(PC-9、CHO)を宿主としてVPLFを発現させた結果を示す。

【図12】ヒトCD34陽性細胞に対するVPLF Nの作用を検討した結果を示す。

【図13】ラット平滑筋細胞RSMCに対するVPLF N、VEGF165、PDGFBB、及びIL-5の増殖促進活性を検討した結果を示す。

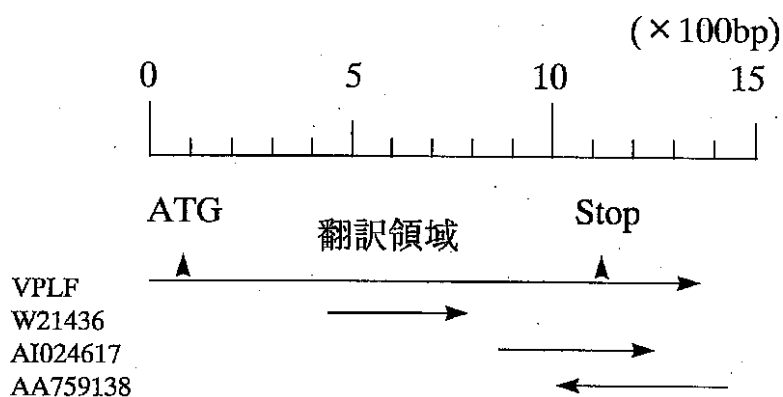
20 【図14】ヒト臍帯静脈血管内皮細胞HUVECに対するVPLF N、VEGF165、PDGFBB、及びIL-5の増殖促進活性を検討した結果を示す。

【図15】抗ヒトVPLFモノクローナル抗体KM2676の反応特異性を解析した結果を示す。

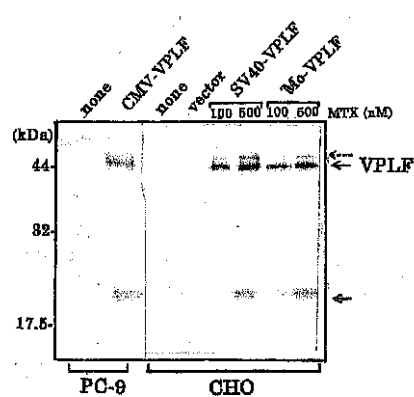
【図16】ウェスタンブロッティングによるヒトVPLFの検出結果を示す。



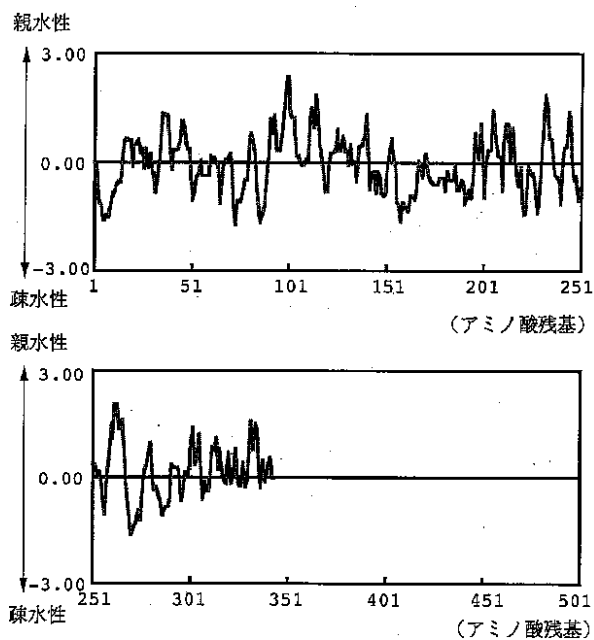
【図2】



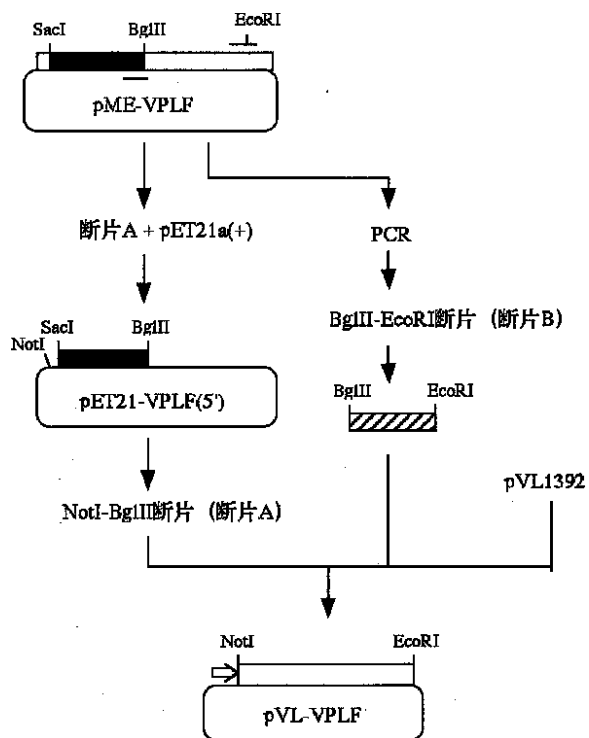
【図11】



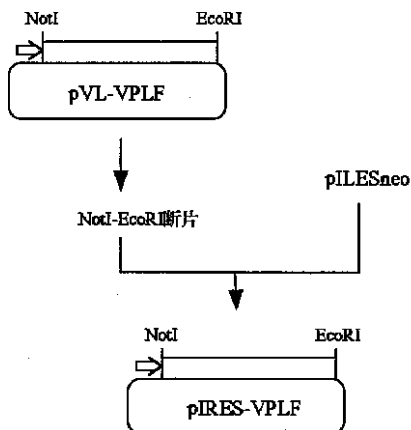
【図3】



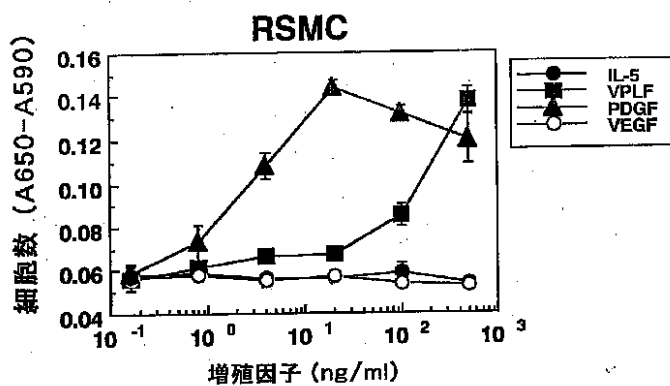
【図6】



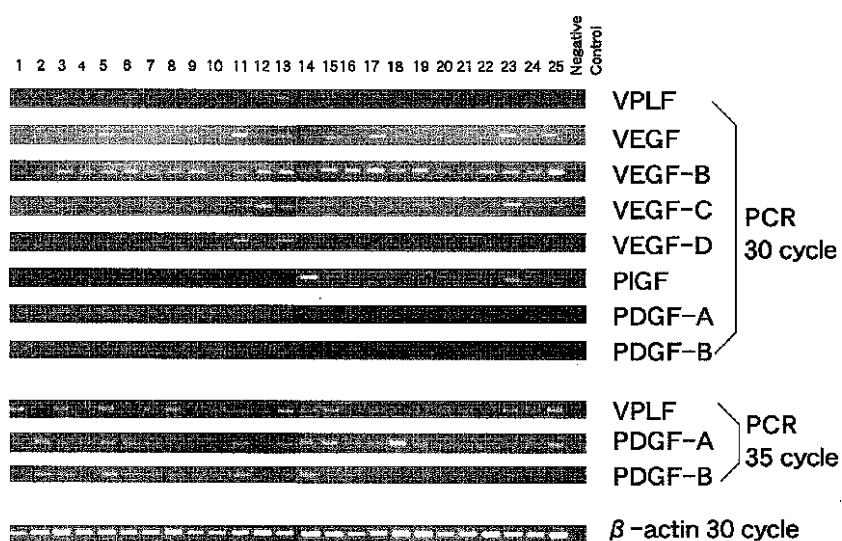
【図9】



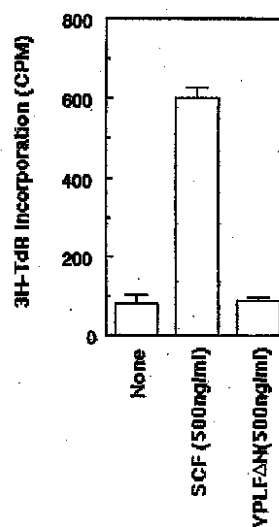
【図13】



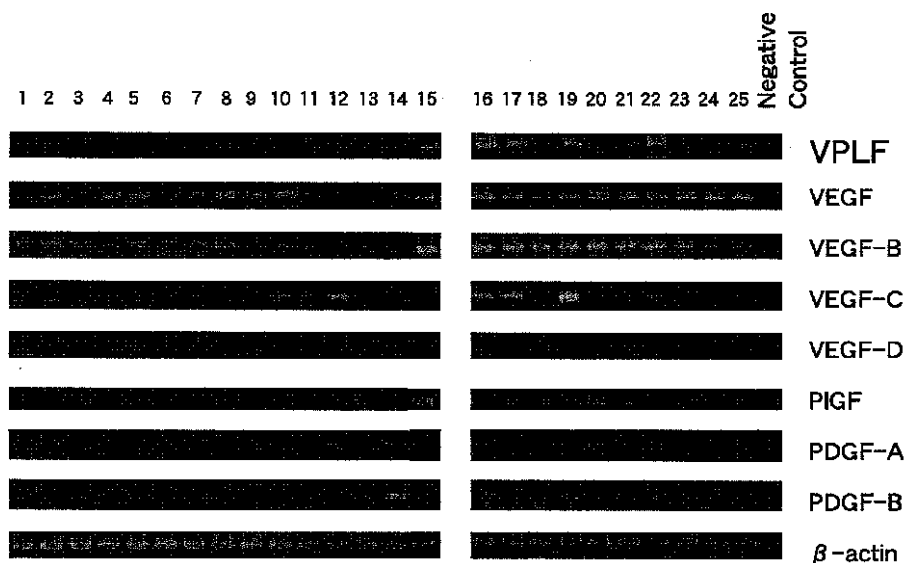
【図4】



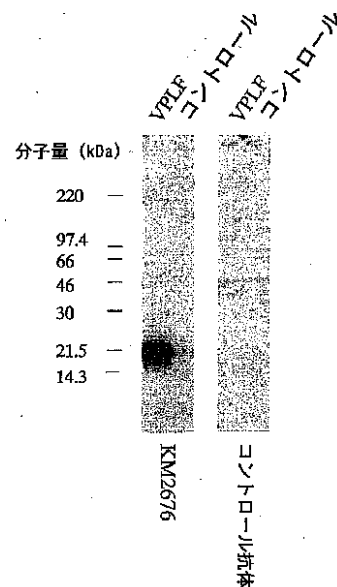
【図12】



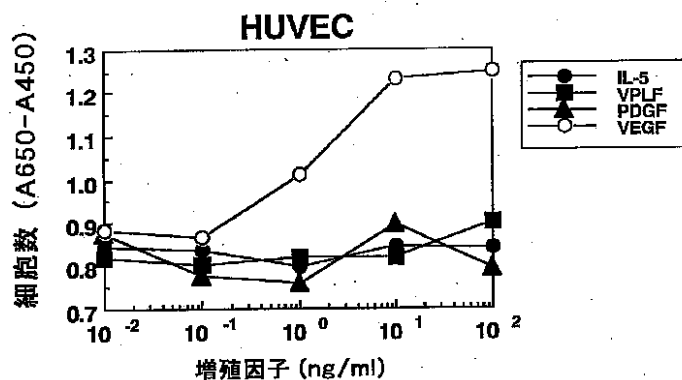
【図5】



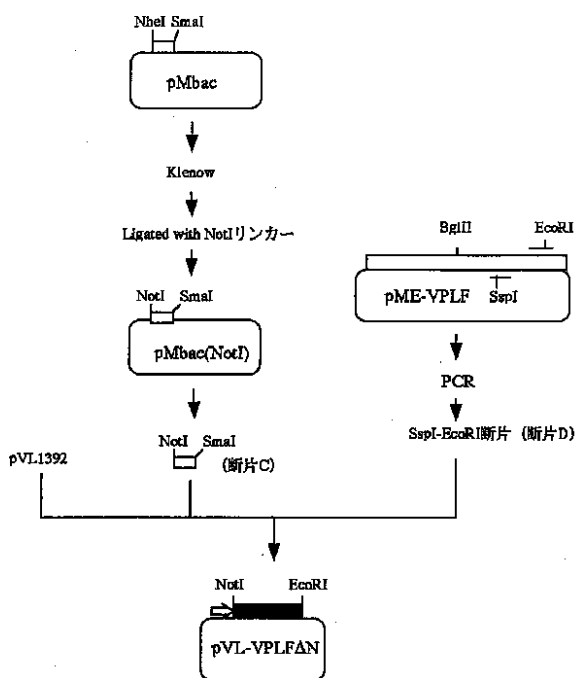
【図16】



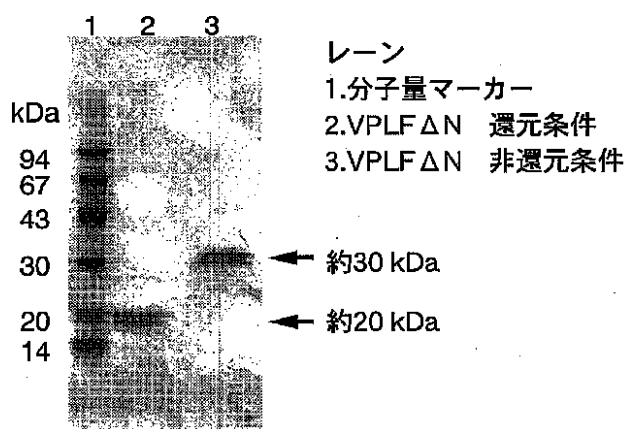
【図14】



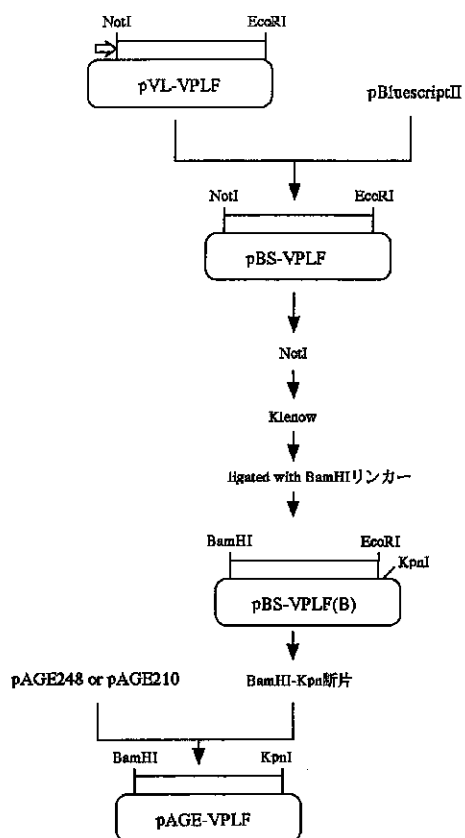
【図7】



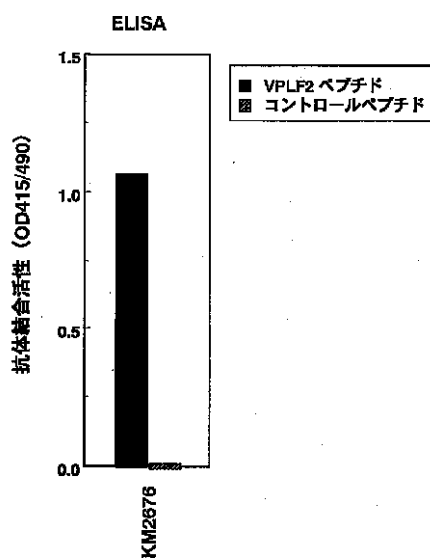
【図8】



【図10】



【図15】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>8</sup> (参考)
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	3/10		7/00
	7/00		7/06
	7/06		9/10
	9/10		1 0 1
	1 0 1		9/14
	9/14		13/12
	13/12		15/00
	15/00		17/00
	17/00		19/00
	19/00		19/02
	19/02		19/10
	19/10		21/00
	21/00		27/02
	27/02		29/00
	29/00		1 0 1
	1 0 1		35/00
	35/00		35/04
	35/04	C 0 7 K	14/515
C 0 7 K	14/515		14/52
	14/52		16/24
	16/24	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/15		1/19
	1/19		1/21
	1/21	C 1 2 P	21/02
	5/10		21/08
	15/02	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15
	21/08		33/50
C 1 2 Q	1/68		33/53
G 0 1 N	33/15		
	33/50		33/566
	33/53	A 6 1 K	37/24
	33/566	C 1 2 N	5/00
			15/00
			B
			C

(72)発明者 佐藤 光男  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 榊原 敏弘  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 古谷 安希子  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 廣田 真意子  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 新海 暁男  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 柴田 健志  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 太田 紀夫  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗  
酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 西川 哲夫  
東京都板橋区氷川町27-3-403

(72)発明者 磯貝 隆夫  
茨城県稲敷郡阿見町大室511 - 12

(72)発明者 杉山 友康  
千葉県木更津市清見台2 - 6 - 23 - 102  
(72)発明者 石井 静子  
千葉県木更津市矢那4508 - 19 - 202

专利名称(译)	新的vegf / pdgf样因子		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001017188A</a>	公开(公告)日	2001-01-23
申请号	JP2000122994	申请日	2000-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	螺旋研究院		
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社 公司的Helix研究所		
[标]发明人	設楽研也 佐藤光男 榊原敏弘 古谷安希子 廣田真意子 新海暁男 柴田健志 太田紀夫 西川哲夫 磯貝隆夫 杉山友康 石井静子		
发明人	設楽 研也 佐藤 光男 榊原 敏弘 古谷 安希子 廣田 真意子 新海 暁男 柴田 健志 太田 紀夫 西川 哲夫 磯貝 隆夫 杉山 友康 石井 静子		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K38/22 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P9/14 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/515 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395.D A61K48/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/14 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/515 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/24 C12N5/00.B C12N15/00.C A61K38/18 A61K38/22 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24		

4B064/CE03 4B064/CE06 4B064/CE07 4B064/CE09 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA24 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DB52 4C084/DB55 4C084/DB57 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA442 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB152 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD63 4C085/DD88 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA44 4C086/ZA45 4C086/ZA51 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB15 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/CA45 4H045/DA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA05 4H045/GA10 4H045/GA20

优先权 1999115516 1999-04-22 JP

外部链接 [Espacenet](http://Espacenet)

摘要(译)

(带更正) 提供一种蛋白质, 其包含由特定序列表示的氨基酸序列和编码该蛋白质的DNA。[效果]根据本发明, 与异常高血管化有关的疾病, 基于异常新血管化的眼病, 基于异常新血管化的关节炎, 与异常新血管化有关的皮肤疾病以及异常血管渗透。与增生有关的疾病, 与平滑肌细胞异常增殖/增殖相关的疾病, 与肾小球膜细胞异常增殖/增殖相关的疾病, 与血液干细胞异常增殖/增殖相关的疾病, 与成骨细胞异常相关的疾病, 胰腺β 具有作为生长因子的活性的蛋白质, 可用于寻找和开发由细胞异常, 缺血性疾病, 与伤口愈合延迟相关的疾病, 编码该蛋白质的DNA和对该蛋白质的识别所引起的疾病的治疗剂 可以提供抗体及其使用方法。

