

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-143436

(P2005-143436A)

(43) 公開日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 17/00</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 37/08</b>	A 6 1 P 17/00	4 C O 8 5
<b>C O 7 K 14/47</b>	A 6 1 P 37/08	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 請求項の数 11 O L	(全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-388270 (P2003-388270)	(71) 出願人	591281220 日本全薬工業株式会社
(22) 出願日	平成15年11月18日 (2003.11.18)		福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	津久井 利広 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1-1 日本全薬工業株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌMDC

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 イヌMDC、該イヌMDCをコードする遺伝子、イヌMDCを含むイヌアトピー性皮膚炎の治療薬、診断薬、ならびに抗イヌMDC抗体を含むイヌアトピー性皮膚炎の診断薬の提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。(a) イヌ由来の特定なアミノ酸配列からなるタンパク質(b) イヌ由来の特定なアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌMDC活性を有するタンパク質

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌMDC活性を有するタンパク質

## 【請求項 2】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌMDC活性を有するタンパク質 10

## 【請求項 3】

以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子。

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号 1 の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイヌMDC活性を有するタンパク質をコードするDNA

## 【請求項 4】

請求項 2 または 3 に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載のイヌMDCに対する抗体。 20

## 【請求項 6】

モノクローナル抗体である請求項 5 記載のイヌMDCに対する抗体。

## 【請求項 7】

請求項 6 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 8】

請求項 5 または 6 に記載の抗体とイヌ生体試料中のMDCを接触させることを含む、イヌMDCの免疫学的測定方法。

## 【請求項 9】

ELISAである請求項 8 記載のイヌMDCの免疫学的測定方法。

## 【請求項 10】

請求項 5 または 6 に記載の抗体を有効成分として含む、イヌのアトピー性皮膚病治療剤。 30

## 【請求項 11】

請求項 5 または 6 に記載の抗体をイヌのアトピー性皮膚病罹患部に適用することを含む、イヌアトピー性皮膚病の治療法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、イヌMDC、該イヌMDCをコードする遺伝子、イヌMDCを含むイヌアトピー性皮膚病の治療薬、診断薬、ならびに抗イヌMDC抗体を含むイヌアトピー性皮膚病の診断薬に関する。 40

## 【背景技術】

## 【0002】

アトピー性皮膚病は、しばしばアトピー素因を有し、慢性の湿疹性皮膚病変を長期にわたって繰り返す病気である。また、血液学的所見として、しばしば末梢血の好酸球数増多、血清IgE値の高値などの異常が認められる。アトピー性皮膚病の主な要因として、免疫学的異常と非免疫学的異常が報告されている。近年、ヒトばかりではなくイヌ等の愛玩動物においてもアトピー性皮膚病が増えており、その検出、治療法の確立が望まれている。

## 【0003】

アトピー性皮膚病と関連している物質としてケモカインがある。マクロファージ由来のケモカインについて報告されている(特許文献1および特許文献2参照)。ケモカインは 50

、分子量が約8～14kDaの白血球に走化作用を有するサイトカインの総称で、炎症細胞間の連絡を担当するメディエーターとして、種々の炎症の発生、進展に中心的な役割を果たす。ケモカインは構造上4個のシステイン配列の違いによりC、CC、CXC、CX3Cの4つに大別される。ケモカインにはそれぞれ受容体が存在し、Cケモカインには、Cケモカイン受容体(XCR)、CCケモカインにはCCケモカイン受容体(CCR)、CXCケモカインにはCXCケモカイン受容体(CCXCR)、CX3CケモカインにはCX3Cケモカイン受容体(CXSCR)とに大別され、ケモカインと受容体の相互作用により、それぞれのケモカインに対応した受容体をもつ細胞が遊走し病態の形成・維持に重要な役割を果たすと考えられている。このうち、ヘルパーT細胞Th2特異的に発現されるCCケモカイン受容体4(CCR4)に結合するとされているMDC(macrophage-derived chemokine)が特にアトピー性皮膚炎と関連が深いと考えられている。例えば、アトピー性皮膚炎患者の罹患部に浸潤しているCD4陽性T細胞は、CCR4陽性であり、末梢血中のCCR4陽性メモリーT細胞も、アトピー性皮膚炎の患者では健常人に比べ優位に増加しているという報告がある。さらに、末梢血中のCCR4陽性細胞数と好酸球数、IgE値、および臨床的な重症度が相関していることも報告されている。さらに、ヒトアトピー性皮膚炎患者において、血中MDC値が高値を示し、罹患部におけるMDCの産生も亢進しているという報告もある(特許文献3および特許文献4参照)。

10

20

30

40

50

【0004】

これらの報告はMDCがアトピー性皮膚炎の疾患マーカーとなり得ること、MDCがアトピー性皮膚炎の治療標的となり得ることを示唆しているものの、MDCが健常部でも発現が認められるという報告もあり、MDCの有用性についての検討は未だ十分ではない。

【0005】

さらに、これまでの報告は、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた検討およびヒトを用いた検討であったが、アトピー性皮膚炎の発症機構が動物間で同じとは限らず、イヌに特異的な診断法、治療法の確立が望まれていた。

【0006】

【特許文献1】特表2001-520002号公報

【特許文献2】特表平10-507646号公報

【特許文献3】EP1221618A1号公報

【特許文献4】WO 02/53758号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、イヌ等の愛玩動物におけるアトピー性皮膚炎の診断法、治療剤および治療法に関し、具体的にはケモカインの一種であるMDCに対する抗体を用いたイヌアトピー性皮膚炎の検出法、該抗体を含むイヌMDC治療剤、該抗体を用いたイヌMDC治療法に関し、さらにイヌMDCを標的としたイヌMDCの治療剤および治療法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、イヌのアトピー性皮膚炎にもMDCが関与していると考え、イヌ由来のMDC遺伝子を単離し、リコンビナントMDCおよび抗イヌMDC抗体を作製し、イヌアトピー性皮膚炎の検出、治療について鋭意検討を行い、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質、

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌMDC活性を有するタンパク質

[2] 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子、

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置

換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつイヌMDC活性を有するタンパク質

[3] 以下の(c)又は(d)のDNAを含む遺伝子、

(c) 配列番号1で表される塩基配列を含むDNA

(d) 配列番号1の塩基配列を含むDNAと相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイヌMDC活性を有するタンパク質をコードするDNA

[4] [2]または[3]に記載の遺伝子を含む組換えベクター、

[5] [1]に記載のイヌMDCに対する抗体、

[6] モノクローナル抗体である[5]のイヌMDCに対する抗体、

[7] [6]のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、

[8] [5]または[6]の抗体とイヌ生体試料中のMDCを接触させることを含む、イヌMDCの免疫学的測定方法、 10

[9] ELISAである[8]のイヌMDCの免疫学的測定方法、

[10] [5]または[6]の抗体を有効成分として含む、イヌのアトピー性皮膚治療剤、ならびに

[11] [5]または[6]の抗体をイヌのアトピー性皮膚炎罹患部に適用することを含む、イヌアトピー性皮膚炎の治療法。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明のイヌMDCはイヌのアトピー性皮膚炎の治療および診断のために用いることができ、さらに本発明の抗イヌMDC抗体をイヌのアトピー性皮膚炎の診断のために用いること 20

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、RNAを抽出・精製し、MDCに特異的と考えられるいくつかのプライマーを設計し、RT-PCRを行い、いくつかのDNA断片を得た。この得られた複数のDNA断片をプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定した。決定された塩基配列をもとに、各DNA断片の重複する部分を除いた、目的のイヌMDC遺伝子配列を決定した。本発明の遺伝子は、この方法により目的の遺伝子配列を決定したものである。

##### 【0012】

#### 1. 本発明の遺伝子のクローニング

##### (1) RT-PCRによるcDNAクローンの作製

mRNAの供給源としては、イヌの肝臓、腎臓、肺、脳、胸腺、脾臓、白血球などの組織が挙げられる。mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、上記組織又は細胞から、グアニジウムチオシアネート-フェノール法などにより全RNAを抽出した後、オリゴdT-セルロースやポリU-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法、あるいはパッチ法によりポリ(A)<sup>+</sup>RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりポリ(A)<sup>+</sup>RNAをさらに分画してもよい。

##### 【0013】

このようにして得られたmRNAを鋳型として、オリゴdTプライマー及び逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成する。目的のDNA配列を含むクローンを得るためには、例えば、既に取得されているMDCタンパク質ファミリーのアミノ酸配列に対応する縮重センスプライマー及び縮重アンチセンスプライマーを合成し、これを用いてPCRを行い、得られた断片を適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。そしてこの組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することにより、イヌMDC遺伝子の一部又は全長の配列を含むクローンを得ることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。 40

##### 【0014】

#### (2) DNA断片の塩基配列の決定

上記DNA断片を含む単一の又は複数の単離クローンについて、PCR産物をテンプレートにして塩基配列を決定する。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばApplied Biosystems社製Model 310蛍光シーケンサー等）を用いて配列決定が行われる。上記の方法によって得られた、単一又は複数のMDC由来のDNA断片の塩基配列情報をもとに、重複する部分を除くことで目的のMDCの塩基配列を決定する。

**【0015】**

配列番号1に本発明のイヌMDC遺伝子の塩基配列を、配列番号2に本発明のイヌMDCのアミノ酸配列を例示する。配列番号1はイヌMacrophage-Derived Chemokine (MDC/CCL22)塩基配列であり、配列番号2はイヌMacrophage-Derived Chemokine (MDC/CCL22)アミノ酸配列であるが、このアミノ酸配列からなるタンパク質がイヌMDC活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個、好ましくは1若しくはは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

10

**【0016】**

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1又は数個（例えば1～10個、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

20

**【0017】**

このような配列番号2のアミノ酸配列において1もしくはは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列として、配列番号2のアミノ酸配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等（例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ）を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、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%以上の相同性を有しているものが挙げられる。

**【0018】**

このような配列番号2のアミノ酸配列において1もしくはは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一である。

30

**【0019】**

また、上記遺伝子と相補的な配列からなるDNAと下記の条件下でハイブリダイズすることができるDNAであってイヌMDC活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。すなわち、DNAを固定したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、68℃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とは150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウムからなる）を用い、68℃で洗浄することにより同定することができる条件をいう。

40

**【0020】**

さらに、上記DNAに対するRNA、又は該RNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができるRNAであってイヌMDC活性を有するタンパク質をコードするRNAも本発明に含まれる。

**【0021】**

ここで、MDC活性とは、ケモカインの白血球遊走能をいい、あるタンパク質がMDC活性を有しているかどうかは、ケモタキシスアッセイにより決定することができる。ケモタキシスアッセイは、ケモタキシスチャンパーを用いてケモカインの白血球遊走能を測定するアッセイである。白血球よりも小さい穴のあいたフィルターを境に、リコンビナントケモカインと白血球をそれぞれアプライし、ケモカイン側に遊走してきた白血球の数をカウント

50

することにより遊走能を測定する。また、リコンビナントケモカインをイヌの皮内に投与して、6, 12, 24, 36, 48時間後に生検を行い、得られたサンプルからmRNAを抽出し、RT-PCR法により白血球上のレセプターの発現を検出することにより、ケモタキシス能を測定することもできる。

#### 【0022】

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製))などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。

#### 【0023】

本発明の遺伝子は、イヌMDCのアミノ酸配列に対応する塩基配列を有している。

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はcDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

#### 【0024】

### 2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

#### (1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の遺伝子を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA等が挙げられ、公知のものを用いることができる。

#### 【0025】

#### (2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、公知の手法により目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

#### 【0026】

#### (3) 本発明のタンパク質の生産

本発明のタンパク質は、本発明のイヌMDC遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有するもの、または該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に前記変異が導入されたアミノ酸配列を有し、かつイヌMDC活性を有するものである。なお、本発明のタンパク質をイヌMDCタンパク質ともいう。

#### 【0027】

本発明のイヌMDCタンパク質は、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

#### 【0028】

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、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

#### 【0029】

培養は、通常、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で1~30日行う。培養中は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。

#### 【0030】

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することによりイヌMDCタンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフ

10

20

30

40

50

イー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせ用いることにより、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

【0031】

本発明の組換えイヌMDCに対する抗体は、公知の方法を用いて作製できる。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれも用いることができる。

【0032】

本発明のイヌMDCに対する抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎の検出およびイヌのアトピー性皮膚炎の治療の両方に用いることができるが、治療剤として用いる場合は、イヌの体内に投与した場合に免疫反応を惹起しないものが望ましい。このような抗体として、イヌ以外の動物種由来のMDCをイヌに投与して得られたポリクローナル抗体、または該ポリクローナル抗体から精製した抗体が挙げられ、さらに抗体の定常領域をイヌの定常領域に置き換えたキメラ抗体、定常領域および超可変領域を除く全ての可変領域をイヌの配列に置き換えたイヌ化抗体等が挙げられる。

10

【0033】

本発明の組換えイヌMDCに対するモノクローナル抗体は、ネフロメトリー、競合法、サンドイッチ法等により、本発明の組換えイヌMDCの定量に使用できる。

【0034】

本発明の抗イヌMDC抗体を用いてイヌ生体試料中のMDCを免疫学的に検出することができる。ここで、イヌ生体試料とは、血清、血漿、尿、髄液等の体液をいう。

【0035】

また、酵素免疫測定法(EIA)においては、抗イヌMDC抗体をマイクロプレート、樹脂ビーズ、磁性化ビーズ等の担体に物理吸着や化学結合により固相化する。固相化量は、特に限定されないが担体がマイクロプレートの場合、1ウエル当たり数ngから数十 $\mu$ gが望ましい。固相化は固相化すべき抗体を適切な緩衝液に溶解し、担体と接触させて行うことができる。例えば、マイクロタイターウエルを用いる場合、適当な濃度に調製した抗体溶液をマイクロタイタープレートのウエルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。抗体を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが好ましい。次いで、固相化担体と試料を反応させ、洗浄後、標識抗イヌMDC抗体を反応させる。標識は -D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼ等の酵素を用いて行うことができる。例えば、酵素免疫測定法(EIA)においては、多数のウエル(例えば、96穴)を有するマイクロタイタープレートに抗体を固相化させ、ウエル中で抗原抗体反応を行わせることにより一度に大量測定が可能になる。また用いる抗体及び試料の使用量を非常に少なくすることも可能である。さらに、全自動EIA測定装置などの自動測定機器を用いることも可能になる。

20

30

【0036】

本発明は、イヌ生体試料中のイヌMDCの検出を可能にするキットの提供をも目的とするが、該キットは少なくとも抗イヌMDC抗体を含む。該キットが酵素免疫測定法に基づく場合は、抗体を固相化した担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。また、該キットは適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

40

【0037】

本発明の抗体をアトピー性皮膚炎の治療に用いることも可能である。

本発明の抗体を含む製剤の投与形態は限定されず、経口、非経口、経粘膜(例えば舌下または口腔投与)、局所、経皮、直腸、吸入(例えば鼻または肺奥吸入)等により投与することができる。非経口投与として、静脈内、皮下、筋肉内注射等が挙げられる。局所または経皮製剤は粉末、エマルジョン、懸濁液、スプレー、クリーム、軟膏、ローションおよびペースト等として用いられ、または薬用膏薬、パッチまたは膜の形で用いられる。さらにシャンプー、リンスに本発明の抗体を含有させてもよい。治療に用いるに必要な本発

50

明の抗体の量は、治療する病状の性質、被験体の年齢と状態で変わり、最終的には担当獣医が決めることができる。例えば、軟膏等の局所適用形態では、抗体を、例えば0.1～99%の濃度で含有し、1日あたり0.05～2mgの抗体を投与すればよい。所定の投与量は一回の投与で与えてもよいし、1日当たり2回、3回、4回またはそれ以上の分割投与の適当な間隔で与えてもよい。

さらに、イヌMDCを分子標的とした治療剤も本発明の範囲に含まれる。

#### 【実施例】

##### 【0038】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

10

#### 〔実施例1〕イヌMDC遺伝子の単離

##### (a) イヌMDC由来のDNA断片の取得

既に報告されているヒト、ラットおよびマウスのタンパク質翻訳領域内及び非翻訳領域において、動物種を越えて比較的良く保存されている塩基配列を指標とし、翻訳領域内にセンスプライマーを設定した。アンチセンスプライマーにおいては翻訳領域内及び非翻訳領域に設定した。イヌ胸腺からRNAzol(商品名)B(Bioteck Laboratories社製)を用いて総RNAを抽出した。抽出した総RNAからRNA PCR kit(PERKIN ELMER社製)によりcDNAを合成し、Reverse Transcription (RT)- Polymerase Chain Reaction (PCR)反応に供した。一度のPCR反応では、目的断片を増幅することが困難であったため、一度目のPCR産物を鋳型として、ネステッドPCR反応を行い、目的のサイズのPCR産物を得た。PCR反応は以下の組成を有する反応液を用い、94℃2分反応させた後、94℃30秒、50℃30秒、72℃1分を1サイクルとし、これを30回繰り返した後に、72℃9分反応後、4℃に保存するサイクルで行った。

20

##### 【0039】

反応液の組成：1×PCR Buffer、0.2 mM dNTP、0.005 units/μl EX Taq polymerase(TaKaRa社製)、0.5 μM 各primer

センスプライマー：5' - CAC TCC TGG TTG TCC TCG TCC TCC -3' (配列番号3)

アンチセンスプライマー：5' - TAG GGC TCC TGA GCC TTC CTG GA - 3' (配列番号4)

ネステッドセンスプライマー：5' - CTC GTC CTC CTT GCT GTG GCG CTT -3' (配列番号5)

30

ネステッドアンチセンスプライマー：5' - TTA TTG AGA ATC ATC TTC ACC CAG - 3' (配列番号6)

##### 【0040】

得られたPCR産物は、エチジウムブロマイド存在下アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするPCR産物のサイズを確認した。予測されるサイズの産物を、アガロースゲルより回収し(TaKaRa社製SUPREC-01)、pGEM-T Easy Vector(Promega社製)のクローニングサイトにT4 DNAリガーゼを用いて結合させ、宿主大腸菌TOP10(Invitrogen社製)を形質転換した。すなわち、大腸菌コンピテントセルとプラスミドを混和後、氷上で30分、42℃で30秒、氷上で2分の温度処理を行い、SOC培地(2% Trypton、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MgSO<sub>4</sub>、20 mM Glucose)に浮遊して37℃で1時間インキュベートした。その後50 μg/mlアンピシリンを添加したLB寒天培地上(1% yeast extract、0.5% trypton、1% NaCl)に形質転換した大腸菌を37℃、一晚培養後に大腸菌コロニーを得た。白色の挿入断片を含むと考えられるクローンを選択し、一晚50 μg/mlアンピシリンを添加したLB培地で培養後、プラスミドDNAをGFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit(Amersham Bioscience社製)により精製した。アマシャム社製のダイプライマーサイクルシークエンスキットを用いてシークエンス反応を行い、蛍光DNAシークエンス(島津製作所社製)により塩基配列の解析を行った。なお、最終的な塩基配列の決定は、3クローンの塩基配列解析を行い、各クローンの塩基配列の完全一致をもって決定とした。

40

##### 【0041】

完全長のイヌMDC遺伝子のクローニングは、上記で得られたイヌMDC遺伝子断片の塩基配

50

列を基に設計したプライマーを用いてRapid Amplification cDNA Ends (RACE) 法により行った。5' RACE反応は、Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い、添付のマニュアルに従い行った。一度のRACE反応では目的の増幅産物が得られなかったため、ネステッドPCR反応を行いイヌMDC産物が得られた。

AP1: 5' - CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC -3' (配列番号7)

AP2: 5' - ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC -3' (配列番号8)

GSP1: 5' - GGC ACT CTG GGG TCA GCA CAG ATC T -3' (配列番号9)

NGSP1: 5' - CCC GAT CCT TGA CAG TTA GGA AGA CC -3' (配列番号10)

AP1及びGSP1プライマーは、5' RACE反応に用いた。なお、AP2及びNGSP1はネステッドPCR反応に用いた。増幅産物は、先に述べたようにアガロースゲル電気泳動による分離、回収の後、pGEM-T Easyベクターに連結し、塩基配列解析に供された。

10

【0042】

(b) 挿入断片の塩基配列

(a) で得られたイヌMDC cDNA断片及びRACE産物の塩基配列を、Genetyx-win ver.6ソフトウェア(ソフトウェア開発社製)を用いて組み合わせ、イヌMDC遺伝子タンパク質翻訳領域の全塩基配列を得た。その配列は配列番号1に記載した。配列番号1は282 bpからなっており、GENBANK / EMBL DNA Data Baseを使用し、配列番号1に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。従って、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。オンライン相同性検索プログラムであるBLAST、ならびにGenetyx-win ver.6ソフトウェアを用いて相同性検索を行ったところ、配列番号1の塩基配列は、ヒト、ラット及びマウスのMDC遺伝子塩基配列との間に高い相同性がみられた。

20

【0043】

配列番号1の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、配列番号2に記載した。塩基配列の場合と同様にアミノ酸配列について相同性検索を行ったところ、配列番号2のアミノ酸配列は、ヒト、ラット及びマウスのMDCアミノ酸配列との間に高い相同性が認められた。これらのことから、配列番号1の塩基配列はイヌMDC遺伝子であることが強く示唆された。

表1に相同性を示す。

【0044】

【表1】

塩基配列

30

	イヌ	ヒト	ラット	マウス
イヌ		81.6	78.6	76.6
ヒト	73.1		73.7	73
ラット	68.8	63.4		91.8
マウス	68.8	62.4	85.9	

アミノ酸

40

【0045】

(c) イヌMDCタンパク質翻訳領域全長の増幅およびクローニング

(b) で得られたイヌMDC遺伝子の塩基配列を基に、タンパク質翻訳領域全長を増幅するプライマーを設計し、イヌ胸腺由来cDNAを鋳型とし、以下の組成を有する反応液を用いてPCR反応を行った。94 2分反応させた後、94 30秒、60 30秒、72 1分を1サイクルとし、このサイクルを35回繰り返した後に、72 9分反応後、4 に保存するサイクルでPCR反応を行なった。

反応液の組成: 1×PCR Buffer、0.2mM dNTP、0.005units/μl EX Taq polymerase (TaKaRa社製)、0.5μM 各primer

センスプライマー: 5' - TGA TTG CAG ACA CCT GGG CTA GGC GA -3' (配列番号11)

50

アンチセンスプライマー：5' - GGA GCC AAG GCC ATG GTC T -3' (配列番号12)

【0046】

得られたPCR産物は、エチジウムブロマイド存在下アガロースゲル電気泳動を行い、PCR断片のサイズを確認した。予測されるサイズのPCR断片をアガロースゲルより回収し、pGEM-T Easyベクターに連結させた。そして(a)で記したように、宿主大腸菌の形質転換を行い、大腸菌コロニーを得た。白色の挿入断片を含むと考えられるクローンを選択し、一晚LB培地(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含)で培養後、プラスミドDNAを精製し、制限酵素EcoRIにて処理し、インサートを確認した後、塩基配列の確認を行った。

【0047】

〔実施例2〕大腸菌による組換えイヌMDCタンパク質の作出

10

(a) イヌMDCをコードするDNAを含む大腸菌発現用組換えプラスミドの作製

実施例1(c)で得られたイヌMDCのタンパク質翻訳領域を全長を含むプラスミドDNAを鋳型とし、制限酵素EcoRI及びXhoI切断部位を付加した、センスおよびアンチセンスプライマーを用いてPCR法により制限酵素EcoRI及びXhoI切断部位を付加したイヌMDCタンパクをコードするDNA断片を調整した。このDNA断片をEcoRIとXhoIにて消化し、大腸菌発現ベクターであるpGEX4T-1(Amersham Bioscience社製)のEcoRI及びXhoI切断部位に連結した。前述の方法により大腸菌の形質転換を行い、イヌMDC遺伝子が含まれる大腸菌クローンを選択、プラスミドDNAを精製した。これらクローンを発現ベクター由来シーケンスプライマーであるpGEX5' Sequencing PrimerとpGEX3' Sequencing Primer(Amersham Bioscience社製)を用いて塩基配列の解析を行い、設計どおりにイヌMDCのDNA断片が挿入されていることを確認した。

20

【0048】

(b) 大腸菌BL21株での組換えイヌMDCタンパク質の生産

大腸菌BL21株(TaKaRa社製)を氷中にて融解させ、実施例2(a)で得られた大腸菌発現用組換えプラスミドを形質転換した。すなわち、大腸菌コンピテントセルとプラスミドを混和後、氷上で30分、42 $^{\circ}$ Cで30秒、氷上で2分の温度処理を行い、SOC培地(2% Trypton、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MgSO<sub>4</sub>、20 mM Glucose)に浮遊して37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後50 $\mu$ g/mlアンピシリンを添加したLB寒天培地上(1% yeast extract、0.5% trypton、1% NaCl)に形質転換した大腸菌を37 $^{\circ}$ C、一晚培養後に大腸菌コロニーを得た。得られたコロニー12個を15mLのファルコンチューブに入れたLB培地(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含)1mlに植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。クローンごとに培養液を100 $\mu$ lずつ別の15mlチューブに移し、900 $\mu$ lのLB培地(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて1時間培養した。培養液に100mM IPTGを10 $\mu$ l(終濃度1mM)添加して発現を誘導し、37 $^{\circ}$ Cでさらに3時間培養した。培養液300 $\mu$ lをマイクロチューブに取り、5,000rpmで30秒遠心した後、上清を除き25 $\mu$ lのPBST(137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5% Triton X-100)に懸濁、0.5%になるように $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した25 $\mu$ lのLaemmliサンプルバッファー(BIO-RAD社製)を加えてよく混ぜ、これを電気泳動用試料とした。

30

【0049】

電気泳動試料を100 $\mu$ lにて5分間熱処理し、10%のポリアクリドアミドゲルに、各々の試料を1レーンあたり5 $\mu$ lアプライし、100Vにておよそ2~3時間泳動した。泳動終了後、ゲルをBio-Safe<sup>TM</sup> Coomassie(BIO-RAD社製)にて1時間染色し、蒸留水にてゲルを脱色した。その結果、IPTG誘導によりイヌMDCタンパク質が発現していることを確認した。

40

【0050】

(c) 組換えイヌMDCタンパク質の精製

実施例2(b)にて得られたイヌMDCタンパク質の発現が確認された大腸菌クローンを、50mlのLB培地(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含)に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。500mlのLB培地(50 $\mu$ g/mlアンピシリン含)を入れた三角フラスコの中に培養液を移し37 $^{\circ}$ Cで培養し、分光光度計を用いて培養液の光学密度(O.D.<sub>600</sub>)をモニターし、O.D.<sub>600</sub>=0.5になった時点で100mM IPTGを5ml(終濃度1mM)添加し、37 $^{\circ}$ Cで3時間培養した。培養液を遠心管に移し、4

50

で6,000rpm、10分間遠心して集菌した。上清を除去し、沈殿を氷冷しておいたソニケーションバッファー（50mM Tris-HCl、50mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT；pH8.0）に懸濁し、懸濁液を50mlコニカルチューブに移し、氷水中でチューブを冷却しながら、10秒ずつ5～10回超音波処理を行い、大腸菌を破壊した。冷却しておいた10% Triton X-100を終濃度1%になるように添加し、4 で18,000rpm、30分間遠心し、上清をサンプル試料とした。平衡化しておいたグルタチオンセファロース4B(Amersham Bioscience社製)にサンプル試料を静かに重層し、自然落下により樹脂に通した。樹脂体積の10倍量のPBST（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5% Triton X-100）を静かに加え樹脂を洗浄した。次に樹脂体積の2倍量のソニケーションバッファー（50mM Tris-HCl、50mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT；pH 8.0）を静かに添加し、樹脂を洗浄した。続いて、樹脂体積の3倍量のトロンピンバッファー（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、2.5mM CaCl<sub>2</sub>；pH8.0）を加えて樹脂を洗浄した。10Uのトロンピン(Amersham Bioscience社製)を含むトロンピンバッファー（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、2.5mM CaCl<sub>2</sub>；pH8.0）を樹脂体積と同量カラムに重層し、完全に浸透したところで溶出をとめ、22 で20時間反応させた。樹脂に樹脂体積と同量のトロンピンバッファー（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、2.5mM CaCl<sub>2</sub>；pH8.0）を重層し、目的のリコンビナントイヌMDCタンパク質を溶出した。溶出液を25μl取り、これに25μlのLaemlliサンプルバッファー(BIO-RAD社製)を加えてよく混ぜ、これを電気泳動用試料とした。

10

**【0051】**

電気泳動試料を100 にて5分間熱処理し、15%のポリアクリドアミドゲルに、各々の試料を1レーンあたり5μlアプライし、100Vにておよそ2～3時間泳動した。泳動終了後、ゲルをBio-Safe<sup>TM</sup>Coomassie（BIO-RAD社製）にて1時間染色し、蒸留水にてゲルを脱色した。この結果、およそ10kDaに目的のリコンビナントMDCタンパク質を確認した。

20

**【配列表フリーテキスト】****【0052】**

配列番号3～12：プライマー

**【配列表】**

[2005143436000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 前田 貞俊

東京都文京区千駄木5 - 3 0 - 8 メゾン千駄木2 0 2

(72)発明者 増田 健一

東京都文京区千駄木3 - 3 8 - 6 セブンスターハイツ千駄木3 0 3

(72)発明者 岩淵 成紘

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1 - 1 日本全薬工業株式会社内

(72)発明者 鈴田 靖幸

福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1 - 1 日本全薬工業株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04 DA06 EA04 GA11 HA01 HA12  
 HA15  
 4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 DA01 DA13  
 4B065 AA26X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB31 CC02 CC22 CC23 EE01 GG02  
 GG03 GG04 GG08 GG10  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA22  
 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	犬MDC		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005143436A</a>	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2003388270	申请日	2003-11-18
申请(专利权)人(译)	Nihonzen'yakukogyo有限公司		
[标]发明人	津久井利広 前田貞俊 増田健一 岩淵成紘 鈴田靖幸		
发明人	津久井 利広 前田 貞俊 増田 健一 岩淵 成紘 鈴田 靖幸		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P17/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/566 G01N33/577		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P17/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种犬MDC，一种编码犬MDC的基因，一种含有犬MDC的犬特异性皮炎的治疗药物，一种诊断药物以及一种含有犬抗MDC抗体的犬特异性皮炎的诊断药物。 解决方案：以下(a)或(b)的重组蛋白。(a)由源自狗的特定氨基酸序列组成的蛋白质(b)包括在源自狗的特定氨基酸序列中已缺失，取代或添加了一个或多个氨基酸的特定氨基酸序列，并且具有犬MDC活性 蛋白质 [选择图]无

(43) 公開日 平成17年6月9日 (2005)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	FI	テームコード (参考)
<b>C12N 15/09</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>A61K 39/395</b>	A61K 39/395 D	4B064
<b>A61P 17/00</b>	A61K 39/395 N	4B065
<b>A61P 37/08</b>	A61P 17/00	4C085
<b>C07K 14/47</b>	A61P 37/08	4H045
	審査請求 未請求 請求項の数 11 OL (全 12 頁) 最終頁	
(21) 出願番号	特願2003-388270 (P2003-388270)	(71) 出願人 591281220
(22) 出願日	平成15年11月18日 (2003.11.18)	日本全薬工業株式会社 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番 1
		(74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人 100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫