

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-238844

(P2006-238844A)

(43) 公開日 平成18年9月14日(2006.9.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47	4B064
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B065
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4H045
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-62066 (P2005-62066)

(22) 出願日 平成17年3月7日(2005.3.7)

(71) 出願人 305060567

国立大学法人富山大学

富山県富山市五福3190

(72) 発明者 細谷 健一

富山県富山市畑中5-16

(72) 発明者 寺崎 哲也

宮城県仙台市泉区明石南2-1-5

(72) 発明者 大槻 純男

宮城県仙台市太白区三神峯1-3-3-3  
04

(72) 発明者 登美 斉俊

富山県射水郡小杉町南太閤山2-1 医薬大  
宿舎3-302

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子

(57) 【要約】

【課題】

血管新生に関わる細胞増殖抑制作用を有する網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質を単離し、アミノ酸配列及び塩基配列を得ること。

【解決手段】

以下の手順により、目的とするタンパク質、そのアミノ酸配列及び塩基配列を得た。

(1) 網膜毛細血管周皮細胞の濃縮培地からの内皮細胞増殖抑制効果を指標にした蛋白群を絞り込み。

(2) 蛋白群に含まれるタンパク質を質量分析系等によってそのアミノ酸配列を同定。

(3) アミノ酸配列を元に、該当アミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする複数の塩基配列を決定。

(4) 塩基配列情報を元にPCR等で、該当する内皮細胞増殖抑制効果を持つ蛋白をコードする塩基配列の全長を決定。

(5) 単離した遺伝子を大腸菌等に導入して蛋白を調製。

本発明のタンパク質は、内皮細胞増殖抑制作用を有し、血管新生を伴う糖尿病網膜症の治療薬に有用である。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

## 【請求項 2】

配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

## 【請求項 3】

配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされ、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

10

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 に記載のタンパク質のいずれかをコードする DNA。

## 【請求項 5】

配列番号 2 に記載の塩基配列のコード領域を含む請求項 4 に記載の DNA。

## 【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の DNA が挿入されたベクター。

## 【請求項 7】

遺伝子治療用である請求項 6 に記載のベクター。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載のベクターを保持する形質転換体。

20

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 1 ~ 3 に記載のタンパク質のいずれかを製造する方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 に記載のタンパク質のいずれかに対する抗体。

## 【請求項 11】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 10 に記載の抗体。

## 【請求項 12】

抗体が、少なくともその一部をヒト化したものである請求項 10 または 11 に記載の抗体

30

## 【請求項 13】

請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の抗体を含む、請求項 1 に記載のタンパク質の検出試薬。

## 【請求項 14】

請求項 13 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、網膜周皮細胞由来の内皮細胞増殖抑制作用を有するタンパク質及び当該タンパク質をコードする遺伝子に関するものである。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

糖尿病網膜症の網膜毛細血管では選択的に周皮細胞が脱落し、内皮細胞が増殖することで血管新生が起きている。内皮細胞と周皮細胞を共培養することで、周皮細胞が内皮細胞の増殖を抑えることが非特許文献 1 に開示されている。この知見は、周皮細胞に内皮細胞増殖を抑制する物質が存在することに結びつく。周皮細胞における内皮細胞増殖抑制因子を同定することは、網膜における血管新生を抑制することに結びつき、糖尿病網膜症治療薬として応用することが可能であると考えられる。

## 【0003】

50

内皮細胞増殖抑制因子としては、形質転換因子 1 [transforming growth factor- 1 (TGF- 1)] が知られており、またTGF- 1は周皮細胞に存在するときは活性を有さず、内皮細胞におけるプラスミンで活性型に変換されることが知られている（非特許文献2）。しかし、この現象はインビトロ(in vitro)では観察されるものの、インビボ(in vivo)における内皮細胞増殖抑制効果は説明できない。周皮細胞の培養濃縮液は内皮細胞増殖抑制効果を示すが、抗TGF- 1抗体でTGF- 1の作用を中和した場合、TGF- 1の効果は、周皮細胞の内皮細胞増殖抑制効果の10%程度である（非特許文献3）。また、網膜血管新生を抑制する因子としては、網膜色素上皮細胞の培養上清から単離されたタンパク質である色素上皮由来因子[pigmented epithelium-derived factor (PEDF)]がある（特許文献1）。さらに、コラーゲンXVIIIのC末端断片であるエンドスタチン(endostatin)も細胞増殖抑制因子として知られている（特許文献2）。 10

【0004】

【非特許文献1】J. Cell Biol., 105, 1455-1462 (1987).

【非特許文献2】J. Cell Biol., 109, 309-315 (1989).

【非特許文献3】J. Cell Physiol., 203, 378-386 (2005).

【非特許文献4】Kondo T, Hosoya K et al., Cell Struct. Funct., 28, 145-153 (2003)

【特許文献1】特表2003-522160

【特許文献2】特表2002-501362

【発明の開示】 20

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記したように複数の内皮細胞増殖抑制因子が従来までに知られているが、網膜周皮細胞由来で、特異的に内皮細胞増殖抑制に作用する因子は同定されていない。これは、網膜が非常に小さな組織であるために、網膜周皮細胞から分泌される蛋白を解析できないためである。すなわち、網膜周皮細胞から分泌される特定の活性を持つ蛋白を解析する手法の確立が課題となっている。網膜周皮細胞由来で、特異的に内皮細胞増殖抑制に作用する因子が同定できれば、血管新生抑制剤、特に糖尿病網膜症治療薬として非常に有用である。糖尿病網膜症時における網膜毛細血管内皮細胞の異常増殖機構に関する知見は、未知の部分が多く、新規の内皮細胞増殖抑制因子が同定によって、新たな血管新生抑制剤や糖尿病網 30

【課題を解決するための手段】

【0006】

かかる課題を達成するために、本発明者らは網膜毛細血管周皮細胞株を樹立し（非特許文献4）、培養液を5倍濃縮して網膜毛細血管内皮細胞株で増殖抑制効果を観察したところ、約65%の阻害効果が示された。さらに、虚血誘導性網膜症モデルマウスに濃縮培地を投与しても網膜血管新生抑制効果は示された。すなわち、網膜毛細血管周皮細胞を樹立し、培養上清を用いることによって、初めて蛋白を精製することが可能となり、上記課題を 40

（1）網膜毛細血管周皮細胞の濃縮培地からタンパク質を分子量、電荷のフラクションで分け、内皮細胞増殖抑制効果を指標に蛋白を絞り込む。

（2）絞り込んだ蛋白群に含まれるタンパク質を質量分析系等によってそのアミノ酸配列を同定する。

（3）同定したアミノ酸配列を元に、該当アミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする複数の塩基配列を決定する。

（4）決定した塩基配列情報を元にPCR法やハイブリダイゼーション法を用い、該当する内皮細胞増殖抑制効果を持つ蛋白をコードする塩基配列の全長を決定する。

（5）単離した遺伝子を用い大腸菌や哺乳類培養細胞、昆虫細胞を用い該当遺伝子がコー 50

ドする蛋白を調製し、培養網膜毛細血管内皮細胞や生体内に投与することによって内皮細胞増殖抑制活性を発現させる。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0007】

本発明は、網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質（配列番号1）と機能的に同等なタンパク質を含む。本発明において、機能的に同等なタンパク質をホモログと呼ぶ。ホモログは、具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を含む。アミノ酸配列における変異の数や部位は、タンパク質の機能を維持できる限り制限されない。変異の数は、通常は全アミノ酸の40%以内であり、好ましくは全アミノ酸の30%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の20%以内である。

10

【0008】

本発明のホモログは、前記アミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAに変異を導入することによって得ることができる。DNAに変異を導入するためには、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻」（Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989年）に記載の部位特異的変異誘発法やPCR法などの方法を用いることができる。変異を導入したDNAを、適当なベクターおよび宿主系を用いて、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻」に記載の方法により遺伝子工学的に発現させればよい。

20

【0009】

本発明におけるホモログには、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされ、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAは、本発明の網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含んでいる。ストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAは、構造的に相同性の高いタンパク質をコードしている可能性が高い。したがって、このようなタンパク質には機能的に同等なタンパク質が多く含まれる。本発明において、高い相同性とは、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上の配列の同一性を言う。アミノ酸配列の相同性は、BLAST

30

【0010】

本発明において、ストリンジエントな条件とは、以下のような条件を示すことができる。例えばロングプローブ（50塩基以上）でハイブリダイゼーションを行う場合には、50%の解離を生ずる温度（ $T_m$ ）の目安を下記計算式から求め、ハイブリダイゼーションの温度を以下のように設定できる。

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{ G+C}) - 0.63(\% \text{ formamide}) - (600/n) - 1.5(\% \text{ mismatch})$$

[Na<sup>+</sup>]はNaイオン濃度；[M]、nはプローブの塩基数である。

$$\text{ハイブリダイゼーション温度} = T_m - 25$$

もし、100%相同性で100塩基以上のプローブを用いる場合には、温度条件は下記のように設定できる。

40

(1) 65 ~ 75 (フォルムアミド無添加)

(2) 35 ~ 45 (フォルムアミド存在下)

短いオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合には、以下の計算式を目安に設定できる。

$$\text{ハイブリダイゼーション温度} = T_m - 5 = 2 \times (\text{A} + \text{Tの数}) + 4 \times (\text{C} + \text{Gの数}) - 5$$

本発明におけるストリンジエントな条件とは、上記条件下でハイブリダイズした後、0.2 × SSC、0.5% SDSの溶液中で65にて洗浄する条件でも依然として陽性のシグナルが観察されることを表す。これらの条件の組み合わせはあくまでも一例である。

50

当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する各種の要素を調整し、目的のストリンジェンシーを経験的に設定することは自明である。ストリンジェンシーを決定する要因には上記条件の他に、例えば、プローブ濃度やハイブリダイゼーション反応時間なども含まれる。

【0011】

PCRのような遺伝子増幅技術を用いて本発明のホモログを得ることもできる。すなわち、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA配列をもとにプライマーを設計し、本発明のタンパク質をコードするDNA配列またはその一部と相同性の高いDNA断片を単離することも可能である。

【0012】

本発明において、「網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質（配列番号1）と機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が内皮細胞増殖抑制活性を有することを指す。

【0013】

この活性は、公知の方法によって確認することができる。具体的には、網膜毛細血管内皮細胞株の培養液に、対象となるタンパク質溶液を添加し、一定時間培養し、細胞増殖を抑制する作用であれば、該タンパク質は網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質と機能的に同等であると判定される。

【0014】

本発明の網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質は、該タンパク質が発現している細胞や組織のような生体材料のみならず、これをコードする遺伝子を適当な発現系に組み込んで遺伝子組み換え体（recombinant）として得ることもできる。網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質を遺伝子工学的な手法によって得るためには、後に述べるように網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質をコードする遺伝子を適当な発現系に組み込んで発現させれば良い。一方、網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質をコードする遺伝子は、網膜周皮細胞のcDNAライブラリー等を鋳型としてPCR等で増幅することにより得ることができる。

【0015】

本発明は、本発明のタンパク質あるいはこれらのホモログをコードするDNAに関する。本発明のDNAは、配列番号1に記載のアミノ酸配列、あるいはそのホモログをコードするものであれば、cDNA、ゲノムDNA、あるいは合成DNAなど、その由来は制限されない。例えば、本発明のDNAは、配列番号2に記載の塩基配列のコード領域からなるDNAを化学的に合成することによって得ることができる。また、網膜周皮細胞やその他の細胞・組織のcDNAライブラリーを鋳型として、前記塩基配列に基づいて設計したプライマーによるPCRで本発明のDNAを増幅することもできる。

【0016】

本発明に含まれるDNAのホモログは、配列番号2に記載の塩基配列のコード領域に対して、少なくとも80%以上、より望ましくは90%以上のホモロジーを有する塩基配列を含むDNAである。DNAを構成する塩基配列のホモロジーは、遺伝子解析ソフトGENETYX-SV/RC Ver4.01（ソフトウェア開発社製）や、遺伝子解析プログラムBLASTによって決定することができる。更に、他の種由来のcDNAを鋳型に用いることにより、本発明に基づくホモログをコードするDNAを増幅することもできる。

【0017】

網膜周皮細胞など、本発明の遺伝子を発現する細胞から調製したcDNAライブラリーを、前記塩基配列からなるDNAをプローブとしてスクリーニングすることによって、本発明のDNAを単離することもできる。PCRと同様に他の種由来のcDNAを用いれば、他の種に由来する、網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子のホモログをコードするDNAを単離することができる。プローブは、先に述べたようなストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる。ラット以外の動物としては、例えば、マウス、ウサギ、イヌ、ヒトなどが挙げられる。

【0018】

10

20

30

40

50

その他、一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられており、この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。これら多型に基づいて塩基配列に変異を生じたDNAも、本発明のDNAに含まれる。

#### 【0019】

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質を組み換え体として得ることができる。組み換え体を産生するために必要な操作は、例えば前記の「Molecular Cloning」などの多くの文献に詳細に記述されている。具体的には、発現させたいDNAの上流に翻訳開始コドン(10)を付加し、下流には翻訳終止コドン(10)を付加する。さらに、転写を制御するプロモーター配列(例えば、trp、lac、T7、SV40初期プロモーター)等の制御遺伝子を付加し、適当なベクターに組み込んで宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製することができる。適切な発現ベクターとしては、例えば、細菌についてはpRSET、pET、pGEMEX、pKK233-2など、酵母についてはpYES2、昆虫細胞についてはpVL1393、pFastBac1、動物細胞についてはpEF-BOS、pSR、pDR2、pCR3.1等(10)が挙げられる。

#### 【0020】

本発明のDNAは、遺伝子治療に有用である。本発明のDNAによってコードされる蛋白質は、細胞増殖抑制因子タンパク質として機能する。従って、本発明のDNAを生体に導入して発現させることにより、例えば、血管新生を伴う糖尿病網膜症の治療に利用(20)することができる。

本発明のDNAは、公知の方法によって生体に導入することができる。外来遺伝子を治療を目的として生体に導入する手法は公知である。例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、あるいはアデノ随伴ウイルスベクター等に本発明のDNAを組み込むことにより、本発明のDNA導入用のベクターとすることができる。このベクターを、例えば単離したリンパ球などに感染させた後、再び生体に返すことにより、エキソビボ(ex vivo)で本発明の遺伝子を生体に導入することができる。

#### 【0021】

発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入すれば、形質転換体を得ることができる。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母などの単細胞真核生物、昆虫、哺乳類などの多細胞生物の細胞などが挙げられる。好ましくは、哺乳類の細胞であり、哺乳類の細胞としては、CHO細胞、293細胞、COS7細胞などが例示できる。この形質転換体を培養することにより、タンパク質を産生させることができる。

#### 【0022】

得られたタンパク質は、当業者に周知の硫酸沈殿、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーを単独あるいは組み合わせて精製することができる。また、本発明のタンパク質を、HisタグやHAタグのような結合親和性を持つタンパク質との融合タンパク質として発現させることにより、アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製方法を適用することもできる。

#### 【0023】

本発明は、本発明のDNA、あるいはその相補鎖とハイブリダイズするDNAであって、少なくとも14ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。このようなDNAは、本発明のDNAを合成するためのプライマーとして、あるいは本発明のDNAやそれを転写したmRNAを検出するためのプローブとして用いることができる。与えられた塩基配列に基づいてプライマーの塩基配列を設計することは、当業者が通常行いうることである。また、検出すべき塩基配列と公知の塩基配列を比較して、適切なプローブを設計することも当業者には自明である。本発明のDNAをプローブとして用いるときには、ジゴキシゲニンやビオチンのような親和性物質、あるいはFITCやローダミンのような蛍光物質を利用して公知の方法によって標識することができる。必要な塩基配列を持つDNAは、化学(50)

的に、あるいは酵素的に合成することによって得ることができる。

【0024】

本発明に基づくプローブ、あるいはプライマーは、本発明のDNAやそれが転写されたmRNAの検出に用いることができる。mRNAは、ノーザンブロット法やRT-PCR法により検出することができる。

【0025】

更に本発明は、本発明のタンパク質に対する抗体に関する。本発明の抗体は、モノクロナール抗体およびポリクロナール抗体のいずれをも含む。これらの抗体は、本発明のタンパク質、またはその断片を免疫原として公知の方法に基づいて作成することができる。

本発明のモノクロナール抗体は、例えば、次のようにして得ることができる。具体的には、本発明のタンパク質を抗原としてマウス、ラット、あるいはハムスター等を免疫する。免疫した動物の脾臓またはリンパ節からリンパ球を取り出し、ミエローマ細胞と融合させてKohlerとMilsteinの方法(Nature, 256, 495-497, 1975)、またはその改良法であるUedaらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4386-4390, 1982)等に従ってハイブリドーマを作製する。得られたハイブリドーマのうち、目的とする反応特性を持つ抗体を産生するものをクローニングし、これを培養することによってモノクロナール抗体を産生させることができる。モノクロナール抗体は、免疫原のタンパク質に特徴的に見出される構造を認識するものを選択することにより、そのタンパク質を特異的に認識するモノクロナール抗体とすることができる。本発明のタンパク質に特徴的な構造は、例えば本発明のタンパク質を構成するアミノ酸配列に特異的に見出されるアミノ酸配列を選択することによって推測することができる。

10

20

【0026】

本発明によるモノクロナール抗体は、その定常領域をヒトのイムノグロブリン分子に組み換えることによってキメラ抗体とすることができる。キメラ抗体は、遺伝子工学的に作製されるモノクロナール抗体のひとつである。例えば、その可変領域(V)がマウスイムノグロブリン由来の可変領域(VH、VL)であり、かつその定常領域(C)がヒトイムノグロブリン由来の定常領域(CH、CL)であるマウス/ヒトキメラモノクロナール抗体が公知である。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgAおよびIgEいずれのクラスに属するヒトイムノグロブリンの定常領域でも利用することができる。好ましくは、ヒトIgGの定常領域が用いられる。

30

【0027】

更に、可変領域におけるフレームワークをヒト化することによって、いわゆるヒト化抗体とすることができる。ヒト型抗体(CDR-grafted抗体)も、遺伝子工学的に作製されるモノクロナール抗体のひとつである。例えば、可変領域(V)中の超可変領域(Hypervariable region:HV)がマウス由来であり、その可変領域(V)のフレームワーク領域がヒトイムノグロブリンに由来するヒト化抗体が公知である。HVは相補性決定領域(Complementarity determining region:CDR)とも呼ばれ、可変領域中に3箇所存在する。それぞれHV1(CDR1)、HV2(CDR2)、HV3(CDR3)と名づけられている。これらの領域は、可変領域において抗原結合特異性を決定する重要な領域である。

40

一方フレームワーク(framework region)とは、V領域においてアミノ酸配列の多様性は比較的少ない領域である。V領域においてHVをはさむ形で4つの領域を占めている。それぞれFR1、FR2、FR3、FR4と呼ばれる。ヒト化抗体は可変領域のみで構成することもできる。あるいはその定常領域としてヒトのイムノグロブリン由来の構造を持たせることによって、完全なイムノグロブリン分子として構成することもできる。

【0028】

動物の胚を操作するトランスジェニック技術により、マウスにヒト抗体遺伝子を導入し、このマウスを免疫することによってヒト抗体を作らせる方法も確立されている(日経サイエンス1995年、6月号、P40-50)。この方法によって得ることができるイムノグロブリン分子は、完全なヒト・イムノグロブリン分子である。このように、イムノグロブリンの一部

50

、あるいは全てをヒト化したものも、その抗体が本発明の網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質を認識するものである限り、本発明に含まれる。

【0029】

キメラ抗体は、例えば次のようにして得ることができる

まず、本発明のマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、活性な V H 遺伝子 (H鎖可変領域をコードする再構成された V D J 遺伝子) と、活性な V L 遺伝子 (L鎖可変領域をコードする再構成された V J 遺伝子) を単離する。他方で、ヒトイムノグロブリンをコードする D N A から C H 遺伝子 (H鎖定常領域をコードする C 遺伝子) と、C L 遺伝子 (L鎖定常領域をコードする C 遺伝子) を取得する。次いで、V H の下流に C H を発現可能なように配列して発現ベクター (p S V 2 n e o など) に組み込む。同様に V L についても、その下流に C L を発現可能なように配列して発現ベクターに組み込む。V H + C L と V L + C L は、1つのベクター上に組み込むこともできるし、別のベクターに挿入することもできる。このようにして作製した発現ベクターを適当な宿主細胞に導入する。V H + C L と V L + C L を別のベクターに挿入した場合には、2種のベクターでコトランスフェクトする。スクリーニングを容易にするために、宿主細胞としては、自らは抗体を産生していない細胞株が有利である。具体的には、P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 細胞 (A T C C C R L 1 5 8 0) や S P 2 / 0 - A g 1 4 細胞 (A T C C C R L 1 5 8 1) 等の骨髓腫細胞を利用することができる。ベクターは、D E A E - デキストラン法、リン酸カルシウム法あるいはエレクトロポレーション法などにより形質転換することができる。形質転換細胞は、まず発現ベクターに挿入された薬物耐性遺伝子を指標としてスクリーニングされる。更に目的とする抗体分子を発現している形質転換体をスクリーニングして、目的のキメラモノクローナル抗体産生細胞を得ることができる。

10

20

【0030】

更に、ヒト化抗体は、例えば次のようにして得ることができる。

まず、マウス H 鎖 C D R 遺伝子とそれに対応するマウス L 鎖 C D R 遺伝子を単離する。一方、ヒトイムノグロブリン遺伝子からは、前記マウス H 鎖 C D R に対応するヒト H 鎖 C D R 以外の全領域をコードするヒト H 鎖遺伝子と、マウス L 鎖 C D R に対応するヒト L 鎖遺伝子を単離する。単離したマウス H 鎖 C D R 遺伝子とヒト H 鎖遺伝子を発現可能なように適当なベクターに導入する。同様にマウス L 鎖 C D R 遺伝子とヒト L 鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう一つの発現ベクターに導入する。または、マウス H 鎖 C D R / ヒト H 鎖遺伝子とマウス L 鎖 C D R / ヒト L 鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで、適当な宿主細胞を形質転換することにより、ヒト化抗体産生形質転換細胞を得られる。宿主細胞の形質転換とスクリーニングは、キメラ抗体と同様に行うことができる。

30

【0031】

ポリクローナル抗体は、例えば、「Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H.D.ら編」(Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989年)などに記載の方法に従って作製することができる。

すなわち精製した本発明のタンパク質、あるいはその断片を抗原として用いて、適切な方法で動物を免疫することにより、抗原となるタンパク質を特異的に認識する抗体を容易に作製し、精製することができる。ポリクローナル抗体を得るための免疫動物としては、一般にマウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ等が用いられる。いずれの場合においても、タンパク質断片を免疫原に用いるには、K L H や アルブミン のようなキャリアータンパク質と結合させることによって、免疫原性を高めることができる。

40

【0032】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質の検出に用いることができる。試料中のタンパク質を抗体によって検出する方法は、イムノプロット法、イムノアッセイ法、あるいは免疫染色法等として公知である。また、これらの検出方法に用いるために、抗体を直接、あるいは間接的に標識する方法も公知である。標識には、一般に酵素、放射性同位元素、あるいは蛍光物質などが用いられる。本発明の抗体は、緩衝液、安定剤、懸濁剤、塩などの溶媒

50



および溶質を適宜組み合わせ、本発明の網膜周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質の検出試薬キットとすることができる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら制限されるものではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

[実施例]

(細胞増殖抑制タンパク質の同定)

網膜毛細血管周皮細胞株の培養濃縮液から硫酸沈殿によってタンパクを回収し、陰イオン交換カラム (Econo-Pac High Q 1mL cartridge; Bio-rad) に通してタンパク質を保持させた。陰イオン交換カラムからのタンパク質溶出には0.01~1M塩化ナトリウム溶液を用いて分画した。分画サンプルの一部を限外濾過によってバッファー交換して10%FBS - DMEMに溶解して網膜毛細血管内皮細胞株に添加し、5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込み量を測定することで、細胞増殖抑制活性を評価した。合計で60に分けたフラクションの中で、No.21~35で顕著なBrdU取り込み抑制が示された。次に、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー法によるさらなる分画のため、BrdU取り込み抑制が示されたフラクションのタンパク質をハイドロキシアパタイトカラム (CHT-1、セラミックハイドロキシアパタイト2mL colume; Bio-rad) に保持させ、0.01~0.5Mリン酸緩衝液を用いて分画した。分画サンプルの一部を限外濾過によってバッファー交換して10%FBS - DMEMに溶解して網膜毛細血管内皮細胞株に添加し、BrdUの取り込み量を測定すると、フラクション25付近で強いBrdU取り込み抑制が示された。さらに、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、BrdU取り込み抑制が示されたフラクションのタンパク質を2次元電気泳動で分離した。1次元目等電点電気泳動にImmobiline DryStrip (pH3.0~10.0NL, 7cm; Amersham Biosciences) を用い、2次元目にSDS - PAGE (ExcelGel 2-D Homogeneous 12.5; Amersham Biosciences) を用いて分離した。泳動後のゲルをクマーシー・プリリアント・ブルーで染色し、可視化した。得られたスポットを切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化によって断片化した。タンパク質量分析法としてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOFMS, AXIMA-CFR; Shimadzu) を用いた。算出されたモノアイソトピックイオンのピーク値を基にデータベースProFoundで検索してPMF法によるタンパク質同定を行った。その結果トロポミオシン [tropomyosin(TM)] であることが示唆された。この段階ではTM (MW=28.33kDa, pI=4.8, NCBI番号 = 167850)、TM3 (MW=28.77kDa, pI=4.7, NCBI番号 = NP476556)、TM6 (MW=29.30kDa, pI=4.7, NCBI番号 = Np775134) である可能性があった。ラットTM3を特異的に認識するプライマーを作製してRT-PCR法でオープンリーディングフレーム (ORF) のクローニングを行った。さらに、RT-PCR解析からラット網膜、網膜毛細血管周皮細胞株に発現が示された。増幅された網膜毛細血管周皮細胞株のPCR産物をDNAシーケンサー解析した結果、配列表2に示す配列を得た。得られた配列はラットTM3、ラットTM6と異なる配列を示した。さらに、塩基配列をアミノ酸に変換した (配列表1) ところ、やはり両者とは異なっていた。

【0034】

(同定タンパク質の細胞増殖抑制活性)

配列表2にある遺伝子配列に制限酵素サイトが付くようなプライマーでPCRを行い、得られた増幅DNA断片をタンパク質発現誘導させるため、pGEX-6P-1ベクター (Amersham Biosciences) に導入した。目的遺伝子のORFを導入したpGE-6P-1溶液5μLにBL21 (DE3) コンピテントセル (STRATGENE) を100μL加え、ヒートショックを加え、SOC培地200μLを加え、37℃で1時間インキュベーションした後、LB Amp plateに播き、37℃、12~16時間インキュベーションすることによって、コロニーを形成させた。4~5mLのLB Amp mediumに形成されたコロニーを加えて、37℃、11時間のインキュベーションによって大量培養後、遠心して集菌した。

【0035】

10

20

30

40

50

集菌した B L 2 1 ( D E 3 ) をリン酸緩衝液 ( pH7.5 ) に懸濁させ、超音波細胞破砕機 ( M I S O N I X ; Farmingdale, NY ) で破砕後、遠心して上清を回収した。得られたタンパク質はグルタイオン・セファロース 4 B ( Amersham Biosciences ) を用いて精製した。精製したタンパク質は、M A L D I - T O F M S によってタンパク質量の測定し、さらにプロテインシークエンサー ( P P S Q - 2 1 ; Shimadzu ) を用いて N 末端アミノ酸配列の解析を行い確認した。

【 0 0 3 6 】

網膜毛細血管内皮細胞株をコラーゲンコートプレート ( Biocoat Collagen I Cellware 96 - Well plate ; BD Biosciences ) に 750 セル / ウェルの割合で播種し、24 時間培養した。濃縮したリコンビナントタンパク質溶液を設定した濃度になるように希釈し、各濃度のタンパク質、または、網膜毛細血管周皮細胞株の培養濃縮液 ( 5 倍、5x rPCT1-CM ) を含む 10% F B S - D M E M で 48 時間培養した。細胞測定は、同仁化学研究所製の細胞増殖アッセイキット ( Cell Counting Kit-8 ) を用いて行った。細胞増殖抑制活性を表 1 に示す。本発明のタンパク質 1 ~ 37  $\mu$  M にて顕著な内皮細胞増殖抑制効果を示した。

10

表 2 には同じ濃度のウシ血清アルブミンを用いた結果を示している。ウシ血清アルブミンでは同濃度を用いても内皮細胞増殖に全く影響を与えないことから、本発明で得られた内皮細胞増殖因子タンパク質の効果が特異的であることが示された。

【 0 0 3 7 】

【 表 1 】

	Control	5x CM	TM3 sv		
			0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% of control	100	13.2	97.4	72.4	22.6

20

Control: 培地のみ

5x CM: 培地に網膜毛細血管周皮細胞の培養濃縮液 ( 5 倍 ) を添加

0.1  $\mu$  M: 培地に本発明タンパク質 ( TM3 sv ) 濃度 0.1  $\mu$  M で添加

1  $\mu$  M: 培地に本発明タンパク質濃度 ( TM3 sv ) 1  $\mu$  M で添加

10  $\mu$  M: 培地に本発明タンパク質濃度 ( TM3 sv ) 10  $\mu$  M で添加

【 0 0 3 8 】

【 表 2 】

	Control	5x CM	BSA		
			0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
% of control	100	12.3	101.2	90.4	93.3

30

Control: 培地のみ

5x CM: 培地に網膜毛細血管周皮細胞の培養濃縮液 ( 5 倍 ) を添加

0.1  $\mu$  M: 培地にウシ血清アルブミン ( BSA ) 濃度 0.1  $\mu$  M で添加

1  $\mu$  M: 培地にウシ血清アルブミン ( BSA ) 濃度 1  $\mu$  M で添加

10  $\mu$  M: 培地にウシ血清アルブミン ( BSA ) 濃度 10  $\mu$  M で添加

40

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 9 】

本発明により、新規な血管新生に関わる細胞増殖抑制作用を有するタンパク質及びタンパク質をコードする遺伝子が得られた。本発明の遺伝子がコードするタンパク質は内皮細胞増殖抑制作用を有し、血管新生を伴う糖尿病網膜症の治療薬に有用である。さらに、本発明に係る血管新生に関わる細胞増殖抑制作用を有するタンパク質は、未熟児網膜症の血管新生を伴う疾病、悪性腫瘍における血管新生および炎症疾患における血管新生等における細胞増殖抑制剤として様々な疾病に適用できる。

【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 0 4 0 】

【 図 1 】 ラット網膜毛細血管周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質のアミノ酸配列である。

【 図 2 】 ラット網膜毛細血管周皮細胞由来の細胞増殖抑制因子タンパク質のDNA配列である。

【 図 1 】

```

M A G S T T I E A V K R K I Q V L Q Q A D D A E 25
E R A E R L Q R E V E G E R R A R E Q A E A E V A 50
S L N R R I Q L V E E E L D R A Q E R L A T A L Q 75
K L E E A E K A A D E S E R G M K V I E N R A L K 100
D E E K M E L Q E I Q L K E A K H I A E E A D R R K 125
Y E E V A R K L V I I E G D L E R T E E R A E L A 150
E S R C R E M D E Q I R L M D Q N L K C L S A A E 175
E K Y S Q K E D K Y E E E I K I L T D K L K E A E 200
T R A E F A E R S V A K L E K T I D D L E D E L Y 225
A Q K L K Y K A I S D E L D H A L N D M T S I 248

```

【 図 2 】

```

ATGGCCGGGA GCACCACCAT CGAGGCGGTA AAGCGCAAGA TCCAGTTCT 50
GCAGCAGCAG GCTGATGATG CGGAGGAGAG GCGCGAGCGC CTCCAGCGGG 100
AAGTGGAGGG AGAAAGGCGG GCCCGGGAGC AGGCTGAAGC TGAGGTGGCC 150
TCCTTGAAAC GCAGGATCCA GCTGTTGAA GAGGAGCTGG ACCGCGCCA 200
GGAGCGCCTT GCCACTGCTT TGCAGAAAGCT GGAGGAAGCG GAGAAGGCTG 250
CTGATGAGAG TGAGAGAGGT ATGAAGGTGA TTGAAAACCG GGCTCTAAAA 300
GATGAAGAAA AGATGGAGCT CCAGGAAATC CAGCTGAAGG AAGCAAAGCA 350
CATTCAGAAA GAGGCAGACA GGAAGTATGA AGAGGTGGCT CGTAAGTTGG 400
TGATTATTGA AGGAGACTTG GAAOCGACGG AGGAAACGGC CGAGCTGGCA 450
GAGTCCCGTT GCCGAGAGAT GGATGAGCAG ATCAGACTGA TGGACCAGAA 500
CCTGAAAGTG CTGAGTGCTG CTGAAGAAAA GTACTCTCAA AAAGAAGACA 550
AGTATGAAGA AGAAATAAAG ATTCTTACTG ATAAACTCAA GGAGGCGGAG 600
ACCCGGGCTG AGTTTGCTGA AAGATCGGTA GCCAAACTGG AAAAGACCAT 650
TGATGACTTG GAAGATGAGC TCTATGCCA GAAACTGAAG TACAAGCCA 700
TTAGCGACGA GCTGGACCAC GCCCTCAATG ACATGACCTC TATATAA 747

```

【配列表】

2006238844000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月2日(2006.3.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006238844000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02	C
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/577	B
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04  
GA11 HA15  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01  
DA13  
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 AB04 BA02 CA24  
CA25 CA44 CA46  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	细胞增殖抑制剂来源于视网膜周细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006238844A</a>	公开(公告)日	2006-09-14
申请号	JP2005062066	申请日	2005-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人富山大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人富山大学		
[标]发明人	細谷健一 寺崎哲也 大槻純男 登美斉俊		
发明人	細谷 健一 寺崎 哲也 大槻 純男 登美 斉俊		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

亲切代码：为了分离源自视网膜周细胞的细胞生长抑制因子蛋白，其具有与血管生成相关的细胞增殖抑制作用，以获得氨基酸序列和碱基序列。一 通过以下步骤获得所需蛋白质，其氨基酸序列和碱基序列。  
 (1) 基于视网膜毛细血管周细胞富集培养基的内皮细胞增殖抑制作用，缩小蛋白质组。(2) 通过质谱法等鉴定蛋白质组中包含的蛋白质的氨基酸序列。(3) 基于氨基酸序列，确定编码含有相关氨基酸序列的多肽的多个碱基序列。(4) 基于碱基序列信息，通过PCR等确定编码具有相关内皮细胞增殖抑制作用的蛋白质的碱基序列的总长度。(5) 通过将分离的基因导入大肠杆菌等中来制备蛋白质。本发明的蛋白质具有内皮细胞增殖抑制作用，可用作伴随血管生成的糖尿病性视网膜病的治疗剂。系统技术领域

	Control	5x CM	TM3 sv		
			0.1 μM	1 μM	10 μM
% of control	100	132	97.4	72.4	22.6