

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5373407号  
(P5373407)

(45) 発行日 平成25年12月18日(2013.12.18)

(24) 登録日 平成25年9月27日(2013.9.27)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C07K</b>	<b>16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/18
<b>G01N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D
<b>C12N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>A61K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D
<b>A61P</b>	<b>35/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-558153 (P2008-558153)	(73) 特許権者	598138051
(86) (22) 出願日	平成20年2月15日 (2008.2.15)		李 鎮彪
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/052551		東京都世田谷区成城5-6-7
(87) 国際公開番号	W02008/099928	(73) 特許権者	598138062
(87) 国際公開日	平成20年8月21日 (2008.8.21)		金 薫
審査請求日	平成23年2月15日 (2011.2.15)		東京都世田谷区成城5-6-7
(31) 優先権主張番号	特願2007-36567 (P2007-36567)	(74) 代理人	110000523
(32) 優先日	平成19年2月16日 (2007.2.16)		アクシス国際特許業務法人
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100127133
			弁理士 小板橋 浩之
		(72) 発明者	李 鎮彪
			東京都世田谷区成城5-6-7
		(72) 発明者	金 薫
			東京都世田谷区成城5-6-7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質分解酵素活性を調節する作用を有する胎盤蛋白質及びその関連遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号6で表されるペプチドのN末端の8アミノ酸配列 (Ser - Ser - Leu - Leu - Glu - Lys - Gly - Leu) に対する特異的抗体。

【請求項2】

請求項1に記載の特異的抗体を含んでなる、細胞浸潤能阻害剤。

【請求項3】

請求項1に記載の特異的抗体を使用して、

配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとを、等モルずつ含んでなる多量体である、19kDa蛋白質を、検出する方法。

【請求項4】

請求項1に記載の特異的抗体を使用して、

配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとを、等モルずつ含んでなる多量体である、19kDa蛋白質を、単離する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質分解酵素活性を調節する作用を有する蛋白質又はその特異的抗体を含

む、周産期疾患、癌、神経疾患、炎症疾患、免疫疾患、心血管疾患、内分泌疾患、ウイルス感染症、細菌感染症及びプリオン病からなる群より選択される疾患の治療用、予防用又は診断用医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

現在までに報告されている蛋白質分解酵素は、セリン・スレオニンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ等のプロテアーゼファミリー等に分類され、それらのプロテアーゼファミリーを構成する共通の蛋白質モチーフ構造を持つことを特徴とする。しかしながら、それらの蛋白質モチーフ構造を持たず、蛋白質分解酵素活性、他の蛋白質分解酵素の酵素活性を調節する活性、細胞浸潤能を調節する活性及び平滑筋弛緩・収縮を調節する活性を有する蛋白質分解酵素は未だに報告されていない。

10

本発明者らはヒト胎盤組織よりオキシトシン受容体作用物質を抽出、精製、単離してその部分アミノ酸構造を決定し(特許文献1、特許文献2、非特許文献1)、さらに、当該蛋白質の遺伝子の構造を決定し(特許文献3、非特許文献1)、ヒト妊娠末期胎盤にその遺伝子のスプライスバリエーションが存在することを示した(非特許文献1)。本発明者らは当該蛋白質の生理作用を探究し、子宮平滑筋を弛緩させる作用があること(特許文献3)、また蛋白質分解酵素活性があること(特許文献4、非特許文献1)を開示した。しかしながら、当該蛋白質が他の蛋白質分解酵素の活性を調節する活性を有し種々の疾患の治療、予防、診断に有用であること、細胞浸潤能を調節する活性を有し癌等の治療に有用であること、さらには、子宮平滑筋を弛緩のみならず収縮する活性、すなわち、広く子宮平滑筋の機能を調節する活性を有し種々の周産期疾患の治療、予防、診断に有用であることは示されていない。

20

【0003】

【特許文献1】特開2000-095797号公報

【特許文献2】特開2003-226699号公報

【特許文献3】特開2005-210901号公報

【特許文献4】特開2004-344156号公報

【非特許文献1】J.P. Lee Motoyama (Shizuo Motoyama), H. Kim-Motoyama (Kaoru Motoyama), P. Kim, H. Nakagama, K. Miyagawa, K. Suzuki, Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 357 (2007) p. 828-833

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、本発明は、既知の蛋白質モチーフ構造を有さず、蛋白質分解酵素活性、他の蛋白質分解酵素の酵素活性を調節する活性、細胞浸潤能を調節する活性及び平滑筋弛緩・収縮を調節する活性を有する蛋白質を含む医薬組成物であって、これにより種々の疾患の治療、予防、診断を可能とする新たな医薬組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

40

【0005】

本願発明者らは、既知の蛋白質モチーフ構造を有さない蛋白質について、他の蛋白質分解酵素の酵素活性を調節する活性、細胞浸潤能を調節する活性及び平滑筋弛緩・収縮を調節する活性を有するという驚くべき特性を見出し、これにより種々の疾患の治療、予防、診断を可能とする新たな蛋白質の治療、予防及び診断用医薬組成物を完成するに至った。

【0006】

即ち、本発明は、配列表1の蛋白質又はその特異的抗体を含む、蛋白質分解酵素活性調節剤、細胞浸潤能調節剤又は平滑筋弛緩・収縮調節剤を提供する。

また、本発明は、配列表1の蛋白質をコードする配列表2の遺伝子又はそのスプライスバリエーションである配列表3若しくは配列表4の遺伝子を含む、蛋白質分解酵素活性調節用

50

、細胞浸潤能調節用又は平滑筋弛緩・収縮調節用組換えベクターを提供する。

さらに、本発明は、配列表 1 の蛋白質又はその特異的抗体を含む、周産期疾患、不妊症、癌、神経疾患、炎症疾患、免疫疾患、心血管疾患、内分泌疾患、ウイルス感染症、細菌感染症及びプリオン病からなる群より選択される疾患の治療用、予防用又は診断用医薬組成物を提供する。

また、本発明は、配列表 1 の蛋白質をコードする配列表 2 の遺伝子又はそのスプライスバリエントである配列表 3 若しくは配列表 4 の遺伝子を含む、周産期疾患、不妊症、癌、神経疾患、炎症疾患、免疫疾患、心血管疾患、内分泌疾患、ウイルス感染症、細菌感染症及びプリオン病からなる群より選択される疾患の治療用、予防用又は診断用組換えベクターを提供する。

10

【発明の効果】

【0007】

本発明の蛋白質の蛋白質分解酵素活性、他の蛋白質分解酵素の酵素活性を調節する活性、細胞浸潤能を調節する活性及び平滑筋弛緩・収縮を調節する活性に基づき、これを含む医薬組成物による不育症、流産、早産、子宮内胎児発育不全、子宮内胎児死亡、妊娠中毒症、子癇等の周産期疾患；不妊症；発癌、癌の浸潤、転移；神経疾患；炎症疾患；免疫疾患；動脈硬化症のような心血管疾患；糖尿病のような内分泌疾患；ウイルス感染症、細菌感染症、プリオン病等の感染疾患を含む種々の疾患に対する治療用、予防用、診断用医薬組成物を提供することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0008】

本発明の蛋白質分解酵素活性調節剤、細胞浸潤能調節剤、平滑筋弛緩・収縮調節剤又は治療用、予防用若しくは診断用医薬組成物に含まれる蛋白質は、妊娠期間中の胎盤、羊膜、脱落膜、あるいは胎盤を還流する母体因子、例えば、白血球等の母体血球成分、一例を挙げれば母体単球・リンパ球に由来するものであってもよいが、そのいずれに由来するかは問わない。同様に、当該蛋白質の由来は、妊娠期間に限らず、脳・神経組織、腫瘍組織、炎症組織等のヒトのいかなる組織由来であるか、または生理的状态または病理的状态のいかなる組織に由来するものであるかは問わない。さらに、当該蛋白質の由来がヒト以外のいかなる種由来である場合も本願発明に包含される。

【0009】

30

本発明において、配列表 1 の蛋白質の特異的抗体とは、配列表 1 の蛋白質に特異的に反応する抗体を意味する。調製した抗体が配列表 1 の蛋白質に特異的に反応するか否かは、ウェスタンブロット法、ELISA法等の当業界で常用されるアッセイ法により容易に確認することができる。

本発明の組換えベクターは、配列表 1 の蛋白質をコードする配列表 2 の遺伝子又はそのスプライスバリエントである配列表 3 若しくは配列表 4 の遺伝子を、当業界で通常用いられるベクターに、制限酵素処理又は T A クローニング等の当業界で通常行われるクローニングすることにより容易に調製することができる。

本発明の蛋白質によってその活性が調節される蛋白質分解酵素は、いずれの蛋白質分解酵素であってもよい。また、蛋白質分解酵素活性調節とは、蛋白質分解酵素の酵素活性を亢進し又は減弱する作用を意味する。同様に、細胞浸潤能調節とは、細胞浸潤能を亢進し又は減弱する作用を意味し、平滑筋弛緩・収縮調節とは平滑筋を収縮し又は弛緩する作用を意味する。平滑筋はいずれの平滑筋であってもよいが、好ましくは、子宮平滑筋である。

40

【0010】

本発明において治療とは、疾患又は病気の状態を完治又は部分的に改善することを意味する。同様に、予防とは、疾患又は病気の状態の発生を事前に防ぐことのみならず、さらなる疾患又は病気の状態の進展を防ぐことをも意味する。また、本発明において診断とは、疾患又は病気の状態を判定することを意味する。

【0011】

50

蛋白質分解酵素は、組織再構築、蛋白質前駆体の活性化、胚形成、胎盤着床機構をはじめ、様々な生理作用に深く関与すると考えられている。同時に、発癌、癌の浸潤、転移機構あるいは、関節炎、歯周炎を含めた炎症性疾患、妊娠中毒症、流早産等の周産期疾患、不妊症をはじめとする様々な疾患の病態生理とも深く関わっていることが示されている。

蛋白質分解酵素は、単に蛋白質を分解するだけでなく、生体において様々な機能性蛋白質の一部を加水分解により切断することでその機能を調節し、多岐にわたる生体機能の制御に関与する。一例を挙げれば、血液凝固線溶系の前駆体蛋白質活性化カスケードにおける前駆体蛋白質の蛋白質分解酵素による活性化があり、また、DNAの複製、細胞周期、細胞増殖、アポトーシス、細胞分化・脱分化、細胞の移動・浸潤等の重要な細胞機能の制御に蛋白質分解酵素活性が関与することが示唆されている。

10

#### 【0012】

細胞外微小環境において大部分の蛋白質分解酵素は細胞表面、細胞近傍の細胞外基質領域に局限して存在する。細胞外に分泌された蛋白質分解酵素はこれらの傍細胞領域において細胞増殖因子、ホルモン、サイトカイン、受容体蛋白質、又はインテグリン等の機能性蛋白質の一部を加水分解により切断することで修飾し、その機能を調節する。細胞表面では蛋白質分解酵素は精密なネットワークを形成してこれら細胞表面又は細胞膜の機能性蛋白質の機能を調節し、さらにその情報を細胞内へ伝達することで細胞外環境の変化に対応した様々な細胞の機能を制御していることが明らかにされている。

蛋白質分解酵素活性により制御される細胞機能は多岐にわたるが、一例として細胞の浸潤能の調節が挙げられる。癌細胞、絨毛細胞の浸潤においては、細胞は、浸潤していく領域の細胞外基質蛋白質を蛋白質分解酵素活性により逐次分解するのみならず、様々な細胞の挙動、例えば細胞増殖、細胞に対する免疫細胞の攻撃又はアポトーシスからの回避、細胞運動、血管新生等を、細胞表面又は近傍領域の蛋白質分解酵素活性により制御することによって、はじめて周囲組織への細胞浸潤を成立させることができる。

20

#### 【0013】

細胞の浸潤能は、癌細胞の浸潤・転移、神経細胞の可塑性、創傷治癒機構、炎症反応、免疫応答、血管新生等の様々な生体の生理機能、あるいは多岐にわたる疾患の病態生理と深く関わる。一方で胎盤絨毛細胞の浸潤能は妊娠維持のメカニズムに不可欠のものである。絨毛細胞は子宮脱落膜、筋層へと浸潤し、さらには母体血管内膜へ浸潤することにより胎盤が形成され、胎盤内の母体血液循環が確立される。上述のとおり、癌細胞の浸潤と絨毛細胞の浸潤は多くの点で共通の分子メカニズムを持つ。しかしながら、癌細胞が無秩序な細胞浸潤を特徴とすることに対し、絨毛細胞の浸潤は時間的には主に妊娠初期に、空間的には母体子宮筋層近位1/3までに局限される特徴を有する。妊娠中の絨毛細胞の浸潤は厳密に制御されなくてはならず、絨毛細胞の浸潤が抑制されると様々な疾患、一例を挙げれば、子宮内胎児発育不全、妊娠中毒症・子癇、その他、不妊症、不育症、流・早産、子宮内胎児死亡等の病因となる。他方、絨毛細胞の浸潤能の亢進は高い転移能を特徴とする絨毛細胞腫の病因となる。絨毛細胞の浸潤能が妊娠・分娩の分子メカニズムと同時に、不育症、流・早産、子宮内胎児発育不全・胎児死亡、妊娠中毒症・子癇等の周産期疾患、不妊症の病態生理また絨毛細胞腫の発癌、転移等のメカニズムと深くかかわることが明らかにされている。

30

40

#### 【0014】

蛋白質分解酵素活性により制御される細胞の機能として、浸潤能以外にも、平滑筋収縮、弛緩の分子調節機能が挙げられる。妊娠の維持、分娩の完遂には絨毛細胞の浸潤能の制御とともに、子宮平滑筋の弛緩、収縮状態の精緻なコントロールが不可欠である。受精・着床からはじまり、胎芽・胎児の発育にあわせて子宮は増大するが、妊娠期間中その排出を促す子宮筋収縮は抑制され、子宮平滑筋は一定のトーンスを保ちながら弛緩状態を維持しなくてはならない。一方で、過度の子宮筋収縮は流産、早産の病因となる。同時に過度の子宮筋収縮は胎盤血流の減少をもたらす、胎児低酸素血症による胎児脳機能障害の原因となり得るとともに、脳性まひ、胎児仮死、子宮内胎児死亡等の病因となる。また、分娩の発来とともに子宮平滑筋は規則的な収縮を開始するが、この子宮収縮は一定時間内に胎

50

児を子宮外へ排出するために十分に強くない反面、過度の子宮筋収縮は、胎盤血流の減少による胎児低酸素血症、胎児脳機能障害ひいては胎児仮死、子宮内胎児死亡に帰結する危険性を有するため、厳格に制御されなくてはならない。他方、分娩時の子宮筋収縮の抑制は遷延分娩等による胎児仮死、子宮内胎児死亡の病因になり得る。また分娩発来の遅延も胎盤機能不全等により、胎児仮死、子宮内胎児死亡の病因となる。上述のとおり、子宮平滑筋の弛緩、収縮状態の精緻なコントロールが妊娠の維持、分娩の完遂に不可欠であり、その異常は流産、早産、胎児仮死、子宮内胎児死亡、脳性まひ、不育症等の周産期疾患や不妊症の病因となる。

#### 【 0 0 1 5 】

子宮平滑筋弛緩・収縮の分子機構には未だ不明の点が多い。一例として、子宮平滑筋収縮とオキシトシンとの関係が挙げられる。オキシトシンは1950年代に発見された下垂体後葉ホルモンで強力な子宮筋収縮作用を有し、オキシトシン製剤は臨床上も分娩誘発、分娩誘導に広く用いられている。妊娠末期、分娩発来時期にむけて子宮筋オキシトシン受容体の発現が急増することが報告され、分娩発来、分娩期の子宮収縮とオキシトシンが深く関わっていることが示唆されている。一方で、オキシトシンのノックアウトマウスにおいて分娩発来を含めて、妊娠・分娩経過また胎児発育にまったく異常が見られないという報告もある。オキシトシンと分娩発来、分娩期の子宮収縮との関係には未だ不明な点が多い。他方、妊娠期間中の子宮平滑筋の弛緩の分子機構も不明な点が多く、子宮筋弛緩の破綻が病因となる早産の予知及びその予防と治療は、周産期管理の最も大きな問題の一つとなっている。

子宮平滑筋収縮、弛緩の分子機構には、オキシトシンの傍分泌機序又は内分泌機序による液性因子とその子宮筋受容体が関与する以外に、子宮平滑筋細胞膜上あるいはその近傍領域の蛋白質分解酵素活性による受容体蛋白質又はそのリガンドの修飾が関わる場合があることが知られている。

#### 【 0 0 1 6 】

このように、蛋白質分解酵素活性は生体において様々な機能性蛋白質の一部を加水分解により切断することによりその機能を調節し、実に多種多様な生体機能の制御に関与する。蛋白質分解酵素活性により調節される生体機能は、例として示した細胞浸潤能、平滑筋収縮・弛緩活性以外にも、細胞増殖、アポトーシス、血管新生、細胞運動、免疫反応、炎症反応、創傷治癒、神経細胞の可塑性等多岐にわたる。

そのため、蛋白質分解酵素活性は、様々な疾患の病態と深く結びついている。蛋白質分解酵素活性が癌細胞の浸潤と関係することは上述のとおりであり、また発癌機構、癌の転移機構とも密接に関わっている。その他、蛋白質分解酵素活性は炎症疾患、免疫疾患、神経疾患、動脈硬化症を含めた心・血管疾患、糖尿病等の内分泌疾患、ウイルス・細菌、プリオン病等の感染症の病態生理とも深く関わることが知られている。

#### 【 0 0 1 7 】

さらに、蛋白質分解酵素活性は先に述べたように妊娠関連疾患とも密接に関わっている。すなわち、蛋白質分解酵素活性と妊娠関連疾患との関わりの一例は、先に述べた絨毛細胞浸潤機構の破綻に起因する不育症、流・早産、子宮内胎児発育不全・胎児死亡、妊娠中毒症・子癇等の周産期疾患、不妊症及び絨毛細胞腫等であり、また蛋白質分解酵素による子宮平滑筋細胞の収縮、弛緩活性又はその破綻に起因する流産、早産、胎児仮死、子宮内胎児死亡、脳性まひ等の周産期疾患、不妊・不育症等である。

#### 【 0 0 1 8 】

蛋白質分解酵素活性と妊娠関連疾患の病因との密接な関わりはその他にも数多くの報告がなされており、妊娠中毒症・子癇等が挙げられる。妊娠中毒症・子癇は母体死亡、胎児死亡に結びつく重篤な周産期疾患であるが、蛋白質分解酵素活性とその病因との関係がいくつかが報告されている。絨毛細胞浸潤の抑制を病態生理の一つとする妊娠中毒症・子癇の発症、そして絨毛細胞浸潤と蛋白質分解酵素との関わりは先に述べたとおりであるが、その他の例として、胎盤絨毛合体細胞層外層の微絨毛に存在する蛋白質分解酵素活性が、妊娠中毒症・子癇の病態と深く関わるという報告がある。絨毛合体細胞層は母体血液、

10

20

30

40

50

胎児・胎盤の境界面に位置し、その微絨毛は一部が剥離して母体循環系へ流入する。この微絨毛に存在する蛋白質分解酵素活性が妊娠中毒症・子癇の母体側の症状である高血圧、蛋白尿、浮腫の成因になるという報告があるが、未だに当該蛋白質分解酵素は特定されていない。その他、蛋白質分解酵素活性と妊娠中毒症・子癇の病因との関係として絨毛膜上の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体の例を挙げることができる。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体は絨毛細胞上でその細胞外領域(sFln1)が蛋白質分解酵素により切断されて母体循環系へ流入し、妊娠中毒症、子癇の発症につながるというものである。当該蛋白質分解酵素の詳細は十分には明らかにされていない。

#### 【0019】

上述のとおり、蛋白質分解酵素活性は多種多様な疾患の病態生理と関わるということが明らかとなっており、その蛋白質分解酵素活性を調節する物質により、当該蛋白質分解酵素活性が関与する疾患の特異的な治療薬、予防薬、診断薬を開発することが可能となる。またある蛋白質分解酵素活性が病態生理に直接関与しない疾患においても、その疾患の病態に直接関与する蛋白質の機能が当該蛋白質分解酵素活性により調節される場合には、当該蛋白質分解酵素を調節する物質によりその疾患の特異的な治療薬、予防薬、診断薬を開発することが可能となる。

しかしながら、蛋白質分解酵素が、単に蛋白質を分解するだけではなく、生体において様々な機能性蛋白質の一部分を加水分解により切断することによりその機能を調節し、多岐にわたる生体機能の制御及び種々の疾患の病態生理に深くかかわることが明らかになっている反面、その分子メカニズムには未だ不明の点も多く残される。一例を挙げると、細胞表面、その近傍の細胞外基質領域におけるマトリックスメタロプロテアーゼ前駆体の蛋白質分解酵素による活性化のメカニズム、またマトリックスメタロプロテアーゼと細胞の浸潤能をはじめとした細胞機能との関わりはいまだ詳細が明らかでない点も多い。さらに一例を挙げると血液凝固線溶系の前駆体蛋白質活性化カスケードにおける前駆体蛋白質の蛋白質分解酵素による活性化のメカニズムにも未解明の点が残る。同時に、蛋白質分解酵素活性が関わる極めて多岐にわたる生体の機能、又は様々な疾患の病態生理の中には既知の蛋白質分解酵素活性のみではその分子メカニズムを説明しきれない場合も多く存在する。

#### 【0020】

従って、既知の蛋白質モチーフ構造を有さず、他の蛋白質分解酵素の酵素活性を調節する活性、細胞浸潤能を調節する活性及び平滑筋弛緩・収縮を調節する活性を有するという驚くべき特性を有する本発明の配列表1の蛋白質又はその特異的抗体を含む医薬組成物は、周産期疾患、不妊症、癌、神経疾患、炎症疾患(例えば、大腸炎、関節炎及び創傷治療)、免疫疾患、心血管疾患(例えば、動脈硬化)、内分泌疾患(例えば、糖尿病)、ウイルス感染症(例えば、HIV及びカポジ肉腫)、細菌感染症又はプリオン病の治療、予防又は診断に用いることができる。好ましくは、上記の周産期疾患は、不育症、流産、早産、子宮内胎児発育不全、子宮内胎児死亡、妊娠中毒症、子癇である。上記の癌は、固形腫瘍であるか非固形腫瘍であるかを問わずいずれの癌、腫瘍又は肉腫であってもよい。

#### 【0021】

本発明の配列表1の蛋白質又はその特異的抗体を含む医薬組成物は、好ましくは、不育症、流産、早産、子宮内胎児発育不全、子宮内胎児死亡、妊娠中毒症、子癇、不妊症、癌、ウイルス感染症、細菌感染症からなる群より選択される疾患の治療、予防又は診断に用いられる。

配列表1の蛋白質をコードする配列表2の遺伝子又はそのスプライスバリエーションである配列表3若しくは配列表4の遺伝子を含むベクターは、周産期疾患、不妊症、癌、神経疾患、炎症疾患、免疫疾患、内分泌疾患、ウイルス感染症、細菌感染症及びプリオン病からなる群より選択される疾患の治療、予防又は診断に用いることができるが、好ましくは、不育症、流産、早産、子宮内胎児発育不全、子宮内胎児死亡、妊娠中毒症、子癇、不妊症、癌、ウイルス感染症、細菌感染症からなる群より選択される疾患の治療、予防又は診断に用いられる。

10

20

30

40

50

## 【0022】

当業者は理解するように、標的組織で当該遺伝子の発現を達成する多数の方法が存在し、任意の適当な方法を使用することができる。例えば、当該遺伝子をウイルスベクターの中に組込むことができ、このようなウイルスベクターの例は、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、又はワクシニア若しくは他のポックスウイルス（例えば、トリポックスウイルス）であるが、これらに限定されない。このようなベクターの中に遺伝子を組込む技術は、当業者によく知られている。レトロウイルスのベクターは、選択可能なマーカーの遺伝子及び/又は標的部分、例えば、特異的標的組織を構成する細胞上のレセプターのリガンドをコードする遺伝子をさらに組込んで、ベクター標的を特異的にすることができる。また、標的化は、当業界において知られる方法により、例えば、抗体を使用して達成することができる。当該遺伝子を含むベクターは、当該ベクターを注射、吸入、塗布等で標的組織に注入するか、又は患者自身の血球等の細胞を一度取り出し、体外でベクターを導入してから、患者に戻すことにより、上述の疾患の治療、予防又は診断に用いることができる。当該ベクターの例としては、ウイルスベクターが挙げられる。診断用ベクターとして用いる際には、配列表2の遺伝子又はそのスプライスバリエーションである配列表3若しくは配列表4の遺伝子の配列の一部を標識してもよい。当該標識としては、例えば、放射性同位元素による標識等が挙げられる。

10

## 【0023】

本発明の医薬組成物、組換えベクター、調節剤は、それぞれ単独で用いてもよいし、又は本発明の他の活性物質と組み合わせて用いてもよく、必要であれば、他の薬理学的な活性を有する活性物質と組み合わせて用いてもよい。

20

医薬組成物を含む製剤として適切なものの例としては、液剤、特に注入用（皮下投与（s.c.）、静脈内投与（i.v.）、筋肉内投与（i.m.））及び点滴用の液剤又は乳剤が挙げられるが、これらに限定されない。注射用及び点滴用の液剤は、通常の方法、例えば、等張剤、p-ヒドロキシベンゾアートのような保存料、又はエチレンジアミン四酢酸のアルカリ金属塩のような安定剤を添加し、必要に応じて乳化剤及び/又は分散剤を用いてもよい。また、水を希釈剤として用いる場合には、例えば、有機溶媒を溶媒和剤又は溶解剤として用い、注射バイアル又はアンプル又は点滴ボトルへ移して調製してもよい。

当該製剤は、通常の方法により、好ましくは皮下投与（s.c.）、静脈内投与（i.v.）、筋肉内投与（i.m.）により投与される。投与量は、体重、投与経路、当該活性物質に対する個々の反応性、当該活性物質を投与する時間又は間隔に応じて適切に選択されるが、当該製剤中の本発明の蛋白質の投与量は、概して患者の体重1kgあたり約100 $\mu$ g~50mgの範囲である。適当な投与体積は患者の体型等に依存するが、典型的には約0.1mL~約10mLの範囲である。

30

## 【実施例1】

## 【0024】

（本発明の蛋白質の精製及び同定）

本発明の蛋白質は、本発明者らがヒト胎盤で特定した新規オキシトシン受容体作用物質（特開2000-095797号公報）である。本発明の蛋白質のヒト妊娠末期胎盤組織からの単離、精製、アミノ酸配列の決定は、特開2003-226699号公報の実施例1~7、非特許文献1と同一の手法を用いた。要約すると、ヒト満期正常経膣分娩後に得られた胎盤（湿重量約500g）を直ちに液体窒素にて凍結後粉碎し、4倍量の水（95）にて10分間抽出した。さらに酢酸を終濃度1Nで添加し、ポリトロンホモジェナイザーにてホモジェナイズした後、終濃度80%のアセトンを加え、遠心分離により得られた上清画分を濃縮して粗抽出物とした。当該粗抽出物を、オキシトシンのラジオリセプターアッセーを活性の指標として分取用逆相HPLC、陽イオン交換HPLCを用いて精製することで280nmの吸光度に一致する単一の活性フラクションを得た。当該活性フラクションをさらに逆相HPLCで分離し、4箇所活性フラクションを得た。その中で最も疎水性の強いフラクションより、常法に準じてアミノ酸配列の決定を行うことにより配列表5および配列表6に示した本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列を得た。なお、当該活性フ

40

50

ラクシンのプロテインシーケンサーによる解析では、各サイクルで、配列表5および配列表6の2配列のアミノ酸残基が等モルずつ回収された。また、オキシトシンのラジオリセプターアッセーは、特開2000-095797号公報の実施例1に示した方法で行った。すなわち、ヒト妊娠末期子宮筋組織より調製した粗膜分画を用い、オキシトシン受容体結合の特異性・選択性が高く、比放射活性にも優れる<sup>125</sup>I-オルニチンバソトシアナログ(<sup>125</sup>I-OVTA)を標識リガンドとした常法に準ずるインビトロでのラジオリセプターアッセーを行い、精製の各ステップでの活性の指標とした。結果として配列表1に示すアミノ酸配列を有する本発明の蛋白質が同定された。免疫組織染色は本発明者らが作製した本発明の蛋白質に対する特異的抗体を用いた。特異的抗体としてウサギでポリクロナール抗体を作製し、免疫原には本発明で開示した部分アミノ酸配列のうち配列表6で表わされるペプチドのN末端の8アミノ酸配列を化学合成したペプチドを用いた。コントロール染色には、免疫原として蛋白質データベース上に存在しない8アミノ酸配列(GSGNQKGL)を化学合成したペプチドを用いたウサギポリクロナール抗体を作製し使用した。それぞれの抗原ペプチドには、ウシサイログロブリンをキャリア蛋白として結合させ、常法に準じてウサギを免疫した。抗体精製に際し、ウサギ血清IgG画分をさらに免疫原に用いたペプチドを結合させたカラムによりアフィニティー精製することで、終濃度0.108 mg/mL(コントロール抗体は0.448 mg/mL)の高力価な特異的抗体が得られた。特異的抗体による免疫組織染色の結果、本発明の蛋白質が、妊娠初期胎盤絨毛において合胞体細胞層表層に局在することが明らかとなった(図1)。絨毛合胞体細胞層は母体、胎児の境界に位置し、母体・胎児間のガス交換・栄養交換、又はホルモン、成長因子、サイトカイン、蛋白質分解酵素等の産生により胎児・母体間のホメオスタシスの維持に参与している。これにより、本発明の蛋白質が妊娠維持機構、分娩のメカニズムと深く関与することが示唆された。

#### 【0025】

なお、本発明の蛋白質の単離、精製過程において本発明の蛋白質の生化学的特性が抗細菌ペプチドであるヒト好中球ディフェンシン-1及びヒト好中球ディフェンシン-2と密接に関連することが明らかとなった。すなわち、特開2003-226699号公報の実施例1~7、非特許文献1で示した本発明の蛋白質の精製過程で、本発明の蛋白質が単離された最終逆相HPLCの前段階の陽イオン交換HPLCにおける活性フラクションは、N端アミノ酸配列解析、Maldi-Tof質量分析の結果、大部分の構成成分がヒト好中球ディフェンシン-1及びヒト好中球ディフェンシン-2であり、同時に最終逆相HPLCの活性フラクションで本発明の蛋白質が得られたフラクション以外の3フラクションからはすべてヒト好中球ディフェンシン-1及びヒト好中球ディフェンシン-2が得られた。つまり、本発明の蛋白質の生化学的特性が抗細菌ペプチドであるヒト好中球ディフェンシン-1及びヒト好中球ディフェンシン-2と密接に関連することが明らかとなり、またこれらの実験結果は本発明の蛋白質の生理活性と抗細菌その他病原微生物、抗ウイルス、抗プリオン活性との関連を強く示すものである。

#### 【実施例2】

#### 【0026】

(本発明の蛋白質をコードする遺伝子及びそのスプライスバリエーションのクローニング)

妊娠末期胎盤からの本発明の蛋白質の遺伝子のクローニングは、特開2005-210901号公報の実施例、非特許文献1に記した方法と同一の方法により行い、2つのスプライスバリエーションのクローニングは、非特許文献1に記した方法と同一の方法により行った。その結果、本発明の蛋白質をコードする遺伝子として配列番号2の遺伝子を同定し、その2つのスプライスバリエーションとして配列番号3及び4の遺伝子を同定した。妊娠初期の本発明の蛋白質の遺伝子のクローニングもこれらの方法に準じて行った。要約すると、妊娠末期胎盤からの本発明の蛋白質の遺伝子のクローニングは、まず第一に、胎盤より得られた本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列である配列表6に示す29残基のペプチドの中のC末端の7残基のペプチドをコードする遺伝子の塩基配列をBLASTプログラムによりヒト21番染色体上の21塩基配列に特定することより開始した。次に、当該21塩基配列

10

20

30

40

50

を含んだ7000塩基配列のヒト21番染色体上の領域で、様々な遺伝子予測プログラムを用いて遺伝子構造を予測した。インシリコで予測されるいくつかの遺伝子構造の中で、FGENESを用いて予測された5エクソンからなる遺伝子のみが、胎盤から得られた本発明の蛋白質の部分アミノ酸配列である配列表5と配列表6で示したアミノ酸配列をコードする遺伝子であることが判明した。最後に、予測された当該遺伝子が妊娠末期胎盤で発現していることを、RT-PCR法を用いて確認し、さらに5'および3'非翻訳領域の塩基配列をRT-PCR法で決定することにより本発明の蛋白質の遺伝子のクローニングを完了した。

さらに、RT-PCR法を用いて、ヒト妊娠末期の胎盤、羊膜組織に本発明の蛋白質をコードする遺伝子の2つのスプライスバリエーションの発現を確認した。2つのスプライスバリエーションのそれぞれから、5エクソンよりなる本発明の蛋白質の遺伝子のイントロン領域に遺  
10  
伝子データベースに報告されず遺伝子予測プログラムでも予測されなかったエクソンが1つずつ特定された。すなわち、ヒト21番染色体上の当該領域に、7エクソンからなる新規な遺伝子構造が判明した。

本発明の2つのスプライスバリエーションは、ヒト胎盤以外の臓器、組織での発現の報告が見られず、また妊娠初期胎盤では発現しないことがRT-PCR法により判明した(図2-b)。したがって、この2つのスプライスバリエーションは、妊娠の成立とともに、時間的にも空間的にも非常に限局して発現することが判明し、これらの3つの関連遺伝子の発現が、妊娠期間を通じて非常に精緻にコントロールを受けることが推察された。

### 【実施例3】

#### 【0027】

(本発明の蛋白質による他の蛋白質分解酵素活性の調節)

JAR細胞から免疫沈降により得られた本発明の蛋白質をトリプシンに対する蛍光ペプチド基質に加え、基質分解による蛍光強度の増加を判定することにより、蛋白質分解酵素活性を測定した。その結果、本発明の蛋白質単独では基質分解による蛍光強度の増加は認められず、逆に若干の消光現象を認めた(図3-a)。当該消光現象は、本発明の蛋白質の蛍光ペプチド基質への結合、それに伴う合成ペプチド基質の三次構造の変化による消光現象であると考えられた。ところが、本発明の蛋白質をエンテロキナーゼとともに蛍光ペプチド基質に加えた場合には極めて高い蛍光強度の増加が認められた(図3-b)。エンテロキナーゼ単独では、基質分解による蛍光強度の顕著な増加は認められず、蛋白質分解酵素活性をほとんど示さなかった(図3-b)。すなわち、エンテロキナーゼ単独でほとん  
30  
ど認められない蛋白質分解酵素活性を、JAR細胞から免疫沈降により得られた本発明の蛋白質は著しく亢進させることが判明した。

以上のことから、本発明の蛋白質が他の蛋白質分解酵素であるエンテロキナーゼの蛋白質分解酵素活性を亢進する生理活性を有すること、さらには、本発明の蛋白質が直接的に蛋白質分解酵素活性を示さない基質に対して、他の蛋白質分解酵素の活性を修飾することにより間接的に作用することが明らかとなった。次に、JAR細胞のライセート(レーン1)、およびJAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質(レーン2)の特異的抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、約19kDの単一のバンドが識別でき(図3-c)、作製した抗体と本発明の蛋白質が特異的に結合することが示唆された。他方、ヒトJAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質が、他の蛋白質分解酵素の活性を調  
40  
節する作用以外に、大腸菌より得られた本発明の組換え蛋白質と同様に(特許文献6及び非特許文献1)、蛋白質分解酵素活性を持つことを図3-dに示す。すなわち、マトリックスメタロプロテアーゼ9前駆体は、免疫沈降により得られた本発明の蛋白質と25、一晚反応させることで活性化され、ゼラチンザイモグラムにおいて82kDの活性体が出現した(図3-d、レーン1)。図3-d、レーン1ではマトリックスメタロプロテアーゼ9阻害剤であるフェナントロリンを反応系へ添加した。これらの結果から、免疫沈降により得られた本発明の蛋白質を反応系へ加えた際のマトリックスメタロプロテアーゼ9前駆体活性化に、マトリックスメタロプロテアーゼ9自体の蛋白質分解酵素活性は関与せず、本発明の蛋白質の蛋白質分解酵素活性のみにより生じたものである事が示され、ヒトJAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質が蛋白質分解酵素活性を有することが確認された  
50

【実施例 4】

【0028】

(本発明の蛋白質による細胞浸潤能の調節)

本発明の大腸菌での組み換え蛋白質の調製は特開 2005 - 210901号公報の実施例、非特許文献 1 に示した方法に準じて行った。要約すると、以下のとおりであった。発現ベクター、組み換え蛋白質の作製は、Stratagene社のキット (Affinity LIC Cloning and Protein Expression Kit) を用いた。配列表 1 で示す本蛋白質の塩基配列の一部を LIC クローニングベクターへ挿入し発現ベクターを得た。さらに当該発現ベクターで大腸菌 (BL21細胞) を形質転換し、イソプロピルチオガラクトピラノシドにて発現誘導して組み換え蛋白質を得た。組み換え蛋白質は、N末端側にタグ配列 (カルモジュリン結合蛋白 (Calmodulin Binding Protein)) を連結し、連結部位にエンテロキナーゼによる切断認識部位を挿入した。アフィニティー精製 (カルモジュリンアフィニティーカラム) した組み換え蛋白質は、SDS-PAGEで約 19 kD の単一バンドを示した。精製された組み換え蛋白質の N末端タグ配列をエンテロキナーゼで切断し、切り離されたタグ配列およびエンテロキナーゼをアフィニティーカラムにて除去 (カルモジュリンアフィニティーカラム及びSTI-アガロースカラム) して本発明の蛋白質を得た。なお、エンテロキナーゼで切断された当該蛋白質は、配列表 1 で示したプレ体の本蛋白質から N末端の分泌性のシグナルペプチドが除去された配列 (配列表 1 の 20 番アミノ酸の Tyrosin から C末端までの 91 アミノ酸) を有し、切断された N末端には本蛋白質以外の余分なアミノ酸が付加されないように発現ベクターを設計した。

細胞の浸潤能の測定は、人工基底膜基質であるマトリゲルがコートされたフィルターが装着されたインベーションチャンバー (BD Bioscience 社製 BioCoat Matrigel Invasion Chamber) を用いて測定した。ヒト絨毛上皮癌の細胞株である JAR 細胞は、American Type Tissue Collection より入手した。常法により、無血清培地 RPMI1640 中で JAR 細胞の単細胞浮遊液を  $1 \times 10^5$  cells/mL に調製した。インベーションチャンバーの下層には 10% FBS を含む無血清 RPMI1640 を 0.75 mL 添加した。インベーションチャンバー上層に JAR 細胞の単細胞浮遊液を 500  $\mu$ L 添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37、18 時間培養した。培養後、フィルター上面の非浸潤細胞を除去しフィルターを乾燥後、ギムザ染色によりマトリゲルに浸潤した JAR 細胞を観察して浸潤能を定量化した。その結果、大腸菌で発現させた本発明の組み換え蛋白質の量の増加に伴ってベルシェーブ型の反応曲線を示し、本発明の蛋白質は、JAR 細胞の浸潤能を調節することが示唆された (図 4 - a)。

また、組み換え蛋白質の JAR 細胞の浸潤能に対する促進作用がメタロプロテアーゼ阻害剤であるフェナントロリンにより阻害されることから、本物質の細胞浸潤能に対する作用とメタロテアーゼ活性が関係する事が示唆された (図 4 - b)。さらに、特異的抗体として免疫組織染色に用いた抗体を用い、コントロール反応にウサギ IgG を用いて、本発明の蛋白質の細胞浸潤能に与える影響を検討した。その結果、本発明の蛋白質に対する特異的抗体が、用量依存的に JAR 細胞の浸潤能を抑制したことから (図 4 - c)、本発明の蛋白質が細胞浸潤能を調節することが確認された。

【実施例 5】

【0029】

(本発明の蛋白質による平滑筋弛緩・収縮の調節)

特開 2005 - 210901号公報の実施例と同様の手法を用いた。要約すると、妊娠 21 日目の SD 系ラットより子宮を摘出し、幅約 5 mm のリング状標本を作製した。37 に加温したクレブス液の入った浴槽に子宮筋サンプルを固定し、5% CO<sub>2</sub> ガスで持続的に通気しながら、等尺性の収縮を記録した。(0.15 g) の前負荷をかけて、自発収縮が収まった後、1.07 nM のオキシトシンを添加した際の子宮収縮を図 5 - a で示す。浴槽よりオキシトシンを洗い流した後、約 (10 nM) の本発明の組み換え蛋白質をマグナス装置内の摘出妊娠ラット子宮筋に添加し、その 3 分後にオキシトシンを添加した。その結果、オキシトシンのみを添加した図 5 - a と比べ、収縮高が高く、収縮周期が短い規則的な子

10

20

30

40

50

宮収縮が70分間以上持続した(図5-b)。従って、本発明の蛋白質の添加により、陣痛様の持続的な子宮収縮を示すことを見出した。また、浴槽をクレブス液で洗浄し、オキシトシンと組み換え蛋白質を洗い流した後、1.07 nMのオキシトシンを添加すると図5-aと同様な子宮収縮が認められた。更に、浴槽をクレブス液で洗浄し、約(10 nM)の本発明の組み換え蛋白質を加えた3分後にオキシトシンを加えると、図5-bと同様な陣痛様の子宮収縮が認められ、組み換え蛋白質による子宮平滑筋収縮に対する作用が可逆的であることが示された(データは示さず)。受精・着床よりはじまり分娩に至る妊娠・分娩全期間を通じ、子宮筋の収縮、弛緩状態は精緻にコントロールされなくてはならない。胎盤は空間的にも時間的にも妊娠子宮と密着して存在するが、本発明の蛋白質が傍分泌機序により子宮筋の収縮、弛緩状態を精緻にコントロールして、受精・着床から始まる妊

10

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1-aは、本発明の蛋白質の特異的抗体を用いた妊娠初期絨毛組織の免疫染色を示す。図1-bは、ヘマトキシリン-エオジン染色を示す。図1-cは、図1-aの拡大図を示す。図1-dは、コントロール染色を示す。図1-a、図1-bは50xの倍率、図1-c、図1-dは400xの倍率である。

20

【図2】図2は、胎盤での本発明の蛋白質の遺伝子、及びその2つのスプライスバリエーションの発現を示す。図2-aは、RT-PCRにより本発明の蛋白質、及びそのスプライスバリエーションのmRNAを妊娠満期胎盤より増幅した結果を示す。レーン1、2は異なる胎盤の実質部分、レーン3は羊膜より得られたサンプルである。図2-bは、妊娠初期の胎盤においても本発明のたんぱく質の遺伝子の発現が認められることを示す。図2-cは、これらの遺伝子の構造の模式図である。

【図3】図3-aは、JAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質による、トリプシンに対する蛍光ペプチド基質の分解活性を測定した結果を示す。図3-bは、エンテロキナーゼ及び/又は本発明の蛋白質を、蛍光ペプチド基質に加えて、基質分解活性を測定した結果を示す。図3-cは、JAR細胞のライセート(レーン1)、およびJAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質(レーン2)の特異的抗体を用いたウェスタンブロットの図を示す。図3-dは、レーン1において、JAR細胞より免疫沈降により得られた本発明の蛋白質がEDTA存在下で活性化することをゼラチンザイモグラムで示したものである。レーン2は、本発明の蛋白質を加えないで反応させたコントロールを示す。

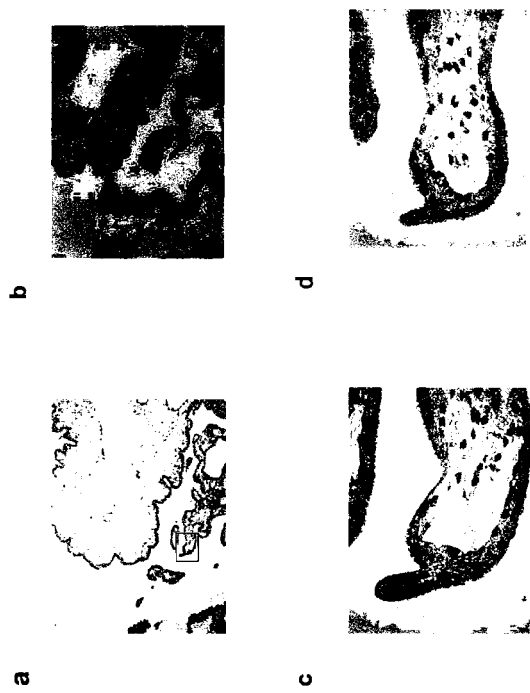
30

【図4】図4-aは、人工基底膜基質のマトリゲルを用いた実験系で、大腸菌で発現させた本発明の組み換え蛋白質がJAR細胞の浸潤能へ及ぼす影響を示すグラフである。図4-bは、大腸菌で発現させた本発明の組み換え蛋白質のJAR細胞の浸潤能に対する促進作用がメタロプロテアーゼ阻害剤であるフェナントロリンにより阻害されることを示すグラフである。図4-cは、JAR細胞の浸潤能が本発明の蛋白質に対する特異的抗体により用量依存的に阻害されるグラフを示す。

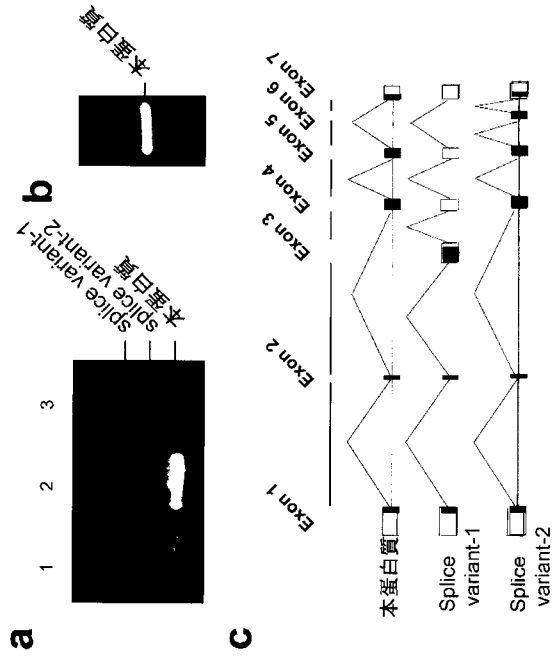
40

【図5】図5は、妊娠末期ラットより摘出した子宮筋を用い、マグヌス装置により各種薬剤の子宮筋収縮に対する影響を測定したチャートである。図5-aは、オキシトシンのみを添加したときのチャートを示す。図5-bは、本発明の組み換え蛋白質を添加した3分後にオキシトシンを添加したときのチャートを示す。

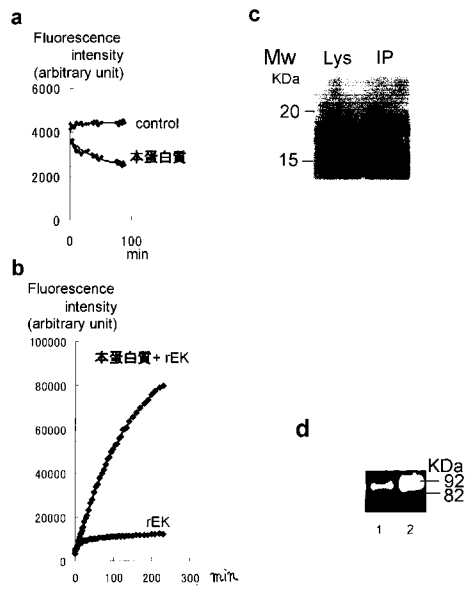
【 図 1 】



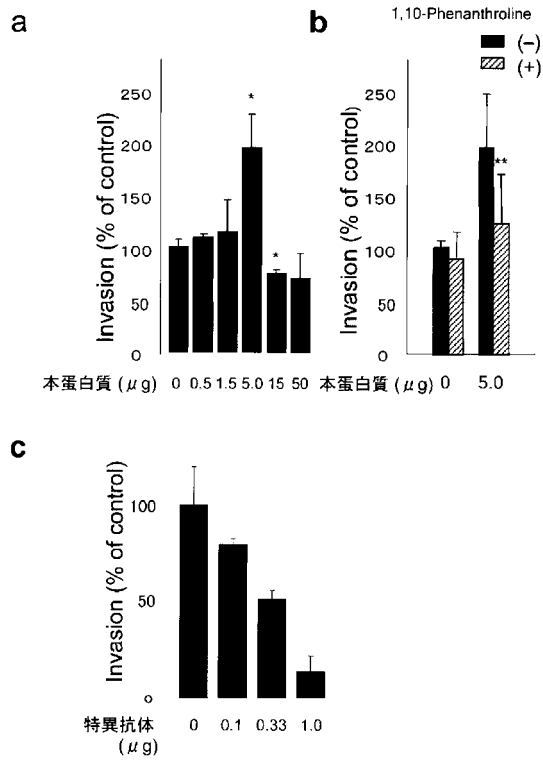
【 図 2 】



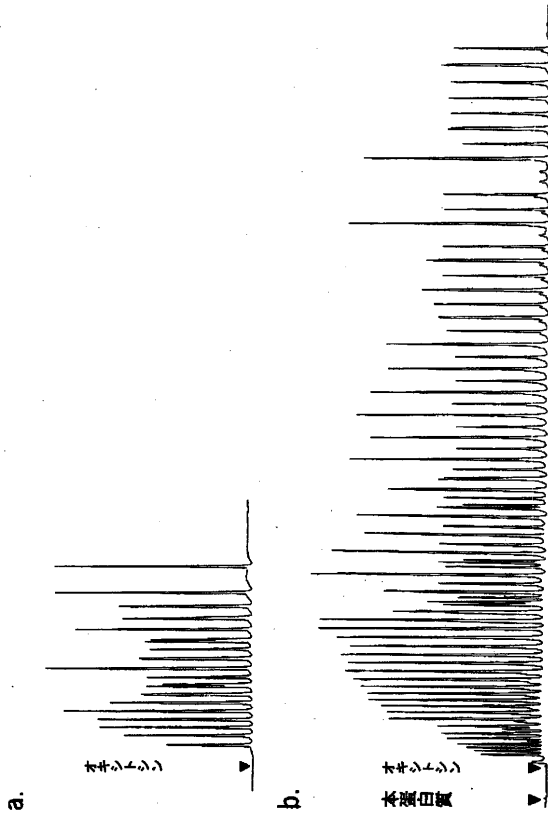
【 図 3 】



【 図 4 】



【図5】



【配列表】

0005373407000001.app

## フロントページの続き

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 特開2004-344156(JP,A)  
特開2005-210901(JP,A)  
特表2005-511552(JP,A)  
米国特許出願公開第2009/0124546(US,A1)  
国際公開第02/100895(WO,A2)  
MOTOYAMA, J-P. L. et al., Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic acti, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007年6月, Vol.357, p.828-833

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/18  
C12N 15/09  
A61K 39/395  
A61K 38/00、38/46  
A61P 35/04  
G01N 33/53  
C12N 9/50  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/GeneSeq  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed

专利名称(译)	具有调节蛋白水解酶活性和相关基因的作用的胎盘蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP5373407B2</a>	公开(公告)日	2013-12-18
申请号	JP2008558153	申请日	2008-02-15
[标]申请(专利权)人(译)	李 鎮彪 金 薰		
申请(专利权)人(译)	李 鎮彪 金 薰		
当前申请(专利权)人(译)	李 鎮彪 金 薰		
[标]发明人	李 鎮彪 金 薰		
发明人	李 鎮彪 金 薰		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C12N15/09 A61K39/395 A61P35/04		
CPC分类号	A61K38/00 A61P15/08 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/4715 C07K16/40 C12N9/6424		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61P35/04		
优先权	2007036567 2007-02-16 JP		
其他公开文献	JPWO2008099928A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明旨在提供针对蛋白的特异性抗体，该蛋白不具有已知的蛋白基序结构，但是具有蛋白水解活性和对其他蛋白酶的活性，细胞侵袭性以及平滑肌收缩和松弛的调节作用，并且能够治疗，预防和诊断各种疾病。该蛋白质用于治疗，预防或诊断选自围产期疾病，不育症，癌症，神经系统疾病，炎症疾病，免疫疾病，心血管疾病，内分泌疾病，病毒感染，细菌感染和病毒疾病的疾病，并显示在序列表1中。

