

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/081515

発行日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(43) 国際公開日 平成14年10月17日(2002.10.17)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 74 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-579900 (P2002-579900)	(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
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/003343	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(22) 国際出願日	平成14年4月3日(2002.4.3)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(31) 優先権主張番号	特願2001-104766 (P2001-104766)	(72) 発明者	榊原 敏弘 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和▲ 醗▼酵工業株式会社 東京研究所内
(32) 優先日	平成13年4月3日(2001.4.3)	(72) 発明者	関根 進 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和▲ 醗▼酵工業株式会社 東京研究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン様増殖因子結合蛋白質

(57) 【要約】

本発明の蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体を用いることにより、本発明の蛋白質に関与する疾患の判定法、および本発明の蛋白質に関与する疾患の診断薬、予防薬および治療薬を提供できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 2】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

【請求項 3】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

10

【請求項 4】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号 62 ~ 69 番のアミノ酸配列を含む部分アミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の蛋白質のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の蛋白質のアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 8】

配列番号 2 で表される塩基配列のコード領域を含む DNA。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA、または配列番号 2 で表される塩基配列のコード領域を含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ請求項 1 に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質をコードする DNA。

30

【請求項 10】

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の組換え体 DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 12】

宿主細胞が、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物細胞からなる群から選ばれる細胞であることを特徴とする、請求項 11 に記載の形質転換体。

【請求項 13】

請求項 11 または 12 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 ~ 6 のいずれか 1 項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 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

40

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を認識する抗体。

【請求項 15】

寄託番号が FER M B P - 7977 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 16】

ハイブリドーマ FER M B P - 7977。

【請求項 17】

50

請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の抗体を用いる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。

【請求項 1 8】

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列中の連続した 5 ~ 6 0 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド、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、またはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体。

【請求項 1 9】

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA または請求項 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体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 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出または定量する方法。

10

【請求項 2 0】

請求項 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体をプライマーとして用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクションを行うことを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出または定量する方法。

【請求項 2 1】

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA または請求項 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を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 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 8 に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクションを行うことを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。

20

【請求項 2 3】

以下の (A) または (B) に記載の疾患の判定方法。

(A) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA の変異の検出または発現量の測定を行ない、健常人と比較することを特徴とする、疾患の判定方法。

(B) 請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の抗体を用いて、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の変異の検出または発現量の測定を行ない、健常人と比較することを特徴とする、疾患の判定方法。

30

【請求項 2 4】

疾患が、異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患、または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患である、請求項 2 3 に記載の判定方法。

【請求項 2 5】

異常な細胞増殖を伴う疾患が、急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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る、請求項 2 4 に記載の判定方法。

40

【請求項 2 6】

50

判定方法が、以下の(A)または(B)に記載の方法によるものである、請求項23~25のいずれか1項に記載の判定方法。

(A) 請求項21または22に記載の検出方法。

(B) 請求項17、19または20に記載の検出方法、または定量方法。

【請求項27】

請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する医薬。

【請求項28】

請求項7~9のいずれか1項に記載のDNA、または請求項18に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体を含有する医薬。

【請求項29】

医薬が、遺伝子予防用ベクターまたは遺伝子治療用ベクターである、請求項28に記載の医薬。

【請求項30】

請求項14または請求項15に記載の抗体を含有する医薬。

【請求項31】

医薬が、異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、請求項27~30に記載の医薬。

【請求項32】

異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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る、請求項31に記載の医薬。

【請求項33】

(i) 請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質を発現する細胞での該蛋白質の発現量と、(ii) 該蛋白質を発現する細胞と被験試料を接触させた場合の該蛋白質の発現量とを比較し、被験試料より請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量を制御する化合物を選択することを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項34】

(i) 請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質を発現する細胞の機能と(ii) 該蛋白質を発現する細胞と被験試料を接触させた場合の細胞の機能とを比較し、被験試料より請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を制御する化合物を選択することを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項35】

請求項1~6のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より請求項1~6に記載の蛋白質をコードする遺伝

10

20

30

40

50

子の発現を制御する化合物を選択することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を制御する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング法によって得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する医薬。

【請求項 3 8】

異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患に対する予防薬または治療薬である、請求項 3 7 に記載の医薬。

10

【請求項 3 9】

異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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る、請求項 3 8 に記載の医薬。

20

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と被験試料を接触させ、被験試料より該蛋白質と特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と特異的に結合する蛋白質のスクリーニング法。

30

【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載のスクリーニング法により取得される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と特異的に結合する蛋白質。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が低下または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の有する機能が低下または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

40

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規なインスリン様増殖因子結合蛋白質、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、および該蛋白質が関与する疾患の判定法、診断薬、予防薬または治療薬に関する。

背景技術

インスリン様増殖因子結合蛋白質 (insulin-like growth factor binding protein、以下、「IGFBP」という) は、体液中のインスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor、以下、「IGF」という) が高分子複合体として存在することから発見された分子群で、現在ま

50

で、IGFBP-1~10までの10種類の分子の存在が報告されており、スーパーファミリーを形成していることが知られている〔Endocr. Rev., 18, 801 (1997)、Prog. Growth Factor Res., 3, 243 (1991)、Mol. Reprod. Dev., 35, 368 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12981 (1997)〕。

IGFBPの機能としては、インテグリンへの結合などによる直接作用の存在も示唆されているが、主な作用は、IGFやインスリンに結合してその活性や分布、代謝などを調節することによって発揮されると考えられ〔Endocr. Rev., 18, 801 (1997)、Bio Science用語ライブラリー サイトカイン・増殖因子 改訂版 p 14-17 (1988)〕、具体的にはIGFBPは、血中および血管外へのIGFの運搬と分解の抑制、受容体への結合調節などによりその機能を発揮していると考えられている。

10

IGFBPスーパーファミリーのうち、IGFBP-1~6までの6種類の分子は構造的にも類似しており、インスリンよりもIGFに高い親和性をもって結合することから、IGF高親和性IGFBPとしてサブファミリーに分類されている〔Mol. Endocrinol., 2, 404 (1988)、EMBO J., 8, 2497 (1989)、Mol. Endocrinol., 2, 1176 (1989)、Mol. Endocrinol., 4, 1806 (1990)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 219 (1991)、J. Biol. Chem., 266, 9043 (1991)、J. Biol. Chem., 266, 10646 (1991)〕。

20

IGF高親和性IGFBPのサブファミリー分子間のアミノ酸配列の相同性はヒトで49%~60%である。また、IGFBP-6を除く5種類のIGFBPでは18個のシステイン残基が保存されており、このうちN末端の3個がGly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cysで代表される相同配列〔Xは任意のアミノ酸を表しており、該相同配列はインスリン様増殖因子結合モチーフと呼ばれ(以下、「IGFBPモチーフ」ともいう)〕を形成し、IGFの結合に関与することが示されている〔Prog. Growth Factor Res., 3, 243 (1991)〕。

IGFBP-1と3は、IGFの作用を抑制する場合と促進する場合の両方があることが知られている。また、IGFBP-2、4、6は抑制性の、IGFBP-5は促進性のIGF結合蛋白質である。IGFには、成長ホルモン依存的に肝、骨組織などで産生され、身体的成長を促進させる増殖因子として機能しているIGF-Iと中枢神経系、骨組織などに多量に発現し、主として胎生期の成長に重要な役割を果たしていると推定されるIGF-IIとが存在するが、IGFBP-1、3、4はIGF-I及びIGF-IIに同等の結合活性を示し、IGFBP-2、5、6は主としてIGF-IIに強い結合活性を示すことが知られている。

30

また、IGF高親和性IGFBPのサブファミリー分子の組織分布は、各分子によって異なっており、IGFBP-1は主に羊水や胎児血清中に、IGFBP-2は主に胎児肝臓や成人脳に、IGFBP-3は主に肝臓や血清中に、IGFBP-4は主に腎系球体、皮膚および腸上皮に、IGFBP-5は主に腸上皮や骨に、IGFBP-6は主に皮膚や心臓に存在していることが知られている。

40

IGFBPと病態との関わりに関しては、以下にあげるような知見が報告されている。小人症や末端肥大症患者ではIGFやIGFBPの発現変動が病態生理に直接関与していることが知られている。また、小児慢性腎不全においてもしばしば成長障害が起こるが、成長ホルモンやIGFの発現レベルは正常であり、多くはIGFBP-2や3の増加によるIGFの機能障害が原因であることが知られている〔Miner. Electrolyte Metab., 18, 320 (1992)〕。IGFBP-4および5は骨代謝に重要な機能を有しており、骨粗鬆症ではIGFBP-5の発現量が減少し、副甲状腺ホルモンの上昇を伴う老人女性の骨折患者ではIGFBP-4の発現が上昇することが報告されている。また、腎摘出後や小腸切除後の代償性肥大においてIGF-Iの傍分泌作用の亢進が観察されているが、IGF-IのmRNA量は変化せず、IGFBP-3の発現低

50

下によって遊離のIGF-Iが増加することが報告されている〔J. Fuller; Baillieres Clin. Endocrinol. Metab., 8, 165 (1994)〕。さらに、子宮内膜の悪性腫瘍では、良性腫瘍に比べてIGFBP-1の発現が低下していることが報告されている〔Growth Regul., 3, 74, (1993)〕。

一方、IGFBPスーパーファミリーのうち、IGFBP-7~10までの4種類の分子は構造的に類似し、かつ、IGFに低い親和性を有するという共通の性質を持つと考えられることから、IGF低親和性IGFBPとして別のサブファミリーに分類されている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 12981 (1997)、Cancer Res., 59, 2787 (1999)〕。

10

IGFBP-7については様々な生理活性についての報告がなされ、特に癌およびその病態との関係について多くの報告がなされている。

IGFBP-7は、老化したヒト上皮細胞で発現が上昇している〔J. Clin. Endocrinol. Metab., 4, 715 (1993)〕一方で、カルシノーマ細胞株などでは発現が低下していることから、癌抑制活性遺伝子としての機能を有するのではないかと考えられている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4472 (1995)〕。

IGFBP-7のヒト染色体上の遺伝子座は4q12で、ヒト上皮細胞をレチノイン酸で処理することでその発現が上昇することも知られている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4472 (1995)〕。

20

乳癌組織では、染色体4q12~13の位置にLOH (loss of heterozygosity) が約50%の頻度で観察され、かつ、IGFBP-7の発現が減少していることが確認されている〔Oncogene, 16, 2459 (1998)〕。前立腺癌組織でもIGFBP-7の発現がmRNAレベルで減少しており、特に悪性の前立腺癌由来の細胞株では検出されないことが報告されている〔J. Clin. Endocrinol. Metab., 83, 4355 (1998)〕。

さらに、IGFBP-7の発現が減少した前立腺癌細胞株にIGFBP-7を強制発現させると、細胞分裂時間の延長、軟寒天培地中でのコロニー形成能の低下、ヌードマウス移植時の腫瘍形成能の低下、薬剤処理によるアポトーシス誘導率の上昇が観察されており、IGFBP-7の発現と前立腺癌の悪性度との関係が示唆されている〔Cancer Res., 59, 2370 (1999)〕。

30

白血病患者では、脳脊髄液中のIGFBP-7およびIGFBP-3の濃度が上昇することが報告されており、白血病の病態との関係が注目されている〔J. Clin. Endocrinol. Metab., 84, 1283 (1999)〕。

大腸癌では、大腸癌組織および大腸癌細胞株においてIGFBP-7の発現が上昇していることから、病態との関係が注目されている〔J. Gastroenterology, 33, 213 (1998)〕。

大型の子宮平滑筋腫部位では、IGFBP-7の発現が低下しており、ゴナドトロピン分泌促進ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone) 治療を受けた患者ではIGFBP-7の発現が上昇することが報告されている〔J. Reprod. Immunol., 43, 53 (2000)〕。

40

SV40T抗原で誘導されたマウス肝臓癌細胞では、IGFBP-7遺伝子の5'上流域がメチル化され発現量が減少していることから、癌化にともなうIGFBP-7の発現調節に遺伝子のメチル化による機構が提唱されている〔Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 109 (2000)〕。

IGFBP-7と糖尿病との関連についても報告されている。

血管内皮細胞に作用しプロスタサイクリンPGI₂の産生を促進する因子 (PGI₂-stimulating factor、以下「PSF」と略す) が、IGFBP-7と同一であることが示され〔Biochem. J., 303, 591, (1994)〕、血管内皮細胞及び平滑筋細胞において発現している該因子は〔Thromb Haemost 50

、74、1407 (1995)]、ストレプトゾトシン投与によるI型糖尿病モデルでは腎臓および血管障害部位で発現が低下していることが報告されている [Diabetes, 45, S111 (1996)、J. Diabetes & its Complications, 12, 252 (1998)]。またII型糖尿病患者の冠状動脈平滑筋細胞においてもIGFBP-7の発現低下が蛋白質レベルで観察されている [Diabetes, 46, 1627 (1997)]。さらに、牛の動脈由来平滑筋細胞を高グルコース培地で培養するとIGFBP-7の発現量が低下することがmRNAおよび蛋白レベルで確認されている [Diabetes, 46, 1627 (1997)、Diabetologia, 41, 134 (1998)]。

TGF- (Transforming growth factor -)、副甲状腺ホルモン (PTH) およびプロスタグランジンE2 (PGE2) によってIGFBP-7の発現が骨芽細胞において上昇することから、IGFBP-7が骨芽細胞に生理的作用を及ぼすことが示唆されている [Endocrinology, 140, 1998 (1999)]。また、骨芽細胞をグルココルチコイドで処理するとIGF-Iの発現を抑制する一方でIGFBP-7の発現を上昇させることも報告されている [Endocrinology, 140, 228 (1999)]。

また、IGFBP-7は骨格筋への分化にもIGFの分化促進作用を抑制することで影響していることが示唆されている [Exp. Cell Res., 237, 192 (1997)、Endocrinology, 141, 100 (2000)]。

IGFBP-7がプロスタサイクリンPGI2の産生を促進する因子PSFと同一分子であったことから、IGFBP-7の生理機能の一部はPGI2をエフェクター分子として発揮されていると考えられている。

プロスタグランジンの一種であるPGI2は強力な血小板凝集抑制作用と血管弛緩作用を有し、逆の作用を有するTXA2と拮抗的に作用し生体内の恒常性の維持に参与していることが知られており [Br. J. Pharmac., 76, 3 (1982)]、血栓症や動脈硬化症などではTXA2およびPGI2の産生の不均衡、とりわけPGI2の産生が低下し血管障害が発症することが知られている [Br. J. Pharmac., 76, 3 (1982)]。糖尿病性血管障害の発症や進展においても、血小板由来のTXA2の産生亢進に加え [Thromb. Res., 19, 211 (1980)、J. Lab. Clin. Med., 97, 87 (1981)]、血管由来のPGI2の産生低下が血小板凝集の亢進を引き起こすことが糖尿病患者や実験糖尿病動物で確認されている [Lancet, 1, 325 (1979)、Lancet, 2, 1365 (1979)、N. Engl. J. Med., 300, 366 (1979)、Life Sci., 23, 351 (1978)]。

また、PSFは血流中に存在する因子であり、血管壁でのPGI2産生を刺激すること [Nature, 271, 549 (1978)]、および該因子は、溶血性尿毒症症候群 [Lancet, 2, 871 (1978)]、血栓性血小板減少性紫斑病 [Lancet, 2, 748 (1979)]、鎌形赤血球性貧血症 [Br. J. Haematol., 48, 545 (1981)]、急性心筋梗塞 [Coronary, 2, 49 (1985)]、糖尿病性血管障害 [Metabolism, 38, 837 (1989)、Haemostasis, 16, 447 (1986)、Diab. Res. Clin. Pract., 3, 243 (1987)]、動脈硬化性疾患において血中レベルが低下していることが報告されている。

すなわち、IGFBP-7は血管内皮細胞のPGI2産生を促し血中のPGI2濃度を高めることにより血小板凝集抑制作用、平滑筋弛緩作用、胃酸分泌抑制作用を発揮することが明らかになっている。

以上のように、IGFBPスーパーファミリーに属する因子は、IGFやインスリンの機能の調節、妊娠、消耗性疾患における代償作用、骨代謝、骨格筋細胞の分化、血管内皮細胞に対するPGI2産生促進、PGI2を介した血小板凝集抑制、血管平滑筋弛緩、気管支平滑筋弛緩、胃酸分泌抑制など様々な生理現象に参与していることが示されている。ま

た、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全、骨粗鬆症、乳癌、前立腺癌、急性白血病、大腸癌、子宮平滑筋腫、肝臓癌、I型糖尿病、II型糖尿病、血栓症、動脈硬化症、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、鎌形赤血球性貧血症、急性心筋梗塞、糖尿病性血管障害等の疾患に關与していることも示されている。

したがって、IGFBPスーパーファミリーに属するIGFBPとしての活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、アンチセンスDNA、蛋白質を認識する抗体は、異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、IGFや成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患の判定、治療または予防のための医薬になりうると考えられており、IGFBPスーパーファミリーに属する因子は有用な新薬開発のターゲットとして非常に注目されている。

10

また、IGFBPスーパーファミリーに属する新規な因子が存在する可能性も想起され、新規IGFBP遺伝子を取得できれば、該IGFBPのアミノ酸配列と既知IGFBPのアミノ酸配列とを比較したり、該IGFBP遺伝子の転写物の発現分布を調べることにより、該IGFBPの機能を推定し、医薬品開発に有用な情報を得ることがができる。また、新規IGFBP遺伝子を取得できれば、該IGFBPの発現または機能を抑制する物質をスクリーニングすることが可能になる。該スクリーニングにより得られる化合物は有用な医薬品として期待される。

発明の開示

20

本発明は、新規インスリン様増殖因子結合蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、該蛋白質が關与する疾患の判定方法、診断薬、予防薬および治療薬を提供する。

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、IGFBPファミリーに属する新規インスリン様増殖因子結合蛋白質および該蛋白質をコードする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)~(43)を提供するものである。

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

(2) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

30

(3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

(4) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号62~69番のアミノ酸配列を含む部分アミノ酸配列からなり、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

(5) (4)に記載の蛋白質のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

(6) (4)に記載の蛋白質のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質。

40

(7) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするDNA。

(8) 配列番号2で表される塩基配列のコード領域を含むDNA。

(9) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするDNA、または配列番号2で表される塩基配列のコード領域を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(1)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(10) (7)~(9)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組込んで得られる組換え体DNA。

(11) (10)に記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

50

- (12) 宿主細胞が、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物細胞からなる群から選ばれる細胞であることを特徴とする、(11)に記載の形質転換体。
- (13) (11)または(12)に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1)~(6)のいずれか1項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)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の製造方法。
- (14) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質を認識する抗体。
- (15) 寄託番号がFERM BP-7977であるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体。
- (16) ハイブリドーマFERM BP-7977。
- (17) (14)または(15)に記載の抗体を用いる、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質を免疫学的に検出または定量する方法。 10
- (18) (7)~(9)のいずれか1項に記載のDNAの塩基配列中の連続した5~60塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド、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、またはそれらオリゴヌクレオチドの誘導体。
- (19) (7)~(9)のいずれか1項に記載のDNAまたは(18)に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体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)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出または定量する方法。
- (20) (18)に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体をプライマーとして用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクションを行うことを含む、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現の検出方法、または発現量の定量方法。 20
- (21) (7)~(9)のいずれか1項に記載のDNAまたは(18)に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用いてハイブリダイゼーションを行うことを含む、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。
- (22) (18)に記載のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクションを行うことを含む、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の変異を検出する方法。
- (23) 以下の(A)または(B)に記載の疾患の判定方法。 30
- (A) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするDNAの変異の検出または発現量の測定を行ない、健常人と比較することを特徴とする、疾患の判定方法。
- (B) (14)または(15)に記載の抗体を用いて、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の変異の検出または発現量の測定を行ない、健常人と比較することを特徴とする、疾患の判定方法。
- (24) 疾患が、異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患である、(23)に記載の判定方法。
- (25) 異常な細胞増殖を伴う疾患が、急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、 40
肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾 50

患、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る、(24)に記載の判定方法。

(26) 判定方法が、以下の(A)または(B)に記載の方法によるものである、(23)~(25)のいずれか1項に記載の判定方法。

(A) (21)または(22)に記載の検出方法。

(B) (17)、(19)または(20)に記載の検出方法、または定量方法。

(27) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質を含有する医薬。

(28) (7)~(9)のいずれか1項に記載のDNA、または(18)に記載のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド誘導体を含有する医薬。

(29) 医薬が、遺伝子予防用ベクターまたは遺伝子治療用ベクターである、(28) 10
に記載の医薬。

(30) (14)または(15)に記載の抗体を含有する医薬。

(31) 医薬が、異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患に対する診断薬、予防薬または治療薬である、(27)~(30)に記載の医薬。

(32) 異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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る、(31) 20
に記載の医薬。 30

(33) (i) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質を発現する細胞での該蛋白質の発現量と、(ii)該蛋白質を発現する細胞と被験試料を接触させた場合の該蛋白質の発現量とを比較し、被験試料より(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量を制御する化合物を選択することを特徴とする、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の発現量を制御する化合物のスクリーニング方法。

(34) (i) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質を発現する細胞の機能と(ii)該蛋白質を発現する細胞と被験試料を接触させた場合の細胞の機能とを比較し、被験試料より(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を制御する化合物を選択することを特徴とする、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の機能を制御する化合物のスクリーニング方法。 40

(35) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の転写を制御する領域の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させ、被験試料より(1)~(6)に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を制御する化合物を選択することを特徴とする、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現を制御する化合物のスクリーニング方法。

(36) (33)~(35)のいずれか1項に記載のスクリーニング法によって得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

(37) (36)に記載の化合物またはその薬理的に許容される塩を含有する医薬。

(38) 異常な細胞増殖を伴う疾患、血管障害を伴う疾患、骨代謝の異常を伴う疾患、 50

インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃酸分泌の異常を伴う疾患または異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患に対する予防薬または治療薬である、(37)に記載の医薬。

(39) 異常な細胞増殖を伴う疾患が急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍または固形腫瘍であり、血管障害を伴う疾患が心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血または脈絡膜循環障害であり、骨代謝の異常を伴う疾患が骨粗鬆症であり、インスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患が小人症、末端肥大症または小児慢性腎不全であり、異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患が動脈硬化、気管支疾患または再狭窄であり、異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患が重症筋無力症であり、胃酸分泌の異常を伴う疾患が胃潰瘍であり、異常なリンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患が微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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る、(38)に記載の医薬。

10

(40) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質と被験試料を接触させ、被験試料より該蛋白質と特異的に結合する蛋白質を選択することを特徴とする、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質と特異的に結合する蛋白質のスクリーニング法。

20

(41) (40)に記載のスクリーニング法により取得される、(1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質と特異的に結合する蛋白質。

(42) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質をコードする遺伝子の発現が低下または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

(43) (1)~(6)のいずれか1項に記載の蛋白質の有する機能が低下または完全に抑制されたノックアウト非ヒト動物。

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からなる蛋白質

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(a)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

30

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ(a)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

(d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号62~69番のアミノ酸配列を含む部分アミノ酸配列からなり、かつ上記(a)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

(e) 上記(d)に記載の蛋白質を表すアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記(a)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質

(f) 上記(d)に記載の蛋白質を表すアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ上記(a)に記載の蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質をあげることができる。

40

インスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属する因子は、IGFあるいはインスリンと親和性を有する蛋白質の因子であり、インスリン様増殖因子結合モチーフ(IGFBPモチーフ)を有している。該モチーフはインスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属する蛋白質のN末端部分で保存されており、Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cysで代表されるアミノ酸配列からなる蛋白質の部分(Xは任意のアミノ酸を表す)をさす。インスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属する蛋白質では、IGFBPモチーフを中心に少なくとも10個のシステイン残基が保存されており、IGFBPモチーフ部分を介してIGFあるいはインスリンに親和性を示

50

す。配列番号1で表されるアミノ酸配列においては、アミノ酸番号62～69番で表されるアミノ酸配列がIGFBPモチーフである。

上述した配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一な活性を有する蛋白質としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と、結合するインテグリン、IGF、インスリンまたは受容体等の蛋白質が同一である蛋白質があげられる。実質的に同一とは、活性が性質的に同一であることを示す。したがって、結合活性の程度、蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

本発明の蛋白質である配列番号1で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、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., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で表されるアミノ酸配列からな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取得することができる。欠失、置換、挿入および/もしくは付加されるアミノ酸の数は1個以上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、欠失、置換、挿入および/も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。また、本発明には、このような人為的に作成した変異体のみならず、自然界において生じた変異体も含まれる。

本発明の蛋白質である配列番号1で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質としては、例えば、シグナルペプチドが除去された蛋白質が挙げられる。

また、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と80%以上の相同性を有し、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質であり、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有するためには、配列番号1に記載のアミノ酸配列との相同性が、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上であることが好ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877 (1993)]によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている [Altschul et al. J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

10

20

30

40

50

本発明の蛋白質は、上記本発明の蛋白質のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列からなる蛋白質であり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質も含む。

配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有するには、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、アミノ酸番号62～69番のアミノ酸配列を含む部分アミノ酸配列からなる蛋白質であることが好ましい。

また該蛋白質に1以上のアミノ酸の欠失、置換、挿入および/または付加したアミノ酸配列からなる蛋白質もまた本発明の蛋白質である。該蛋白質としては、上述した周知の部位特異的変異導入法により導入可能な数のアミノ酸が欠失、置換または付加した蛋白質であり、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質をあげることができる。

また、上記(d)に記載の蛋白質と80%以上の相同性を有し、かつ配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質である。配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と実質的に同一の活性を有するには、(d)に記載の蛋白質のアミノ酸配列との相同性が、上記BLASTのプログラムを利用して計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上である。

本発明のDNAとしては、

(1) 配列番号2の塩基配列のコード領域を含むDNA

(2) 上記定義した(a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)に記載の本発明の蛋白質をコードするDNA

(3) (2)に記載のDNA、または配列番号2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同一な活性を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号2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DNA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プ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、0.7～1.0 mol/L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倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを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、配列番号2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。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明のDNAの調製

本発明のDNAは、ヒト組織由来のmRNA、例えばヒト脳由来のmRNAを単離し、そのcDNAライブラリーを作製し、次いで該cDNAライブラリーをスクリーニングして目的のクローンを得ることにより調製することができる。

ヒト脳mRNAは、市販のもの(例えば、Clontech社製)を用いてもよいし、以下のごとくヒト脳組織から調製してもよい。後者の場合には、まず、脳組織から全RNA

を調製し、該全RNAからmRNAを単離することができる。

脳組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)〕、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法〔Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学, 9, 1937 (1991)〕などがあげられる。全RNAからpoly(A)⁺ 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。あるいは、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。 10

調製したヒト脳組織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 (STRATAGENE社、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))、Triplex (Clontech社製)、ExCell (Pharmacia社製)、pT7T318U (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。 20

宿主微生物としては、エシュリヒア属 (Escherichia) に属する微生物、特にエシュリヒア・コリ (Escherichia coli、以下、「大腸菌」ともいう) に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' (STRATAGENE社、Strategies, 5, 81 (1992))、Escherichia coli C600 (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。 30 40

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、完全長cDNAをできるだけ効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法〔Gene, 138, 171 (1994)、Gene, 200, 149 (1997)、蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996)、実験医学, 11, 2491 (1993)、cDNAクローニング, 羊土社 (1996)、遺伝子ライブラリーの作製法, 羊土社 (1994)〕を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

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 (Sa 50

nger)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。

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2で表される塩基配列があげられる。 10

配列番号2で表される塩基配列からなるDNAを翻訳して得られる蛋白質(配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質)は、BLAST2〔Nuc. Acid. Res., 25, 3389 (1997)〕を用いた相同性解析において、IGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質ヒトIGFBP-7と39%の相同性を有する。

IGFBPスーパーファミリーにおいては、IGFあるいはインスリンとの結合に重要なインスリン様増殖因子結合モチーフ部分およびIGFBPモチーフを中心とした少なくとも10個のシステイン残基の位置が保存されていることが知られている。配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質においても、インスリン様増殖因子結合モチーフに相当する部分に、代表的なインスリン様増殖因子結合モチーフであるGly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cys(Xは任意のアミノ酸を示す)からなるアミノ酸配列と非常に類似したGlu-Cys-Gly-Cys-Cys-Ala-Arg-Cysからなるアミノ酸配列が存在し、このモチーフ部分を中心に10個のシステイン残基がIGFBPスーパーファミリーに属する因子間で保存されている位置に存在する。従って、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質がIGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質としての活性を有することがわかる。 20

IGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質と疾患の関係については、急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等について報告があることから、本発明の蛋白質もまた、上記疾患と関連がある蛋白質であることが予想される。これら疾患は、例えば、本発明の蛋白質の機能や発現の異状に起因している可能性がある。本実施例において、本発明の蛋白質を発現させた細胞の培養上清が癌細胞株の増殖を抑制する活性を示したことから、本発明の蛋白質は、大腸癌などの異常な細胞増殖を伴う疾患に関係していると考えられる。 30 40

配列番号2で表される塩基配列を含む分子がcDNAライブラリー作製の際に人工的に生じたものではないことを確認するためには、ヒトゲノムライブラリーを、配列番号2で表される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判断することができる。

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自体公知の方法〔Genomics, 29, 413 (1995)、Genomics, 24, 527 (1994) 50

）等に記載の方法）を用いて調製してもよい。

ヒトゲノムライブラリーを、配列番号2で表される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2で表される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2で表される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・クローニング第2版）などがあげられる。

上記の方法で配列番号2で表される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。このゲノムDNAの塩基配列を決定し配列番号2で表される塩基配列と比較すると、配列番号2で表される塩基配列は6つの部分に別れて同一ヒトゲノム上に約18kbにわたって存在していることが分かる。すなわち、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質は6つのエクソンから構成されており、cDNAライブラリー作製の際に人工的に生じたものではないことが分かる。

配列番号2で表される塩基配列からなるDNAが一旦取得され、その塩基配列が決定された後は、該塩基配列の5'端および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脳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2で表される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脳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、フォ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。

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IGFBP-1、ヒトIGFBP-2、ヒトIGFBP-3、ヒトIGFBP-4、ヒトIGFBP-5、ヒトIGFBP-6、ヒトIGFBP-7、ヒトIGFBP-8、ヒトIGFBP-9若しくはヒトIGFBP-10のアミノ酸配列との相同性およびシステイン残基の位置を比較することにより、該DNAがIGFBPスーパー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。

配列番号2で表される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2で表される塩基配列のうち、連続した5~60塩基、好ましくは10~40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチド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體（以下、オリゴヌクレオチド誘導體という）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（ T_m ）およ

10

20

30

40

50

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。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体、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オリゴヌクレオチド誘導体等があげられる〔細胞工学, 16, 1463(1997)〕。

10

2. 本発明の蛋白質の製造

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

20

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。

30

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、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200〔Agricultural Biological Chemistry, 48, 669(1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306(1985)〕、pBluescript IISK(-)(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 B-400)より調製、特開昭60-221091〕、pGKA2〔Escherichia coli IGKA2(FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091

40

50

〕、pTerm2 (US 4686191、US 4939094、US 5160735)、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。

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} × 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let I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。

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 amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum、ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110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、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)、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ブ

10

20

30

40

50

ロモーター、CUP 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、サッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwannomyces 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)〕、スフェロプラスチ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriology, 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

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; Cytotechnology, 3, 133, (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840, (1987)〕、pcDNA1/Amp (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)、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。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

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、pBlueBac111 (ともにInvitrogen社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A

10

20

30

40

50

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バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等を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、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法(特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

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・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞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。

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、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、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、これらを含み、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。

無機塩としては、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。

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、1

a c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、t r p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。

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RPMI 1640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pH 6~8、30~40、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharming社製)、Sf-900 I I SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCell 400、ExCell 405 (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pH 6~7、25~30等の条件下で、1~5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、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pH 5~9、20~40の条件下で3~60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え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・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、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。

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)〕、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、W094/23021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。

10

20

30

40

50

また、特開平 2 - 2 2 7 0 7 5 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。

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)、*Bio/Technology*, 9, 830 (1991)〕に準じて遺伝子を導入して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。 10

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 - 309192）、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。 20

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

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、水系緩衝液にけん濁後、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、等電点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。 30

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。 40

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 で表されるアミノ酸配列を 50

有する蛋白質をあげることができる。

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。

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、またそれら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、またそれら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、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50～100 μ g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。

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）、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。

(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。

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、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）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、P3-U1と略す）〔Curr. Topics. Microbiol. Immu

10

20

30

40

50

no1., 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(1.5 mmol/L)、2-メルカプトエタノール(5 × 10⁻⁵ mol/L)、ジェンタマイシン(10 μg/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(15 μg/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 × 10⁷個以上用いる。

10

(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1.83 g、リン酸一カリウム0.21 g、食塩7.65 g、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、1,200 rpm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細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、10⁸抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2 g、MEM 2 mlおよびジメチルスルホキシド(DMSO)0.7 mlを混合した溶液を0.2~1 ml添加し、さらに1~2分間毎にMEM培地1~2 mlを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50 mlになるように調製する。該調製液を900 rpm

20

で5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン(10⁻⁴ mol/L)、チミジン(1.5 × 10⁻⁵ mol/L)およびアミノプテリン(4 × 10⁻⁷ mol/L)を加えた培地〕100 ml中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100~200 μl/穴ずつ分注し、5% CO₂ 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

30

酵素免疫測定法の具体的例として、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第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質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回繰り返し〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

40

本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株の1例としては、ハイブリドーマ株KM3103が挙げられる。ハイブリドーマ株KM3103は、平成14年3月26日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6: 郵便番号305-8566)にFERM BP-7977として寄託されている。

(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) 0.5 ml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

50

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 $5 \sim 20 \times 10^6$ 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。

10

4. 本発明のDNA、蛋白質または抗体の利用

(1) 本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出・定量することによる疾患の判定方法

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・クローニング第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)等を行い、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することで、急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等のIGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質の関与の報告がある疾患の判定を行うことができる。

20

30

RT-PCR法は簡便な方法であるため、遺伝子の発現の検出法として特に有用である。例えば、配列番号2で表される塩基配列中の連続した100～2881塩基と同じ配列を有するDNA、または該DNAと相補的な配列を有するDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、配列番号2に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現量を定量し、健常者と比較することにより上記疾患を判定することができる。

該判定の具体的方法として、例えば、以下の方法をあげることができる。

被験者および健常者の白血球細胞または組織由来全RNA(10～20μg)、またはそれらのmRNA(1～5μg)を、変性溶液[50%(v/v)ホルムアミド、2.2mol/Lホルムアルデヒド、20mmol/L MOPS[3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸](pH7.0)、5mmol/L 酢酸ナトリウム、1mmol/L EDTA]中、65℃で5分間加熱し、変性させ、2.2mol/Lホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動する。

40

電気泳動後、ゲル中のRNAをニトロセルロースフィルター(Optimal BA-S85; Schleicher & Schuell社製)上にブロッティングし、減圧下80℃で1時間加熱し固定化する。

該フィルターをハイブリダイゼーション溶液[5×SSPE(750mmol/L NaCl、50mmol/L NaH₂PO₄、5mmol/L EDTA; pH7.4)、5×デンハルト溶液(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)、1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、0.2mg/mlのサケ精子DNA(Pharmacia Biotech社製)]中に浸漬しプレハイブリダイ

50

ゼーションを行う。

プレハイブリダイゼーション後、該溶液にプローブを添加し、65 でハイブリダイゼーションを行う。

プローブとしては、例えば配列番号2に記載のDNA断片をマルチプライムDNA標識システム(アマシャム社製)を用いて³²Pで標識したものを使用できる。

ハイブリダイゼーション後のフィルターを、以下の順で洗浄する。

(a) 0.1% SDSを含む2×SSC(300mmol/L NaCl、30mmol/L クエン酸ナトリウム)溶液中、室温で15分間洗浄する。これを数回繰り返す。

(b) 0.1% SDSを含む1×SSC(150mmol/L NaCl、15mmol/L クエン酸ナトリウム)溶液中、50~70 で15分間洗浄する。これを数回繰り返す。 10

(c) 50~70 の0.1% SDSを含む0.1×SSC(15mmol/L NaCl、1.5mmol/L クエン酸ナトリウム)溶液中、50~70 で15分間洗浄する。これを数回繰り返す。

フィルター洗浄後、イメージングプレートを用いてオートラジオグラフィを行い、バイオイメージングアナライザーBAS2000(富士写真フィルム)で配列番号2に記載のDNAの発現を検出し定量することができる。

また、例えば、本発明の蛋白質をコードするcDNAに特異的な1組のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、被験者および健常者の白血球細胞または組織由来全RNA、それらのmRNAまたはこれらRNAから調製したcDNAを鋳型としてPCRを行い、増幅断片を検出・定量し、被験者と健常者の本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を比較することにより上記疾患を判定することができる。 20

オリゴヌクレオチドとしては、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることができる。

PCRの鋳型となるmRNAまたは全RNAは、血液より分離・取得した各種白血球細胞、または疾患の疑いがある組織等から抽出することができる。

白血球細胞としては、多形核白血球、単球、リンパ球、T細胞、B細胞等をあげることができる。

多形核白血球および単核球は、被験者の末梢血より、ナイコメッド・ファーマ(Nycomed Pharma)社製のキットであるPolymorph prepTMを用いることにより、分離・取得することができる。 30

取得した単核球より、J. Immunol., 130, 706(1983)等に記載の方法により、単球およびリンパ球を、Tissue Antigen, 9, 153(1977)、J. Immunol., 11, 273(1976)、Nycomed社の血球細胞の単離法に関するマニュアル等に記載の方法により、T細胞やB細胞を分離・取得することができる。

T細胞はナイロンウール法[Eur. J. Immunol., 3, 645(1973)]を用いて取得することもできる。また、T細胞、B細胞、単球/マクロファージにそれぞれ特異的な抗体を結合した磁気ビーズ(例えば、Dynal社製のDynabeads)を用いて、各細胞を分離・取得することができる。

白血球細胞または組織から全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 Enzymol., 154, 3(1987)]等をあげることができる。 40

全RNAからポリ(A)⁺RNA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・クロニング第2版)等をあげることができる。

また、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット[Fast Track mRNA Isolation Kit; Invitrogen社製]、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット(Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア社製)等のキットを用いてmRNAを調製することもできる。

一本鎖cDNAは、全RNAまたはmRNAから、一本鎖cDNA合成キットSuper 50

script preamplification system (BRL社製)を用いて、合成することができる。合成は、キットに添付のマニュアルに従って行うことができる。

上記のように調製できる全RNA、mRNAまたはcDNAを用いたRT-PCR法〔PCR Protocols、Academic Press(1990)〕により、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の発現量を定量することができる。

(2) 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による疾患の判定方法
本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クロニング第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、IGFBPファミリーに属する蛋白質が関与しているとの報告がある急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、脳腫瘍、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等の判定に利用することができる。

具体的には、例えば、患者が保有する本発明の蛋白質をコードするDNAの翻訳領域をPCR法で増幅させ、塩基配列を決定し、健常者が有する該DNAの塩基配列と比較することにより、翻訳領域における変異の有無を調べることができる。

PCR法に供する鋳型となるcDNAは(1)に記載した方法により取得できる。取得されたcDNAの塩基配列は、パーキンエルマー社のDNAシークエンサー377と反応キット(ABI PrismTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: Applied Biosystems社製)を用いて決定できる。

(3) 免疫学的検出法・定量法による疾患の判定法

本発明の抗体を用いて、被験者および健常者の血液中または組織における本発明の蛋白質の発現を免疫学的に検出または定量し、健常者と比較することで下記疾患を判定することができる。

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、免疫組織染色法等をあげることができる。

免疫学的に定量する方法としては、例えば液相中で本発明のポリペプチド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、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明の蛋白質と該蛋白質を認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

該免疫学的方法は、本発明の蛋白質の関与が報告されている急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等の疾患の判定に利用することができる。

(4) 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による疾患の予防および治療

IGFBPの発現量の上昇と疾患の関係については、小児慢性腎不全はIGFBP - 2や3の増加が原因であること〔*Electrolyte Metab.*, 18, 320 (1992)〕、副甲状腺ホルモンの上昇を伴う老人女性の骨折患者ではIGFBP - 4の発現が上昇すること、白血病患者では脳脊髄液中のIGFBP - 7およびIGFBP - 3の濃度が上昇すること〔*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1361 (1996)〕、大腸癌では、大腸癌組織および大腸癌細胞株においてIGFBP - 7の発現が上昇していること〔*J. Gastroenterology*, 33, 213 (1998)〕等が報告されている。

また、TGF - β 、PTHrPによってIGFBP - 7の発現が上昇すること〔*Endocrinology*, 140, 1998 (1999)〕、骨芽細胞をグルココルチコイドで処理するとIGF - Iの発現を抑制する一方でIGFBP - 7の発現を上昇させること〔*Endocrinology*, 140, 228 (1999)〕、IGFBP - 7は骨格筋への分化にもIGFの分化促進作用を抑制することで影響していること〔*Exp. Cell Res.*, 237, 192 (1997)、*Endocrinology*, 141, 100 (2000)〕から、IGFBP - 7は骨代謝および骨格筋分化に関わる疾患にも関与すると考えられている。

従って、IGFBP遺伝子の発現量の増大、あるいはIGFBPの機能亢進が一因となっている疾患については、本発明の蛋白質をコードするDNAの転写量若しくは翻訳量を減少させることが疾患の予防および治療に有効である。またIGFBPに直接起因しない疾患であっても、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写量若しくは翻訳量を低下させる、または本発明の蛋白質の機能を抑制することにより対症療法的に上記疾患の予防または治療を行うこともできる。

また、IGFBPの発現増加が原因で受容体を介した生理作用が亢進している患者がいる場合、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を患者に投与することにより、該生理作用を抑制することができ、またIGFBPの発現増加が疾患の直接の原因でなくても本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体の投与により対症療法が可能な疾患に対して、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、有効な予防薬および治療薬となり得る。

該予防薬または治療薬を使用する方法としては、例えばアンチセンスRNA/DNA技術〔*BioScience & Industry*, 50, 322 (1992)、*Chem.*, 46, 681 (1991)、*Biotechnology*, 9, 358 (1992)、*Trends in Biotechnology*, 10, 87 (1992)、*Trends in Biotechnology*, 10, 152 (1992)、*細胞工学*, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔*Trends in Biotechnology*, 10, 132 (1992)〕、リボザイム技術〔*Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 274 (1999)、*FEMS Microbiology Reviews*, 23, 257 (1999)、*Frontiers in Bioscience*, 4, D497 (1999)、*Chemistry & Biology*, 6, R33 (1999)、*Nucleic Acids Research*, 26, 5237 (1998)、*Trends In Biotechnology*, 16, 438 (1998)〕、あるいはデコイDNA法〔*Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*, 56, 563 (1998)、*Circulation Research*, 82, 1023 (1998)、*Experimental Nephrology*, 5, 429 (19

10

20

30

40

50

97)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)]をあげることができ、該方法を用いることにより任意の遺伝子の発現を抑制することができる。

本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を上記予防薬および治療薬として使用する場合は、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、下記に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

レトロウイルス、アデノウイルス等のウイルスベクターやその他遺伝子治療用のベクターに組み込んだ遺伝子治療用ベクターを遺伝子治療薬または予防薬として用いるには、該遺伝子治療用ベクターと遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。本発明の遺伝子治療剤は、液体の場合はそのまま、個体の場合は必要により滅菌処理をした上記の基剤に遺伝子治療の直前に溶解して治療に使用することができる。本発明の遺伝子治療剤の投与方法としては、患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与方法をあげることができる。また、非ウイルス遺伝子移入法によっても目的とする治療部位にDNAを輸送することができる。

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法[*Virology*, 52, 456-467 (1973); *Science*, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5399-5403 (1980); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7380-7384 (1980); *Cell*, 27, 223-231 (1981); *Nature*, 294, 92-94 (1981)]、リポソームを介した膜融合-介在移入法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417 (1987);

Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); *J. Biol. Chem.*, 264, 12126-12129 (1989); *Hum. Gene Ther.*, 3, 267-275, (1992); *Science*, 249, 1285-1288 (1990); *Circulation*, 83, 2007-2011 (1992)]あるいは直接DNA取り込みおよび受容体-媒介DNA移入法[*Science*, 247, 1465-1468 (1990); *J. Biol. Chem.*, 266, 14338-14342 (1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3655-3659 (1991); *J. Biol. Chem.*, 264, 16985-16987 (1989); *BioTechniques*, 11, 474-485 (1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3410-3414 (1990); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4255-4259 (1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4033-4037 (1990); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8850-8854 (1991); *Hum. Gene Ther.*, 3, 147-154 (1991)]等をあげることができる。

リポソームを介した膜融合-介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込みおよび発現が可能であることが

10

20

30

40

50

腫瘍に関する研究において報告されている〔Hum. Gene Ther., 3, 399 (1992)〕。

(5) 本発明の蛋白質の発現量または機能が低下している疾患の予防および治療
 IGFBPの発現減少と疾患の関係については、骨粗鬆症ではIGFBP-5の発現が減少していること、腎摘出後や小腸切除後の代償性肥大ではIGFBP-3の発現低下に伴う遊離IGF-Iの増加がみられること〔Baillieres Clin. Endocrinol. Metab., 8, 165 (1994)〕、子宮内膜の悪性腫瘍ではIGFBP-1の発現が低下していること〔Growth Regul., 3, 74 (1993)〕、乳癌組織においてはヒト染色体上のIGFBP-7の遺伝子座に50%以上の頻度でLOHが観察され、IGFBP-7の発現の減少が見られること〔Oncogene, 16, 2459 (1996)〕、前立腺癌組織におけるIGFBP-7の発現のmRNAレベルでの減少、および悪性の前立腺癌由来細胞株においてIGFBP-7の発現が検出されないこと〔J. Clin. Endocrinol. Metab., 83, 4355 (1998)〕、大型の子宮平滑筋腫部位では、隣接する子宮平滑筋細胞や腫瘍容積が120 cm³以下の小さな子宮平滑筋に比べIGFBP-7のmRNAの発現が低下していること〔Am. J. Reprod. Immunol., 43, 53 (2000)〕、SV40T抗原で誘導されたマウス肝臓癌細胞では、IGFBP-7遺伝子の5'上流領域がメチル化され発現量が減少していること〔Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 109 (2000)〕、ストレプトゾトシン投与によるI型糖尿病モデルでは腎臓および血管障害部位でIGFBP-7の発現が低下していること〔Diabetes, 45, S111 (1996)、J. Diabetes & its Complications, 12, 252 (1998)〕、II型糖尿病患者の冠状動脈平滑筋細胞においてもIGFBP-7の発現低下が蛋白質レベルで観察されていること〔Diabetes, 46, 1627 (1997)〕、牛の動脈由来平滑筋細胞を高グルコース培地で培養するとIGFBP-7の発現量がmRNAおよび蛋白レベルで低下すること〔Diabetes, 46, 1627 (1997)、Diabetologia, 41, 134 (1998)〕、またIGFBP-7は血管壁でのPGI₂産生を刺激すること〔Nature, 271, 549 (1978)〕、および溶血性尿毒症症候群〔Lancet, 2, 871 (1978)〕、血栓性血小板減少性紫斑病〔Lancet, 2, 748 (1979)〕、鎌形赤血球性貧血症〔Br. J. Haematol., 48, 545 (1981)〕、急性心筋梗塞〔Coronary, 2, 49 (1985)〕、糖尿病性血管障害〔Metabolism, 38, 837 (1989)、Haemostasis, 16, 447 (1986)、Diab. Res. Clin. Pract., 3, 243 (1987)〕、動脈硬化性疾患において血中レベルが低下していること等が報告されている。

また、TGF- β 、PTHrP、PGE₂によってIGFBP-7の発現が上昇すること〔Endocrinology, 140, 1998 (1999)〕、骨芽細胞をグルココルチコイドで処理するとIGF-Iの発現を抑制する一方でIGFBP-7の発現を上昇させること〔Endocrinology, 140, 228 (1999)〕、IGFBP-7は骨格筋への分化にもIGFの分化促進作用を抑制することで影響していること〔Exp. Cell Res., 237, 192 (1997)、Endocrinology, 141, 100 (2000)〕から、IGFBP-7が骨代謝および骨格筋分化に関わる疾患にも関与すると考えられている。

IGFBP-7の発現が減少した前立腺癌細胞株にIGFBP-7を強制発現させると、細胞分裂時間の延長、軟寒天培地中でのコロニー形成能の低下、ヌードマウス移植時の腫瘍形成能の低下、薬剤処理によるアポトーシス誘導率の上昇すること〔Cancer Res., 59, 2370 (1999)〕、p53の機能が失われているオステオザルコーマ細胞株にIGFBP-7を強制発現させると、p53遺伝子を導入したときと同様に細胞株の増殖を抑制することができることから〔Oncogene, 12, 1361 (1996)〕、本発明のDNAおよび蛋白質の発現を増大させることで、IGFBPの発現減

少が関与する上記疾患を予防または治療できる。また I G F B P に直接起因しない疾患であっても、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写量若しくは翻訳量を増大させる、または本発明の蛋白質量を増大させることにより対症療法が可能な上記疾患の予防または治療を行うことも可能である。

従って、I G F B P の発現減少または機能低下により該蛋白質の生理作用が減退している患者がいる場合、本発明の D N A、オリゴヌクレオチドまたはその誘導體、あるいは本発明の蛋白質を患者に投与することにより、該生理作用を促進することができ、また I G F B P の発現減少、または機能低下が疾患の直接の原因でなくても対症療法が可能な疾患に対しては、本発明の D N A、オリゴヌクレオチドまたはその誘導體、あるいは本発明の蛋白質は、上記疾患の予防薬および治療薬として有用である。

10

該予防薬および治療薬の投与方法としては、例えば、本発明の蛋白質の発現低下や変異のために正常な生理作用が期待できない患者がいる場合に、(i) 本発明の蛋白質をコードする D N A を該患者に投与し発現させること (i i) 対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードする D N A を挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植すること、あるいは (i i i) 本発明の蛋白質を該患者に投与することなどによって、患者の体内における本発明の蛋白質の量を増加させ、該蛋白質の生理作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明の蛋白質をコードする D N A または本発明の蛋白質は、本発明の蛋白質の発現量または機能が低下した疾患、または該蛋白質の変異による機能異常に起因する疾患、あるいは本発明の蛋白質に直接起因しなくとも、本発明の蛋白質をコードする D N A、あるいは本発明の蛋白質の投与により対症療法的な治療が可能な疾患に対して安全で低毒性な予防薬および治療薬として有用である。

20

本発明の蛋白質をコードする D N A を上記予防薬および治療薬として使用する場合は、本発明の D N A を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記 (4) に記載した常法に従って製剤化、処方および投与することができる。

また、本発明の蛋白質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よく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。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。

30

投与経路は、治療に際し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。

40

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。

50

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、噴霧剤は該蛋白質そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該蛋白質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。該蛋白質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 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 8 \text{mg}/\text{kg}$ である。

(6) 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できる。

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、ヒトの脳組織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(7)に記載した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制御する物質のスクリーニング法に利用することができる。

(7) 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制御する物質のスクリーニング法

急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等の疾患は、IGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質が關与していると報告されている。

上記疾患の一因として、IGFBPをコードするDNAの転写量の変動、または本発明の蛋白質の機能変化が考えられ、この場合、本発明の蛋白質をコードするDNAの転写量若しくは翻訳量を制御することが疾患の予防および治療に有効である。またIGFBPに直接起因しない疾患であっても、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写量若しくは翻訳量を制御することにより対症療法的に上記疾患の予防または治療を行うことが可能である。

従って、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物から蛋白質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該蛋白質の発現を制御することにより、該蛋白質を介して発揮される細胞機能を制御することが可能であり、安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

該化合物は、以下(a)~(c)に示す方法により取得できる。

(a) [i] 本発明の蛋白質を発現する細胞と、[ii] 試験物質の存在下、本発明の蛋白質を発現する細胞を、上記2に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該蛋白質量を、上記(3)に記載した本発明の抗体を用いて測定、比較し、該蛋白質量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、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、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

10

20

30

40

50

(b) [i] 本発明の蛋白質を発現する細胞と、[ii] 被験物質の存在下、本発明の蛋白質を発現する細胞を、上記2に記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該蛋白質をコードするDNAの転写産物量を、上記(1)に記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定、比較し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

(c) 上記(6)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記2に記載の方法に準じて動物細胞に導入し、形質転換体を取得する。[i] 該形質転換体と、[ii] 被験物質の存在下、該形質転換体を、上記2に記載の培養法で2時間から1週間培養し、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を公知の方法〔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)、*Bio techniques*, 20, 914(1996)、*J. Antibiotics*, 49, 453(1996)、*Trends in Biochemical Sciences*, 20, 448(1995)、細胞工学, 16, 581(1997)〕を用いて測定、比較し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

(8) 本発明の蛋白質の機能を制御する物質のスクリーニング方法

急性骨髄性白血病、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌、骨髄腫、子宮平滑筋腫、悪性腫瘍、固形腫瘍等の異常な細胞増殖を伴う疾患、心筋梗塞、脳梗塞、末梢血管閉鎖症、狭心症、高血圧、高脂血症、糖尿病、糖尿病性網膜症、糸球体腎炎、動脈硬化、血栓、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、虚血性心疾患、虚血性脳疾患、心不全、うっ血、脈絡膜循環障害等の血管障害を伴う疾患、骨粗鬆症等の骨代謝の異常を伴う疾患、小人症、末端肥大症、小児慢性腎不全等のインスリン様増殖因子や成長ホルモン作用の障害を伴う疾患、動脈硬化、気管支疾患、再狭窄等の異常な平滑筋細胞の分化増殖を伴う疾患、重症筋無力症等の異常な骨格筋細胞の分化増殖を伴う疾患、胃潰瘍等の胃酸分泌の異常を伴う疾患、微生物感染、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、腎炎、外傷性脳損傷、炎症性腸疾患、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リンパ球浸潤を伴う炎症性の疾患等の疾患は、IGFBPスーパーファミリーに属する蛋白質が関与していると報告されている。

上記疾患の一因として、IGFBPの機能変化が考えられ、この場合、本発明の蛋白質の機能を阻害または亢進させることが該疾患の予防および治療に有効である。またIGFBPに直接起因しない疾患であっても、本発明の蛋白質の機能を阻害または亢進させることにより対症療法的に上記疾患の予防または治療を行うことができる。

よって、本発明の蛋白質の機能変化が原因で、細胞の生理作用が減退または亢進している患者がいる場合、本発明の機能を制御する化合物を投与することにより該生理作用を制御することができ、また本発明の蛋白質の機能変化が疾患の直接の原因でなくても本発明の蛋白質の機能を制御することで対症療法が可能疾患もまた、該化合物の投与により予防および治療できる。

該化合物は、例えば以下に示す方法により取得できる。

[i] 本発明の蛋白質を発現する細胞と、[ii] 被験物質の存在下、本発明の蛋白質を発現する細胞を、上記2に記載の培養法で2時間から1週間培養後、該蛋白質が機能することにより生じる細胞応答を検出、比較し、該蛋白質の機能を阻害または亢進させる活性を有する化合物を選択し取得する方法。

本発明の蛋白質が機能することにより生じる細胞応答を検出する方法としては、例えば、培地中に含まれるインスリンあるいはインスリン様増殖因子に依存的な細胞内情報伝達、遺伝子の転写、糖の取り込み、増殖などの変化を検出する公知の方法が挙げられる。また

10

20

30

40

50

、プロスタグランジン産生の変化を測定する公知の方法も挙げられる〔*Nature*, 263, 663 (1976)、臨床科学, 17, 958 (1981)〕。

(9) 本発明の蛋白質と特異的に結合する蛋白質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蛋白質は、本発明の蛋白質に起因する疾患の予防薬または治療薬の開発に利用することができる。例えば、本発明の蛋白質の受容体は、本発明の蛋白質と結合して、細胞内に情報を伝達し、生理作用を発現する機能を有しているため、該受容体の活性、または該受容体をコードする遺伝子の転写若しくは翻訳を制御する物質は、本発明の蛋白質、または本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写若しくは翻訳を制御する物質と同様、本発明の蛋白質の機能異常に起因する疾患の予防薬および治療薬として有用である。

10

本発明の蛋白質と特異的に結合する蛋白質をスクリーニングする方法としては、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、*Science*, 255, 989 (1992)等に記載の発現クローニングの方法を挙げることができ、本発明の蛋白質と被験試料を接触させたとき、本発明の蛋白質に特異的に結合する蛋白質を被験試料より選択することで取得できる。

具体的には、以下の方法があげられる。

組織よりcDNAを調製する。該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しcDNAライブラリーを作製する。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、組織で発現している遺伝子を発現する形質転換体を得る。標識した本発明の蛋白質が特異的に結合する蛋白質を産生する形質転換体を選択する。

20

選択した該形質転換体に導入したcDNAにコードされている遺伝子配列を決定することにより、本発明の蛋白質と特異的に結合する蛋白質を取得することができる。

cDNAライブラリーを調製する方法としては、上記1に記載した方法が挙げられる。

組換えベクターの導入方法、形質転換体を得る方法、および得られた形質転換体を培地に培養する方法としては、上記2に記載した方法が挙げられる。

放射性同位元素やビオチン化等公知の蛋白質を標識する方法で標識した本発明の蛋白質と形質転換体とを共培養することで、標識された本発明の蛋白質と特異的に結合する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択することができる。

選択した形質転換体に導入したcDNAを単離する方法としては、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、*Mol. Cell. Biol.*, 8, 2837 (1988)等に記載のファージベクターやプラスミドベクターを回収する方法あるいはHirt法を挙げることができる。

30

単離したcDNAの遺伝子配列を決定する方法としては、上記1に記載した方法が挙げられる。

(10) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に関与する疾患の予防薬および治療薬として有用である。

IGFBPの発現量の上昇と疾患の関係については、小児慢性腎不全はIGFBP-2や3の増加が原因であること〔*Electrolyte Metab.*, 18, 320 (1992)〕、副甲状腺ホルモンの上昇を伴う老人女性の骨折患者ではIGFBP-4の発現の上昇すること、白血病患者では脳脊髄液中のIGFBP-7およびIGFBP-3の濃度が上昇すること〔*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1361 (1996)〕、大腸癌では、大腸癌組織および大腸癌細胞株においてIGFBP-7の発現が上昇していること〔*J. Gastroenterology*, 33, 213 (1998)〕等が報告されている。

40

また、TGF- β 、PTHおよびPGE2によってIGFBP-7の発現が上昇すること〔*Endocrinology*, 140, 1998 (1999)〕、骨芽細胞をグルココルチコイドで処理するとIGF-Iの発現を抑制する一方でIGFBP-7の発現を上昇させること〔*Endocrinology*, 140, 228 (1999)〕、IGFBP

50

- 7は骨格筋への分化にもIGFの分化促進作用を抑制することで影響していること〔Exp. Cell Res., 237, 192 (1997)、Endocrinology, 141, 100 (2000)〕から、IGFBP-7が骨代謝および骨格筋分化に関わる疾患にも関与すると考えられている。

よって、IGFBPの発現量の増大、あるいは機能の亢進が一因である疾患に対しては、本発明の蛋白質の発現量を抑制する、あるいは機能を阻害することが疾患の予防および治療に有効である。またIGFBPに直接起因しない疾患であっても、本発明の蛋白質の発現量を抑制、あるいは機能を阻害することにより対症療法が可能な上記疾患の予防または治療を行うこともできる。

従って、IGFBPの発現量の増大、あるいは機能亢進が原因で、細胞の生理作用が亢進している患者がいる場合、本発明の蛋白質と結合する抗体を投与することにより該生理作用を抑制することができ、また本発明の蛋白質が疾患の直接の原因でなくても本発明の蛋白質の機能を抑制することで対症療法が可能な疾患もまた、本発明の抗体の投与により予防および治療できる。

該抗体を有効成分として含有する医薬は、上記(5)に記載した本発明の蛋白質を含有する医薬の製造に準じ、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供することができる。

(11)(7)の探索法で得られた化合物を含有する医薬

本発明の蛋白質をコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物から蛋白質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

(7)で得られた化合物は(5)に記載した本発明の蛋白質を含有する医薬の製造法に準じ、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供することができる。

(12)本発明のDNAを用いたノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含有してなる組換えベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ニワトリ等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化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。

また、染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子の任意の位置へ変異を導入することにより、ノックアウト非ヒト動物を作製することも可能である。例えば染色体上の本発明の蛋白質をコードする遺伝子の翻訳領域中へ塩基を置換、欠失、挿入等させて変異を導入することにより、その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ィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335, (1997)〕が知られている。

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。

発明を実施するための最良の形態

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。

[実施例1] ヒト神経前駆細胞NT-2由来cDNAライブラリーの作製

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞であって、レチノイン酸処理により神経細胞に分化可能なNT-2神経前駆細胞(Stratagene社より購入)を用いて以下の方法によりcDNAライブラリーを作製した。添付マニュアルに従って、NT-2細胞を培養後、レチノイン酸を添加して、さらに2週間培養した。その培養細胞を集めて、モレキュラー・クロニング第2版に記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、オリゴdTセルロースでpolyA(+)RNAを精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャプ法[Gene, 138, 171(1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-captainer(配列番号3で表される塩基配列を有するRNA)及びOligo-dT primer(配列番号4で表される塩基配列を有するDNA)を用いて文献[蛋白質核酸酵素, 41, 197(1996)、Gene, 200, 149(1997)]に記載の方法に従ってBAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)処理、TAP(Tobacco Acid Phosphatase)処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。

次いで、5'末端側のセンスプライマー(配列番号5で表される塩基配列を有するDNA)と3'末端側のアンチセンスプライマー(配列番号6で表される塩基配列を有するDNA)の2種のPCRプライマーを用いるPCR(polymerase chain reaction)により二本鎖cDNAに変換し、SfiIで切断した。なお、このPCRは市販のキットであるGeneAmp XL PCRキット(Perkin Elmer社製)を使用して、95℃で5分間熱処理後、95℃で1分間、58℃で1分間及び72℃で10分間の反応サイクルを12回繰り返す、その後4℃で保持することにより行った。次いで、DraIIIで切断したベクターpME18SFL3(GeneBank AB009864、発現ベクター、3392bp)にcDNAを一定方向で連結して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いてEscherichia coli DH10Bを形質転換することによりcDNAライブラリーを作製した。得られた形質転換体が保持する各々のプラスミドDNAについて、cDNAの5'端と3'端の塩基配列を、DNAシーケンシング試薬(Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit又はBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製)を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応を行った後、DNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)を用いて決定した。

[実施例2] IGFBPスーパーファミリーに属する新規因子の同定

作製したcDNAライブラリーの各クローンの塩基配列について、蛋白アミノ酸データベースSWISSPROTあるいは塩基配列データベースGenBankに登録されているIGFBPスーパーファミリーに属する既知蛋白質としてヒトIGFBP-1、ヒトIGFBP-2、ヒトIGFBP-3、ヒトIGFBP-4、ヒトIGFBP-5、ヒトIGFBP-6、ヒトIGFBP-7、ヒトIGFBP-8、ヒトIGFBP-9若しくはヒ

10

20

30

40

50

トIGFBP-10の10分子を用い、これら分子をコードする塩基配列と相同性を有するクローンC-NT2RI2004312を選択した。C-NT2RI2004312の塩基配列は配列番号2の塩基番号451~2881の塩基配列に相当し、塩基番号451~863の塩基配列部分はBLAST2を用いた相同性解析においてヒトIGFBP-7 (UniGene Hs.119206)とP値 6.0×10^{-14} で59%の有意な相同性を示した。

C-NT2RI2004312は5'部分が欠出した不完全長cDNAであったことから、C-NT2RI2004312の塩基配列をもとに、GenomeWalkerTMkits (Clontech社製)を用い添付のプロトコールに従い、C-NT2RI2004312の塩基配列を含むヒトゲノムDNA領域の塩基配列情報を取得した。取得した、C-NT2RI2004312の5'末端から36塩基部分の塩基配列(配列番号2の塩基番号451~486の塩基配列の部分)を含むクローンの塩基配列を配列番号7に示した。C-NT2RI2004312の5'末端から36塩基部分の塩基配列を含むゲノム領域の450塩基上流に開始コドンATGが、さらに28塩基上流付近にスプライシングのアクセプター配列であるAGが存在した。また、C-NT2RI2004312の5'末端から36塩基部分の塩基配列を含むゲノム領域直後にはスプライシングのドナー配列であるGTが存在することから、配列番号7の塩基番号9~494の塩基配列の部分は一つのエクソンを構成しており、C-NT2RI2004312の完全長cDNAの塩基配列は配列番号2に示す塩基配列であることが分かった。配列番号1にC-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列を示した。

C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列は、BLAST2を用いた相同性解析において、インスリン様増殖因子結合蛋白質ファミリーに属する蛋白質であるヒトIGFBP-7 (GenBankアクセッションナンバー: I52825)とP値 1.0×10^{-39} で39%の有意な相同性を示した。インスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーにおいては、IGF-1やIGF-2、インスリンとの結合に重要な10個のシステイン残基が存在し、そのうち4個のシステイン残基を含むインスリン様増殖因子結合モチーフ[GCGCCXC(G:グリシン残基、C:システイン残基、X:任意のアミノ酸残基)]を中心に、このファミリーに属する因子間で高く保存されている。C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列をインスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーの各因子と比較してみると、配列番号1で表されるアミノ酸配列においても、システイン残基の位置と数が保存されており、インスリン様増殖因子結合モチーフ部分も高く保存されていることが分かった(図1)。また、N末端側のシグナル配列も、C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質とインスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属する因子間で高く保存されていた(図1)。

以上の結果より、C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質がインスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属するヒト新規蛋白質であり、インスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリーに属する蛋白質としての活性を有することが明らかとなった。

配列番号2に示した塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenBank/EMBL/DDBJを、BLAST2を用いて検索したところ、機能が未知な遺伝子として登録されているUniGene Hs.21400と相同性が高いことが分かった。このHs.21400は他の遺伝子と有為な相同性を示さない32個のESTから構成されており、BLAST2を用いた相同性解析で配列番号2に示した塩基配列の3'部分とP値 8.5×10^{-103} 、相同性93%であった。また、配列番号2に示した塩基配列と同一遺伝子由来と考えられるヒトESTが一つ存在したが、このEST塩基配列はC-NT2RI2004312の完全長cDNAをカバーしていなかった。このESTのGeneBankアクセッションナンバーはAW129076である。

プラスミドC-NT2RI2004312を含む大腸菌: Escherichia coli DH10B/pME18SFL3-NT2RI2004312は、FERMBP

10

20

30

40

50

- 7473として、平成13年3月1日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地中央第6 郵便番号305-8566）（旧称経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所、旧住所 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。

[実施例3] C-NT2RI2004312の完全長cDNAの塩基配列の解析
配列番号2に示したC-NT2RI2004312の完全長cDNAの塩基配列をもとに、蛋白質の開始コドン予測プログラムATGPr[Bioinformatics, 14, 384(1998)]を用いて開始コドン周辺配列を解析した。配列番号2に示した塩基配列では、27~29番目に位置するATGが開始コドン、861~863番目に位置するTAGが終始コドンと特定され、ORFにコードされる蛋白質は278アミノ酸から構成されると推定された。配列番号1に示したC-NT2RI2004312の完全長cDNAのコードするアミノ酸配列をもとに、GENETYX-MAC 7.3(SOFTWARE DEVELOPMENT CO., LTD製)を用いて疎水性プロットを作製した結果、N末端部分には分泌蛋白質に特徴的な疎水性の高い領域が存在した。

10

[実施例4] C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする遺伝子のゲノム解析

配列番号2に示したC-NT2RI2004312の完全長cDNAの塩基配列をもとに、塩基配列データベースGenBank/EMBL/DDBJをBLAST2を用いて検索し、配列番号2で表される塩基配列を含むゲノムクローン(GenBankアクションナンバー:AL135785)の塩基配列情報を取得した。

20

取得したヒトゲノム遺伝子配列と配列番号2で表される塩基配列の比較から、配列番号2で表される塩基配列は6つの部分に別れて同一ヒト第9染色体p11-13.3のゲノム上に約18kbにわたって存在していることが分かった。

[実施例5] C-NT2RI2004312の完全長cDNAを発現している臓器
UniGene Hs.21400のNCBIに登録されているSAGEデータ(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>からのリンクデータ)を表1に示した。配列番号2に示したC-NT2RI2004312の完全長cDNAは、脳組織由来のcDNAライブラリーSAGE Duke 1273で高頻度存在し、脳組織に比較的選択的に発現していることが分かった。また、C-NT2RI2004312自身もレチノイン酸処理したNT-2神経前駆細胞より調製されたことから、脳組織における細胞増殖、細胞分化、組織再生に関わりの深い分子で有ることが推定された。

30

表 1

Hs.21400 : ESTs

SAGE library data and reliable tag summary:

Reliable tags found in SAGE libraries:

ATGTCACGAC

Library name	Tags per million	Tag counts	Total tags
SAGE Duke 1273	566	22	38836
SAGE Duke BB542			
normal cerebellum	24	1	40909
SAGE 293-CTRL	23	1	43442
SAGE Duke GBM H1110	14	1	70061
SAGE pooled GBM	48	3	61841
SAGE NHA(5th)	57	3	52196
SAGE normal pool(6th)	31	2	63064
SAGE Panc 96-6252	27	1	35745
SAGE OV1063-3	25	1	38938
SAGE Tu98	20	1	49005
SAGE Ped GBM1062	50	3	59935
SAGE Duke H341	89	4	44563
SAGE Duke 757	51	1	19503
SAGE normal cerebellum	45	2	44421
SAGE Duke H1043	13	1	76673

Number of SAGE libraries: 87

Total tags in all SAGE libraries: 3517661

[実施例 6] RT-PCR法を用いた C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 の由来遺伝子の発現解析

クロンテック社より購入したヒト臓器 poly A⁺ RNA 4 μg を鋳型とし、市販の SUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (ギブコ社製) を用い、添付マニュアルに従って cDNA を合成した。

ヒト臓器 poly A⁺ RNA としては、脳、下垂体、精巣、甲状腺、子宮、副腎、小脳、腎臓、膵臓、小腸、骨髄、心臓、肝臓、肺、リンパ節、乳腺、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、脊髄、脾臓、胃、胸腺、気管由来の poly A⁺ RNA を用いた。

次いで、合成した cDNA を鋳型とし、配列番号 8 および 9 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 10 および 11 で表される塩基配列を有する DNA をそれぞれプライマーセットとして、PCR を行った。PCR は、合成した cDNA を滅菌水を用いて 50 倍に希釈した溶液および Advantage^R cDNA PCR kit (クロンテック社製) を用いて常法により反応液を調製後、94 で 7 分間反応させ、次いで 94 で 1 分間、68 で 3 分間のサイクルを 32 サイクル反復し、最後に 68 で 7 分間反応させる条件で行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動し、それぞれのプライマーセットに特異的な DNA 断片の濃さを比較することで発現量の比較を行った結果、C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 は脳、下垂体、精巣、甲状腺、子宮で有意に高い発現が確認された。

なお、配列番号 8 および配列番号 9 で表される塩基配列からなる DNA を C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 に特異的なプライマーセットとして、配列番号 10 および配列番号 11 で

10

20

30

40

50

表される塩基配列からなるDNAをヒト アクチンに特異的なプライマーセットとして用いた。

[実施例7] C-NT2RI2004312の完全長cDNAの取得

(1) ヒト脳由来全一本鎖cDNAの調製

ヒト脳由来全RNA(クロンテック社製)を45 μ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase(Promega社製)1 μ l、付属の10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor(Promega社製)0.5 μ lをそれぞれに添加して、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy(QIAGEN社製)により全RNAを再精製し、50 μ lの滅菌水に溶解した。

10

得られた各々の全RNA 3 μ lに対しSUPERSCRIPTTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Life Technologies社製)を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとした20 μ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。PCRクローニングには該反応液の50倍希釈水溶液を使用した。使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

(2) C-NT2RI2004312の完全長cDNAの取得

(a) 5'末端側のcDNA断片の取得

上記(1)で作製したヒト脳由来一本鎖cDNAに対し、配列番号16および配列番号17で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。PCR反応は、ExTaq(宝酒造社製)を用いてヒト脳由来一本鎖cDNAを1 μ l含む25 μ lの反応液(ExTaq buffer、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l上記プライマーセット)を調製し、94 $^{\circ}$ Cで5分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ Cで1分、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間からなる反応を1サイクルとして30サイクル繰り返した後、さらに72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱する条件で行った。PCR終了後、反応液を1%アガロースゲル電気泳動に供し、約1100bpの増幅DNA断片をGENECLEAN SPIN Kit(BIO101)を用いて精製(以下、アガロースゲルからのDNA断片の精製にはこの方法を用いた。)し、滅菌水20 μ lで溶出した。該DNA断片9 μ lをLigation High(東洋紡)を用いた20 μ lの反応系でpGEM T vector(クロンテック社製)50ngとの連結反応を行い、該反応液2 μ lを用いて大腸菌DH5 α をコーエンらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110(1972)](以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた)により形質転換した。得られた複数のアンピシリン耐性コロニーから、公知の方法[Nucleic Acids Research, 7, 1513(1979)](以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた)に従って、プラスミドDNA(以下、pGEM-C-NT2RI2004312nと称す)を単離した。

20

30

(b) 3'末端側のcDNA断片の取得

上記(1)で作製したヒト脳由来一本鎖cDNAに対し、配列番号18および配列番号19で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いて、上記(2)(a)と同様にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。得られた増幅DNA断片をLigation Highを用いてpBluescript SK-のApaI-SacI断片と連結し、上記(2)(a)と同様の方法でプラスミドDNA(以下、pSK-C-NT2RI2004312cと称す)を単離した。

40

(c) 完全長cDNAの取得

上記(2)(a)で作製したpGEM-C-NT2RI2004312nのSacII-ApaI断片を、Ligation Highを用いて本項(2)(b)で作製したpSK-C-NT2RI2004312cのSacII-ApaI断片と連結し、上記(2)(a)と同様の方法でプラスミドDNA(以下、pSK-C-NT2RI2004312tと称す)を単離した。

インサートの有無は、アガロースゲル電気泳動によるサイズ比較により確認し、塩基配列

50

はDNAシーケンサー377(Perkin Elmer社)およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin Elmer社)を使用して添付のマニュアルに従い決定した。PCRに伴う塩基の読み誤りを除いた後、決定された塩基配列と配列番号2で表される塩基配列を比較し、該プラスミドに挿入されたDNAは、配列番号2で表されるC-NT2RI2004312の完全長cDNAと同じであることを確認した。

[実施例8] 動物細胞を宿主としたC-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質の発現

(1) 組換えベクターの作製

実施例7で取得されたクローンC-NT2RI2004312tを鋳型とし、配列番号12および配列番号13で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、または配列番号12および配列番号14で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてKOD DNA Polymerase(TOYOBO社製)を用いて常法により反応液を調製後、98で15秒間、65で2秒間、74で30秒間のサイクルを25サイクル繰り返す条件でPCRを行い、各々の反応にて約840bpの増幅DNA断片としてC-NT2RI2004312を得た。

次に該C-NT2RI2004312の5'側がpBluescript II SK-(Stratagene社製)のHindIII部位に、C-NT2RI2004312の3'側が、pBluescript II SK-のXhoI部位側になるように挿入することにより、配列番号12および配列番号13で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いたPCRにより得られたDNA断片を有するプラスミドであるpSK-C-NT2RI2004312、配列番号12および配列番号14で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いたPCRにより得られたDNA断片を有するプラスミドであるpSK-C-NT2RI2004312hを作製した。

次に、pSK-C-NT2RI2004312およびpSK-C-NT2RI2004312hのHindIII-KpnI断片(約830bp)を動物細胞用発現ベクターpcDNA3(インビトロジェン社製)のHindIII-KpnI部位に挿入し、pcDNA3-C-NT2RI2004312およびpcDNA3-C-NT2RI2004312hを作製した。

なお、配列番号12および配列番号14で表される塩基配列からなるDNAのプライマーセットは、C-NT2RI2004312のC末端にHisマーカールペプチドが付加されるように設計した。

(2) 細胞へのベクターの導入

Opti-MEM(ギブコ社製)100μlにFuGENETM6トランスフェクション試薬(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)2μlを加え、室温で5分間放置した。次いでコントロールプラスミドpcDNA3、上記(1)で作製したC-NT2RI2004312発現プラスミドpcDNA3-C-NT2RI2004312またはpcDNA3-C-NT2RI2004312hを1μg添加し、さらに室温で15分間放置した。この間に6ウェルプレートに10%FCSを含むDMEM培地(ギブコ社製)を2ml/ウェルとなるように分注し、さらにCOS-1細胞(Riken Cell Bank; RCB0143)を3×10⁵個/ウェルで播種した。15分間放置後、該プラスミドとFuGENETM6トランスフェクション試薬の混合液を25μl/ウェルずつ6ウェルプレートへ添加し、37のCO₂インキュベーター中で72時間培養し、一過性形質転換株を取得した。以下、pcDNA3、pcDNA3-C-NT2RI2004312、およびpcDNA3-C-NT2RI2004312hを各々導入して作製した形質転換株を、それぞれCOS-1/mock株、COS-1/C-NT2RI2004312株、およびCOS-1/C-NT2RI2004312h株と称する。

(3) 発現の確認

(a) 培養上清の調製

上記(2)で作製したCOS-1/mock株、COS-1/C-NT2RI20043

12株、およびCOS-1/C-NT2RI2004312h株の培養上清を4ml回収し、1,200rpmで5分間遠心分離して固形物を除去し、培養上清を取得した。なお、取得した培養上清は-20で保存し、必要に応じて解凍後、以下の実験に用いた。

(b) 細胞破碎液の取得

上記(2)で作製したCOS-1/mock株、COS-1/C-NT2RI2004312株、およびCOS-1/C-NT2RI2004312h株の細胞をセルスクレイパー(住友ベークライト社製)で6ウェルプレートから剥離後、Phosphate Buffered Saline (pH7.2)〔以下、「PBS」と称す(ギブコ社製)〕2mlに懸濁し、1,200rpmで5分間遠心分離して上清を除去した。次いで、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)100 μ lを含むPBS1mlに懸濁した後、超音波破碎することにより、細胞破碎液を取得した。なお、取得した細胞破碎液は-20で保存し、必要に応じて解凍後、以下の実験に用いた。

10

(c) ウェスタンブロッティングによる検出

上記(3)(a)で調製したCOS-1/mock株、COS-1/C-NT2RI2004312h株の培養上清10 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)にて分画後、常法に従い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(以下、「ブロッティング液」と称す)でブロッティング後、該膜に抗Hisモノクローナル抗体(口シュ・ダイアグノスティックス社製)を1 μ g/mlの濃度になるように添加し、室温で1時間放置した。該膜を0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート〔商品名:スパン20(ICI社商標Tween20相当品:和光純薬社製)〕/PBS(以下、「Tween-PBS」と略す)でよく洗浄した後、二次抗体として2,000倍希釈した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)を用いて検出した。

20

COS-1/C-NT2RI2004312h株の培養上清では、COS-1/mock株には観察されないバンドが検出された。従って、COS-1細胞において、C-NT2RI2004312がコードする蛋白質の発現が確認された(図2)。

[実施例9] C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質を認識するモノクローナル抗体の作製

30

(1) 抗原ペプチドの選択

C-NT2RI2004312の完全長cDNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1(配列番号15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。

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〔ヨーロピアン・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。

40

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

Arg: L-アルギニン

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

Gly: グリシン

His: L-ヒスチジン

Leu: L-ロイシン

Lys: L-リジン

50

Pro : L - プロリン

Thr : L - スレオニン

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。

Fmoc : 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル

tBu : t - ブチル

Trt : トリチル

Pmc : 2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルフォニル

Fmoc - Arg (Pmc) - OH : N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -

N^ε - 2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル - L - アルギニン

Fmoc - Asp (OtBu) - OH : N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - L - アスパラギン酸 - t - ブチルエステル 10

Fmoc - His (Trt) - OH : N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - Nⁱm - トリチル - L - システイン

Fmoc - Lys (Boc) - OH : N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - N - t - ブチルオキシカルボニル - L - リジン

Fmoc - Thr (tBu) - OH : N - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル - O - t - ブチル - L - スレオニン

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。

HBTU : 2 - (1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート 20

HOBT : N - ヒドロキシベンゾトリアゾール

DIEA : ジイソプロピルエチルアミン

DMF : N , N - ジメチルホルムアミド

TFA : トリフルオロ酢酸

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法により行った。アミノ酸分析は、コーエン (Cohen , S . A .) らの方法 [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 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。 30

(2) 化合物1 (配列番号15で表されるアミノ酸配列からなるペプチドAc - Arg - Ala - Arg - His - Thr - Pro - Arg - Ala - His - Pro - Gly - His - Leu - His - Lys - Ala - Arg - Asp - Gly - Pro - Cys - OH) の合成

Fmoc - Cys (Trt) 、 22 . 8 μmol が結合した担体樹脂 [H - Cys (Trt) - 2 - ClTrt 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、600 μl のDMFを加えて3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 500 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。 40

(b) 担体樹脂を600 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 - Pro - OH (228 μmol) 、 HBTU (228 μmol) 、 HOBT 1水和物 (228 μmol) およびDIEA (684 μmol) をDMF (1 . 12 ml) 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600 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。

上記の工程により、Fmoc - Pro - Cys (Trt) を担体上に合成した。 50

次に、(a)(b)の工程の後、(c)の工程でFmoc-Gly-OHを用いて縮合反応を行い、(d)の洗浄工程を経て、Fmoc-Gly-Pro-Cys(Trt)を担体上に合成した。

以下、工程(c)において、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-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、ブ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。次に得られた担体樹脂に対し次の(e)~(g)の操作を行った。

(e)担体樹脂を800 μ lのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

(f)無水酢酸(456 μ mol)及びDMF(500 μ l)を樹脂に加えて混合物を2時間攪拌し、溶液を排出した。

(g)担体樹脂を800 μ lのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を3回繰り返した。

この後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、N末端がアセチル化された側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1mlを加えて室温で8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66.6mgを取得した。この粗生成物全量を酢酸水溶液に溶解後、逆相カラム(資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. X 250mm)を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物1を23.0mg得た。

質量分析[FA BMS]; m/z = 2413.0 (M + H⁺)

アミノ酸分析; Asx 1.0(1), Gly 2.0(2), His 4.3(4), Arg 3.8(4), Thr 1.0(1), Ala 2.9(3), Pro 2.9(3), Leu 1.0(1), Lys 1.0(1), Cys 1.3(1)

(3) 免疫原の調製

実施例9(2)で得られた化合物1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10mg/mlに調整し、1/10容量の25mg/ml MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)succinimide; ナカライテスク社]を滴下して30分攪拌反応させた。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG-25カラムなどのゲルろ過カラムでフリーのMBSを除いて得られたKLH-MBS 2.5mgを0.1mol/lリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)に溶解したペプチド1mgと混合し、室温で3時間、攪拌反応した。反応後、PBSで透析したペプチドを免疫原として用いた。

(4) 動物の免疫と抗体産生細胞の調整

実施例9(3)で調製した化合物1のKLHコンジュゲート100 μ gを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） 1×10^9 細胞とともに6週令雌Balb/cマウス3匹に投与した。投与2週間後より、KLHコンジュゲート $100 \mu\text{g}$ を1週間に1回、計4回投与した。該マウスの眼底静脈叢より採血し、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にKLHコンジュゲート $100 \mu\text{g}$ を最終免疫し、その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（ $\text{pH} 7.6$ ）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。

（5）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9（2）で得られた化合物1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を用いた。作製方法は実施例9（3）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穴の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 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{l}/\text{穴}$ で分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%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 $100 \mu\text{l}/\text{穴}$ 加え、室温で1時間放置し、残っている活性基をブロックした。

放置後、1% BSA/PBSを捨て、該プレートに一次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマ培養上清を $50 \mu\text{l}/\text{穴}$ で分注し、2時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGグロブリン（ダコ社）を $50 \mu\text{l}/\text{穴}$ で加えて室温、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、 $1 \text{mmol}/\text{L}$ ABTS/ $0.1 \text{mol}/\text{L}$ クエン酸バッファー（ $\text{pH} 4.2$ ）〕を添加し、発色させOD 415nm の吸光度をプレートリーダー（Emax；Molecular Devices社）を用いて測定した。

（6）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P3-X63Ag8U.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 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

（7）ハイブリドーマの作製

実施例9（4）で得られたマウス脾細胞と実施例9（6）で得られた骨髄腫細胞とを10：1になるよう混合し、遠心分離（ $250 \times g$ 、5分間）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1000（PEG-1000）1g、MEM培地1mlおよびジメチルスルホキシド0.35mlの混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり0.5ml加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。

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（インビトロジェン社製）を加えた培地〕100ml中に懸濁した。該懸濁液を96穴培養用プレートに $200 \mu\text{l}/\text{穴}$ ずつ分注し、5%CO₂ インキュベーター中、37℃で10~14日間培養した。

培養後、培養上清を実施例9（5）に記載した酵素免疫測定法で調べ、化合物1に反応して陰性対照化合物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C-NT2RI2004312モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株KM3103を確立した。

10

20

30

40

50

抗C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2モノクローナル抗体KM3103を産生するハイブリドーマ細胞株は、平成14年3月26日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6：郵便番号305-8566）にFERM BP-7977として寄託されている。

(8) 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9(7)で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8ml/匹)した。

該腹水を遠心分離(1200×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法により決定した。図3に示すようにKM3103のサブクラスはIgG1であった。

(9) モノクローナル抗体の反応性の検討(バインディングELISA)

実施例9(5)に示した方法に従って行なった。ただし、1次抗体には実施例9(8)で得られたKM3103を10μg/mlから10倍希釈で5段階に希釈したものをを用いた。結果を図4に示す。KM3103は濃度依存的に化合物1に特異的な反応性を示した。

[実施例10] モノクローナル抗体KM3103を用いたC - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質のウエスタンブロッティングによる検出

実施例8で調製したCOS-1/mock株、COS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2株、およびCOS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 h株の培養上清10μl、または細胞破砕液2.5μlを、実施例8(3)(c)の記載に従い、検出抗体として実施例9で取得したモノクローナル抗体KM3103を用いてウエスタンブロッティングを行った。

抗C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2モノクローナル抗体KM3103は、実施例8に記載したCOS-1細胞で発現させたC - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質を特異的に認識することが分かった(図5)。

[実施例11] C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質の癌細胞増殖に及ぼす効果

C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質の癌細胞増殖への作用を調べるため、実施例8(3)(a)で取得したCOS-1/mock株、COS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2株、およびCOS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 h株の培養上清を用い、ヒト大腸癌細胞株HT-29(ATCC HTB-38)のIGF依存的な増殖に与える影響を以下のように検討した。

ウシ血清アルブミン(ギブコ社製)200μg/ml、ヒトトランスフェリン(ギブコ社製)10μg/mlを添加したD - M E M / F - 1 2培地(ギブコ社製)中に 1×10^5 個/mlに調製したHT-29細胞を、96ウェルプレートに50μl/wellずつ播種し、37のCO₂インキュベーター中で3時間培養した。次いで、ヒトIGF-I(Peprotech社製)、またはヒトIGF-II(Peprotech社製)をそれぞれ10ng/mlとなるように添加した。続いてCOS-1/mock株、COS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2株、またはCOS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 h株の培養上清を5μl/wellずつ添加して、さらに37のCO₂インキュベーター中で5日間培養した後、生細胞数をCell Proliferation Reagent WST-1(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)により測定した。

COS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2株およびCOS-1/C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2 h株の培養上清を加えた試験区では、ヒト大腸癌細胞株HT-29細胞のIGF依存的な増殖を有意に阻害することが示された(図6)。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、新規インスリン様増殖因子結合蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質を認識する抗体、および該蛋白質が関与する疾患の判定法、診断薬、予防薬および治療薬が提供できる。

配列表フリーテキスト

配列番号 3 - 人工配列の説明：合成RNA

配列番号 4 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 5 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 6 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 8 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 9 - 人工配列の説明：合成DNA

10

配列番号 10 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 11 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 12 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 13 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 14 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15 - 人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号 16 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 18 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19 - 人工配列の説明：合成DNA

20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

Helix Research Institute

<120> Novel IGFBP proteins

10

<130> K5-A0102P

<150> JP 2001-104766

<151> 2001-04-03

20

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

30

<211> 278

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Arg Leu Ser Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

40

1 5 10 15

Pro Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Ser Leu Gly Ile Arg Asp Val Gly

20 25 30

Gly Arg Arg Pro Lys Cys Gly Pro Cys Arg Pro Glu Gly Cys Pro Ala
 35 40 45
 Pro Ala Pro Cys Pro Ala Pro Gly Ile Ser Ala Leu Asp Glu Cys Gly
 50 55 60
 Cys Cys Ala Arg Cys Leu Gly Ala Glu Gly Ala Ser Cys Gly Gly Arg
 65 70 75 80
 Ala Gly Gly Arg Cys Gly Pro Gly Leu Val Cys Ala Ser Gln Ala Ala
 85 90 95
 Gly Ala Ala Pro Glu Gly Thr Gly Leu Cys Val Cys Ala Gln Arg Gly
 100 105 110
 Thr Val Cys Gly Ser Asp Gly Arg Ser Tyr Pro Ser Val Cys Ala Leu
 115 120 125
 Arg Leu Arg Ala Arg His Thr Pro Arg Ala His Pro Gly His Leu His
 130 135 140
 Lys Ala Arg Asp Gly Pro Cys Glu Phe Ala Pro Val Val Val Val Pro
 145 150 155 160
 Pro Arg Ser Val His Asn Val Thr Gly Ala Gln Val Gly Leu Ser Cys
 165 170 175
 Glu Val Arg Ala Val Pro Thr Pro Val Ile Thr Trp Arg Lys Val Thr
 180 185 190
 Lys Ser Pro Glu Gly Thr Gln Ala Leu Glu Glu Leu Pro Gly Asp His
 195 200 205
 Val Asn Ile Ala Val Gln Val Arg Gly Gly Pro Ser Asp His Glu Ala
 210 215 220
 Thr Ala Trp Ile Leu Ile Asn Pro Leu Arg Lys Glu Asp Glu Gly Val
 225 230 235 240

10

20

30

40

Tyr Gln Cys His Ala Ala Asn Met Val Gly Glu Ala Glu Ser His Ser

245

250

255

Thr Val Thr Val Leu Asp Leu Ser Lys Tyr Arg Ser Phe His Phe Pro

260

265

270

Ala Pro Asp Asp Arg Met

275

10

<210> 2

<211> 2881

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(860)

<400> 2

30

gcgcccgcgc tgtcccggag caagcc atg ccg cgc ttg tct ctg ctc ttg ccg 53

Met Pro Arg Leu Ser Leu Leu Leu Pro

1

5

ctg ctg ctt ctg ctg ctg ctg ccg ctg ctg ccg ccg ctg tcc ccg agc 101

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Ser

40

10

15

20

25

ctt ggg atc cgc gac gtg ggc ggc cgg cgc ccc aag tgt ggt ccg tgc 149

Leu Gly Ile Arg Asp Val Gly Gly Arg Arg Pro Lys Cys Gly Pro Cys

	30	35	40	
cgg cca gag ggc tgc ccg gcg cct gcg ccc tgc ccg gcg ccc ggg atc				197
Arg Pro Glu Gly Cys Pro Ala Pro Ala Pro Cys Pro Ala Pro Gly Ile				
	45	50	55	
tcg gcg ctc gac gag tgc ggc tgc tgc gcc cgc tgc ctg gga gcc gag				245
Ser Ala Leu Asp Glu Cys Gly Cys Cys Ala Arg Cys Leu Gly Ala Glu				10
	60	65	70	
ggc gcg agc tgc ggg ggc cgc gcc ggc ggg cgc tgt ggc ccc ggc ctg				293
Gly Ala Ser Cys Gly Gly Arg Ala Gly Gly Arg Cys Gly Pro Gly Leu				
	75	80	85	
gta tgc geg agc cag gcc gct ggg gca gcg ccc gag ggc acc ggg ctc				341
Val Cys Ala Ser Gln Ala Ala Gly Ala Ala Pro Glu Gly Thr Gly Leu				20
	90	95	100	105
tgc gtg tgc gcg cag cgc ggc acc gtc tgc ggc tcc gac ggt cgc teg				389
Cys Val Cys Ala Gln Arg Gly Thr Val Cys Gly Ser Asp Gly Arg Ser				
	110	115	120	
tae ccc age gtc tgc gcg ctg cgc ctg cgc gct cgg cac acg ccc cgc				437
Tyr Pro Ser Val Cys Ala Leu Arg Leu Arg Ala Arg His Thr Pro Arg				30
	125	130	135	
gcg cac ccc ggt cac ctg cac aag gcg cgc gac ggc cct tgc gag ttc				485
Ala His Pro Gly His Leu His Lys Ala Arg Asp Gly Pro Cys Glu Phe				
	140	145	150	
gct cct gtg gtc gtc gtt cct ccc cga agt gtt cac aac gtc acc ggg				533
Ala Pro Val Val Val Val Pro Pro Arg Ser Val His Asn Val Thr Gly				40
	155	160	165	
gcg cag gtg ggc ctg tcc tgt gaa gtg agg gct gtg cct acc cca gtc				581

Ala Gln Val Gly Leu Ser Cys Glu Val Arg Ala Val Pro Thr Pro Val
170 175 180 185
atc acg tgg aga aag gtc acg aag tcc cct gag ggc acc caa gca ctg 629
Ile Thr Trp Arg Lys Val Thr Lys Ser Pro Glu Gly Thr Gln Ala Leu
190 195 200
gag gag ctg cct ggg gac cat gtc aat ata gct gtc caa gtg cga ggg 677 10
Glu Glu Leu Pro Gly Asp His Val Asn Ile Ala Val Gln Val Arg Gly
205 210 215
ggc cct tct gac cat gag gcc acg gcc tgg att ttg atc aac ccc ctg 725
Gly Pro Ser Asp His Glu Ala Thr Ala Trp Ile Leu Ile Asn Pro Leu
220 225 230
cga aag gag gat gag ggt gtg tac cag tgc cat gca gcc aac atg gtg 773 20
Arg Lys Glu Asp Glu Gly Val Tyr Gln Cys His Ala Ala Asn Met Val
235 240 245
gga gag gct gag tcc cac agc aca gtg acg gtt cta gat ctg agt aaa 821
Gly Glu Ala Glu Ser His Ser Thr Val Thr Val Leu Asp Leu Ser Lys
250 255 260 265
tac agg agc ttc cac ttc cca gct ccc gat gac cgc atg tga 863 30
Tyr Arg Ser Phe His Phe Pro Ala Pro Asp Asp Arg Met
270 275
tggagaaatg gtgtagaaa cattgatcat gggatgatgg aaaagtcaaa taacggatct 923
ttgtgcttca tgaagagttg gaaaacctgt gtgtgtagat gaccctttt gtgtgttttt 983
aaaaattaga tgcaaaactag attgtatgc agatgtagtt tttagcaggg caaacagtga 1043 40
gaaacggatt tgcattgtgc tttttatac ttttgaaatg aattgttcca tgagaagtct 1103
ttttgtaatt actctettcc aggagatca cagaatggca tgtttgcatt ttcgaaaggg 1163
ctcgtgtcag ctgtgactct ttacctcatt tgtctatgac ctattagtgg tgctctgtga 1223

cttagtgtgt gttgtagaag gagggatgag ggtcccagct gtcctctgce tgactgtaac 1283
 ttgctgtgtg acctgaacag gtgecttccc ctctctgggc cctggteect tcctctgtga 1343
 gtatggcatt ttaactggat gttatcaatg tccccttttag cctgcccac ctagagtaag 1403
 atggcctttt gggaaaataa caggaagtgt ggtcttagtg ttctttctaa aatggtatte 1463
 cctcagaaac aaattccatt gctttacccc agcgtgtgga cagctggctg tagctcttct 1523
 attcetaact ttttcccctt gaaggagatt tagtttttagg tgggatgctt taccagactc 1583
 aggagcgcct tggetgggtc tttggagacc agagcateca tttgttagcc tagcattete 1643
 ttttttaaaa ttttattttg agacagggtc tcgctetate acccaggctg gagtgcagtg 1703
 gcgtgatcat ggctcactgc aacctccact ttctgggctc gagtgatect tccacctcag 1763
 ggteactctc aaactatgta aaggcagatg ttgccaatcc acaggcttca gggactctta 1823
 tcaagactca tcccactttt taaggcacac tttcacaccg ctacattgt gcattacatt 1883
 ttggagtect tgttggaagt gaactttccg cctgtaagcc tgccattcea tgtctaaaat 1943
 attgggatgg catcaccttc tgtactatgc agcagaagga gactggcctg ggattctgga 2003
 aacatgagat ccatttgcac attaatcccc ggctcgtctg gtgacctga gcaagtctcc 2063
 tteactttct gtgcctcagt gtccttattt gagtaaaaag ggaataaaac tagatgagtg 2123
 gttttcaaac tttaaaacac tggaagctct ctttgaaaac aaaagatgag aattgaaatg 2183
 gatggcactg gaagctgttc ttgtctactg gggtttgag ctgccagggg acctgctcac 2243
 atccactect cactcagecc ctcccgcctc tcccttctcc acgcaactgtg actgacttcc 2303
 atgtgtgaga gcctgcagtt aattctctg tgtcttgaat ggttgggaga tgagttggte 2363
 agacccttag tgaaatgatg tggaaggaa caggaatgct gtggctctga agaaggtagt 2423
 agaacatccc acacctgcta ataagcacat tttgcaaac cagttgactc acctcagatt 2483
 tgctagtga aaactgaagg gctggatgta gaccagaga gcagggtgga cagagcccat 2543
 gctggaagta ctgagcatca ggactgtatg gggctggctt tagcatcate attctgtgca 2603
 aagacaaata aataattaat gtcacactgt ctgaaatttt caccaaaacc aaaaagcgc 2663
 attaacatga ttgttccaac ctcatggtt ttcaagtgtg agcgcceaga gacctcttca 2723
 gaggctaaga gagcatgcgc tgccacagct gttagcattt ggagacgtaa ttacaatgcc 2783

10

20

30

40

cccactcccc gcaccaaacc tgggtttttc taccgttttt gtagatgtca tgatgtcacg 2843
 acccctgcac cctgaaaaaa ataaatgttt ttaaggac 2881

<210> 3

<211> 30

10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic RNA

20

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg 30

<210> 4

<211> 42

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

40

<400> 4

gggctgaag acggcctatg tggecttttt tttttttttt tt 42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

10

<400> 5

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 6

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

30

<400> 6

gcggetgaag acgacctatg t

21

<210> 7

40

<211> 540

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

aagcagaggc gccgccgctg tcccggagca agccatgccg cgcttgtctc tgctcttgcc 60      10
gtgtgtgctt ctgtgtctgc tgcgctgct gccgccgctg tcccagagcc ttgggateccg 120
cgacgtgggc ggccggcgcc ccaagtgtgg tccgtgccgg ccagaggget gcccgcgcc 180
tgcgccctgc ccggcgcccc ggatctcggc gctcgacgag tgcgctgct gcgcccgctg 240
cctgggagcc gagggcgcca gctgcggggg ccgcgccggc gggcgctgtg gccccgceet 300
ggtatgcgcg agccaggccg ctggggcagc gcccgagggc accgggctct gcgtgtgcgc 360
gcagcgcggc accgtctgcg gctccgacgg tcgctcgtac cccagcgtct gcgcgctgcg 420      20
cctgcgcgct cggcacacgc cccgcgcgca ccccggteac ctgcacaagg cgcgcgacgg 480
cccttgcgag ttcggtgagt cagggtcggg gattgggtgg gtagagaagg agggatteca 540

```

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA 40

<400> 8

tgccccgag caagccatgc cgcgcttgtc 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 9

atgcaaatcc gtttctcact gtttgcctg

30

20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 10

cctcgcttt gcegatec

18

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 11

ggatcttcat gagtagtca gtc

23

20

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 12

aaaaagcttg ccaccatgcc gcgcttgtct ctgctc

36

40

<210> 13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

10

<400> 13

tttctgcagc tcgagttatc acatgcgggc atcgggagc 39

<210> 14

<211> 72

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

30

<400> 14

tttctgcagc tcgagttatc agtgcgggtg atggatgatc ttatcgtcat cgtccatgcg 60

gtcatcggga gc 72

40

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic peptide

<400> 15

10

Arg Ala Arg His Thr Pro Arg Ala His Pro Gly His Leu His Lys Ala

1

5

10

15

Arg Asp Gly Pro Cys

20

20

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 16

tgtcccggag caagccatgc cgcgcttgtc

30

40

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

10

<400> 17

tggtcagaag ggccccctcg cact

24

<210> 18

<211> 24

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

30

<400> 18

agtgcgaggg ggcccttctg acca

24

<210> 19

40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : synthetic DNA

<400> 19

ctcggggtca tctacacaca ca

22

【図面の簡単な説明】

10

図1は、C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質とIGFBPファミリー因子とのアミノ酸配列の比較を示す図である。なお、図中のIGFBP - 1、IGFBP - 2、IGFBP - 3、IGFBP - 4、IGFBP - 5、IGFBP - 6、IGFBP - 7は、それぞれヒトIGFBP - 1、ヒトIGFBP - 2、ヒトIGFBP - 3、ヒトIGFBP - 4、ヒトIGFBP - 5、ヒトIGFBP - 6、ヒトIGFBP - 7を指す。また、C - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2の完全長cDNAがコードする蛋白質とインスリン様増殖因子結合蛋白質スーパーファミリー間で保存されているアミノ酸配列を白抜きで示し、ファミリー間で高く保存されているシステイン残基に*印を記した。図2は、COS - 1細胞を宿主としたC - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2がコードする蛋白質の発現を示す写真である。m o c kは対照を表す。

20

図3は、サブクラスタイピングキットを用いたELISA法によるモノクローナル抗体KM3103のサブクラスを示す図である。左カラムがP3 - U1、右カラムがモノクローナル抗体KM3103の結果を示す。各カラムは左から、全サブクラス、G1、G2a、G2b、G3、Mを認識する抗体を用いた試験区を示す。

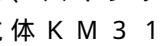

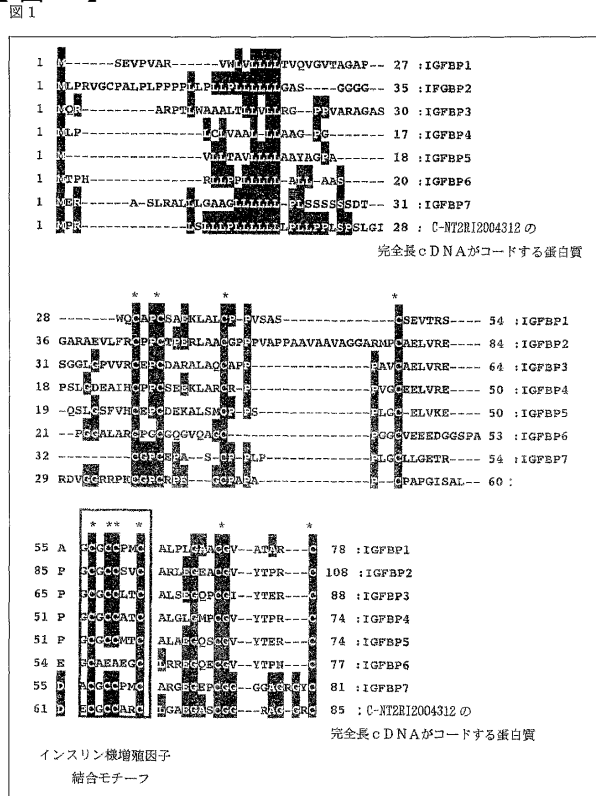
図4は、バインディングELISAによりモノクローナル抗体KM3103とモノクローナル抗体KM3103の抗原ペプチドとの反応性を示す図である。図中、は化合物1を加えた試験区を、はコントロール化合物を加えた試験区を示す。

図5は、KM3103を用いたウエスタンブロッティングによるC - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2がコードする蛋白質の検出を示す写真である。m o c kは対照を表す。

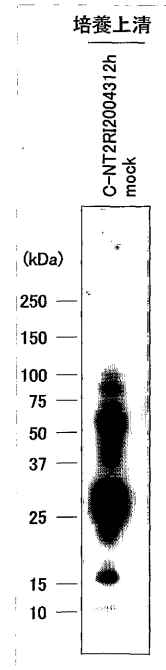
図6は、HT - 29細胞のIGF依存的な増殖に及ぼすC - N T 2 R I 2 0 0 4 3 1 2がコードするタンパク質の影響を示す図である。m o c kは対照を表す。

30

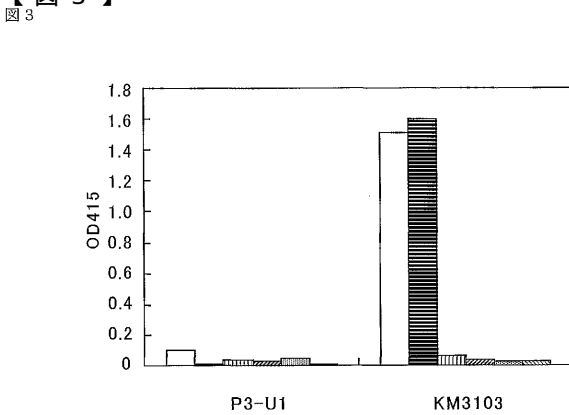
【 図 1 】



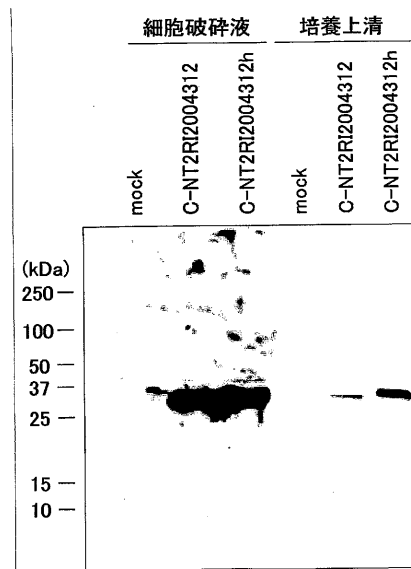
【 図 2 】



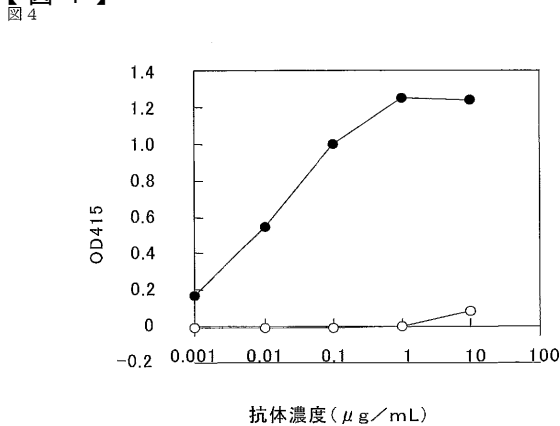
【 図 3 】



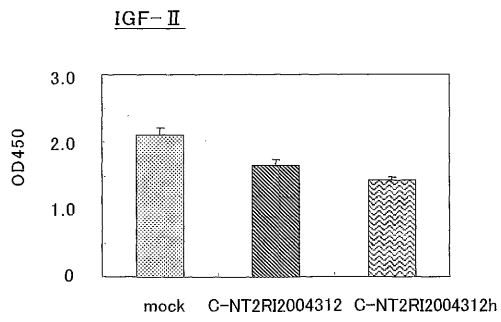
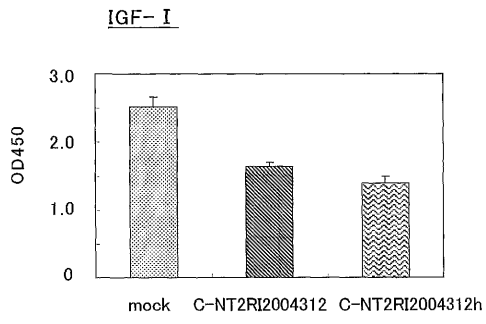
【 図 5 】



【 図 4 】



【 6 】
6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/03343
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/18, C12Q1/68, G01N33/53, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, A01K67/027 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/18, C12Q1/68, G01N33/53, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, A01K67/027 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01/94416 A2 (Curagen Corp.), 13 December, 2001 (13.12.01), (Family: none)	1-35, 40, 42-43
P, X	WO 01/75067 A2 (Hyseq, Inc.), 11 October, 2001 (11.10.01), & AU 4925101 A	1-35, 40, 42-43
P, X	WO 01/75064 A2 (Hyseq, Inc.), 11 October, 2001 (11.10.01), & AU 5521401 A	1-35, 40, 42-43
A	WO 94/29448 A1 (NAMATA, Hajime), 22 December, 1994 (22.12.94), & JP 7-132095 A	1-35, 40, 42-43
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 July, 2002 (02.07.02)		Date of mailing of the international search report 23 July, 2002 (23.07.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03343

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 36-39, 41
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/03343Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1)

The compound as set forth in claim 36 and the drugs as set forth in claims 37 to 39 and 41 are specified by the "screening method described in any of claims 33 to 35" and thus involve any compounds and drugs obtained by the screening methods.

However, the description provides no specific compound or drug obtained by the screening methods. Thus, the compound as set forth in claim 36 and the drugs as set forth in claims 37 to 39 and 41 are neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized what specific compounds are involved in the scopes thereof and what are not. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner.

Such being the case, no meaningful search can be made on the inventions as set forth in the above claims.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/03343
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/18, C12Q1/68, G01N33/53, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, A01K67/027		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/18, C12Q1/68, G01N33/53, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, C12Q1/02, A01K67/027		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO 01/94416 A2 (CURAGEN CORPORATION) 2001. 12. 13. (ファミリーなし)	1-35, 40, 42-43
PX	WO 01/75067 A2 (HYSEQ, INC.) 2001. 10. 11 & AU 4925101 A	1-35, 40, 42-43
PX	WO 01/75064 A2 (HYSEQ, INC.) 2001. 10. 11 & AU 5521401 A	1-35, 40, 42-43
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日目の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.07.02	国際調査報告の発送日 23.07.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本前 夏子	4N 9637
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/03343
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 94/29448 A1 (NAWATA, Hajime) 1994. 12. 22 & JP 7-132095 A	1-35, 40, 42-43

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/03343
<p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き) 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 36-39, 41 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 特別ページ参照</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き) 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の前付と共に出願人から異議申立てがあった。 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の前付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/03343

請求の範囲36に記載の化合物及び請求の範囲37-39, 41に記載の医薬は「請求の範囲33-35のいずれかに記載のスクリーニング方法」によって特定されており、当該スクリーニング方法で得られるあらゆる化合物及び医薬を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法で得られる化合物及び医薬としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲36に記載の化合物及び請求の範囲37-39, 41に記載の医薬は明細書による裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることはできない。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 5/06	A 6 1 P 5/06	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 5/00	C
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 佐藤 光男

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 中川 智

東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内

- (72)発明者 若松 愛
千葉県木更津市高柳1473-4-202
- (72)発明者 杉山 友康
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 入江 亮太郎
千葉県木更津市請西1-25-13-103
- (72)発明者 磯貝 隆夫
茨城県稲敷郡阿見町大室511-12
- (72)発明者 永井 啓一
東京都東大和市桜が丘3-44-14-9-204
- (72)発明者 小林 有己
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 古谷 安希子
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 山口 弘之
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和 醗 酵工業株式会社 東京研究所内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	胰岛素样生长因子结合蛋白		
公开(公告)号	JPWO2002081515A1	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002579900	申请日	2002-04-03
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	榊原敏弘 関根進 佐藤光男 中川智 若松愛 杉山友康 入江亮太郎 磯貝隆夫 永井啓一 小林有己 古谷安希子 山口弘之		
发明人	榊原 敏弘 関根 進 佐藤 光男 中川 智 若松 愛 杉山 友康 入江 亮太郎 磯貝 隆夫 永井 啓一 小林 有己 古谷 安希子 山口 弘之		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K38/00 A61K38/30 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/06 A61P7/02 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/18 C12N15/02 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/74 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/30 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/06 A61P7/02 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/4743 G01N33/68 G01N33/74		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/06 A61P7/02 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.C A61K37/02 C12P21/08		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001104766 2001-04-03 JP		

摘要(译)

通过使用本发明的蛋白质，编码该蛋白质的DNA和识别该蛋白质的抗体，用于确定与本发明的蛋白质有关的疾病的方法以及用于与本发明的蛋白质有关的疾病的诊断剂或预防剂 并且可以提供治疗剂。

