

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4346540号
(P4346540)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C

請求項の数 8 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-326314 (P2004-326314)	(73) 特許権者	507371032
(22) 出願日	平成16年11月10日(2004.11.10)		藤原 浩
(65) 公開番号	特開2005-160473 (P2005-160473A)		京都府京都市北区紫野官西町34-601
(43) 公開日	平成17年6月23日(2005.6.23)	(73) 特許権者	507371526
審査請求日	平成19年11月9日(2007.11.9)		上田 正道
(31) 優先権主張番号	特願2003-379618 (P2003-379618)		京都府京都市左京区高野東開町1-23
(32) 優先日	平成15年11月10日(2003.11.10)		東大路高野第3住宅17-502
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 復代理人	100068526
前置審査			弁理士 田村 恭生
		(74) 復代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 復代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗
		(74) 復代理人	100146259
			弁理士 橋本 諭志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 絨毛外栄養膜細胞特異的蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合する抗体を含む、絨毛外栄養膜細胞における配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質を定量するための組成物。

【請求項2】

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合する抗体を含む、絨毛外栄養膜細胞を検出するための組成物。

【請求項3】

抗体がモノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体又はこれらの断片である請求項1または請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

絨毛外栄養膜細胞を単離する方法であって、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合する抗体を用いる方法。

【請求項5】

絨毛外栄養膜細胞を標識する方法であって、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合する抗体を用いる方法。

【請求項6】

抗体がモノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体又はこれらの断片である請求項4または請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的な抗体を製造する方法であって、

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはそのフラグメントを非ヒト哺乳動物に免疫する工程；

(b) 該哺乳動物より血清を採取する工程；および

(c) 絨毛外栄養膜細胞を含む組織を用いて、免疫染色により絨毛外栄養膜細胞を特異的に認識する血清を選別する工程

を含む、方法。

【請求項 8】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的な抗体を製造する方法であって、

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質またはそのフラグメントを非ヒト哺乳動物に免疫する工程；

(b) 該哺乳動物より採取した脾細胞を用いてハイブリドーマを作成する工程；および

(c) 絨毛外栄養膜細胞を含む組織を用いて、免疫染色により絨毛外栄養膜細胞を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別する工程

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な蛋白質に関し、さらに詳しくはヒト絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblasts) に特異的に発現する新規蛋白質及びそれをコードするDNAに関する。

【背景技術】

【0002】

初期の胎盤形成においてヒト胎児由来のトロホプラスト (栄養膜細胞) の幹細胞は、絨毛栄養膜細胞と絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, 以下、「EVT」と略称する) という2つの主要な細胞系列に分化する。前者は胎盤の絨毛膜絨毛を覆い、その機能は母体から胎児へ酸素と栄養を輸送することである。一方、後者 (EVT) は母体の子宮内膜 (脱落膜) に浸潤していく細胞であり、免疫学的に寛容となっており、母体免疫細胞から攻撃を受けることなく母体の子宮ラセン動脈血管に沿って子宮筋層内まで浸潤する。これらの血管がEVTで置き換わることにより初めて十分量の胎児への胎盤血流が保たれるため、EVTの子宮内への浸潤は妊娠の維持に必須の現象であり、この浸潤機構の障害が妊娠中毒症などの周産期疾患の発症に深く関わっていると考えられている (非特許文献1)。

特にEVTの細胞数は妊娠12週から19週にかけてピークに達しており、この時期のEVTの活動が妊娠の進行に伴う胎盤機能の順応性を左右するとされている。

【0003】

またEVTは癌細胞と同様に正常組織内へ浸潤しその組織を破壊するが、癌細胞と大きく異なる点として、EVTの組織内浸潤様式はある一定のルールに沿っていること、及び正常妊娠では必ずその浸潤が子宮筋層内の内側1/3までで停止することが挙げられる。この停止に関与する調節機構は未だ解明されておらず、他人の細胞であるEVTを母体子宮が免疫学的に受け入れ、自己の子宮動脈への浸潤は許容しつつも、いかにしてその浸潤を制御しているのか、また一方でEVTはその過程の中でどのように機能を変え分化していくのか、などの問題を明らかにすることは生殖及び周産期医療の発展に極めて有用である。またEVTの浸潤停止機構の解明は、自然界が利用しているEVTに対する停止機構を、癌の浸潤抑制へ応用するための研究に応用することで、これらの成果は新しい視野からの癌治療法の開発に貢献する可能性が期待される。さらに、EVTは母体免疫細胞から攻撃を受けることなく子宮筋層内まで浸潤することができ、免疫学的に寛容となっている。EVTの免疫寛容成立に関する機構の解明は、自己免疫疾患や移植時の拒絶反応など免疫疾患の治療に貢献する可能性が期待できる。

10

20

30

40

50

【0004】

上述のように正常妊娠ではEVTの浸潤は妊娠初期には子宮内膜の脱落膜内に止まっているが、妊娠15週頃までには子宮筋層の1/3に達し、子宮ラセン動脈の再構築をする。一方で、妊娠中毒症症例ではEVTの浸潤が脱落膜内に止まって子宮筋層内まで達しないため子宮ラセン動脈の再構築とそれに伴う血管拡張が十分に起こらないとされている。その後胎盤は子宮ラセン動脈の拡張不全による胎盤虚血の状態に反応して炎症性サイトカインを産生し、これらが母体血中の白血球の活性化と血管内皮細胞障害を起し、高血圧、蛋白尿、浮腫を3主徴とする妊娠中毒症が発症すると考えられている（非特許文献2）。

【0005】

このように妊娠中毒症の発生機序にはEVTの機能が深く関与しており、その原因はすでに妊娠15週までに完成されているとされ、妊娠中毒症の発症前のなるべく早い段階で発症の可能性を予知できるようにすることが周産期管理において重要である。しかし、これまでのところ臨床で満足できる方法は確立されていない。また、EVTの浸潤不全の検出に関しては、その機能や障害の指標となるEVTに特異的なマーカーが知られていないこと及びその機能制御機構そのものがまだ解明されていないことにより、実現の見込みが立たない状況である。

【0006】

EVTは卵膜にも存在することが知られている。卵膜は胎児側から母体子宮側にかけて、胎児由来の羊膜とchorion laeve（平滑絨毛膜）、及び母体由来の脱落膜の3層からなる構造を有しているが、EVTはこのchorion laeveのうちでもさらに母体組織（脱落膜）に接している面を形成しているその外側層の主要構成細胞であり、羊水中で発育する胎児の液層環境を母体細胞との相互作用を介して制御していると推測されている。また平滑絨毛膜は陣痛発来に必要なプロスタグランジンの産生に重要な役割を演じていることが知られており、ヒトにおける自然分娩時の陣痛発来の調節機構の中核は卵膜にあると推測され、chorion laeveのEVTもこの機構に深く関与していると考えられているが、その詳細はほとんど明らかにされていない。

【0007】

加えてEVTは増殖能を消失しているものの、妊娠中には母体からの免疫学的攻撃から免れアポトーシスに陥っていないが、出産後には何らかの機序で母体組織内から消失するという特徴をも備えており、母体にとってEVTは他人の細胞として妊娠終了後も最後まで母体内組織に残っている免疫学的にも極めて特殊な細胞である。

【0008】

このように、ヒトEVTは他の細胞に見られない様々な特徴を有し、かつ妊娠維持機構に深く貢献しており、いわばヒトとしての種の保存に直接関わる細胞群であるが、その機能に関しては分離培養の困難さ等の問題がありほとんど解析が進んでいない。

上記の問題の解決法の一つは、EVTに特異的に発現している分子（蛋白質）を同定し、クローニングすることである。そのような分子はEVTの機能を推定するマーカーとなり得るため、該分子又はそれに対する抗体を用いて、極めて特異性及び感度の高い血中の該マーカー測定系を作成することができる。この測定系で妊娠初期から中期さらに後期にかけての胎盤機能を監視することにより、胚着床異常症例や子宮内胎児発育遅延症例及び妊娠中毒症例の早期発見が可能となる。

EVT特異的な分子はEVTの機能や分化の解析を可能にすると考えられるが、EVTの生体における極めて特異的な機能や特性に鑑みて、解析の成果は産科学のみならず免疫学、腫瘍学等を含む広範な医学領域における研究の発展に大いに貢献するものと期待されている。

【0009】

【非特許文献1】研修ノートNo.64 妊娠中毒症（平成13年3月）p19-22 日本母性保護産婦人科医会発行

【非特許文献2】日本産科婦人科学会雑誌55巻9号（2003年9月）N265-N268

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

本発明はEVTの生理学的機能を解明する上で有用な、EVTに特異的に発現している分子を同定しクローニングすることにより、それをマーカーとする妊娠中毒症の診断及び予防、治療のための手段を確立することを目的とする。

また本発明は、EVTの機能、分化の機構を解明する手段を提供し、産科学のみならず免疫学、腫瘍学等の発展に寄与することを目的とする。

その他の目的は明細書を通して明らかである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、従来より着床部からの分離が困難で免疫不能と考えられていたヒトEVTを、卵膜のchorion laeve (絨毛膜) から分離するために、chorion laeve由来細胞をマウスに免疫してEVTに特異的に発現している分子を認識する抗体を作成し、それを用いてEVTに特異的に発現している分子を同定し、クローニングすることに成功した。

即ち本発明は、

(1) 以下の (a) 又は (b) に記載の蛋白質：

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質、又は

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、かつ上記 (a) 記載の蛋白質と同等の性質又は機能を有する蛋白質、

(2) 上記 (1) 又は (2) に記載の蛋白質をコードするDNA、

(3) 以下の (a) 又は (b) に記載のDNA：

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNA、又は

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記 (a) 記載の蛋白質と同等の性質また h 機能を有する蛋白質をコードするDNA、

(4) 上記 (3) に記載のDNAを含有する組換えベクター、

(5) 上記 (4) に記載の組換えベクターを含む形質転換体、

(6) 上記 (5) に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質と同等の性質又は機能を有する蛋白質を回収することを特徴とする前記蛋白質の製造方法、

(7) 上記 (1) 記載の蛋白質に対する抗体、

(8) 抗体がモノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体又はこれらの断片である上記 (7) に記載の抗体、

(9) 配列番号 1 の塩基配列からなるDNAのコーディング配列又は 5' ノンコーディング配列の中の断片DNAと相補的な配列をもつDNA若しくはそのDNAに対応するRNA、又はその化学的修飾体、

(1 0) 上記 (1) に記載の蛋白質、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のDNA、上記 (7) ~ (8) のいずれかに記載の抗体、上記 (9) に記載のアンチセンスポリヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物、

(1 1) 上記 (1) に記載の蛋白質を定量することを特徴とする絨毛外栄養膜細胞機能の測定法、

(1 2) 上記 (1) に記載の蛋白質を定量することを特徴とする妊娠中毒症の診断法、及び

(1 3) 上記 (1) に記載の蛋白質の発現を制御する化合物を有効成分として含む医薬組成物

等に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 2 】

本発明のEVT特異的な抗原蛋白質は、それをマーカーとする妊娠中毒症の診断及び予防、治療のための手段を確立することを可能とし、さらにはEVTの機能、分化の機構を解明

10

20

30

40

50

する手段を提供することを通して産科学のみならず、免疫学、腫瘍学等の発展に寄与することができる。

具体的には、胚着床異常症例や子宮内胎児発育遅延症例及び妊娠中毒症例を早期に検知可能な診断法の開発・確立が可能となる。

本発明の抗原蛋白質やそれに対する抗体は、妊娠中毒症の治療薬の必須成分として有効と考えられる。また、胎盤の形成、維持におけるEVTの機能を解明し、EVT活性を調節する化合物、発現を調節する化合物のスクリーニングにも有用である。

さらに、laeverin蛋白質は生体内で種々の細胞の遊走や浸潤に関与していると考えられることから、組換え型laeverin蛋白質は、例えば、創傷治癒の調節、神経再生の調節、梗塞部位治癒の調節、胎盤形成の調節、臓器再生の調節、血管新生の調節、悪性腫瘍浸潤の調節、自己免疫疾患による組織変性・炎症反応の調節等に用いる医薬組成物の有効成分として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は、EVTに特異的に発現している新規な蛋白質、それをコードするDNA、該蛋白質に対する抗体、アンチセンス、及びそれらの利用に関する。本発明は配列番号2で表される絨毛外栄養細胞に特異的に発現している新規な蛋白質（以下、「laeverin」と呼称する）のみならずlaeverin蛋白質に特有の機能、性質を有する変異体蛋白質をも包含する。

本明細書中、「laeverin蛋白質に特有の機能、性質を有する蛋白質」とは、EVTの浸潤、増殖、免疫反応、細胞接着、細胞分裂等の調節機能を有するか、これらに関与しうる蛋白質を指す。

【0014】

EVT特異的蛋白質の同定

ヒト卵膜を含むchorion laeveを分離して細切処理し、それを用いてマウスを免疫して抗体を産生するハイブリドーマを作成し、その中からヒト着床部組織の凍結切片を用いた免疫組織染色でEVTに特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。この抗体をCHL-2と命名して大量に作成精製し、この抗体をもとに胎盤及び卵膜組織からCHL-2抗体が反応する蛋白分子を精製した。この物質は分子量約160kDaの糖蛋白で、EVTの細胞表面部位に存在し、N端11残基のアミノ酸配列はGPPSSSGFYVS（配列番号3）であった。この配列はデータベースに登録されていない配列であり、引き続きこの蛋白分子の分析を進めた。

【0015】

CHL-2抗体を用いてchorion laeveからイムノ・アフィニティ・クロマトグラフィーにより抗原蛋白を大量に精製し、一部はマウスに免疫して同様にEVTに存在する抗原蛋白に反応する抗体CHL-2Jを作成した。残りの精製抗原蛋白を再度アミノ酸配列分析に供し、4か所の内部アミノ酸配列を10残基ずつ同定した。これらのアミノ酸配列もデータベースに登録されていない新規な配列であった。同定した内部アミノ酸配列のうち、3つが、2003年1月に登録されたestimated sequence tag (EST, 1672 bp, AK075131) から推定されるアミノ酸配列と完全に一致していた。

【0016】

次いで、5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて、ヒトEVTから調製したmRNAから目的抗原をコードしているcDNAを同定した(2970 bp)。決定されたDNA配列で開始コドンの下流にある最初のアミノ酸配列は、先に決定していた抗原蛋白のN端のそれと完全に一致し、かつ残りのもう一つの内部アミノ酸配列に完全に一致するDNA配列を有していたため、目的の抗原蛋白をコードするcDNAであると結論した。このcDNAはNCBI websiteのBLAST programに登録されておらず、まだ存在が確認されていない新規の蛋白質であると判断し、「laeverin」と名付けた。得られたlaeverinのcDNAの塩基配列を配列番号1に、推定のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0017】

laeverinの解析

10

20

30

40

50

配列番号1記載のlaeverin DNAがコードするアミノ酸配列（配列番号2）のN端部にはM1ペプチダーゼファミリーに属するモチーフ（アミノ酸98-506）が含まれており、さらにその中に酵素活性の中心部であるZn結合部位のモチーフ（His-Glu-Xaa-Xaa-His-18 アミノ酸-Glu, 415-438）が存在している。またN末端近部には23アミノ酸の疎水基残基（14-36）からなる細胞膜貫通部位が確認された。ホモロジー検索ではM1ペプチダーゼファミリーに属するアミノペプチダーゼN（EC 3.4.11.2）と36%の同一性が認められた。また同じくM1ペプチダーゼファミリーのグルタミルアミノペプチダーゼ（aminopeptidase A, EC 3.4.11.7）及びオキシトシナーゼ/インスリン-調節（insulin-regulated）アミノペプチダーゼ（EC 3.4.11.3）ともホモロジーが認められた。塩基数はこれらの細胞膜結合型M1ペプチダーゼとほぼ同様である。本発明のlaeverinの塩基配列から計算される蛋白分子量は113kDaであり、実際の分子量より少ないが、上記ペプチダーゼと同様、糖鎖による修飾のためと予想される。

【0018】

laeverinの体内分布

免疫組織染色法及びRT-PCR法でヒト正常組織でのlaeverinの発現を検討したところ、成人女性の卵巣、子宮内膜、卵管などの生殖臓器での発現は見られず、胎盤組織の中でもEVTのみに発現が確認された。また、全身臓器からのmRNAのtissue blot membraneを用いたnorthern blot法による検討でもlaeverin遺伝子の発現は胎盤組織のみから検出され、他の臓器には確認できなかった。この知見はlaeverinがEVTの特異的な細胞分化マーカーであることを示している。

【0019】

laeverinの機能

laeverinをCOS7細胞に遺伝子発現させたところ、細胞の接着能及び増殖が抑制され、細胞死が誘導された。これはlaeverinが特殊な細胞であるEVTの機能に重要な働きを行っていることを強く示唆している。（データ示さず）

また、CHO(Chinese hamster ovary)細胞にlaeverin遺伝子を導入して樹立したlaeverin蛋白質を発現する細胞株は、Matrigel invasion assay法[Sato Yら “Involvement of dipeptidyl peptidase IV in extravillous trophoblast invasion and differentiation”, J Clin Endocrinol Metab 87:4287-4296 (2002)及びSato Yら, “Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype”, Development 130:5519-5532 (2003)]において、メンブレン浸潤活性の顕著な増大を示した（実験例1、図6）。特に、メンブレン下面に浸潤した細胞の多くに強いlaeverin発現が認められた。さらに、抗laeverin抗体（CHL-2抗体）の存在下、laeverin遺伝子導入細胞の浸潤が亢進する傾向が観察された。これは、laeverin蛋白質が細胞の浸潤制御に関与している可能性を示唆している。

【0020】

laeverinの定量

laeverinはEVTに特異的に発現しているため、それを定量することによりEVTの機能をモニターすることができる。EVTが胎児への胎盤血流の供給に重要な働きをしており、妊娠の維持、妊娠中毒症の発症に関与していることは当該技術分野で認められており、EVTに特異的なマーカーが同定されたことで、妊娠の進行に伴う変化をモニターすることが可能となる。定量法として、例えば、血中濃度測定系を使用する次の方法が挙げられる。

96穴の酵素免疫測定法（ELISA）用プレート底面に、laeverinに対する抗体A（ポリクローナル、又はモノクローナル抗体）を固相化し、適度の濃度に調整した患者血清を一定時間反応させる。洗浄後、酵素標識したlaeverinに対する抗体B（モノクローナル抗体）を一定時間反応させる。これを洗浄後、酵素に対する基質を含む発色反応液を加え、比色定量する。次いで、精製laeverin蛋白を用いて作成した標準曲線を用い、測定値から血清laeverin量を算出する。

【0021】

laeverin変異体

本発明はまた、上記の方法でクローニングされた、配列番号2で表される laeverin 蛋白質と同等の機能を有する蛋白質を包含する。laeverin 蛋白質と同等の機能を有する蛋白質として、アミノ酸配列における変異体であって、laeverin 蛋白質に特有の機能、性質を有する蛋白質が挙げられる。そのような変異体は、例えば、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失しているか、少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が付加しているか、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていてもよい。laeverin 蛋白質と同等の機能を有する蛋白質には、配列番号2に記載のアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する配列を含有し、かつ、配列番号2に記載の laeverin 蛋白質と実質的に同質の機能、性質を有する蛋白質も包含される。変異体の製造は当技術分野で既知であり、例えば文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版第1-3巻 Sambrook, J. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版) 記載の方法により実施できる。

10

本発明の laeverin 蛋白質と同等の機能を有する蛋白質又は変異体は、例えば CHL-2 モノクローナル抗体により認識されること、細胞浸潤アッセイ (後述の実験例1参照) で高い細胞浸潤能を示すこと等により、同定することができる。

アミノ酸配列に変異を導入する方法は当業者に既知であり、通常は、それをコードする遺伝子の塩基配列に変異を導入することにより行う。例えば、変異オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた部位特異的突然変異誘発法やPCR法等により変異を導入するが、市販の変異導入用キットを用いて変異を導入することもできる。

20

【0022】

さらに本発明は、配列番号2で表される laeverin をコードする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 laeverin 蛋白質に特有の機能、性質を有する蛋白質をコードするDNA、該DNAによってコードされている蛋白質をも包含する。ストリンジエントな条件とは、ナトリウム濃度が $0.1 \times SSC$ であり、温度が50 の条件をいう。より詳しくは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版第1-3巻 Sambrook, J. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版に記載の方法によって得ることができる。

【0023】

本発明により laeverin DNA の塩基配列が決定されたので、当業者ならば常法に従い、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いたPCRによって、本発明のDNAを得、それを用いて laeverin 蛋白質を得ることができる。

30

【0024】

組換えベクター

本発明の laeverin DNA を適当なベクターに挿入することにより、組換えベクターを得ることができる。そのようなベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。

プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド (例えば pBR322 等)、枯草菌由来のプラスミド (例えば pUB110 等)、酵母由来のプラスミド (例えば YEp13 等) などが挙げられ、ファージDNAとしては ファージ (例えば gt10 等) が挙げられる。また、レトロウイルス、アデノウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルスやバキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

40

ベクターに laeverin DNA を挿入するには、まず、精製DNAを適当な制限酵素で切断し、必要に応じてその上流に転写を制御するプロモーター配列を付加し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する。発現ベクターは適当な宿主に導入された時、目的DNAを発現するために、プロモーター、エンハンサー、選択マーカー等を含有することが好ましい。そのような発現ベクターの構築方法は当該技術分野で既知である。

【0025】

50

形質転換体

上記の組換えベクターを、laeverin DNAの発現に適した宿主中に導入することにより形質転換体を得ることができる。宿主は、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等の *Escherichia* 属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属の細菌、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、及びSf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

それぞれの宿主に関して適当なプロモーター(例えばtrpプロモーター、lacプロモーター(細菌)、gal1プロモーター(酵母)、SV40プロモーター(動物細胞)等)などが既知であり、これらから適宜選択することができる。

組換えベクターの宿主への導入方法も当該技術分野で既知であり、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0026】

組換え蛋白質の生産

本発明のlaeverin蛋白質は、上で作成した形質転換体をインピボ又はインピトロで培養し、その培養物から採取することにより生産することができる。

本発明の形質転換体の培養は、選択した宿主に応じて通常の方法に従って行われ、それぞれの宿主に適した培地、培養条件も既知である。

通常、微生物が宿主である場合の培地としては、微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うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で8~12時間行う。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。

【0027】

動物細胞が宿主である場合の培地としては、一般に使用されているRPMI-1640培地、DME M培地又はこれらの培地にウシ胎仔血清等を添加した培地等が挙げられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で2~3日行う。培養後、発現した蛋白質が菌体内又は細胞内に蓄積されている場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抽出する。また、菌体外又は細胞外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、蛋白質の単離精製に用いられる一般的な方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで、前記培養物から目的の蛋白質を単離精製することができる。

【0028】

なお、本発明は組換え法で得られる蛋白質のみならず、組織から単離精製された蛋白質、あるいはペプチド化学合成により製造されるものも包含する。しかし、組換え法で製造されることが好ましい。

【0029】

laeverinに対する抗体

(1) ポリクローナル抗体

本発明のlaeverin蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、前記のようにして調製したlaeverin蛋白質又はそのフラグメントを用いて動物を免疫する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、マウスの場合、50µgである。免疫は、哺乳動物(例えばラット、マウス、ウサギなど)に静脈内、皮下又は腹腔内に投与することにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~3週間間隔で、1~10回、好ましくは4~5回である。最終の免疫日から7~10日後に抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。抗体価の測定は、酵素免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、免疫組織染色法等により行うことができる。

10

20

30

40

50

抗血清から抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【 0 0 3 0 】

(2) モノクローナル抗体

1) 免疫

本発明の laeverin 蛋白質に対するモノクローナル抗体を得るには、前記のようにして調製した laeverin 蛋白質又はそのフラグメントを用いて動物を免疫する。免疫は、哺乳動物（例えばラット、マウスなど）に静脈内、皮下又は腹腔内に投与することにより行う。抗原の1回の投与量は、マウスの場合1匹当たり30 μ gである。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～3週間間隔で、最低4～5回行う。そして、最終免疫後、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞が好ましい。

10

【 0 0 3 1 】

2) 細胞融合

脾臓細胞等の抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合を行う。ミエローム細胞として、マウスなどの動物由来の細胞であって一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株として、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。例えば、ミエローム細胞の具体例としてはP3X63 - Ag、X63 Ag 8.653などのマウスミエローム細胞株が挙げられる。

20

血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中に、抗体産生細胞とミエローム細胞とを所定の割合（例えば3：1）で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合促進剤存在の下で、あるいは電気パルス処理（例えばエレクトロポレーション）により行う。

【 0 0 3 2 】

3) ハイブリドーマの選別

例えば、ヒポキサンチン（100 μ m）、アミノプテリン（0.4 μ m）及びチミジン（16 μ M）を含む培地を用いて培養し、生育する細胞をハイブリドーマとして得ることができる。次に、増殖したハイブリドーマの培養上清中に、目的とする抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、免疫染色法、酵素免疫測定法（ELISA）、RIA等によってスクリーニングすることができる。

30

【 0 0 3 3 】

4) クローニング

融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生細胞であるハイブリドーマを樹立する。樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取するには、通常の細胞培養法等を採用することができる。

40

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%牛胎児血清含有RPMI-1640培地又はMEM培地等の動物細胞培養培地中、通常の培養条件（例えば37℃、5% CO₂濃度）で例えば14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【 0 0 3 4 】

5) 精製

抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらの方法を組み合わせることにより精製することができる。

なお、本発明のモノクローナル抗体は、着床部及び卵膜組織を用いた免疫組織染色法、遺伝子発現細胞を用いた免疫細胞染色法又は生成された組換え蛋白質を用いたELISA法に

50

基づいて選択することが好ましい。

【0035】

laeverinのアンチセンス

本明細書において、「配列番号1の塩基配列からなるDNAのコーディング配列又は5'ノンコーディング配列の中の断片DNAと相補的な配列をもつDNA若しくはそのDNAに対応するRNA、又はその化学的修飾体」とは、二本鎖DNAのアンチセンス鎖のDNA又はそのアンチセンス鎖のDNAに対応するRNAであって(以下、アンチセンスポリヌクレオチドという)、DNA若しくはRNAに結合し、laeverinの発現を調節するものを意味する。アンチセンスポリヌクレオチドは、例えばlaeverin蛋白をコードする遺伝子の塩基配列に基づきDNAとして製造するか、又はこのDNAをアンチセンスの向きに発現プラスミドに組み込むことでRNAとして製造することができる。このアンチセンスポリヌクレオチドは配列番号1の塩基配列からなるDNAのコーディング配列、5'ノンコーディング配列のいずれの部分のDNA断片と相補的な配列であってもよいが、好ましくは転写開始部位、翻訳開始部位、5'非翻訳領域、エクソンとイントロンとの境界領域若しくは5'CAP領域に相補的配列であることが望ましい。

10

【0036】

上記「DNA若しくはそのDNAに対応するRNA」の「化学的修飾体」としては、DNA又はRNAの細胞内への移行性又は細胞内での安定性を高めるために修飾された誘導体であり、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデート等の誘導体("Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊 1992 P.1-50)が挙げられる。この化学的修飾体は、同文献等に記載の方法に従って製造することができる。このアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその化学的修飾体を用いて、laeverin蛋白をコードする遺伝子の発現を制御することにより、laeverin陽性細胞の生存、転移を阻害することができる。アンチセンスポリヌクレオチド又はその化学的修飾体をそのまま投与する場合は、好ましい長さとしては、例えば5~200塩基のものが挙げられ、さらに好ましくは8~50塩基のものが挙げられ、特に好ましくは10~30塩基のものが挙げられる。

20

【0037】

また、アンチセンスポリヌクレオチドを発現プラスミドに組み込む場合は、その好ましい長さとしては、1000塩基以下、好ましくは500塩基以下、より好ましくは150塩基以下である。発現プラスミドに組み込んだ後、目的の細胞に常法に従って導入する。導入はリポソームや組換えウイルスなどを利用する方法で行うことができる。アンチセンスポリヌクレオチドの発現プラスミドは通常発現ベクターを用いてプロモーターの下流、逆向きに、すなわちlaeverin遺伝子が3'から5'の向きに転写されるように、連結することにより作製できる。

30

【0038】

laeverin蛋白質、DNA、抗体、アンチセンスポリヌクレオチド等の用途

本発明のlaeverin蛋白質をコードするDNAは該蛋白質の発現を制御する化合物のスクリーニングに有用である。例えば、該DNAを含むインビボ又はインビトロの発現系を利用し、当該技術分野において特定の蛋白質の発現を阻害する物質をスクリーニングするために通常用いられる方法により、目的の化合物を同定することができる。

40

また、laeverin蛋白質、その変異体又は抗体は、laeverinに関連する生理活性を促進或いは抑制することにより、妊娠中毒症の診断、治療、予防や一般的な創傷治癒の調節、神経再生の調節、梗塞部位治癒の調節、臓器再生の調節、血管新生の調節、悪性腫瘍浸潤の調節、自己免疫疾患による組織変性・炎症反応の調節等に有用である。

【0039】

治療用途に用いるためには、これらを薬学的に許容される適当な担体、賦形剤と無菌的に混合することにより、例えば注射用製剤(溶液、懸濁液、乳濁液)、埋め込み製剤として調製する。本発明組成物は、通常、非経口投与で、好ましくは、静脈内、筋肉内、皮下組織もしくは腹腔、胸膜腔、関節腔などの体腔内に投与される。laeverin蛋白質、抗体等

50

の投与量は治療目的、患者の体重、年齢、症状等の種々の因子に基づいて臨床医により決定されるが、通常、体重1kg当たり、約0.01mg以上、より一般的には、約0.1mg以上、好ましくは約1mg以上である。投与量の上限は症例ごとに異なるが、1週間の総計として、一般に、体重1kg当たり1,000mg以下、好ましくは100mg以下、より好ましくは10mg以下とする。

laeverin蛋白質を定量することによる妊娠中毒症の診断は、上記laeverin蛋白質の定量法に記載の定量法を使用して行うことができる。

【0040】

laeverin DNA又はアチセンスDNAを用いて、例えばEVTにlaeverinの発現を抑制することにより細胞浸潤を阻害又は調節することができ、創傷治癒の調節、神経再生の調節、梗塞部位治癒の調節、胎盤形成の調節、臓器再生の調節、血管新生の調節、悪性腫瘍浸潤の調節、自己免疫疾患による組織変性・炎症反応の調節などの治療及び予防に有用である。

laeverin DNAやアンチセンスポリヌクレオチド等のポリヌクレオチド又はその誘導体は、安定化剤、緩衝液、溶媒などと混合して製剤した後、抗生物質、抗炎症剤、麻酔薬などと同時に投与することができる。この製剤は、連日又は数日から数週間おきに投与することができる。また、頻回の投与を避けるために徐放性のミニペレット製剤を作成し患部近くに埋め込むことも可能である。あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することもできる。通常、投与量は作用部位における濃度が0.1nM-10µMになるように調製する。

以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、該実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0041】

実施例1 EVT特異的蛋白質のクローニング

(1) 試薬

マウス抗ヒトサイトケラチン8, 18モノクローナル抗体(clone 5D3, IgG1)はYlem S. R.L. (Rome, Italy)から購入した。マウスIgG1(clone DAK-G01, DAK0, Glostrup, Denmark)を陰性コントロール染色として用いた。FITC-結合ラビット抗マウス免疫グロブリン(Dakopatts, Glostrup, Denmark)を免疫染色法の二次抗体として用いた。

【0042】

(2) 組織標本

妊娠満期胎盤(n=15)及び卵膜は正常分娩より得た。RNA抽出のために組織は迅速に液体窒素中で凍結し-80で保存した。免疫染色法のために、各組織はOCT compound(Tissue-Tec, Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, IN, USA)で包埋し、液体窒素中で凍結し-80で保存した。

【0043】

(3) EVT特異的蛋白質スクリーニング用のモノクローナル抗体

モノクローナル抗体の作成と選別は以下の方法で行った。

卵膜からchorion laeveを手動的に剥離し鋏で細切した。この小片1mg(PBS中)を8週齢BALB/cマウスの腹腔内に4週ごと4回注入した。最終免疫より5日目にこれらマウスの脾細胞を採取してX63Ag8.653骨髄腫細胞と3:1の比率で混合し、50%ポリエチレングリコール3000を用いて細胞融合した。静置後に15%ウシ胎児血清を含むHAT培地に浮遊させ、あらかじめ3週齢のマウスより採取分離した胸腺細胞をフィーダー細胞として敷きつめておいた96穴マイクロプレート上でこの融合細胞を培養した。増殖したハイブリドーマの培養上清を適宜採取し、卵膜組織から作成した凍結切片を用いて間接蛍光免疫染色を行い、EVTに特異的に反応する抗体を含むハイブリドーマをスクリーニングした。重要な抗体を産生するハイブリドーマはその培養液を適宜HT培地さらには10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培養液にシフトし、限界希釈法によるクローニングを3回施行し、安定して抗体を産生する細胞株を選択した。これをさらに培養増殖させ、あらかじめ0.5mlのpristane(2,6,10,14-tetramethylpentadecane, Aldrich, Milwaukee, WI, USA)処理(腹腔内投与

10

20

30

40

50

)をしたBALB/c雌マウスの腹腔内に 2×10^7 cellsの割合で投与した。約10日後に腹腔内で増殖したハイブリドーマが産生した抗体を大量に含む腹水を採取し、これより免疫グロブリン分画をAffi-gel protein A (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて分離し、目的のモノクローナル抗体を精製した。

このようにして、免疫染色法で1つのハイブリドーマを選別した。該ハイブリドーマが産生する抗体CHL-2はIgG1 isotypeに属していた。

【 0 0 4 4 】

(4) 免疫組織染色

間接蛍光免疫染色法は以下の方法で行った。

凍結組織をクリオスタット・ミクロトーム (cryostat microtome、Cryocut 1800, Reichert-Jung, Heiderberg, Germany) で7- μ m厚の切片を作成し、直ちにNeoplane (Nisshin EM, Tokyo, Japan) コートしたスライドグラスに載せて風乾し、アセトンにて-20 で5分間固定した。

【 0 0 4 5 】

標本切片を精製したCHL-2モノクローナル抗体 (5 μ g/ml)、抗ヒトサイトケラチン8, 18モノクローナル抗体 (5 μ g/ml) あるいは陰性コントロール抗体(mouse IgG1 negative control (clone DAK-G01, DAKO, Glostrup, Denmark)、5 μ g/ml)で60分室温で反応させた。抗体は10% ウシ胎児血清と0.1% NaN_3 を含むRPMI 1640培養液で希釈した。洗浄後、FITC-結合ラビット抗マウス免疫グロブリン (希釈率 1:40) で遮光下に30分反応させた。標本はPBSで洗浄しanti-fade agent (Perma Fluor Aqueous Mounting Medium; Immunon, Pittsburgh, PA, USA) をかぶせ、蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。連続した標本切片の幾つかはヘマトキシリン-エオジン染色した。結果を図1に示す。

図1のA-Cは妊娠満期胎盤における結果を示す。Aはヘマトキシリン-エオジン染色、Bは抗ヒトサイトケラチン8, 18 mAbを用いるFITC-染色、CはCHL-2 mAbを用いるFITC-染色の結果である。図中、AEは、amniotic (羊膜) 上皮組織を表し、CLはchorion laeveを表す。また、chorion laeve(CL)層は点線で示されている。Cytokeratin 8, 18は羊膜上皮組織とchorion laeve中のEVTに高度に検出された (矢印)。免疫反応性のlaeverinはchorion laeveの外側のEVTの細胞表面領域に明確に検出された (矢印頭部, C)。なお、バーは100 μ mである。

このように、CHL-2抗原はchorion laeve中のEVTに検出された。しかし、胎児の羊膜上皮や母体の脱落膜細胞にはその発現は認められなかった。CHL-2抗原はまた母体の脱落膜組織中に侵入しつつあるEVTにも発現していた (データ示さず)。主な発現部位はEVTの細胞表面領域であった。

【 0 0 4 6 】

(5) 絨毛膜 (chorion laeve) と胎盤からのCHL-2抗原の精製

CHL-2抗原の精製は前記と同様に行った。

組織材料 (chorion laeve, 1g; 胎盤, 5g; 湿重量) 10から50 mlの、150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.2 mg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド 塩酸塩 (和光純薬)、10 μ g/ml ロイペプチン (Peptide Institute Inc.) 及び10 μ g/ml ペプチタチン (Peptide Institute Inc.) を含む40 mM リン酸緩衝液、pH 7.3中で攪拌した。遠心後 (11,000 x g ; 30分)、Nonidet P-40を除いた組織溶液で0.3%に希釈することでNonidet P-40濃度を下げた。上清は非特異的に結合した成分を除くために10 mlの抗-トリニトロフェニル (TNP, 無関係のモノクローナル抗体) を結合したAffigel 10 (Bio-Rad Labs., Hercules, CA, 2 mg IgG/ml gel) を含むカラムに4で通した。濾過された分画を0.15 mlのCHL-2を結合したAffigel 10 (2 mg IgG/ml gel) と4で2時間反応させた。十分にゲルを洗浄後、抗原を0.1% Nonidet P-40を含有する0.5 M NH_4OH で溶出した。溶出物は室温で真空中で乾燥させた。サンプルは0.1 Mジチオスレイトールに溶解し、8% スルフェート-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。ゲル中の蛋白は銀染色キット (和光純薬) を用いて銀染色した。同じ実験を別の組織材料を用いて3回繰り返した。結果を図2に示す。

【 0 0 4 7 】

図 2 中、レーン1は分子量マーカー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA、200 kDa: Myosin、116 kDa: β -galactosidase、97.4 kDa: PhosphorylaseB、66 kDa: Serum albumin)、レーン2-5は4個の胎盤組織から独立して精製されたlaeverin類、レーン6は無関係なモノクローナル抗体である抗TNP(コントロール) mAbを用いて胎盤から精製した蛋白質である。主要蛋白質バンド(矢印)が160 kDa付近に観察された。

図 2 から明らかに、CHL-2抗原分子はchorion laeveと胎盤から精製された。SDS-PAGEでこれらの組織から精製されたCHL-2抗原は同じ蛋白のバンドを有しており、分子量は約160 kDaであった。

【 0 0 4 8 】

(6) 胎盤から精製されたCHL-2抗原の部分アミノ酸配列の解析

300gのヒト胎盤組織を800 mlの0.2 mg/mlフェニルメチルスルホニルフルオリド塩酸塩を含む溶解液中で攪拌した。遠心 (15,000 x g ; 30 min) 後、上清を10 μ m孔の膜で濾過し、Nonidet P-40を除いた組織溶液で0.3%に希釈することでNonidet P-40 濃度を下げた。20 mlの抗-TNP抗体を結合させたAffigel 10と4 で1時間反応させた後、ゲルを取り除いた。溶解物はCHL-2を結合させた0.6 mlのAffigel 10と4 で2時間反応させた。抗原を上記の如く溶出した。この過程を3つのサンプルを用いて7回繰り返した。精製した抗原は3 mM Tris HCl buffer, pH 6.8 (0.1% SDS含有) で透析し、乾燥させた。精製抗原を8% SDS-PAGEで電気泳動した。ポリアクリルアミドゲル中の蛋白を50 mM Tris, 15 mM ホウ酸, 0.05% SDS, 及び20% エタノール中、PVDF膜 (Millipore Co., Bedford, MA, USA) にプロットした。蛋白をCoomassie Blueで染色し、主な蛋白バンドを切り出してアミノ酸シーケンサーPSQ-1 (Shimazu Co., Kyoto, Japan) で解析した。精製したCHL-2抗原はさらにその内部で切断し、高速液体クロマトグラフィーでペプチド分画に分離した。各ペプチド分画のN端のアミノ酸配列を上記と同様に解析した。アミノ酸配列の相同性はNCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) のBLASTを利用して解析した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 4 9 】

表 1 ヒト胎盤から精製したlaeverinの部分アミノ酸配列

部 位	配 列	配列番号
N-末端配列 (11)	GPPSSSGFYVS	3
内部配列 1 (10)	SYVALSNMP	4
内部配列 2 (10)	QEPFYLENIK	5
内部配列 3 (10)	VDHPENEIPY	6
内部配列 4 (10)	EWDILLNTYT	7

N末端領域の11残基からなるアミノ酸配列は報告されたアミノ酸配列とは相同性がなかった。独立して決定された4個の内部の部分アミノ酸配列のうち、1つは報告されていない配列であった (内部配列1)。しかし、他の3個の部分アミノ酸配列(内部配列2-4)は3'側1672塩基対からなるEST (AK075131 発現遺伝子配列断片から翻訳される配列と完全に一致していた。

【 0 0 5 0 】

(7) Total RNA抽出と5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends)

EST(AK075131)の情報に基づきCHL-2抗原をコードするcDNAの5'側の配列を5' RACE法で解析した。

Total RNAはchorion laeve (1g) からRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて供給者の指示にしたがって抽出した。mRNAの5'末端にアダプター付加したcDNAをSMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) を用いて作成し、これを鋳型として、アダプターの部分塩基配列を有するセンスプライマー (5' -AGAATTCCTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-3'、配列番号8) とアンチセンスプライマ

-(5'-AGAATTCTTTCCACCTTCATGGCCACAGCTC-3'、配列番号9)を用いてPCR反応を行った(下線部は制限酵素EcoRIの切断配列)。PCRの反応条件は、94 5秒、72 3分を5サイクル、94 5秒、70 10秒、72 3分を5サイクル、94 5秒、68 10秒、72 3分を25サイクルであった。得られたcDNAを単離しDNA配列を解析した。上記の5'RACE法で決定したDNA配列の相同性をNCBI websiteのBLASTで解析した。

【0051】

得られたcDNAの塩基配列を図3及び配列番号1に、推定のアミノ酸配列を図4及び配列番号2に示す。

図3(配列番号1)に記載の、cDNAクローンがコードする配列(図4及び配列番号2)は先に同定した精製CHL-2抗原のN末端領域の部分アミノ酸配列と一致した。CHL-2抗原をコードするcDNAの全長配列(2970塩基対)はこれまでに報告されていない。コード領域は配列番号1における塩基53-3022の領域であり、翻訳されるアミノ酸配列はアミノ酸990であった(図4)。このアミノ酸配列は最後の部分アミノ酸配列を含んでいた(268-277)。この新規な抗原蛋白質を「laeverin」と命名した。

【0052】

(8) CHL-2抗原のアミノ酸配列の相同性検索

CHL-2抗原のアミノ酸配列はアミノペプチダーゼ N (EC 3.4.11.2) とそれぞれ36% (identities) 及び54% (positives) の相同性を有していた。またグルタミルアミノペプチダーゼ (aminopeptidase A, EC 3.4.11.7) (L. Li, et al., Genomics 17 (1993) 657-664) やオキシトシナーゼ/インスリン-制御アミノペプチダーゼ (insulin-regulated aminopeptidase (EC 3.4.11.3) (P.G. Laustsen, et al., Biochim. Biophys. Acta. 1352 (1997) 1-7及びS.R. Keller, et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 23612-23618) とも相同性を持っていた。これらはすべてMA族 gluzincinアミノペプチダーゼ類のM1 family zinc aminopeptidase (A.J. Barrett, Methods Enzymol. 244 (1994) 1-15) に属している。

【0053】

(9) Northern blot法による遺伝子発現の検索

スクリーニング的な実験は、本発明の分子量約160 kDaの新規な蛋白質laeverinが、免疫組織染色でEVTが存在する胎盤や卵膜以外の卵巣、子宮などには発現しておらず、EVTに特異的に発現していることを示していた。

Northern blot法による遺伝子発現の検索の結果を図5に示す。Northern blot法は、以下の手順に沿って施行した。まず制限酵素BstXIでベクターpCMV-scriptプラスミドを切断し、5'RACEで作成されたlaeverinをエンコードするPCR産物を挿入したのち、E.coliを形質転換した。E.coliを増殖させ、プラスミドを抽出した。直線化したプラスミドを³²Pでラベルし、プローブとした。ヒト多臓器から抽出したmRNAサンプルはクローンテック社からMultiple Tissue membraneとして購入した。得られたmembrane (Human 12-Lane Multiple Tissue Northern Blot) をプレハイブリダイゼーション・バッファー(ファルマシア社)中で、65、30分間インキュベートしたのち、³²Pラベルしたlaeverinプローブをハイブリダイゼーションした。0.1% SDSを含む2 x standard saline citrate (SSC, 2 mM 酢酸ナトリウム、20mM 塩化ナトリウム)溶液で室温にて15分間洗浄し、その後0.1% SDSを含む0.2 x SSC溶液で65にて30分間洗浄した。次いで、-80にて1日間オートラジオグラフィを行い、laeverinに相当する遺伝子をmembrane上で検出した。その結果、試験した組織(脳(Brain)、心臓(Heart)、骨格筋(Skeletal muscle)、結腸(粘膜不含)(Colon(no mucosa)、胸腺(Thymus)、脾臓(Spleen)、腎臓(Kidney)、小腸(Small intestine)、胎盤(Placenta)、肺(Lung)、末梢血単核球(PBMC))のうち、胎盤のみにて4.0kbと3.0kbの位置にlaeverin遺伝子発現が確認された。種々の週数の胎盤組織及び卵膜組織を用いて検討した結果、4.0kbのバンドが主たるmRNAであり、3.0kbのバンドはスプライシングバリエーションと考えられた。また、胎盤以外の脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、小腸、肺及び末梢血免疫細胞などの臓器や細胞には発現が認められなかった。

【0054】

実験例1 Laverin遺伝子を導入した細胞の浸潤能

10

20

30

40

50

CHO (Chinese hamster ovary) 細胞にlaeverin遺伝子を導入し、4つの細胞株を樹立した。その膜浸潤能を、マトリゲルインベーションアッセイ (Matrigel invasion assay) により検討した。対照として、空ベクターを導入したlaeverin遺伝子陰性細胞を用いた。抗体として、上記の E T V 特異的蛋白質スクリーニング用抗体 (CHL-2抗体) を用いた。

【 0 0 5 5 】

(1) 細胞株B2D1、B2D2、D1D1及びD1D2の樹立

laeverin遺伝子をCHO細胞にlipofectamineを用いて導入し、抗生剤G418と10%FCSを含んだnutrient mixture F-12/HAM培地で遺伝子導入細胞を選択培養した。次いで、得られた細胞群をクローニングしてlaeverin蛋白の発現の有無について抗laeverin抗体を用いた蛍光免疫染色法で確認した。陽性細胞群をさらに培養し、抗laeverin抗体を用いたフローサイトメトリー法 (FACScalibur, Becton Dickinson) でlaeverin蛋白が細胞表面へ発現している細胞を選別し、培養及びクローニングして細胞株B2D1、B2D2、D1D1及びD1D2を得た。

【 0 0 5 6 】

(2) laeverin 発現細胞の浸潤能の検定

アッセイは、既に報告されている方法に従って行った (Sato Yら、2002 J Clin Endocrinol Metab 87:4287-4296; Sato Yら、2003 Development 130:5519-5532)。

それぞれの細胞株をG418と10%FCSを含んだnutrient mixture F-12/HAM培養液に $5 \times 10^5 / \text{ml}$ の濃度に調整して細胞浮遊液を用意した。

あらかじめ底面のメンブレン (ポアサイズ: 8ミクロン) 上にマトリゲル基底膜マトリックス (MATRGEL (登録商標) Basement Membrane; Beckton Dickinson Labware, Bedford, MA) をコートしたチャンバー (セルカルチャーインサート8.0ミクロンポアサイズPETメンブレン; Beckton Dickinson Labware, Bedford, MA) を用意し、これを800 μl の培養液 (nutrient mixture F-12/HAM培養液名称) を加えた24-ウエル培養プレート内に設置した。チャンバー内に200 μl の上記細胞浮遊液を加えて37°Cで20時間培養した。非浸潤細胞はマトリゲル基底膜マトリックスを通過できないが、浸潤細胞はマトリゲル基底膜マトリックスから8ミクロンのメンブレンポアへと浸潤することができる。

次いで、非浸潤細胞を除去し、メンブレンをメタノールで固定後にヘマトキシリンで染色し、マトリゲル基底膜マトリックス内を浸潤して底面のメンブレンに存在する直径8 μm のミリポアを通過してメンブレンの下面まで到達した細胞数を計数することで、細胞の浸潤能を検定した。

【 0 0 5 7 】

(3) laeverin抗体の、laeverin 発現細胞の浸潤能への影響

浸潤亢進を示した細胞群について、laeverin蛋白を免疫して作製したマウス抗ヒトlaeverinモノクローナル抗体 (10mg/ml) を、G418と10%FCSを含んだnutrient mixture F-12/HAM培養液中の細胞浮遊液 ($5 \times 10^5 / \text{ml}$) に加え、上記 (2) と同様にして細胞浸潤能を検定した。この実験において、それぞれの細胞群間及び培養条件下での細胞増殖の速度には有意な差は観察されなかった。

【 0 0 5 8 】

結果を図6に示す。laeverin遺伝子を導入した4つの細胞株のうちB2D1を除くB2D2、D1D1及びD1D2でlaeverin遺伝子を導入していない陰性細胞株に比べ浸潤細胞数が有意に亢進した。中でもB2D2及びD1D2では細胞群における浸潤細胞能が6倍も増強されていた。

また、laeverin抗体は、laeverin遺伝子非導入の、陰性細胞株には作用しなかったが、laeverin遺伝子導入細胞では浸潤が亢進する傾向が観察された。

さらに、laeverin発現が強い細胞が、メンブレン下面に浸潤した細胞の多数を占めていることが免疫細胞染色にて確認された。

【 0 0 5 9 】

B2D2、D1D1及びD1D2の浸潤能が陰性細胞株に比べて高いことは、laeverin蛋白が細胞の浸潤制御に関与している可能性を示している。抗laeverin抗体がlaeverin遺伝子導入細胞の浸潤能に影響を与えるという結果は、この推論を支持するものと考えられる。

laeverin蛋白が酵素であることを考慮すると、実験結果は、生体においてもlaeverin蛋

10

20

30

40

50

白の存在で血管内皮細胞や神経細胞など種々の細胞の遊走能や浸潤能が変化しうることを示しており、組換え型 laeverin の治療薬としての可能性を強く示唆している。

【 0 0 6 0 】

laeverin 分子に関する考察

本発明の laeverin はペプチダーゼ M1 モチーフという長い領域を持っている (98-506)。この領域のなかに laeverin は高度に保存されたモチーフ、すなわち、His-Glu-Xaa-Xaa-His- (18 アミノ酸残基) -Glu (415-438) を有している (図 4)。この亜鉛結合モチーフは多くの酵素活性に共通であり、この構造はグルジンシンアミノペプチダーゼ (gluzincin aminopeptidase) と名付けられている (A. J. Barrett, *Methods Enzymol.* 244 (1994) 1-15)。laeverin の N 末端には高度の疎水性領域 (14-36, 23 残基) があり、これは膜貫通ドメインと考えられる。従って laeverin は短い細胞内部分を持つ膜結合型蛋白であると推測される。

10

【 0 0 6 1 】

laeverin のアミノ酸配列はアミノペプチダーゼ N (J. Olsen, et al., *FEBS Lett.* 238 (1988) 307-314)。と相同性を有している。アミノペプチダーゼ N は 160 kDa の亜鉛依存性の膜結合型ペプチダーゼである (B. L. Vallee, et al., *Biochemistry* 29 (1990) 5647-5659)。このペプチダーゼに関して、卵巣の内夾膜細胞と子宮内膜間質細胞に発現しており、卵胞発育や子宮内膜間質細胞の脱落膜化の制御に関与している可能性が報告されている (H. Fujiwara et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74 (1992) 91-95; K. Imai, et al., *Biol. Reprod.* 46 (1992) 328-334; T. Tachibana, et al., *Hum. Reprod.* 11 (1996) 497-502; K. Nakamura, et al., *Hum. Reprod.* 11 (1996) 1952-1957; T. Inoue, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 171-175)。

20

【 0 0 6 2 】

cDNA の翻訳領域から計算した laeverin の分子量は 113 kDa であり、胎盤から精製した Laevelin の分子量 (160 kDa) より小さい。この不一致はアミノペプチダーゼ N の場合と同様に、グリコシル化 (糖鎖) などによる laeverin の修飾によると考えられる。これらの所見より、この新しい蛋白は膜結合型メタロペプチダーゼの一種と同定できる。

ヒト chorion laeve が膜結合型ペプチダーゼであるジペプチジルペプチダーゼ IV (dipeptidyl peptidase IV, DPPIV, EC3.4.14.5) と中性エンドペプチダーゼ (neutral endopeptidase, NEP, EC3.4.24.11) を発現していることが報告されている (K. Imai, et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170 (1994) 1163-1168)。最近、本発明者らは DPPIV ともう一つの膜結合型ペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼ M (carboxypeptidase M, CP-M, EC3.4.17.12) が母体の脱落膜組織に侵入した EVT に発現していることを見出した (Y. Sato, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 4287-4296)。これらのペプチダーゼは細胞膜表面に発現し、細胞外でいくつかの生物学的活性のあるペプチドを分解することができる。Kenny らは細胞膜表面のペプチダーゼは多くの細胞で、ペプチド因子活性や標的細胞への到達を調節することでその成長や分化を制御していることを示唆している (A. J. Kenny, et al., *Lancet* 2 (1989) 785-787)。

30

【 0 0 6 3 】

卵膜の chorion laeve は子宮内で胎児と羊水を含む羊膜に包まれて、胎児 - 母体間の境界を形成し、胎児周囲の水相の環境維持を制御していると考えられている。一方、母体脱落膜組織に浸潤している EVT はさらに母体のらせん動脈に侵入し、絨毛間腔に十分な血流を供給するために置換されて血管を拡張させている。これらのトロホプラストに発現する膜結合型ペプチダーゼはトロホプラストの機能調節に何らかの役割を果たしていると思われる。この概念を補強するものとして、RANTES を含むいくつかのケモカインが DPPIV の基質であることが近年明らかにされている。また RANTES の受容体である CCR1 が DPPIV の発現に合わせて EVT に発現していることも報告された。さらに RANTES は EVT の浸潤を促進し、EVT 上の DPPIV と CCR1 は EVT の浸潤、代謝及びケモカインへの反応性を制御していることも示唆されている (Y. Sato, et al., *Development* 130 (2003) 5519-5532)。DPPIV と CP-M もまた、排卵後の黄体形成においてヒト顆粒膜細胞の黄体化に関与していることが提唱され

40

50

ている (H. Fujiwara, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 5 (1992) 1352-1357; H. Fujiwara, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 79 (1994) 1007-1011; S. Yoshioka, et al., Mol. Hum. Reprod. 4 (1998):709-717]。これらのペプチダーゼはまた分化のクラスター (cluster of differentiation; CD) マーカーとして免疫細胞の膜表面分子であることが知られている。そして、膜結合型ペプチダーゼは免疫細胞の機能や分化の調節に重要な役割を果たしていることが提唱されている (U. Lendeckel, et al., Adv. Exp. Med. Biol. 477 (2000) 1-24)。これらの所見は総合的に、本発明の laeverin を含む膜結合型ペプチダーゼ が生殖現象に関与していることを支持する事象の存在を示唆しており (H. Fujiwara, et al., Endocr. J. 46 (1999) 11-25)、本発明の laeverin の有用性を裏付けるものである。

10

【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明の EVT 由来の新規な蛋白質 laeverin は、生体内で極めて特異的な機能、免疫学的特性を有する EVT の分子マーカーとなりうる蛋白質であり、本発明は、該蛋白質及びその遺伝子を大量に提供する方法を提供するものである。EVT 特有の蛋白質の解析は免疫学、腫瘍学等を含む広範な医学領域において有用であり、その解析を通して本発明は、妊娠維持の調節機構の理解、さらには癌細胞の浸潤抑制法の開発、免疫寛容機構成立のメカニズム解明、自己免疫疾患治療の開発など広範な分野で医学の発展に大いに貢献しうる。

【図面の簡単な説明】

【0065】

20

【図1】免疫組織染色に基づいて分析した、chorion laeve の EVT 上に発現している laeverin の分布を示す写真の模写図である。

【図2】CHL-2モノクローナル抗体を用いてヒト胎盤から生成した laeverin の銀染色8% SDS-PAGE 上のプロファイルを示す写真の模写図である。

【図3】laeverin の cDNA 配列である。

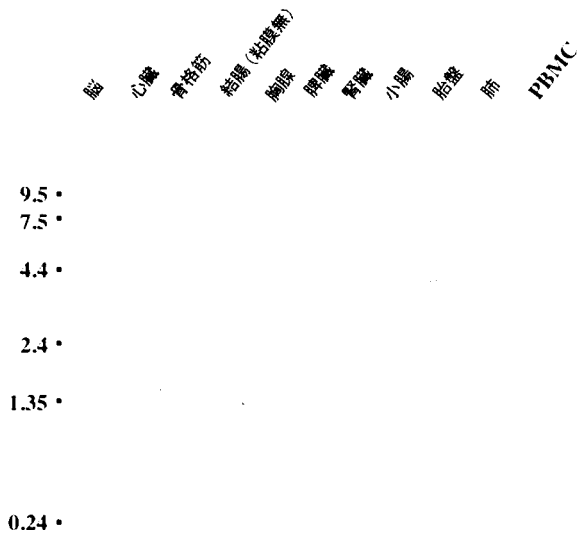
【図4】laeverin の推定のアミノ酸配列である。

【図5】Northern blot法による遺伝子発現の検索の結果を示す写真の模写図である。

【図6】Matrigel invasion assayにおける、laeverin 遺伝子を導入した CHO 細胞と導入していない CHO 細胞の浸潤細胞数を示すグラフである。

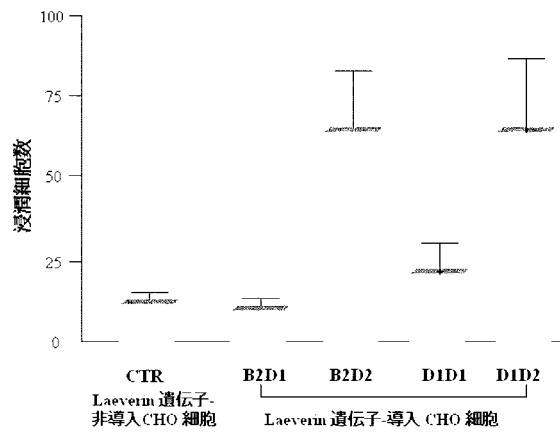
【 図 5 】

図5



【 図 6 】

図6



【 配列表 】

0004346540000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	9/48 (2006.01)	C 1 2 N	9/48
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/577 A

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(72)発明者 藤原 浩

京都府京都市北区紫野宮西町34-601

(72)発明者 前田 道之

京都府京都市左京区高野東開町1-19

(72)発明者 上田 正道

京都府京都市左京区高野東開町1-23 東大路高野第3住宅17-502

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第01/083782(WO, A1)
 国際公開第03/006646(WO, A1)
 国際公開第99/013329(WO, A1)
 Cancer Res., 2000年, vol. 60, 722-727
 Mol. Genet. Metab., 1998年, vol. 63, 289-294
 Exp. Hematol., 1993年, vol. 21, 1695-1701

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 4 0
 C 0 7 K 1 6 / 1 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 1 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 3 8
 C 1 2 N 9 / 4 8
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 0
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 G 0 1 N 3 3 / 5 7 7
 MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 PubMed
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)
 WPIDS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	绒毛外染养膜细胞特异的蛋白质		
公开(公告)号	JP4346540B2	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	JP2004326314	申请日	2004-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
当前申请(专利权)人(译)	藤原 浩 上田正道		
[标]发明人	藤原浩 前田道之 上田正道		
发明人	藤原 浩 前田 道之 上田 正道		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/18 C12N5/06 C12P21/08 C12N15/02 C12N9/48 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/577 C12N15/09 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P15/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/07 C12N5/078 C12N5/09 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/02		
FI分类号	C07K16/40 C07K16/18 C12N5/00.E C12P21/08 C12N15/00.ZNA.C C12N9/48 G01N33/53.Y G01N33/50.Z G01N33/577.A A61K31/7088 A61K37/02 A61K38/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P15/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P9/00 A61P9/10 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.C C12N15/00.AZN.A C12N15/00.CZN.A C12N5/00.A C12N5/00.101 C12N5/00.202.J C12N5/00.202.U C12N5/078 C12N5/09 C12N5/10 C12P21/02.C C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/HA11 4B024/HA17 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA06 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC13 4C085/DD33 4C085/DD34 4C085/DD35 4C085/DD63 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA46 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏		
优先权	2003379618 2003-11-10 JP		
其他公开文献	JP2005160473A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供分析绒毛外滋养层 (EVT) 功能的方法，用于澄清与控制妊娠维持，癌细胞侵袭和免疫耐受相关的机制，以及治疗自身免疫疾病。解决方案：蛋白质包含如下所述的蛋白质 (a) 或蛋白质 (b)：蛋白质 (a) 包含特定的氨基酸序列；蛋白质 (b) 包含通过使蛋白质 (a) 的氨基酸序列中的一个或几个氨基酸经历缺失，取代或添加而给出的氨基酸序列，并且具有与蛋白质相同的特征或功能 (a) 。

部位	配列	配列番号
N-末端配列 (11)	GPPSSSGFYVS	3
内部配列 1 (10)	SYVALSNMP	4
内部配列 2 (10)	QEPFYLENIK	5
内部配列 3 (10)	VDHPENEIPY	6
内部配列 4 (10)	EDILLNTYT	7