

(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 - 231578

(P2001 - 231578A)

(43)公開日 平成13年8月28日(2001.8.28)

(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		A 0 1 K 67/027	
A 0 1 K 67/027			A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/711			39/395	D
38/00				N
39/395			48/00	

審査請求 未請求 請求項の数 36 O L ( 全 38数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000 - 372864(P2000 - 372864)	(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
(22)出願日	平成12年12月7日(2000.12.7)	(72)発明者	松下 武史 東京都町田市旭町3 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(31)優先権主張番号	特願平11 - 349780	(72)発明者	榊原 敏広 東京都町田市旭町3 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(32)優先日	平成11年12月9日(1999.12.9)	(74)代理人	100096219 弁理士 今村 正純 ( 外 2 名 )
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L - 1 ファミリーに属する蛋白質

(57)【要約】 ( 修正有 )

【課題】 IL-1が関与する疾患等の治療薬の探索、開発に有用なIL-1ファミリーに属する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の提供。

【解決手段】 ヒト由来の特定のアミノ酸配列を含むIL - 1ファミリーに属する蛋白質；上記蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL - 1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；上記蛋白質が有するアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL - 1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；及びハイブリドーマFERM B P - 7 3 6 8 が産生するモノクローナル抗体で認識され、かつハイブリドーマFERM B P - 7 3 6 9 が産生するモノクローナル抗体では認識されない、上記の蛋白質。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)～(f)から選ばれる蛋白質：

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、46～208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むIL-1ファミリーに属する蛋白質；

(d) (a)または(b)の蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；

(e) (a)または(b)の蛋白質が有するアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；および

(f) ハイブリドーマFERM BP-7368が産生するモノクローナル抗体で認識され、かつハイブリドーマFERM BP-7369が産生するモノクローナル抗体では認識されない、上記(d)または(e)に記載の蛋白質。

【請求項2】 以下の(a)～(d)から選ばれるDNA：

(a) 請求項1に記載の蛋白質をコードするDNA；

(b) 配列番号4で表される塩基配列において、370～1023番目の塩基配列を有するDNA；

(c) 配列番号4で表される塩基配列において、505～993番目の塩基配列を有するDNA；及び

(d) (a)～(c)のいずれかのDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質をコードするDNA。

【請求項3】 以下の(a)～(c)から選ばれる蛋白質：

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質；及び

(c) 配列番号1で表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有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質。

【請求項4】 以下の(a)～(c)から選ばれるDNA：

(a) 請求項3に記載の蛋白質をコードするDNA；

(b) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNA；

及び

(c) (a)または(b)のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項5】 請求項2または4に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換えDNA。

【請求項6】 請求項5に記載の組換えDNAを保有する形質転換体。

【請求項7】 受託番号がFERM BP-6943である、請求項6に記載の形質転換体。

【請求項8】 請求項6または7に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1または3に記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、請求項1または3に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項9】 請求項1または3に記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項10】 抗体が、請求項1または3に記載の蛋白質が有する活性を阻害する活性を有する抗体である、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】 抗体が、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体である、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】 抗体が、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～20番目のアミノ酸配列部分を抗原エピトープとして認識する抗体である、請求項10または11に記載の抗体。

【請求項13】 受託番号がFERM BP-7368であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。

【請求項14】 受託番号がFERM BP-7369であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。

【請求項15】 請求項1に記載の蛋白質における配列番号1のアミノ酸配列の領域または配列番号1のアミノ酸配列に相応する領域をコードするDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項16】 請求項2または4に記載のDNAまたは請求項15に記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことを含む、請求項1または3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17】 請求項15に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、請求項1または3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18】 請求項2または4に記載のDNAまたは請求項15に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法により、請求項1または3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19】 請求項15に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、請求項1または3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20】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 感染や炎症を伴う疾患が微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患または異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項2または4に記載のDNAまたは請求項15に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または3に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

【請求項23】 請求項2または4に記載のDNAまたは請求項15に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または3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24】 請求項1または3に記載の蛋白質を含む、医薬。

【請求項25】 請求項2または4に記載のDNAを含む、医薬。

【請求項26】 請求項9から14の何れか1項に記載の抗体を含む、医薬。

【請求項27】 請求項15に記載のオリゴヌクレオチドを含む、医薬。

【請求項28】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬である、請求項24～27のいずれか1項に記載の医薬。

\*【請求項29】 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患または異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬である、請求項24～27のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項30】 感染や炎症を伴う疾患が微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患または異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、請求項28または29に記載の医薬。

【請求項31】 請求項1または3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相互作用する受容体のスクリーニング方法。

【請求項32】 請求項31に記載のスクリーニング方法により取得される、請求項1または3に記載の蛋白質と特異的に相互作用する受容体。

【請求項33】 請求項9から14の何れか1項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1または3に記載の蛋白質の免疫学的検出法。

【請求項34】 請求項9から14の何れか1項に記載の抗体を用いて、請求項1または3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35】 請求項1または3に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

【請求項36】 請求項1または3に記載の蛋白質の有する活性が一部または完全に抑制されている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および該蛋白質を認識する抗体、並びにそれらの利用法に関する。

【0002】

【従来技術】インターロイキン-1(IL-1)とは、炎症反応の初期において鍵となる役割を担っている2種類の蛋白質(IL-1 およびIL-1)をいう(総説として、

\*50 Blood,87, 2095, 1996; Bio Science用語ライブラリー、

サイトカイン・増殖因子,改訂版, p14-17, 1998; およびそれら総説中の参考文献を参照)。IL-1は、1940年代からその存在について知られており、内因性発熱物質あるいはリンパ球活性化因子などの名称で呼ばれてきた。1985年までには、IL-1のcDNAが単離され、異なる遺伝子に由来する2種類の分子、すなわちIL-1とIL-1'の存在が明らかにされた(Nature, 315, 641, 1985)。IL-1 およびIL-1' は異なる等電点を有し、ともにシグナルペプチドを持たない271および269アミノ酸からなる31kDの前駆体として産生された後、それぞれ159および153アミノ酸からなる17kDの成熟型分子に切断される。IL-1' はカルパインにより、IL-1 はIL-1' 変換酵素により前駆体から成熟型分子に変換されることが知られている(Nature, 356, 768, 1992; 及びBlood, 87, 2095, 1996)。IL-1 とIL-1' のアミノ酸配列の相同性は27%であるが、類似の高次構造を有していることが知られている。IL-1' の成熟型分子は、ヘリックスを含まず、シートが59%、残りはランダムコイルの球状蛋白質で12本のシートからなる4面体様構造をとる(EMBO J., 7, 339, 1988)。また、IL-1 とIL-1' の遺伝子はともにヒトの染色体の2q13に位置していることが明らかにされている(Nucleic Acids Res., 14, 3167, 1986; 及びNucleic Acids Res., 14, 7897, 1986)。

【0003】IL-1 とIL-1' は同一のレセプターに結合することで生物活性を示す。IL-1受容体には、80kDのタイプI(IL-1RI: CD121a)と68kDのタイプII(IL-1RII: CD121wb)の2種類が存在し、それぞれ1988年と1991年にクローニングされた(Science, 241, 585, 1988; 及びEMBO J., 10, 2821, 1991)。タイプI遺伝子はヒト染色体2q13-21に、タイプII遺伝子はヒトの染色体2q13-22に位置している。また、タイプIIの細胞外領域は、可溶性受容体(sIL-1R)として存在することも示されている(FEBS Lett., 260, 213, 1990)。タイプIおよびタイプII受容体はともに免疫グロブリンスーパーファミリーに属する受容体で、3つの免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外領域と、1つの膜貫通領域および細胞内領域から構成されている。タイプIとタイプIIの細胞外領域のアミノ酸組成の相同性は28%であるが、細胞内領域の構造には大きな相違が観察される。すなわち、タイプIの細胞内領域は215アミノ酸から構成され、その中にはプロテインキナーゼCリン酸化構造と類似の配列などが存在するのに対して、タイプIIの細胞内領域は29アミノ酸と短く、シグナル伝達に関わると考えられる配列は見い出されていない。また、発現分布に関しても差が観察され、タイプIはT細胞、繊維芽細胞、表皮細胞、内皮細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、肝細胞で、タイプIIはB細胞、単球、好中球、骨髄細胞などで発現している。これら2つの受容体は細胞内領域に大きな構造的相違が存在すること、発現分布に

相違があることなどから、IL-1との結合親和性以外にも、細胞内情報伝達系や発現制御の違いなどによって異なった生物学的な機能を担っていると考えられている。

【0004】1990年になると、IL-1受容体と結合してIL-1とIL-1受容体との結合を阻害するIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)がクローニングされた(Nature, 343, 341, 1990)。IL-1raは152アミノ酸からなる17kDの蛋白質で、そのアミノ酸組成はIL-1 と19%、IL-1' と26%の相同性を有し、タイプIおよびタイプIIの受容体のいずれにも結合することができる。IL-1raには少なくとも3種類のスプライス形態が存在することが知られており、1つは分泌蛋白質を、他の2つは細胞内蛋白質をコードしていることが明らかにされている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3681, 1991; 及びBlood, 87, 2095, 1996)。分泌型のIL-1raは単球やマクロファージ、好中球、繊維芽細胞などから産生され、非分泌型のIL-1raはケラチノサイトや上皮細胞、マクロファージで産生される。IL-1ra遺伝子は、ヒト染色体上の2q13-14.1に位置する。

【0005】1998年にはIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)が、ESTデータベースの検索を介してIL-1raと有意な相同性を有する遺伝子として同定され(特開平10-304888号)、1999年にはTango-77が、ゲノム配列データベースの解析を介してIL-1raと有意な相同性を有する遺伝子として同定された(国際公開W099/06426号)。取得されたIL-1ra cDNAはシグナル配列を有していないため、シグナル配列を含む別のスプライス形態が存在する可能性が指摘されているが、未だ同定されていない。Tango-77では、コンピュータプログラムProcrustesを用いて、取得されたcDNA以外に別のスプライス形態が存在する可能性が推測され、その推定スプライス形態T77-procrustesの配列が明らかになっている。しかしながら、現時点でのインフォマテック技術では、すべてのスプライス形態を正確に予測することは不可能であり、未知な生物学的役割を担うさらに別のスプライス形態が存在している可能性が考えられる。

【0006】このように、IL-1、IL-1'、IL-1ra、IL-1ra'、Tango-77は互いに相同性の高い一群のファミリーを形成していることが明らかとなっており、さらなるメンバーの存在も想起される。また、IL-1ファミリーに属する因子は多様な生物活性を持つことも明らかにされてきており、病態との関連を含め生理的に重要な因子と考えられている(総説として、Blood, 87, 2095, 1996; Bio Science用語ライブラリー, サイトカイン・増殖因子,改訂版, p14-17, 1998; およびそれら総説中の参考文献を参照)。また、IL-1ファミリーに属する因子の部分ペプチドが様々な活性を持つことも報告されている(Blood, 177, 1627, 1991)。即ち、IL-1の208から240番目に相当する部分ペプチドはT細胞を活性化能力を欠出するが催眠作用やパイロジェン作用を

有していること (Am. J. Physiol., 259, R439, 1990)、IL-1 の237から269番目に相当する部分ペプチドはIL-1によるT細胞の活性化を阻害すること (Biochem. Biophys. Res. Comm., 147, 204, 1987)、IL-1 の163から171番目に相当する部分ペプチドはT細胞の活性化やグリコサミノグリカン合成を促進するがパイロジェン作用を欠出すること (Adv. Exp. Med. Biol., 251, 153, 1989、Eur. Cytokine Net., 1, 21, 1990)、IL-1 の165から186番目に相当する部分ペプチドは繊維芽細胞の増殖促進活性を有することが報告されている (Scand. J. Immunol., 30, 549, 1989)。

【0007】IL-1ファミリーに属する因子は、本明細書中後記されるように、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患に關与することが示されている。また、IL-1ファミリーに属する因子のIL-1活性を阻害できるIL-1アンタゴニスト、抗体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患を治療する活性が示されている。さらに、IL-1ファミリーに属するIL-1活性を有する因子は、その蛋白質あるいはそれをコードする遺伝子の投与により、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患に有効であることが示されている。従って、IL-1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。また、IL-1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。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、微生物感

染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患等の治療薬の探索、開発に有用なIL-1ファミリーに属する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、およびこれらの利用方法を提供することにある。

【0009】

【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、新規なアミノ酸配列を含むIL-1ファミリーに属する因子およ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。すなわち、本発明は、以下の(1)~(36)を提供するものである。

(1) 以下の(a)~(f)から選ばれる蛋白質：

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むIL-1ファミリーに属する蛋白質；

(d) (a)または(b)の蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；

(e) (a)または(b)の蛋白質が有するアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；および

(f) ハイブリドーマFERMBP-7368が産生するモノクローナル抗体で認識され、かつハイブリドーマFERMBP-7369が産生するモノクローナル抗体では認識されない、上記(d)または(e)に記載の蛋白質。

【0010】(2) 以下の(a)~(d)から選ばれるDNA：

(a) (1)に記載の蛋白質をコードするDNA；

(b) 配列番号4で表される塩基配列において、370~1023番目の塩基配列を有するDNA；

(c) 配列番号4で表される塩基配列において、505~993番目の塩基配列を有するDNA；及び

(d) (a) ~ (c) のいずれかのDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質をコードするDNA。

【0011】(3) 以下の(a) ~ (c) から選ばれる蛋白質:

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質;

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質; 及び

(c) 配列番号1で表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有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質。

(4) 以下の(a) ~ (c) から選ばれるDNA:

(a) (3) に記載の蛋白質をコードするDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNA; 及び

(c) (a) または(b) のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0012】(5) (2) または(4) に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換えDNA。

(6) (5) に記載の組換えDNAを保有する形質転換体。

(7) 受託番号がFERMBP-6943である、(6) に記載の形質転換体。

(8) (6) または(7) に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1) または(3) に記載の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、(1) または(3) に記載の蛋白質の製造方法。

【0013】(9) (1) または(3) に記載の蛋白質を認識する抗体。

(10) 抗体が、(1) または(3) に記載の蛋白質が有する活性を阻害する活性を有する抗体である、(9) に記載の抗体。

(11) 抗体が、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体である、(10) に記載の抗体。

(12) 抗体が、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1~20番目のアミノ酸配列部分を抗原エピトープとして認識する抗体である、(10) または(11) に記載の抗体。

(13) 受託番号がFERMBP-7368であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。

(14) 受託番号がFERMBP-7369であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。

【0014】(15) (1) に記載の蛋白質における配列番号1のアミノ酸配列の領域または配列番号1のアミノ酸配列に相応する領域をコードするDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド。

(16) (2) または(4) に記載のDNAまたは(15) に記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行うことを含む、(1) または(3) 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。

(17) (15) に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、(1) または(3) 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。

(18) (2) または(4) に記載のDNAまたは(15) に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ハイブリダイゼーション法により、(1) または(3) 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。

(19) (15) に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行うことを含む、(1) または(3) 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。

【0015】(20) 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、または異常な細胞増殖を伴う疾患を検出するために用いる、(16) ~ (19) のいずれかに記載の方法。

(21) 感染や炎症を伴う疾患が微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患または異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍である、(20) に記載の方法。

(22) (2) または(4) に記載のDNAまたは(15) に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) または(3) に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(23) (2)または(4)に記載のDNAまたは(15)に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)または(3)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。

【0016】(24) (1)または(3)に記載の蛋白質を含む、医薬。

(25) (2)または(4)に記載のDNAを含む、医薬。

(26) (9)から(14)の何れかに記載の抗体を含む、医薬。

(27) (15)に記載のオリゴヌクレオチドを含む、医薬。

(28) 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、異常な細胞増殖を伴う疾患または神経細胞の障害に基づく疾患の治療および/または予防のための医薬である、(24)~(27)のいずれかに記載の医薬。

(29) 感染や炎症を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患、異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患、膵臓細胞の障害を伴う疾患、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患または異常な細胞増殖を伴う疾患の診断のための医薬である、(24)~(27)のいずれかに記載の医薬。

【0017】(30) 感染や炎症を伴う疾患が微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷または炎症性腸疾患であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化または再狭窄であり、異常な繊維芽細胞の活性化を伴う疾患または異常な滑膜組織の活性化を伴う疾患がリウマチ性関節炎であり、膵臓細胞の障害を伴う疾患が糖尿病であり、異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患が骨粗鬆症であり、異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患がアレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏または自己免疫疾患であり、異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病または悪性腫瘍であり、神経細胞の障害に基づく疾患がアルツハイマー病または虚血性脳疾患である、(28)または(29)に記載の医薬。

【0018】(31) (1)または(3)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相互作用する受容体のスクリーニング方法。

(32) (31)に記載のスクリーニング方法により取得される、(1)または(3)に記載の蛋白質と特異的に相互作用する受容体。

(33) (9)から(14)の何れかに記載の抗体を用いることを特徴とする、(1)または(3)に記載の

蛋白質の免疫学的検出法。

(34) (9)から(14)の何れかに記載の抗体を用いて、(1)または(3)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。

(35) (1)または(3)に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。(36) (1)または(3)に記載の蛋白質の有する活性が一部または完全に抑制されているノックアウト非ヒト動物。

10 【0019】

【発明の実施の形態】本発明の蛋白質としては、

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質；

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むIL-1ファミリーに属する蛋白質；

(d) (a)または(b)の蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；

(e) (a)または(b)の蛋白質が有するアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；および

(f) 受託番号FERMBP-7368であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体で認識され、かつ受託番号FERMBP-7369であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体では認識されない、(d)または(e)に記載の蛋白質；が挙げられる。

30 【0020】また、本発明の蛋白質としては、

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質；及び

(c) 配列番号1で表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有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性を有する蛋白質；が挙げられる。IL-1ファミリーに属する蛋白質とは、IL-1レセプターと親和性を有する蛋白質である。IL-1ファミリーに属する蛋白質の具体例としては、例えばIL-1、IL-1、IL-1ra、IL-1ra及びTango-77などが挙げられる。

【0021】配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-

50

77より高い蛋白質、配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質；並びに配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質において1以上のアミノ酸が欠出、置換および/または付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合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版と略す)、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・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., US A, 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2のアミノ酸配列を有する蛋白質、配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質、または配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより行うことができる。欠出、置換及び/または付加されるアミノ酸の数は1から数個でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠出、置換若しくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0022】また、本発明の蛋白質としては、配列番号2のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質、配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質、並びに配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質も含まれる。配列番号2、配列番号2の46~208番目、または配列番号1のアミノ酸配列との相同性は、BLAST (J. Mol. Bio., 215, 403, 1990) やFASTA (Method in Enzymology, 183, 63, 1990) 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上の相同性を有していることが好ましい。本発明において、受託番号FERM B

P-7368であるハイブリドーマが産生する抗体で認識され、かつ受託番号FERMBP-7369であるハイブリドーマが産生する抗体では認識されない蛋白質とは、例えば上記抗体を用いたウエスタンブロッティングやELISAなどの方法により検出されるか否かで特定ができる蛋白質である。具体的には、該蛋白質として、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

【0023】本発明のDNAとしては、  
 (a) 上記定義した本発明の蛋白質をコードするDNA；  
 (b) 配列番号4で表される塩基配列において、370~1023番目の塩基配列を有するDNA；  
 (c) 配列番号4で表される塩基配列において、505~993番目の塩基配列を有するDNA；及び  
 (d) (a)~(c)のいずれかのDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性がTango-77より高い蛋白質をコードするDNA；を挙げることができる。また、本発明のDNAとしては、  
 (a) 配列番号1で表される蛋白質をコードするDNA；  
 (b) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNA；及び  
 (c) (a)または(b)のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合親和性を有する蛋白質をコードするDNA；を挙げることができる。

【0024】ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号3または配列番号4で表される塩基配列を有するDNAなどの本発明のDNAまたはその一部の断片をプローブとして、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あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の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、0.1~2×SSC溶液(1×SSC溶液は150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)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をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第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。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等の解析ソフトを用いて計算し

たときに、配列番号3で表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70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。また、本明細書で言う「配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質の有する活性」の種類は特に制限されず、例えば、ヒトIL-1ファミリーに属する蛋白質の受容体との結合活性などが挙げられるが、これに限定されるわけではない。

【0025】以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. 本発明のDNAの調製

ヒト骨髄mRNAは市販のもの(例えば、Clontech社製)を用いてもよいし、以下のごとくヒト骨髄組織から調製してもよい。骨髄組織から全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; 及び実験医学, 9, 1937, 1991)などがあげられる。また、全RNAからpoly(A)<sup>+</sup>RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)等があげられる。さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia社製)など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。

【0026】調製したヒト骨髄組織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・クローニング第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、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Life Technologies社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit(STRATAGENE社製)を用いる方法などがあげられる。cDNAライブラリーを作製するためのクロー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でも使用できる。具体的には、ZAP Express(STRATA GENE社製、Strategies, 5, 58, 1992)、pBluescript II SK(+)(Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989)、Lambda ZAP II(STRATAGENE社製)、gt10、gt11(DNA cloning, A Practical Approach, 1, 49, 1985)、Tripl Ex(Clontech社製)、ExCell(Pharmacia社製)、pT7 T318U(Pharmacia社製)、pcD2(Mol. Cell. Biol., 3, 280, 1983)およびpUC18(Gene, 33, 103, 1985)等をあげることができる。

【0027】宿主微生物としては、大腸菌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、Escherichia coli XL1-Blue MRF'(STRATAGENE社製、Strategies, 5, 81, 1992)、Escherichia coli C60(Genetics, 39, 440, 1954)、Escherichia coli Y1088(Science, 222, 778, 1983)、Escherichia coli Y1090(Science, 222, 778, 1983)、Escherichia coli NM522(J. Mol. Biol., 166, 1, 1983)、Escherichia coli K802(J. Mol. Biol., 16, 118, 1966)およびEscherichia coli JM105(Gene, 38, 275, 1985)等が用いられる。このcDNAライブラリーを、そのまま以下の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを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; 及び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解析に用いてもよい。

【0028】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、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977)あるいは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、該DNAの塩基配列を決定する。それぞれのcDNAの塩基配列が新規な配列を有しているかどうかは、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよび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完全に一致すると考えられるような明らかな相同性を示す塩基配列がないことにより確認できる。

【0029】上記の方法で得られる新規な配列を含むcDNAの塩基配列として、例えば配列番号4の塩基配列があげられる。配列番号4の塩基配列からなるDNAを翻訳して得られる蛋白質は、BLAST2を用いた相同性解析において、IL-1ファミリーに属する蛋白質ヒトIL-1、ヒトIL-1、ヒトIL-1raと、それぞれ33%、28%、29%の相同性を有する。また、配列番号4の塩基配列とTango-77との塩基配列比較から、配列番号4の塩基配列は、Tango-77の塩基配列に配列番号3の120塩基の新たな塩基配列が付加された配列を有していることがわかる。IL-1ファミリーに属する蛋白質の遺伝子は、ヒト染色体2番の長腕にクラスターを形成して存在することが知られている。すなわち、ヒトIL-1、ヒトIL-1、ヒトIL-1raの遺伝子はヒト染色体2q13~14に位置し、お互いに450kb以内の距離に位置している。ヒトIL-1ra およびTango-77の遺伝子もヒト染色体2q13付近に存在する。配列番号3の塩基配列がヒト染色体2番の長腕のクラスター領域に存在するか確認

するためには、ヒトゲノムライブラリーを、配列番号4の塩基配列に特異的な配列を用いてスクリーニングし、得られたゲノムクローンの塩基配列を決定することで決めることができる。

【0030】ヒトゲノムライブラリーは市販のもの（例えば、Research Genetics社製BACライブラリー）を用いてもよいし、ヒトの細胞や組織から公知の方法（例えば、Genomics, 29, 413, 1995.; 及びGenomics, 24, 527, 1994等に記載の方法）を用いて調製してもよい。また、ヒトゲノムライブラリーを、配列番号4の塩基配列に特異的な配列を用いてスクリーニングする方法としては、配列番号4の塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCR法（PCR Protocols, Academic Press, 1990）や、配列番号4の塩基配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用いたコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クロニング第2版）などがあげられる。上記の方法でヒトIL-1raの塩基配列と配列番号4の塩基配列の両方を含むゲノムDNAクローン（例えば、ヒトゲノムBACクローン）が得られる。従って、配列番号4の塩基配列からなる遺伝子

は、ヒト染色体2番の長腕のIL-1ファミリーに属する遺伝子が存在しているクラスター領域の近傍に存在していることが分かる。

【0031】得られるゲノムDNAクローンの塩基配列のうち、配列番号3の塩基配列が含まれる部分の塩基配列としては、配列番号5の塩基配列があげられる。配列番号3の塩基配列はスプライシングのアクセプター配列であるAGとスプライシングのドナー配列であるGTに囲まれており、配列番号4の塩基配列からなる遺伝子のエクソンを形成していることがわかる。配列番号4の塩基配列からなるDNAを翻訳して得られる蛋白質の二次元構造を、公知のチョーフアスマン、ロブソン、DSCなどの方法（<http://www.bmm.icnet.uk/software.html>、<http://www.gh.wits.ac.za/crystal/w3v1c/misc.anc003.html>）を用いて解析すると、IL-1ファミリーに属する因子に共通してみられる12本のシート構造が保持されていることがわかる。一方、Tango-77はN末端3つのシートを有していない。従って、配列番号4の塩基配列からなるDNAを翻訳して得られる蛋白質の一つのスプライス形態がTango-77であり、配列番号4の塩基配列がコードする蛋白質が、新規なIL-1ファミリーに属する因子としての本質的な活性を有することは明白である。

【0032】IL-1ファミリーに属する因子は様々な疾患に関与することが知られている。以下にその例を挙げる。IL-1は、TNF-、IFN-、IFN-、IFN-などのサイトカイン類や細菌のエンドトキシン、ウィルス、種々のマイトジェンにより誘導され、炎症反応、特に急性期炎症反応のメディエーターとして重要な役割を演ずる。すなわち、細菌感染などにより血中のエンドトキシン濃

度が増加すると、単球、マクロファージ、好中球などによりIL-1が放出され、炎症反応が惹起され、発熱や急性期蛋白質の誘導などの生体反応が引き起こされる（Blood, 87, 2095, 1996）。免疫系においては、IL-1が抗原やマイトジェンの存在下でIL-2の産生を亢進させ、IL-2受容体の発現を促進することによりT細胞を活性化することが知られている。また、T細胞からのIL-2、IFN-、CSF、IL-6などのサイトカインの産生を促進したり、TNF、IFN-、CSFなどのサイトカイン遺伝子の発現を増加させることが知られている（J. Biol. Chem., 269, 19021, 1994）。これらサイトカイン類の産生増加は、B細胞を刺激し、増殖および活性化を促し、免疫グロブリンの産生を亢進させる（J. Immunol. 130, 2708, 1983）。さらに、IL-1は、単球が炎症性マクロファージに成熟する過程にも関与することが知られている（J. Exp. Med., 175, 1793, 1992）。このように、IL-1は炎症反応のメディエーターとして種々の作用を発現することから、慢性関節リウマチや糖尿病、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎などをはじめとして、感染や炎症を伴う多くの疾患との関連が指摘されており、これら疾患におけるIL-1の産生亢進が観察されている（Virus Res., 32, 253, 1994; 及びN. Eng. J. Med., 328, 106, 1993）。従って、IL-1作用の阻害剤は、抗炎症作用を有することが期待される。IL-1raについては炎症やリウマチなどをターゲットとした臨床応用に向けた開発が行われている。

【0033】IL-1を平滑筋に構成的に発現させた場合、平滑筋の増殖を促進することが知られている（Am. J. Physiol., 45, H901, 1999）。また、血管平滑筋にIL-1を作用させるとE-セレクトインをはじめとする接着分子類の発現が増加し、白血球の接着を促進させることが知られている（Atherosclerosis, 115, 89, 1995）。これらのことから、動脈硬化発症との関連も注目されており、IL-1作用の阻害剤は動脈硬化の治療薬、予防薬としても有用であり得る。

【0034】IL-1は、線維芽細胞を刺激し、コラゲナーゼ等の蛋白質分解酵素や、プロスタグランジン類をリウマチ性関節炎局所にて放出させていることが知られている（Annu. Rev. Immunol., 3, 263, 1985）。また、リウマチ性関節炎患者の滑膜組織はIL-1を産生しており、その産生量は関節炎の程度と相関するとの結果が報告されている（Arthritis Rheum., 31, 480, 1988）。これらのことから、IL-1のリウマチ性関節炎の発症、進展への作用が強く示唆されている。従って、IL-1作用の阻害剤はリウマチ性関節炎の治療薬、予防薬としても有用であり得る。

【0035】IL-1は、膵臓のランゲルハンス島に対して傷害性の作用を有すること（Science, 232, 1545, 1986）、ランゲルハンス島に浸潤したマクロファージが放出するIL-1が細胞に傷害を与え、特にインスリン依存性

糖尿病(IDDM)の発症に強く関与すること(Autoimmunity, 10, 241, 1991)が報告されている。これらのことから、IL-1作用の阻害剤は糖尿病の治療薬、予防薬としても有望であり得る。

【0036】IL-1は、破骨細胞の活性化と骨吸収を促進することが報告されている(J. Bone Miner. Res., 4, 113, 1989)。従って、IL-1作用の阻害剤は骨吸収抑制作用が期待され、すなわち骨粗鬆症の治療薬、予防薬としても有望であり得る。実際、IL-1raが骨吸収を抑制したとの報告があり(J. Immunol., 145, 4181, 1990)、この

ような薬剤としての可能性は高いと考えられている。【0037】IL-1をマウスに投与すると、骨髄細胞の放射線感受性が弱まることが報告されており(Blood, 74, 2257, 1989)、抗ガン剤等の前に投与すると骨髄機能抑制による致死作用が軽減されるという知見が得られている。このことから、ガンの放射線療法や化学療法において、IL-1は骨髄細胞の保護作用を有することが期待されている。

【0038】IL-1はメラノーマ細胞株A375をはじめとする数種類の癌細胞に対して細胞障害性を有することが報告されている(J. Immunol., 136, 3098, 1986; 及びJ. Immunol., 135, 3962, 1985)。また、T細胞、B細胞、NK細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞に対しては細胞増殖を促進するが、ヒト骨髄球系細胞株K562、乳癌細胞MCF-7、あるいはマウスT細胞株Ebなどある種の腫瘍細胞の増殖を阻害することが報告されている(J. Immunol., 136, 340, 1986)。これらのことから、IL-1は異常な細胞増殖に基づく疾患、例えば、悪性腫瘍に対する治療薬、予防薬として有用でありうる。また、IL-1は胃癌細胞株に対して増殖促進活性を示す

(Cancer Res., 53, 4102, 1993)。このことから、IL-1の作用を阻害する薬剤は異常な細胞増殖に基づく疾患、例えば悪性腫瘍に対する治療薬、予防薬として有用でありうる。【0039】IL-1は神経細胞に作用して神経成長因子(NGF)の発現を増加させる作用があることが報告されている(Nature, 330, 658, 1987)。また、繊維芽細胞に作用しNGFの発現を増強させるとともにNGFのmRNAの安定性を増加させることが知られている(J. Biol. Chem., 263, 16348, 1988)。神経伝達物質であるNGFは神経細胞の増殖や神経突起の進展を促進する作用を有しており、障害を受けた神経細胞の再生や保護因子として機能することが知られている。従って、IL-1がNGFの発現を増強することにより、神経細胞の障害に基づく疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患に対する治療薬、予防薬として有用でありうる。また、神経切断後の再生を促す効果も期待できる。さらに、視床下部においてcAMPを上昇をさせ、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)産生を引き起こしたり、視床下部ホルモンや脳下垂体ホルモンの分泌を促進すること

が報告されており(Biochem. Biophys. Res. Commun., 164, 1262, 1989)、その脳機能の改善に対する効果が注目されている。

【0040】IL-1raは、IL-1のタイプIおよびタイプII受容体に結合して、IL-1ならびにIL-1の受容体への結合を競合的に阻害することにより、IL-1の生物活性を阻害する(Annu. Rev. Immunol., 16, 27, 1998)。IL-1raを種々の病態モデル動物に投与すると炎症が抑えられることが報告されている。例えば、IL-1raはLPS投与による敗血症ショックを防止し、組織への炎症細胞の浸潤や浮腫、壊死などを抑制する(Nature, 348, 550, 1990)。これらの病態モデルの結果は、ヒトにおける敗血症、リウマチ様関節炎、移植片-対-宿主疾患、喘息、発作、虚血性心疾患、骨髄性白血病などにおけるIL-1raの治療効果を期待させるものであり、臨床的試みがなされている(Int. Rev. Immunol., 16, 457, 1998)。

【0041】sIL-1レセプターはIL-1と結合し、IL-1の受容体への結合を阻害する(J. Exp. Med., 174, 1251, 1991)。また、移植された心臓の生着を促進させたり、急性骨髄性白血病細胞の増殖を抑制する作用があることが知られている(Blood, 79, 1938, 1992)。

【0042】以上のように、IL-1ファミリーに属する因子は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患に關与することが示されている。また、IL-1ファミリーに属する因子のIL-1活性を阻害できるIL-1アンタゴニスト、抗体、アンチセンスDNA等の阻害剤は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患を治療する活性が示されている。さらに、IL-1ファミリーに属するIL-1活性を有する因子は蛋白質あるいはコードする遺伝子投与により、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増

殖を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患の治療および骨髄機能抑制による癌の放射線療法や化学療法における副作用の軽減と治療効果の促進に有効であることが示されている。

【0043】配列番号4の塩基配列からなる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'端および3'端の塩基配列に基づいたプライマーを調製し、ヒトまたは非ヒト動物の骨髄等の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいは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。また、配列番号4のDNAの全長あるいは一部をプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の骨髄等の組織または細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいは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や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)を行うことにより、本発明のDNAを取得することができる。決定されたDNAの塩基配列に基づいて、ホスフォ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。

【0044】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、または該DNAがコードするアミノ酸配列とヒトIL-1、ヒトIL-1ra、ヒトIL-1ra、Tango-77のアミノ酸配列との相同性および二次元構造を比較することにより、該DNAがIL-1ファミリー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。また、取得した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取得した蛋白質と、Tango-77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取得した蛋白質の活性を比較することで、Tango-77は配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質が有する活性と全く同じ活性を有しているわけではないことがわかる。更に、IL-1ファミリーに属する因子の部分ペプチドが様々な活性を持つことも報告されていることより(Blood, 177, 1627, 1991; Am. J. Physiol., 259, R439, 1990; Biochem. Biophys. Res. Comm., 147, 204, 1987; Scand. J. Immunol., 30, 549, 1989; Adv. Exp. Med. Biol., 251, 153, 1989; Eur. Cytokine Net., 1, 21, 1990)、配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドである、配列番号1のアミノ酸配列を有する蛋白質も独自の活性を有することがわかる。後述の実施例より、該蛋白質はIL-1受容体との結合に関わる重要な部分であることより、該蛋白質は他のIL-1ファミリーのアンタ

ゴニストとして利用でき、また、該蛋白質のアミノ酸配列を有しないIL-1ファミリーの蛋白質に該配列を導入することによりIL-1受容体との結合を強化させることができる。他のIL-1ファミリーに該蛋白質のアミノ酸配列を導入するためには、例えば、配列番号3の塩基配列を有するDNAを他のIL-1ファミリーをコードするDNAに挿入することにより達成できる。また、配列番号1をコードする蛋白質を生体内で発現させるためには、例えば、配列番号3に記載の塩基配列を組み込んだウイルスベクターなどを用いることで達成できる。さらに、配列番号3に記載の塩基配列のアンチセンスDNAを細胞内に導入することで、該塩基配列を含む遺伝子の発現を阻害することができる。

【0045】配列番号4の塩基配列またはその断片の塩基配列に関する情報に基づき、常法または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4の塩基配列のうち、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また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もいう)を調製することができる。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、およ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)等があげられる。該オリゴヌクレオチドまた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'末端側の塩基配列に相当するアンチセンスプライマー等をあげることができる。ただし、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ジンとなる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとしては、両者の融解温度(Tm)およ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、5~60塩基、好ましくは10~50塩基数のものがあげられる。

【0046】誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたもの、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もの、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もの、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もの、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もの、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)で置換されたもの、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボ

ースで置換されたもの、あるいは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もの等があげられる(細胞工学, 16, 1463, 1997)。

#### 【0047】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。全長cDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。該DNA断片、または全長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。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。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も用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明の蛋白質をコードする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。

【0048】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、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、本発明の蛋白質をコードする遺伝子、及び転写終結配列より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2(ベーリンガー・マンハイム社製)、pBTac1(ベーリンガー・マンハイム社製)、pBTac2(ベーリンガー・マンハイム社製)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600号)、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社製)、pTrs30[*Escherichia coli* JM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]、pTrs32[*Escherichia coli* JM109/pTrs32(FERM BP-5408)より調製]、pGHA2[*Escherichia coli* IGHA2(FERM BP-400)より調製、特開昭60-221091号]、pGKA2[*Escherichia coli* IGKA2(FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091号]、pTerm2(米国特許第4,686,191号、米国特許第4,939,094号、及び米国特許第5,160,735号)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400(J. Bacteriol., 172, 2392, 1990)、pGEX(Pharmacia社製)、pETシステム(Novagen社製)、pSupex等をあげることができる。

【0049】プロモーターとしては、宿主細胞中で発現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あげることができる。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、let1プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(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。本発明の蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主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。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。

【0050】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、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefacines*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Brevibacterium flavum* ATCC14067、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium acetophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354、*Pseudomonas sp.* D-0110等をあげることができる。

【0051】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号)、またはGene, 17, 107., 1982やMolecular & General Genetics, 168, 111, 1979に記載の方法等をあげることができる。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)、YCP50(ATCC37419)等をあげることができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現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、ヘキソ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、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0052】宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリイペロミセス属、トリコスポロン属、シュウニオミセス属等に属する微生物、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces fragilis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*等をあげることができる。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; 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978) をあげることができる。

【0053】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 (フナコシ社製)、pAGE107 (特開平3-22979号; 及び Cytotechnology, 3, 133, 1990)、pAS3-3 (特開平2-227075号)、pCDM8 (Nature, 329, 840, 1987)、pcDNA1/Ampl (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 (J. Biochemistry, 101, 1307, 1987)、pAGE210等をあげることができる。プロモーターとしては、動物細胞中で発現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プロモーター等をあげることができる。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。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) 等をあげることができる。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号)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987) 等をあげることができる。

【0054】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、タンパク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およびパキユロウイルス

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、タンパク質を発現させることができる。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、pBlueBacIII (ともに Invitrogen社製) 等をあげることができる。パキユ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ア・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。

【0055】昆虫細胞としては、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)、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製) 等を用いることができる。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パキユ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号)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987) 等をあげることができる。

【0056】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あげることができる。プロモーターとしては、植物細胞中で発現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プロモーター等をあげることができる。宿主細胞としては、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等をあげることができる。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号、特開昭60-70080号、国際公開W09/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-25187号)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856号、特許第2517813号) 等をあげることができる。

【0057】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、融合タンパク質発現等を行うことができる。酵母、動物細胞、昆虫細胞また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。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。

【0058】大腸菌等の原核生物あるい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、無機塩類等を含む、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、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいは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、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、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もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、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、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。無機物としては、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。

【0059】培養は、通常振盪培養また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、無機または有機の酸、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。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。

【0060】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)また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。培養は、通常pH6～8、30～40、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で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。

【0061】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社製)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium(Grace, T.C.C., Nature, 195, 788, 1962)等を用いることができる。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。

【0062】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、または植物の細胞や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、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。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。

【0063】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体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるい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。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、あるいは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、該方法を選択することができる。

【0064】本発明の蛋白質が宿主細胞内あるい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; 及び Genes Develop., 4, 1288, 1990)、または特開平5-336963号、特開平6-823021号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。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手前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。さらに、遺伝子導入した動物また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)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、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。

【0065】形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体また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。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、及びBio/Technology, 9, 830, 1991) に準じて遺伝子を導入して 10 造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。動物個体の場合は、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63-30919 2)、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現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 20 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。

【0066】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; 及びTrends in Biotechnology, 15, 45, 1997) に準じて栽培し、 30 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あげられる。本発明の形質転換体により製造された蛋白質は、例えば本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、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碎し、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 40 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 (三菱化成社製) 等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社製) 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あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0067】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碎し、遠心分離を行うことにより、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。該可溶化液を希釈また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。本発明の蛋白質あるい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、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加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または配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

【0068】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 Technology 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。

【0069】3. 本発明の蛋白質を認識する抗体の調製  
本発明の蛋白質または該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品、あるい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、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明の蛋白質を認識する抗体を作製することができる。

#### (1) ポリクローナル抗体の作製

本発明の蛋白質または該蛋白質の部分断片ポリペプチドの精製標品、あるい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、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週令のラット、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。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。

【0070】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); 及び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。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)、または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またはG-カラムあるいは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

または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0071】(2)モノクローナル抗体の作製

(a)抗体産性細胞の調製

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。

【0072】(b)骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまた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)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す)(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(1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール(5×10<sup>-5</sup>mol/l)、ジェンタマイシン(10μg/ml)および牛胎児血清(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(15μg/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2×10<sup>7</sup>個以上用いる。

【0073】(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)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地または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:骨髓腫細胞=5～10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈澱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<sup>8</sup>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およ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になるように調整する。該混合液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、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<sup>-4</sup>mol/l)、チミジン(1.5×10<sup>-5</sup>mol/l)およびアミノプテリン(4×10<sup>-7</sup>mol/l)を加えた培地]100ml中に懸濁する。

【0074】該懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/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。酵素免疫測定法の具体的な例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に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もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を一次抗体として反応させ、さらに二次抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、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。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産生するハイブリドーマ株として選択する。

【0075】(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週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明の蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5～20×10<sup>6</sup>細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。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また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、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0076】4. 本発明のDNA、蛋白質または抗体の利用

(1) 本発明のDNAまた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、またはポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法により遺伝子の発現を検出する方法

本発明のDNAまた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・クロニング第2版)、PCR法およびRT(reverse-transcribed)-PCR法[ともにPCR Protocols, Academic Press (1990)](以上、併せてPCR法ともいう)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、また微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患等、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。

【0077】(2) 本発明のDNAまた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または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DNAまたは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、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性

化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患等、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。

【0078】(3) 本発明のDNAまた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また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; 及び細胞工学, 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または翻訳を抑制することができる。

【0079】例えば、本発明のDNAまた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また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、また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。

【0080】該抑制方法は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患等、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または予防に利用することができる。

【0081】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。

【0082】(4) 本発明のDNAまた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また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。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あげられる。例えば、ヒトの骨髄で、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あげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング方法に

【0083】(5)本発明の蛋白質を含有する医薬本発明の蛋白質は、たとえば配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質はIL-1raと高い相同性を示すが、IL-1は炎症反応のメディエーターとして種々の作用を発現し、慢性関節リウマチや糖尿病、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎などをはじめとして、感染や炎症を伴う多くの疾患と關連することが報告されていることから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患の治療薬または予防薬になり得る。

【0084】IL-1を平滑筋に構成的に発現させた場合、平滑筋の増殖を促進すること、血管平滑筋にIL-1を作用させるとE-セレクトインをはじめとする接着分子類の発現が増加し、白血球の接着を促進させることが報告されていることから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質は動脈硬化の治療薬または予防薬になり得る。

【0085】IL-1は、線維芽細胞を刺激し、コラゲナーゼ等の蛋白質分解酵素や、プロスタグランジン類をリウマチ性関節炎局所にて放出させていること、リウマチ性関節炎患者の滑膜組織はIL-1を産生しており、その産生量は関節炎の程度と關連することが報告されていることから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質はリウマチ性関節炎の治療薬または予防薬になり得る。

【0086】IL-1は、膵臓のランゲルハンス島に対して傷害性の作用を有すること、ランゲルハンス島に浸潤したマクロファージが放出するIL-1が細胞に傷害を与え、特にインスリン依存性糖尿病(IDDM)の発症に強く關与することが報告されていることから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質は糖尿病の治療薬または予防薬になり得る。

【0087】IL-1は、破骨細胞の活性化と骨吸収を促進することが報告されていることから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質は骨粗鬆症の治療薬または予防薬になり得る。IL

-1は胃癌細胞株に対して増殖促進活性を示すことから、配列番号2または配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質は異常な細胞増殖に基づく疾患、例えば悪性腫瘍に対する治療薬または予防薬になり得る。

【0088】(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特異的に結合する物質を同定する方法等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VEGF蛋白質を用い、VEGF受容体を同定した発現クローニング法が挙げられる(Science, 255, 989, 1992)。該受容体は本発明の蛋白質が關与する疾患の治療薬、または本発明の蛋白質が關与する情報伝達系や生体機能に關する研究に利用することができる。

【0089】(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關与する物質、また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。

【0090】(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、本発明の蛋白質また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。該検出方法は、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患等、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。免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA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あげられる。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ELISA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

セイ法等があげられる。

【0091】(9)本発明の抗体を含有する医薬本発明の蛋白質は、たとえば配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質はIL-1raと高い相同性を示すが、IL-1はメラノーマ細胞株A375をはじめとする数種類の癌細胞に対して細胞傷害性を有すること、ヒト骨髄球系細胞株K562、乳癌細胞MCF-7、あるいはマウスT細胞株Ebなどある種の腫瘍細胞の増殖を阻害することが報告されていることから、配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質に対する抗体は異常な細胞増殖に基づく疾患、例えば、悪性腫瘍に対する治療薬または予防薬になり得る。

【0092】また、IL-1は神経細胞に作用して神経成長因子(NGF)の発現を増加させる作用があること、繊維芽細胞に作用しNGFの発現を増強させるとともにNGFのmRNAの安定性を増加させることが報告されていること、視床下部においてcAMPを上昇をさせ、PGE2産生を引き起こしたり、視床下部ホルモンや脳下垂体ホルモンの分泌を促進することが報告されていることから、配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質に対する抗体は神経細胞の障害に基づく疾患、例えば、神経切断、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患に対する治療薬または予防薬になり得る。

【0093】さらに、IL-1を抗ガン剤等の前に投与すると骨髄機能抑制による致死作用が軽減されることが報告されていることから、配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質に対する抗体は放射線療法や化学療法における癌の治療薬または予防薬になり得る。

【0094】本発明の蛋白質、DNAまたは抗体を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において周知の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。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0095】投与経路は、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、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、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、テープ剤等があげられる。経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル

剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およ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。

【0096】非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるい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、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用い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が可能である。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もできる。投与量または投与回数は、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10μg/kg~8mg/kgである。

【0097】(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、好ましくは非ヒト哺乳動物、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; 及びCell, 51, 3, 503, 1987等)により不活化また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を用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法また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の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一部または完全に抑制

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。

【0098】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、欠失及び/または挿入等させて変異を導入することにより、その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イルスを用いて、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。

【0099】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る、または任意の挿入、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、任意の程度または任意の部位で、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、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0100】

#### 【実施例】実施例1：IL-1ファミリーに属する新規増殖因子の同定

Clontech社より購入したヒトcDNAライブラリー(Human Bone Marrow 5'-STRETCH PLUS cDNA)の各クローンの塩基配列について、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; PE Biosystems社製)を用い、添付されているマニュアルにしたがってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー(ABI PRISM377; PE Biosystems社製)を用いて塩基配列を決定した。決定した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SWISSPROTあるいは塩基配列データベースGenBankに登録されているIL-1ファミリーに属する既知蛋白質として、ヒトIL-1(SWISSPROTアクセッションナンバ

ー:P14778)、ヒトIL-1(SWISSPROTアクセッションナンバー:P01584)、ヒトIL-1ra(SWISSPROTアクセッションナンバー:P18510)の3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翻訳した。配列番号2に翻訳した蛋白質のアミノ酸配列を配列番号4にその塩基配列を示す。

【0101】配列番号2のアミノ酸配列を有する蛋白質は、BLAST2を用いた相同性解析において、IL-1ファミリーに属する蛋白質ヒトIL-1、ヒトIL-1raと、それぞれP値0.009で28%、P値 $1 \times 10^{-8}$ で29%という有意な相同性を示した。また、同じIL-1ファミリーに属するTango-77(国際公開W099/06426)との塩基配列の比較から、配列番号4の塩基配列は、Tango-77の塩基配列に配列番号3で示す120塩基の新たな塩基配列が付加された配列を有していることがわかった。また、ヒトIL-1、ヒトIL-1、Tango-77がコードされているヒトゲノムBACクローンの塩基配列との比較から、配列番号3の塩基配列部分を含むゲノムDNA塩基配列を見出した。配列番号3の塩基配列部分を含むゲノムDNAの塩基配列を配列番号5に示す。配列番号3の塩基配列は、スプライシングのアクセプター配列であるAGとスプライシングのドナー配列であるGTに囲まれており、配列番号4の塩基配列からなる遺伝子のエクソンを形成していることがわかった。従って、配列番号4の塩基配列がコードしている蛋白質は、本発明により初めて取得された新規なIL-1アンタゴニストのスパイス形態であることが分かった。配列番号4の塩基配列がコードするcDNAを含有するプラスミドを含む大腸菌Escherichia coli DH5aは、FERMBP-6943として、平成11年11月22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。

#### 【0102】実施例2：配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質が骨髄において主たる発現物であることの確認

Clontech社より購入したヒトcDNAライブラリーMarathon-Ready<sup>TM</sup>cDNA(Human Bone Marrow:カタログ番号7416-1)を鋳型として用い、添付されているAP1プライマー、およびTango-77と配列番号4の塩基配列と共通の塩基配列を含む27マーのプライマー1(5'-CAAATTAGCGAGGAAGCGTTCATGG-3':配列番号6)を用いて一度PCR反応を行い、さらにその反応産物を鋳型として、AP2プライマーおよびTango-77と配列番号4の塩基配列と共通の塩基配列を含みかつプライマー1よりAP1プライマー寄りの塩基配列を含む24マーのプライマー2(5'-CTCCTTCTCAGCTGAAGGGATGG-3':配列番号7)を用いてPCR反応を行った。ヒト骨髄cDNAライブラリーMarathon-Ready<sup>TM</sup>cDNAを材料にAP1プライマーとプライ

マー1およびAmpliQ Gold™ (PE Applied Biosystems社製)を用いて常法により反応液を調製後、94 で9分間反応させ、次いで94 で30秒間、68 で2分間の反応を38回反復した。この反応液を滅菌水で50倍希釈し、希釈したDNA溶液を材料にAP2プライマーとプライマー2およびAmpliQ Gold™ (PE Applied Biosystems社製)を用いて反応液を調製し、さらに94 で9分間反応させ、次いで94 で30秒間、68 で2分間の反応を30回反復し、最後に72 で10分間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、増幅されたDNA断片を回収しその塩基配列を決定した。アガロース電気泳動では、約800bpの大きさのバンドと約400bpの大きさのバンドの2本が観察された。それぞれのバンドのDNAを回収し塩基配列を決定したところ両バンドのDNA配列は配列番号4の塩基配列に完全に一致した。約400bpの大きさのバンドのDNA配列は約800bpの大きさのバンドの部分配列であった。したがって、ヒト骨髄においては、配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質が、Tango-77と比較して主たる発現物であることがわかった。

#### 【0103】実施例3：配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列の解析

配列番号2に示した、配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列をもとに、チョーフアスマン、ロブソン、DSC (<http://www.bmm.icnet.uk/software.html>、<http://www.gh.wits.ac.za/crystal/w3v1c/misc.anc003.html>)などの方法を用いて蛋白質の二次元構造を解析し、その結果を同じIL-1ファミリーに属するヒトIL-1、ヒトIL-1、ヒトIL-1ra、ヒトIL-1ra (特開平10-304888号)、Tango-77と比較して図1に示した。図1では、配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質を便宜上IL-1raと記した(以下、本発明の配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質を「IL-1ra」と称する)。また、シート構造をとるアミノ酸配列を枠で囲いシート構造中の疎水性アミノ酸を白抜きで示した。配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質は、ヒトIL-1、ヒトIL-1、ヒトIL-1ra、ヒトIL-1raで共通して見られる12本のシート構造を保持していることが分かった。一方、Tango-77は配列番号3の塩基配列を含まないため、3つのシート構造を欠いている。この部分はIL-1受容体との結合に関わる重要な部分であることが、IL-1とIL-1受容体の部位特異的変異体を用いた解析やX線結晶解析の結果から明らかにされている(E. L-Tompkinsら; Protein Engineering, 6, 535, 1993, <http://www.rcsb.org/pdb/>)。したがって、Tango-77の生物活性は、配列番号4の塩基配列がコードする蛋白質と比較して部分的であることが分かった。

#### 【0104】実施例4：RT-PCR法を用いたヒトIL-1ra遺伝子の組織発現分布解析

Clontech社より購入したヒト臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、骨髄、脾臓、胸腺、リンパ節、乳腺、子宮、前立腺、精巣)由来 polyA<sup>+</sup> RNA 4μgからAGPC法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学、9、1937 (1991)]にて調製した全RNA 4μgを鋳型とし、市販のSUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (GIBCOBRL社)を用い、添付マニュアルに従ってcDNAを合成した。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、ヒトIL-1ra、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およびAmpliQ Gold™ (PE Applied Biosystems社製)を用いて常法により反応液を調製後、94 で9分間反応させ、次いで94 で30秒間、62.5 で1分間、72 で1分間のサイクルを36サイクル反復し、最後に72 で10分間反応させる条件でPCRを行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、用いたプライマーに特異的なDNAバンドの濃さを比較することで、発現量の半定量的な比較を行った。結果を図2に示した。IL-1raは、骨髄に最も強い発現が検出され、次いで乳腺、リンパ節、脾臓に弱い発現が認められた。

【0105】尚、プライマーは、実施例2で用いた配列番号7および配列番号8で表される塩基配列を有するDNAをヒトIL-1raに特異的なプライマーセットとして(Tango-77は増幅されない)、配列番号9および配列番号10で表される塩基配列を有するDNAをヒトアクチンに特異的なプライマーセットとしてPCRを行った。これらプライマーを用いた上述のRT-PCR反応では、プライマー特異的なDNAのバンドが観察され、その大きさはヒトIL-1ra、およびヒトアクチンでそれぞれ、約200 bp、800 bpであった。

#### 【0106】実施例5：RT-PCR法を用いたヒトIL-1ra遺伝子のリンパ球系細胞での発現解析

以下に示すヒトリンパ球系細胞株および活性化ヒト末梢T細胞を材料に、実施例4と同様の方法でRT-PCRによる発現解析を行った。ヒトリンパ球系細胞株としては、T細胞株 [Jurkat細胞 (Riken Cell Bank; RCB 0806)、Molt-3細胞 (ATCC CRL 1552)、Molt-4 (ATCC CRL 1582)、HuT78 (ATCC TIB-161)]、B細胞株 [Namalwa KJM-1 (J. Biol. Chem., 268, 22782, 1993)、Daudi (ATCC CCL-213)、Raji (ATCC CCL 86)]、顆粒球/単球系細胞株 [HL-60 (ATCC CCL 240)、U-937 (ATCC CCL 1593)]を用いた。末梢T細胞は、健康な成人の末梢血よりPolymorphprep™ (Nycomed Pharma社製)を用いて多形核白血球と単核球を分離取得し、次いで、取得した単核球からNylon Fiber (和光純薬社製)を用いてT細胞を取得した。方法はNylon Fiberの説明書に従った。さらに、J. Immunol., 150, 1122 (1993)に記載の方法に従って、取得したT細胞を1×10<sup>6</sup> cells/mlになるように10% FCSを含むRPMI1640培地に加え、50ng/mlのインターロイキン2 (IL-2)、1μg/ml

の phytohemagglutinin-P (PHA-P)、および 5 ng/ml のトランスフォーミング・グロース・ファクター (TGF- $\beta$ ) を添加して、2日間、4日間、6日間、または8日間培養後回収することで活性化T細胞を取得した。ヒトリンパ球系細胞株についての結果を図3に、活性化末梢T細胞についての結果を図4に示す。リンパ球系細胞株ではB細胞株 (Namalwa KJM-1、Daudi、Raji) でのみ発現が検出された。一方、末梢T細胞では、無処理ではほとんど発現が見られないのに対し、IL-2、PHA-P、TGF $\beta$  を添加すると活性化に伴い発現が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、IL-1ra がリンパ球系の細胞で機能を持つ因子であり、炎症・免疫反応に関与していることを示唆している。

#### 【0107】実施例6：昆虫細胞を宿主としたヒトIL-1ra の発現

昆虫細胞による組み換え蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスの作製が必要であるが、その作製には、目的の蛋白質をコードするcDNAを持つ特殊なベクターを作製する過程、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、相同組み換えにより組み換えウイルスを作製し、さらに増殖させる過程、及び、組み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を経る。以下に詳細に説明する。

#### 【0108】(1) トランスファーベクターの作製

まず、IL-1ra の全翻訳領域の核酸配列を得るため、実施例2に記載のヒト骨髄cDNAライブラリーMarathon-Ready™ cDNAを鋳型とし実施例2で用いた配列番号6で表される塩基配列を有するプライマー、配列番号11で表される塩基配列を有するプライマーおよびKOD DNA Polymerase (TOYOBO社製)を用いて常法により反応液を調製後、94で30秒間、65で30秒間、72で1分間のサイクルを36サイクル反復し、最後に72で10分間反応させる条件でPCRを行った。次いで得られた約800 bpの増幅産物をpBluescriptII SK- (Stratagene社製)のSmaI部位に、IL-1ra の5'上流側がpBluescriptII SK-のKpnI部位側に、IL-1ra の3'下流側がpBluescriptII SK-のSacI部位側になるように挿入することによりpSK-IL-1ra を作製した。次にpSK-IL-1ra のPstI-XbaI断片 (840 kb) 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PstI-XbaI部位に挿入し、pVL-IL-1ra を作製した。

#### 【0109】(2) 組み換えウイルスの作製

ESF921メディウム (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テン法にて導入すること (蛋白質核酸酵素、37、2701、1992)によって、組み換えバキュロウイルスを作製した。以下に詳細

に説明する。pVL-IL-1ra 4 $\mu$ gと線状バキュロウイルスDNA 15 ngを12 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解し、さらに、リポフェクテン6 $\mu$ lと滅菌蒸留水6 $\mu$ l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2 mlのESF921培地に懸濁し、直径50 mm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、及びリポフェクテン混和溶液全量を加え、27で3日間培養後、組み換えウイルスを含む培養上清1 mlを採取した。シャーレには新たにESF921培地1 mlを添加し、さらに27で3日間培養し組み換えウイルスを含む培養上清をさらに1.5 ml取得した。

【0110】次に、IL-1ra 遺伝子を運ぶ組み換えウイルスを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50 mlのESF921培地中で、125 mlの三角フラスコを用い、27にて125 rpm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、組み換えウイルスをMOI = 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 $\times$ gで10分間遠心分離して細胞を除去し、蛋白発現に使用する組み換えウイルス溶液を得た。尚、組み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4 mlのESF921培地に懸濁し、直径50 mm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400 $\mu$ lとESF921培地で希釈した上記組み換えウイルス溶液100 $\mu$ lを加え、室温で1時間放置した後、培地を除き、5 ml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、1 mlの5%アガーブランクブラス・アガロース水溶液と4 ml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)を該シャーレに流し込んだ。室温で15分間放置した後、乾燥を防ぐためにビ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1 ml加え、さらに1日培養した後、出現したブランク数を数えた。その結果、0.5~2 $\times 10^8$ /mlの組み換えウイルス溶液を調製することができた。

#### 【0111】(3) 蛋白質の発現

Sf9細胞を5 $\times 10^5$ /mlとなるように100 mlのESF921培地中で、250 mlの三角フラスコを用い、27にて125 rpmで振とう培養した。細胞が3~4 $\times 10^6$ /mlにまで増殖した時点で、3 $\times 10^7$ 個になるように、25 mlのESF921培地をあらかじめ添加してある底面積182 cm<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、IL-1ra 遺伝子を運ぶ組み換えウイルスをMOI = 5になるように添加し、さらにESF921培地を添加して10 mlとし、室温で1時間感染させた。ESF921培地を20 ml添加し、27で3日間培養し、目的の組み換え蛋白質

を発現させた。IL-1ra 遺伝子を運ぶ組み換えウイルスを感染させた細胞の培養上清を試料として、15%SDS-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。その結果、図5に示すように、IL-1ra 遺伝子を感染させた細胞の培養上清中には非感染細胞には見られない分子量約25 kDaのバンドが検出された。

【0112】(4) 昆虫細胞発現ヒトIL-1ra 蛋白質標品の調製

主に培地やSf9細胞由来の低分子性の共雑物を分離するため、以下のように昆虫細胞発現ヒトIL-1ra 蛋白質の部分精製を行った。IL-1ra 遺伝子を運ぶ組み換えウイルスを感染させたSf9細胞の培養上清20 mlをセントリコン-10 (アミコン製) を用いて500  $\mu$ lにまで濃縮した。次にこの濃縮液を、Phosphate-buffered saline (PBS) で平衡化したSephacryl S-300 (アマシャムファルマシアバイオテック社製) カラム20 mlに通塔し、PBSを溶媒としてゲルろ過カラムクロマトグラフィーを0.07 ml/min、1 ml/fractionの条件で行った。各溶出画分について15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことによつてIL-1ra が含まれる画分を確認し、昆虫細胞発現ヒトIL-1ra 蛋白質標品とした。

【0113】実施例7: 抗IL-1ra 抗体作製用の抗原の調製

IL-1ra 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なかから、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1および化合物2 (配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、および配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するポリ

ペプチド) を選択した。  
(略号について) 本発明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 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry), 138 巻, 9 頁 (1984 年)] に従った。

【0114】以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L-アラニン  
Asn: L-アスパラギン  
Asp: L-アスパラギン酸  
Asx: L-アスパラギン酸または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-グルタミン酸または L-グルタミン  
Gly: グリシン  
His: L-ヒスチジン

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  
Met: L-メチオニン

【0115】以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

10 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  
Boc: t-ブチルオキシカルボニル  
Fmoc-Asn(Trt)-OH: N<sup>i</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>i</sup>-トリチル-L-アスパラギン  
Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N<sup>i</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<sup>i</sup>-t-ブチルエステル  
Fmoc-Cys(Trt)-OH: N<sup>i</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  
20 Fmoc-Gln(Trt)-OH: N<sup>i</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>i</sup>-トリチル-L-グルタミン  
Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N<sup>i</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<sup>i</sup>-t-ブチルエステル  
Fmoc-His(Trt)-OH: N<sup>i</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>i</sup>-トリチル-L-システイン  
Fmoc-Lys(Boc)-OH: N<sup>i</sup>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>i</sup>-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン  
Fmoc-Ser(tBu)-OH: N<sup>i</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

30 【0116】以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート  
HOBT: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール  
NMM: N-メチルモルホリン  
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  
TFA: トリフルオロ酢酸

40 【0117】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FAB-MS法により、もしくはブルカー社質量分析装置REFLEXを用いMALDI-TOFMS法により行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen, S. A.) の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 222, 19, 1994] により行った。加水分解は塩酸蒸気中110<sup>o</sup>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) を用い分析した。

50 【0118】(1) 化合物1 (配列番号12) (H-Cys-

Pro-Lys-Val-Lys-Asn-Leu-Asn-Pro-Lys-Lys-Phe-Ser-Ile-His-Asp-Gln-Asp-His-Lys-Val-NH<sub>2</sub>) の合成

Fmoc-NH<sub>2</sub>、22 μmol が結合した担体樹脂 (Rink amide MB HA resin樹脂、ノババイオケム社製) 40mg を自動合成機 (島津製作所) の反応容器に入れ、900 μlのDMFを加えて1分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 30% ピペリジン-DMF溶液900 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 900 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-Val-OH (220 μmol)、PyBOP (220 μmol)、HOBt 1水和物 (220 μmol)およびNMM (330 μmol) を DMF (770.2 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900 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。こうして、Fmoc-Val-NH が担体上に合成された。

【0119】次に、(a) (b)の工程の後、(c)の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、(d)の洗浄工程を経て、Fmoc-Lys(Boc)-Val-NH が担体上に合成された。以下、工程(c)において、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した後、(a)(b)の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、プチルエーテルで順次洗浄し、減圧下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。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 1ml 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 10ml 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49.4mgを取得した。この粗生成物を、5mLの2M酢酸水溶液に溶解し、逆相シリカゲル充填カートリッジ (YMC Dispo SPE C18) に通塔してペプチドを吸着させ、0.1% TFA、10%アセトニトリル水溶液で洗浄後、0.1%TFA、25%アセトニトリル水溶液で溶出させ、化合物1を含む画分を得た。これを凍結乾燥して、化合物1を37.9mg得た。

質量分析 [FABMS]; m/z = 2475.0 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 4.2 (4), Ser 1.0 (1), Glx 1.1 (1), His 1.9 (2), Pro 2.1 (2), Val 1.8 (2), Ile 0.8 (1), Leu 1.0 (1), Phe 1.0 (1), Lys 5.1 (5), Cys 1.3 (1)

【0120】(2) 化合物2 (配列番号13) (H-Cys-Lys-Ala-Glu-Met-Ser-Pro-Ser-Glu-Val-Ser-Asp-OH) の合成

Fmoc-Asp(OtBu)、14.4 μmol が結合した担体樹脂 (Wang樹脂、ノババイオケム社製) 30mg を出発物質として、1-1と同様にして、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Lys(Boc)、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、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 1ml 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 10ml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14.4mgを取得した。この粗生成物を、5mLの2M酢酸水溶液に溶解し、逆相シリカゲル充填カートリッジ (YMC Dispo SPE C18) に通塔してペプチドを吸着させ、0.1% TFA、5%アセトニトリル水溶液で洗浄後、0.1%TFA、20%アセトニトリル水溶液で溶出させ、化合物2を含む画分を得た。これを凍結乾燥して、化合物2を19.8mg得た。

質量分析 [TOFMS]; m/z = 1282.5 (M+H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析; Asx 1.0 (1), Ser 2.9 (3), Glx 2.1 (2), Ala 1.0 (1), Pro 1.0 (1), Val 1.0 (1), Met 0.9 (1), Lys 1.0 (1), Cys 1.2 (1)

【0121】実施例8: IL-1ra 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7で得られた化合物1及び化合物2は、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (カルピオケム社) 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] を滴下して30分間攪拌反応させた。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-MB 2.5 mgを0.1 Mリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) 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。

【0122】(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及び化合物2のKLHコンジュゲート100 μg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] 2 mgおよび百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1 × 10<sup>9</sup>細胞とともに6-8週令雌BALB/cマウス各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。該マウスの頸動脈より採血し、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マウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。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。

【0123】(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7で得られた各化合物をサイログロブリン (以下、THYと略す) とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例8(1)に記した通りであるが、架橋剤にはMBSの代わりにSMCC [4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社] を用いた。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を10 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ l/ウェルで分注し、4度で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) / ダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: PBS) を100 ml/ウェル加え、室温で1時間放置し、残存活性基をブロックした。放置後、1% BSA/PBSを除き、該プレートに被免疫マウス抗血清、モノクローナル抗体の培養上清を50 $\mu$ l/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 (ICI社商標Tween 20相当品: 和光純薬社製) / PBS (以下Tween-PBSと表記) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGグロブリン (DAKO社製) を50 $\mu$ l/ウェル加えて室温、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、1 mmol/l ABTS/0.1 mol/l クエン酸バッファー (pH 4.2)] を添加し、415 nmにおける吸光度をプレートリーダー (Emax; Molecular Devices社) を用いて測定した。

【0124】(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。

【0125】(5) ハイブリドーマの作製

実施例8(2)で得られたマウス脾細胞と実施例8(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 $^{\circ}$ で、ポリエチレングリコール - 1000 (PEG-1000) 2 g、MEM培

地2 ml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0.5 ml加え、該懸濁液に1 ~ 2分間毎にMEM培地1 mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50 mlになるようにした。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 (ベーリンガー・マンハイム社製) を加えた培地] 100 ml中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37 $^{\circ}$ で10 ~ 14日間培養した。

【0126】培養後、培養上清を実施例8(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穴を選び、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IL-1ra モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。化合物1を抗原に用いて取得した抗ヒトIL-1ra モノクローナル抗体をKM2779、化合物2を抗原に用いて取得した抗ヒトIL-1ra モノクローナル抗体をKM2780とそれぞれ名付けた。図6に示すように、KM2779およびKM2780はそれぞれの抗原ペプチドに特異的な反応性を示した。KM2779産生ハイブリドーマ細胞株およびKM2780産生ハイブリドーマ細胞株は、それぞれFERMBP-7368およびFERMBP-7369として、平成12年11月17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。

【0127】(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) に実施例8(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 ~ 8 ml/匹) した。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 Manual, 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、KM2779がIgG<sub>1</sub>、KM2780がIgG<sub>2a</sub>とそれぞれ決定された。

【0128】実施例9: 抗ヒトIL-1ra モノクローナル抗体を用いたヒトIL-1ra 蛋白質のウェスタンブロッティングによる検出

実施例6で調製した昆虫細胞発現IL-1ra 蛋白質を10 ng/レーンで15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) にて分画した後、PVDF膜 (ミリポア社製) にブロッティングした。該膜を5% skim milk-PBSでブロッキング後、該膜に抗ヒトIL-1ra モノク

ローナル抗体KM2779およびKM2780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、二次抗体として1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン(DAKO社製)を添加し、室温で1時間放置した。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7に示すように、抗ヒトIL-1raモノクローナル抗体KM2779およびKM2780は、実施例6に記載した昆虫細胞発現IL-1raを特異的に認識した。

#### 【0129】実施例10：中和抗体としての抗ヒトIL-1raモノクローナル抗体

実施例8に記載した抗ヒトIL-1raモノクローナル抗体KM2779は、以下の事実よりヒトIL-1raのその受容体への結合を阻害する中和抗体であることが分かった。

##### (1) IL-1raとIL-18受容体のホモロジーモデル

図8は、KM2779の認識部位を、IL-1ra(配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質の部分)とIL-1受容体ファミリーの一員であるIL-18受容体(J. Biol. Chem., 271, 3967-3970, 1996)のアミノ酸配列(Genbank Accession no. HSU43672)のアミノ酸番号20~324番目について、ヒトIL-1raとIL-1受容体の複合体の結晶構造(H.A. Schreuder et al., Nature, 194, 386, 1997)をもとに公知の方法で作製した立体構造モデル上に濃色で表示したものである。IL-1raの立体構造は表面モデルで示し、IL-18受容体の立体構造はリボンモデルで示した。なお、立体構造モデルの作製には、Quanta(Molecular Simulation Inc.)、InsightII(Molecular Simulation Inc.)ソフトウェアを用いた。図8に示したようにKM2779の認識部位は、IL-18受容体と複合体形成時に三次元的にIL-18受容体に隣接する位置にあり、両者の複合体形成のための非共有結合に大きく寄与することが明らかとなった。

【0130】なお、本実施例および以下の実施例では、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、配列番号46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質を用いている場合があるが、以下の事実から、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質は、該蛋白質として発現・翻訳され、翻訳後修飾によりN末側である45番目と46番目のアミノ酸の間、およびC末側である208番目と209番目のアミノ酸の間が蛋白質分解酵素等により切断され、成熟体IL-1raになるものと推測された。すなわち、成熟体IL-1raのN末端は、他のIL-1ファミリーの分子群の切断位置とほぼ合致し、さらにキモトリプシン様蛋白質分解酵素による切断の結果生じる配列番号2の46番目のアミノ酸であるバリンと推定し、このことをIL-1raとIL-1受容体ファミリーの一員であるIL-18受容体からなる複合体の立体構造モデルで検証した結果、その安定性から、配列番号2の46番目のアミノ酸であるバリンが成熟体IL-1raのN末端である

と判断された。また、後記する実施例11の(3)において、実施例6で作製したIL-1raの発現用プラスミドで形質転換された動物細胞を用いてIL-1raを発現させた際、培養上清にはC末端側10~25アミノ酸が欠失しているIL-1ra(成熟型と考えられる)が検出された。IL-1ファミリーである蛋白質において、その内部構造に存在するシート構造は重要であり、12(図1参照)を構成する最後のアミノ酸(205番目のプロリン)以降にプロテアーゼの切断点が存在すると考えられるので、塩基性アミノ酸である209番目のリジンのカルボキシル基側でプロテアーゼにより切断される蓋然性が高い。このことは、後記実施例12の(1)の立体構造モデルからも支持された。従って成熟体IL-1raのC末端は、209番目のリジンであると判断された。以上より、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、配列番号46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質が成熟体IL-1raであると考えられ、本実施例および実施例12を行い、そのことを実証した。

##### 【0131】(2) IL-1raの各残基の表面露出面積

図9は、図8に示した立体構造モデルをもとに、IL-1ra(配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質の部分)の各アミノ酸残基の溶媒露出面積を公知の方法で計算し、プロットしたものである。作製には、Quanta(Molecular Simulation Inc.)、InsightII(Molecular Simulation Inc.)ソフトウェアを用いた。図9に示したように、KM2779の認識部位は、溶媒露出面積が大きなアミノ酸残基を複数含んでおり、抗体によって認識可能なことが明らかとなった。

##### 【0132】(3) IL-1raとIL-18受容体間の非共有結合の結合エネルギー

図10は、図8で示した立体構造モデルをもとに、KM2779の認識部位とIL-18受容体のアミノ酸残基(20~324残基の全て)の間の非共有結合による結合エネルギーを公知の方法で計算し、IL-1ra(配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質の部分)の各アミノ酸残基に対してプロットしたものである。作製には、CHARMm(Molecular Simulation Inc.)、Discover(Molecular Simulation Inc.)、AMBER(University of California San Francisco)を用いた。図10に示したように、KM2779の認識部位は、IL-18受容体に対する非共有結合の結合エネルギーが大きなアミノ酸残基を複数含んでおり、両者の複合体形成のための非共有結合に大きく寄与する割合が高いことが明らかとなった。

#### 【0133】実施例11：動物細胞を宿主とした、ヒトIL-1ra蛋白質の発現

##### (1) ベクターの作製

実施例6に記載したpSK-IL-1raのHindIII-NotI断片(870 kb)をNamalwa KJM-1細胞発現用プラスミドpAmo(J. Biol. Chem., 268, 22782, 1993)のHindIII-NotI部位に挿入し、pAmo-IL-1raを作製した。

【0134】(2)細胞へのベクターの導入  
コントロールプラスミド pAMo、および上記(1)のヒトIL-1ra 発現用プラスミド pAMo-IL-1ra を、それぞれ 1 µg/µl になるようにTEに溶解した後、エレクトロポレーション法(Cytotechnology, 3, 133, 1990)によりNamalwa KJM-1細胞に導入し、形質転換細胞を得た。1.6×10<sup>6</sup>細胞あたり4 µgのプラスミドを導入した後、8 mlのRPMI1640・ITPSG培地〔7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200 mmol/l L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000 units/ml ペニシリン、5000 µg/mlストレプトマイシン)を0.5%、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパン-3-スルフォニック・アシッド(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)(10 mmol/l)、インシュリン(3 µg/ml)、トランスフェリン(5 µg/ml)、ピルビン酸ナトリウム(5 mmol/l)、亜セレン酸ナトリウム(125 nmol/l)、ガラクトース(1mg/ml)を添加したRPMI1640培地(日水製薬社製)に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃で24時間培養した。その後、G418(ギブコ社製)を0.5 mg/mlになるように添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.3 mg/mlのG418を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。以下、pAMo、pAMo-IL-1ra を導入して作製した耐性株を、それぞれKJM-1/mock株、KJM-1/IL-1ra 株と称する。

#### 【0135】(3)発現の確認

上記(2)で作製したKJM-1/mock株、KJM-1/IL-1ra 株をそれぞれRPMI1640・ITPSG培地中でコンフルエントになるまで培養した。培養終了後、培養上清を回収する一方、細胞を動物細胞用プロテアーゼインヒビターカクテル(シグマ社製、製品番号P8340)を1/10容量含むPBSにて懸濁した後、超音波により破碎した。調製した培養上清および細胞破碎液を、実施例8で取得した抗IL-1ra 抗体(KM2779、KM2780)を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、図11に示すように、細胞破碎液に対しては、KM2779、KM2780ともに、実施例9に記載した昆虫細胞発現IL-1ra と同じ分子量(約25 kDa)のバンドを与えたことから、上記で作製したKJM-1/IL-1ra 株がIL-1ra 蛋白質を産生していることが明らかとなった。一方、培養上清に対しては、KM2779が約24 kDaのバンドを与えたのに対して、KM2780ではシグナルは検出されなかった。実施例7に記載したとおり、KM2779およびKM2780は、IL-1ra 配列中それぞれ、内部アミノ酸配列およびC末端アミノ酸配列を認識することから、図11の結果は、IL-1ra 蛋白質がNamalwa KJM-1細胞から分泌される際には、C末端配列の切断を伴うことを示している。培養上清中のIL-1ra は、細胞破碎液で検出されるバンドとの分子量の差から考えると、C末端側10~25アミノ酸程度が欠失しているものと予想された。

#### 【0136】(4)成熟型ヒトIL-1ra 蛋白質標品の調製

KJM-1/IL-1ra 株培養上清中のIL-1ra をセントリフラス-10(アミコン製)を用いて約1,000倍にまで濃縮し、IL-1ra 濃度数µg/ml程度の成熟型ヒトIL-1ra 蛋白質標品とした。

#### 【0137】実施例12:成熟型蛋白質としてのNamalwa KJM-1細胞産生IL-1ra

実施例5に記載したとおりNamalwa KJM-1細胞には元来内因性のIL-1ra の発現が認められるため(図3)、Namalwa KJM-1細胞には本来のIL-1ra 分泌機構が備わっていると考えられる。従って、実施例11(3)に記載したKJM-1/IL-1ra 株培養上清中に検出されるC末端配列の切断を受けたIL-1ra が成熟型蛋白質であり、実施例6に記載した昆虫細胞産生IL-1ra はその前駆体型であると予想される。KM2780は前駆体IL-1ra のみを認識するモノクローナル抗体である一方、KM2779は前駆体、成熟型双方のIL-1ra を認識するモノクローナル抗体であると言うことができる。Namalwa KJM-1細胞産生IL-1ra が成熟型蛋白質であることをさらに以下の2点で確認した。

#### 【0138】(1)IL-1ra とIL-18受容体のホモロジーモデル

図12は、IL-1ra がNamalwa KJM-1細胞から分泌される際に切断される、KM2780の認識部位であるC末端アミノ酸配列(配列番号13)の立体構造を公知の方法で予測し、図8の立体構造モデルに追加した立体構造モデルである。図12に示したように、切断されるKM2780の認識部位は、IL-18受容体と複合体形成時に三次元的にIL-18受容体とは離れた位置にあり、複合体形成のための非共有結合に寄与しないことが明らかとなった。

【0139】(2)IL-1ra の各残基の表面露出面積  
図13は、図12で示した立体構造モデルをもとに、切断されるKM2780の認識部位を含むIL-1ra (配列番号2の46~208番目のアミノ酸配列を有する蛋白質の部分)の各アミノ酸残基とIL-18受容体のアミノ酸残基(アミノ酸番号20~324番目)の間の非共有結合による結合エネルギーを公知の方法で計算し、IL-1ra の各アミノ酸残基に対してプロットしたものである。図13に示したように、切断されるKM2780の認識部位は、IL-18受容体に対する非共有結合の結合エネルギーが小さいことから、両者の複合体形成のための非共有結合に不要な配列であることが明らかとなった。

#### 【0140】実施例13:前駆体型ヒトIL-1ra のヒト繊維芽細胞に対する効果

ヒトIL-1ra のIL-1受容体への作用を調べるため、実施例6で取得した前駆体型ヒトIL-1ra の、ヒト繊維芽細胞のIL-1依存性プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)産生(Por.Natl.Acad.Sci.USA, 88, 3681, 1991)に与える影響を以下のように検討した。10%ウシ胎児血清、ペニシリ

ン (GIBCO BRL社製) 50 unit/ml、ストレプトマイシン (GIBCO BRL社製) 50 µg/ml、HEPES [2-[4-(2-Hydroxy ethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic Acid] (ナカラ イテスク社製) 20 mmol/lを添加したDMEM培地 (GIBCO BRL社製) (NHDF培地) にて $1 \times 10^6$ 細胞/mlに調整した正常ヒト新生児包皮皮膚繊維芽細胞 (NHDF細胞) (クラボウ社製) を、96ウェルプレートに100 µl/ウェルで分注し、37 °CでCO<sub>2</sub>インキュベーター中で一晩培養した。培地を新鮮なNHDF培地に交換した後、前駆体型ヒトIL-1ra、あるいは陽性対照としてヒトIL-1ra (R&D Systems社製) を終濃度100~200ng/mlとなるように添加し、37 °CでCO<sub>2</sub>インキュベーター中で2時間培養した。ウェルを2群に分け、一群にはヒトIL-1 (PEPROTECH EC社製) を終濃度1 ng/mlとなるように、他の一群には対照として同容量のNHDF培地を添加して、さらに37 °CでCO<sub>2</sub>インキュベーター中一日間培養したのち、培養上清中に含まれるPGE<sub>2</sub>量をenzyme immunoassay system (アマシャムファルマシアバイオテック社製) により測定した。

【0141】その結果、図14に示すとおり、前駆体型ヒトIL-1ra では、NHDF細胞のPGE<sub>2</sub>産生誘導作用、およびヒトIL-1 によるPGE<sub>2</sub>産生に対する抑制作用は検出されなかった。従って、前駆体型ヒトIL-1ra にはIL-1受容体に対するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性が存在しないか、存在しても本系では測定できないほど非常に弱い可能性が示された。

#### 【0142】実施例14：ヒトIL-1ra のヒト末梢血リンパ球に及ぼす効果

実施例6および10で取得した前駆体型および成熟型ヒトIL-1ra のヒト末梢血リンパ球に及ぼす作用を検討した。健康な成人の末梢血よりLymphoprep™ (Nycomed Pharma社製) を用いて単核球を分離取得し、10% FCSを含むRPMI1640培地を用いて $3 \times 10^6$ 細胞/mlに調整した。コンカナバリンA (Con.A、終濃度500 ng/ml)、およびIL-18 (終濃度10 ng/ml、MBL社製) 共存下、前駆体型ヒトIL-1ra (終濃度200 ng/ml)、あるいは成熟型ヒトIL-1ra (終濃度150 ng/ml) を添加して、37 °CでCO<sub>2</sub>インキュベーター中2日間培養した後、培養上清中のIL-4量をELISA法 (ファーマンジェン社製OptEIA ELISA set) により測定した。陽性対照として、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA、シグマ社製、終濃度50 ng/ml) およびionomycin (シグマ社製、終濃度1 µg/ml) を \*

#### SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> An IL-1 family protein

<130> A01515MA

<160> 13

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

#### 【0146】

\*用いた。その結果、図15に示すとおり、前駆体型ヒトIL-1ra には活性は検出されなかったのに対し、成熟型ヒトIL-1ra はCon.AおよびIL-18によるリンパ球のIL-4産生を抑制した。

#### 【0143】

【発明の効果】本発明によれば、微生物感染、HIV感染、慢性B型肝炎、慢性関節リウマチ、敗血症、移植片-対-宿主疾患、インスリン依存性糖尿病、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患等の感染や炎症を伴う疾患、動脈硬化、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、リウマチ性関節炎等の異常な繊維芽細胞や滑膜組織の活性化を伴う疾患、糖尿病等の膵臓細胞の障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の異常な破骨細胞の活性化を伴う疾患、アレルギー、アトピー、喘息、花粉症、気道過敏、自己免疫疾患等の異常な免疫細胞の活性化を伴う疾患、急性骨髄性白血病、悪性腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、虚血性脳疾患等の神経細胞の障害に基づく疾患等の診断薬、予防薬及び/または治療薬の探索、開発に有用なIL-1ファミリーに属する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、およびこれらの利用方法を提供することができる。

#### 【0144】

【配列表フリーテキスト】配列番号6 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号7 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号8 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号9 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号10 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号11 - 人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号12 - 人工配列の説明：人工的に合成したペプチドのアミノ酸配列  
配列番号13 - 人工配列の説明：人工的に合成したペプチドのアミノ酸配列

#### 【0145】

#### 【配列表】

<213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys Lys  
 Phe Ser Ile His Asp Gln  
 1 5 10 15  
 Asp His Lys Val Leu Val Leu Asp Ser Gly  
 Asn Leu Ile Ala Val Pro  
 57 20 25 30  
**【 0 1 4 7 】** Asp Lys Asn Tyr Ile Arg Pro  
 <210> 2 35  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Ser Phe Val Gly Glu Asn Ser Gly Val  
 Lys Met Gly Ser Glu Asp  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Glu Pro Gln Cys Cys Leu  
 Glu Asp Pro Ala Val Ser  
 20 25 30  
 Pro Leu Glu Pro Gly Pro Ser Leu Pro Ala  
 Met Asn Phe Val His Thr  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys  
 Lys Phe Ser Ile His Asp  
 50 55 60  
 Gln Asp His Lys Val Leu Val Leu Asp Ser  
 Gly Asn Leu Ile Ala Val  
 65 70 75 80  
  
 Pro Asp Lys Asn Tyr Ile Arg Pro Glu Ile  
 Phe Phe Ala Leu Ala Ser  
 85 90 95  
 Ser Leu Ser Ser Ala Ser Ala Glu Lys Gly  
 Ser Pro Ile Leu Leu Gly  
 100 105 110  
 Val Ser Lys Gly Glu Phe Cys Leu Tyr Cys  
 Asp Lys Asp Lys Gly Gln  
 115 120 125  
 Ser His Pro Ser Leu Gln Leu Lys Lys Glu  
 Lys Leu Met Lys Leu Ala  
 130 135 140  
**【 0 1 4 8 】** Ala Gln Lys Glu Ser Ala Arg Arg Pro Phe  
~~120~~ Phe Tyr Arg Ala Gln  
~~125~~ > 120 150 155 1  
~~130~~ > DNA  
~~135~~ His Pro Gly Trp Phe  
~~140~~ His Pro Gly Trp Phe  
 <221> CDS 165 170 175  
~~175~~ > (3) Thr (169) Cys Asn Cys Asn Glu Pro  
 Val Gly Val Thr Asp Lys  
 180 185 190  
 Phe Glu Asn Arg Lys His Ile Glu Phe Ser

&lt;400&gt; 3

gt cca aag gtg aag aac tta aac ccg aag a  
aa ttc agc att cat gac 47

Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys Ly  
s Phe Ser Ile His Asp

1 5 10 15

cag gat cac aaa gta ctg gtc ctg gac tct  
ggg aat ctc ata gca gtt 95

Gln Asp His Lys Val Leu Val Leu Asp Ser  
Gly Asn ~~Leu~~ Ile Ala Val

【 0 1 4 9 】

20 25 30

~~e210ga4~~ aaa aac tac ata cgc cca g

<211> 1104 120

R202ASPNAys Asn Tyr Ile Arg Pro

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (370)..(1023)

<400> 4

ctgatctatc acaagtacct tgaatgtgt tga  
taggtg tggcacagtc cttagcagag 60

tggcactacc cccacaggaa tttgtttata cctt

tggcat gggaaatagc aggaaatgag 120

tgatcactga taactgagga tgctatttat tatt

ggccaa aggaatactt gtgtgtatt 180

tgcataacca ctcaaaact gttgattaca aatg

agtacc agacctagct ccttcaagta 240

aaggatcctg agaactgaag gcaaacagag ctcc

aggagt ccaagacaga gccacagacc 300

acgaggatcc ctggcccagg tcttgactt catt

ccattt tctgttgagt aataaactca 360

acgttgaaa atg tcc ttt gtg ggg gag aac t

ca gga gtg aaa atg ggc tct 411

Met Ser Phe Val Gly Glu Asn Ser Gl  
y Val Lys Met Gly Ser

1 5 10

gag gac tgg gaa aaa gat gaa ccc cag tgc

tgc tta gaa gac ccg gct 459

Glu Asp Trp Glu Lys Asp Glu Pro Gln Cys

Cys Leu Glu Asp Pro Ala

15 20 25 30

gta agc ccc ctg gaa cca ggc cca agc ctc

ccc gcc atg aat ttt gtt 507

Val Ser Pro Leu Glu Pro Gly Pro Ser Leu

Pro Ala Met Asn Phe Val

35 40 45

cac aca agt cca aag gtg aag aac tta aac

ccg aag aaa ttc agc att 555

His Thr Ser Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn

Pro Lys Lys Phe Ser Ile

50 55 60

cat gac cag gat cac aaa gta ctg gtc ctg

Gly Gln Ser His Pro Ser Leu Gln Leu Lys  
 Lys Glu Lys Leu Met Lys  
 130 135 140  
 ctg gct gcc caa aag gaa tca gca cgc cgg  
 ccc ttc atc ttt tat agg 843  
 Leu Ala Ala Gln Lys Glu Ser Ala Arg Arg  
 Pro Phe Ile Phe Tyr Arg  
 145 150 155  
 gct cag gtg ggc tcc tgg aac atg ctg gag  
 tcg gcg gct cac ccc gga 891  
 Ala Gln Val Gly Ser Trp Asn Met Leu Glu  
 Ser Ala Ala His Pro Gly  
 160 165 170  
 tgg ttc atc tgc acc tcc tgc aat tgt aat  
 gag cct gtt ggg gtg aca 939  
 Trp Phe Ile Cys Thr Ser Cys Asn Cys Asn  
 Glu Pro Val Gly Val Thr  
 175 180 185 1  
 90 59

【 0 1 5 0 】

gat aaa ttt gag aac agg aaa cac att gaa  
 ttt caa cca gtt 987  
 Asp Lys Phe Glu Asn Arg Lys His Ile Glu  
 Phe Ser Thr Gln Pro Val  
 <213> Homo sapiens 200 205  
 gct gaa atg agc ccc agt gag gtc  
 agc ggc ttt aggg gaaa aggc gaaga gta aacc  
 GyaahysaAtacagualMetcaEgaEragS60 Glu Val  
 GatCAspaag tactggtcct ggactctggg aatc  
 tcatag cagtttga taaaactac 120215  
 aatgacccg gtgactcga aattgaaact aatt  
 gataa2aaaccccaa40ctgctcact 1096  
 aaaaabNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: an artificially synthesiz  
 ed primer sequence

【 0 1 5 1 】

<400> 6  
 aatgagc aggaaggcgt tcaatgg 27  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: an artificially synthesiz  
 ed primer sequence

【 0 1 5 2 】

<400> 7  
 tttc agctgaagg atgg 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence: an artificially synthesiz  
 ed primer sequence

【 0 1 5 3 】

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic DNA  
 <400> 8 60  
**【 0 1 5 4 】** gtcctggact ctgggaatct catagca  
 <210> 9 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic DNA  
 <400> 9  
**【 0 1 5 5 】** gatatcgccg cgctcgtcgt cgac  
 <210> 10 24  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic DNA  
 <400> 10  
**【 0 1 5 6 】** caggaaggaa ggctggaaga gtgc  
 <210> 11 24  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic DNA  
 <400> 11  
**【 0 1 5 7 】** cctgagaact gaaggcaaac agagctc  
 <210> 12 27  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic PRT  
 <220>  
 <221> AMIDATION  
 <222> 21  
 <223> Xaa represents L-Valine a  
 mide  
 <400> 12  
 Cys Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys  
 Lys Phe Ser Ile His Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Asp His Lys Xaa

【0158】

<210> 13  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial  
 Sequence:synthetic PRT  
 <400> 13  
 Cys Lys Ala Glu Met Ser Pro Ser Glu Val

62

【図面の簡単な説明】Ser Asp

【図1】図1は、配列番号4の塩基配列がコードするアミノ酸配列(IL-1Ra)とヒトIL-1、ヒトIL-1、ヒトIL-1ra、ヒトIL-1ra、及びTango-77のアミノ酸配列との比較を示す図である。

【図2】図2は、ヒト由来の各組織におけるIL-1raおよび-アクチンの発現をRT-PCR法によって解析した結果を示す。

【図3】図3は、リンパ球系細胞株におけるIL-1raおよび-アクチンの発現をRT-PCR法によって解析した結果を示す。

【図4】図4は、ヒト末梢血T細胞の活性化に伴うIL-1raおよび-アクチンの発現変動をRT-PCR法によって解析した結果を示す。活性化T細胞は、50 ng/mlのインターロイキン2(IL-2)、1μg/mlのphytohemagglutinin-P(PHA-P)、および5ng/mlのトランスフォーミング・グロース・ファクター(TGF-)を添加して、2日間、4日間、6日間、または8日間培養することを得た。

【図5】図5は、昆虫細胞を宿主として発現させたIL-1ra蛋白質の電気泳動像を示す。IL-1ra遺伝子を運び組み換えウイルスを感染させたSf9細胞の培養上清2.5μg(16μl相当)を試料として還元条件下SDS-PAGEを行い、クマシーブリリアントブルーR250で染色して検出した。

【図6】図6は、抗ヒトIL-1raモノクローナル抗体KM2676、KM2780の反応特異性を解析した結果を示す。バインディングELISA法により免疫に用いたペプチドおよびコントロールペプチドに対する反応特異性を調べた。白抜きは陰性対象ペプチド、黒色はKM2779を作製する際に用いた抗原ペプチド、斜線はKM2780を作製する際に用いた抗原ペプチドとしたときのアッセイ結果を示す。

【図7】図7は、KM2679、KM2780によるウエスタンブロッティングの検出結果を示す。IL-1ra遺伝子を運び組み換えウイルスを感染させたSf9細胞破砕液をSDS-PAGEに処し、抗ヒトIL-1raモノクローナル抗体KM2679、またはKM2780を用いウエスタンブロッティングを行った。

【図8】図8は、IL-1raとIL-18受容体の複合体の立体構造モデル図を示す。IL-1raを表面モデルで示し、IL-18Rをリボン構造で示した。また、KM2779の認識部位

を濃色で示した。

【図9】図9は、IL-1raの各アミノ酸残基の溶媒露出面積の値をプロットした分布図を示す。KM2779の認識部位を矢印で示した。

【図10】図10は、IL-1raとIL-18受容体の複合体におけるIL-1raの各アミノ酸残基とIL-18受容体の間の非共有結合の結合エネルギーの値をプロットした分布図を示す。KM2779の認識部位を矢印で示した。

【図11】図11は、ヒトIL-1ra遺伝子を導入したヒトB細胞リンパ腫由来Namalwa KJM-1細胞(図中、IL-1raと示す)、およびpAmoを導入したヒトB細胞リンパ腫由来Namalwa KJM-1細胞(図中、mockと示す)を培養して得られる培養液の細胞破砕液(図中、細胞と示す)10μg、および培養上清(図中、上清と示す)1.8ml相当を、抗ヒトIL-1ra抗体KM2779、KM2780を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す図である。

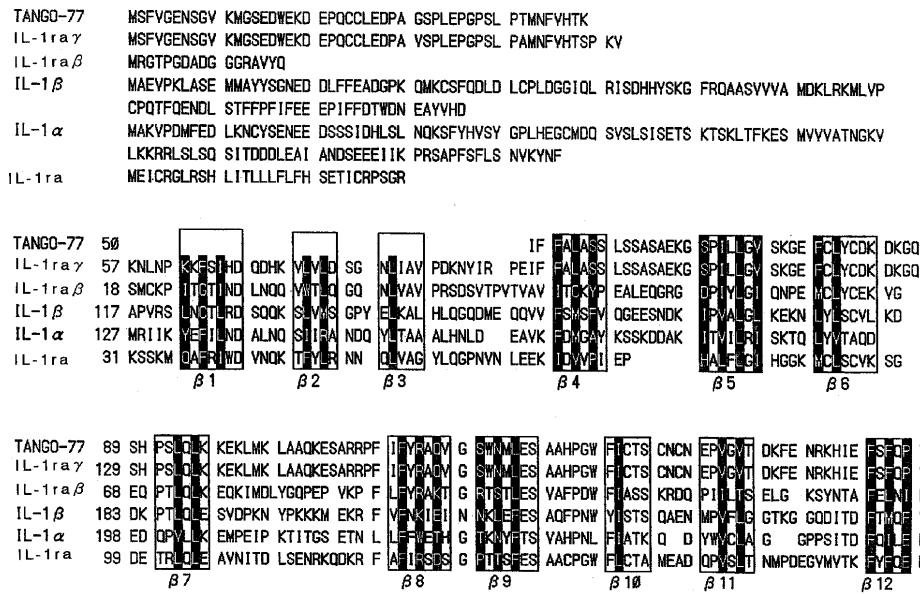
【図12】図12は、IL-1raとIL-18受容体の複合体の立体構造モデル図を示す。IL-1raを表面モデルで示し、IL-18Rをリボンで示した。また、成熟に伴い切断されるKM2780の認識部位を濃色で示した。

【図13】図13は、IL-1raの各アミノ酸残基の溶媒露出面積の値をプロットした分布図を示す。成熟に伴い切断されるKM2780の認識部位を矢印で示した。

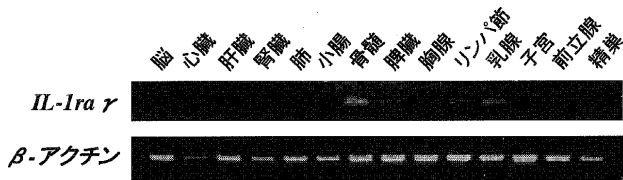
【図14】図14は、ヒト包皮繊維芽細胞(NHDF細胞)のIL-1依存性PGE<sub>2</sub>(プロスタグランジンE<sub>2</sub>)産生に対する昆虫細胞産生前駆体型IL-1ra蛋白質の効果を検討した結果を示す。アゴニスト活性のIL-1は、IL-1を1ng/mlで添加した試験区、アゴニスト活性のIL-1raは、IL-1raを1μg/mlの濃度で添加した試験区を表す。また、アンタゴニスト活性は、ヒトIL-1を終濃度1ng/mlになるように添加し、測定した。

【図15】図15は、ヒト末梢血リンパ球のIL-4産生に対するヒトIL-1ra蛋白質の効果を検討した結果を示す。PMAはphorbol 12-myristate 13-acetate、ConAはコンカナバリンA、IL-18はインターロイキン18を表す。またPMA+ionomycinは、PMAを50ng/ml、およびionomycinを1μg/mlの濃度になるように添加した試験区を、IL-18+ConAは、IL-18を10ng/ml、およびConAを500ng/mlの濃度になるように添加した試験区を表す。

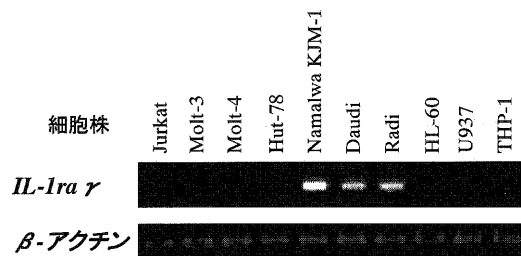
【図1】



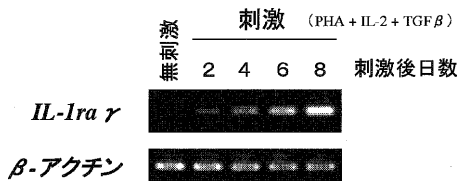
【図2】



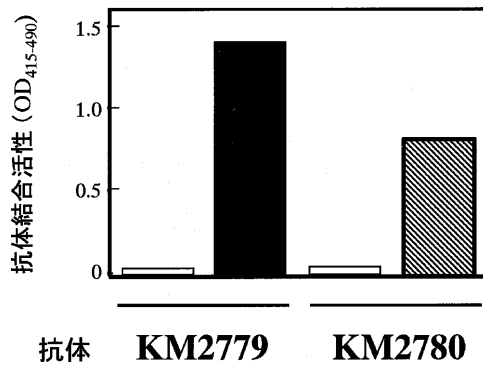
【図3】



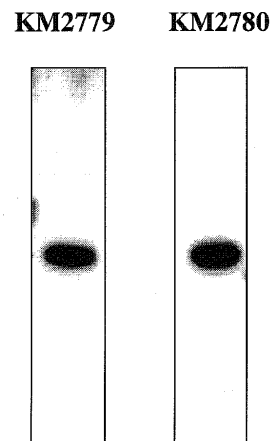
【図4】



【図6】



【図7】

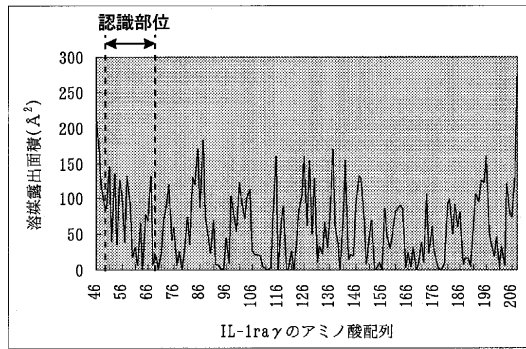


【図5】

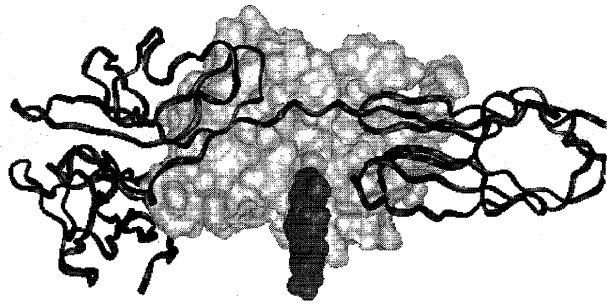


25 kDa

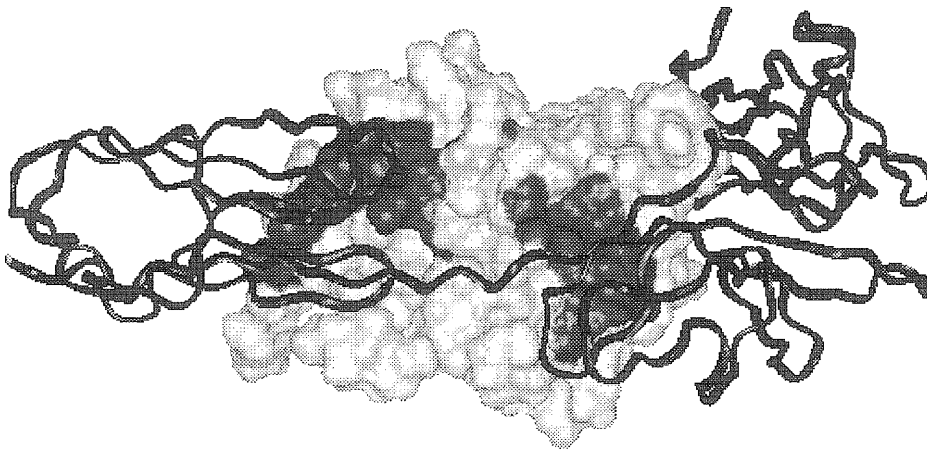
【図9】



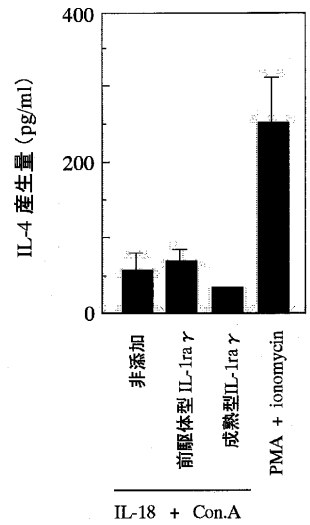
【図12】



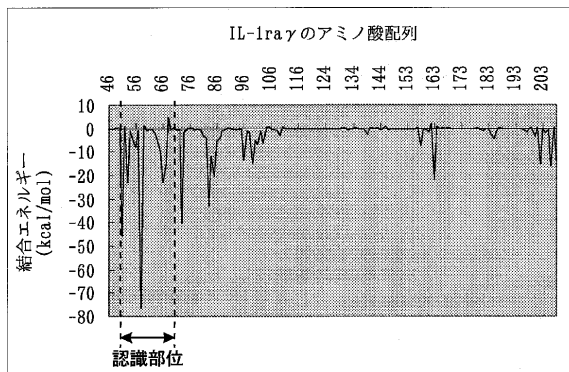
【図8】



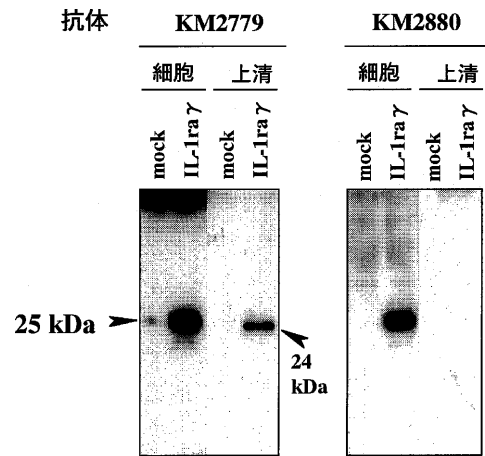
【図15】



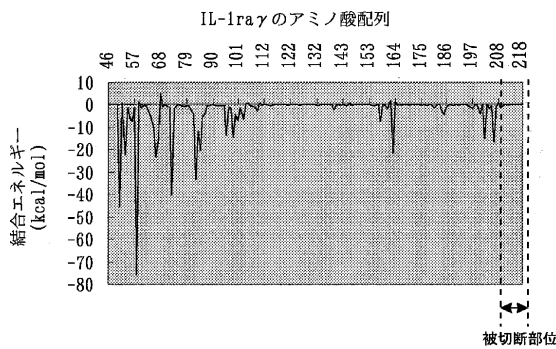
【図10】



【図11】

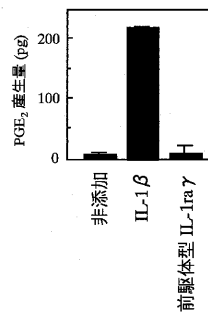


【図13】

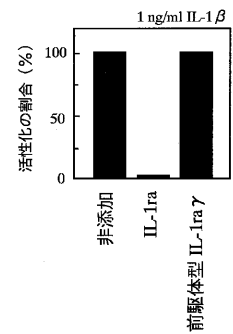


【図14】

i) アゴニスト活性



ii) アンタゴニスト活性



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>7</sup>(参考)

A 6 1 K 39/395  
 48/00  
 A 6 1 P 1/04  
 5/48  
 5/50  
 9/10  
 11/06  
 19/08  
 19/10  
 25/00  
 29/00  
 31/00  
 31/04  
 31/10  
 31/12  
 31/18

A 6 1 P 1/04  
 5/48  
 5/50  
 9/10  
 11/06  
 19/08  
 19/10  
 25/00  
 29/00  
 31/00  
 31/04  
 31/10  
 31/12  
 31/18  
 31/20  
 35/00

	31/20				35/02	
	35/00				37/06	
	35/02				37/08	
	37/06				43/00	
	37/08					1 0 5
	43/00			C 0 7 K	14/545	
		1 0 5			16/24	
C 0 7 K	14/545			C 1 2 N	1/15	
	16/24				1/19	
C 1 2 N	1/15				1/21	
	1/19			C 1 2 P	21/02	K
	1/21				21/08	
	5/10			C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P	21/02			G 0 1 N	33/53	P
	21/08				33/577	B
C 1 2 Q	1/68			C 1 2 R	1:91)	
G 0 1 N	33/53			C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/577			A 6 1 K	37/02	
//(C 1 2 N	5/10			C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 R	1:91)			C 1 2 R	1:91)	

(72)発明者 関根 進  
東京都町田市旭町3 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

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

(72)発明者 櫻井 濟  
東京都町田市旭町3 - 6 - 6 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 - 6 - 6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

专利名称(译)	属于IL-1家族的蛋白质		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001231578A</a>	公开(公告)日	2001-08-28
申请号	JP2000372864	申请日	2000-12-07
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	松下 武史 榊原 敏広 関根 進 佐藤 光男 櫻井 濟 古谷 安希子		
发明人	松下 武史 榊原 敏広 関根 進 佐藤 光男 櫻井 濟 古谷 安希子		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P5/48 A61P5/50 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/545 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/04 A61P5/48 A61P5/50 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 A61P43/00.105 C07K14/545 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.K C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.P G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA13 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA05 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DA13 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA682 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/KA04 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA59 4C086/ZA68 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA03 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22		
优先权	1999349780 1999-12-09 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

(带更正) 解决的问题: 提供具有作为IL-1家族的因子的活性的蛋白质, 该蛋白质可用于寻找和开发与IL-1相关的疾病的治疗剂, 编码该蛋白质的DNA, 识别该蛋白质的抗体和提供如何使用这些。解决方案: 一种属于IL-1家族的蛋白质, 含有一个衍生自人的特定氨基酸序列; 人IL-1具有一个氨基酸序列, 其中一个或多个氨基酸被删除, 取代和/或添加到上述蛋白质中。与Tango-77相比, 该蛋白对属于该家族的蛋白质的受体具有更高的结合亲和力; 一种蛋白质, 其与受体的结合亲和力高于Tango-77; 并且上述蛋白质被杂交瘤FERM BP-7368产生的单克隆抗体识别, 而未杂交瘤FERM BP-7369产生的单克隆抗体识别。

```

TANGO-77 MSFYGENSY KMGSEDEKD EPDCCLEDDPA GSPLEPQSL PTMNFVHTK
IL-1ra $\gamma$  MSFYGENSY KMGSEDEKD EPDCCLEDDPA VSPLEPQSL PAMNFVHTSP KY
IL-1ra $\beta$  MRGTPQDAG GGRAYVQ
IL-1 $\beta$  MAEYPKLASE MMAYSYSEED DLFFRADQPK QMKSFDLDL LQPLDGLQL R1SDHMVSKG FROAASYVA NDKLRMLVP
CPOTFGQNL STFFPFIFEE EP1FFDTWID EAVVHD
IL-1 $\alpha$  MAKYPQMFED LKNCYSNEE DSSSIDHLSL NDKSFVHSY GPLHGCDND SYLSISETS KTSKLTFKES MYYVATNGY
LKKRRLSLQ SITDQLEAI ANDSEEEIK PRSAFFSFLS NKNYF
IL-1ra MEICRGLRSH LITLILLFLH SET1CRPSGR
  
```

```

TANGO-77 50
IL-1ra $\gamma$  57 KNLNP QSSSEH QDRK VAVD SG N1AV PDKNY1R PE1F PAVSS LSSSAEKG SP1LQV SKGE EYVDRK DKQD
IL-1ra $\beta$  18 SNCKP DITDND LNDD VITD GO N1AV PRDSVYPTVAV ITRK P EALDGRG SP1LQV QNPE EYVDRK YG
IL-1 $\beta$  117 APVRS DQTRD SDQK SVAVS GPY EKAL HLOGDNE QDVS SSSG DGEESNDK PAVLQV KEKN MYSYML KD
IL-1 $\alpha$  127 MR1IK EYDND ALND EYVH NDQ VETAJ ALHLLD EAVK EPDQV KSSKQDAK IYV1EK SKTQ VYVADQ
IL-1ra 31 KSSKN EYVHLD VNK T1YR AN QVYS YLOGPWN LEEK QV1L1 EP VAV1E1 HGGK EYV1QV1 SG
  
```

```

TANGO-77 89 SH FSLCK KEKLIK LAOKESARRPF IYVAVY G SWVNES AAHPGN FCTSS CNCA EP1R1T DKFE NRKHIE EYV1E1 VCKAEMSPSEVSD
IL-1ra $\gamma$  129 SH FSLCK KEKLIK LAOKESARRPF IYVAVY G SWVNES AAHPGN FCTSS CNCA EP1R1T DKFE NRKHIE EYV1E1 VCKAEMSPSEVSD
IL-1ra $\beta$  88 EQ PTLCK KEKLIK VYDQEP VCP F EYVAVY G SWVNES VAFDPM FVSS KRQD P1L1LS ELG KSYVTA EYV1E1 ND
IL-1 $\beta$  183 IK PTLCK SVYDKN VYKQD EKR F EYVAVY G SWVNES ADFPMV YVSTG QAVN MPV1G G1KG GQD1TD IYV1E1 YSS
IL-1 $\alpha$  198 ED PTLCK EHP1EP KTYTGS ETN L EYVAVY G SWVNES VHPML F1ATK Q D YVAV1A G GPPS1TD EYV1E1 NDA
IL-1ra 99 DE PTLCK AVNTD LSENKQDKR F EYVAVY G SWVNES AACPMV FCTA MEAD QPS1T1 NMPDQSVVYTK EYV1E1 DE
  
```