

(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2004-298175

(P2004-298175A)

(43) 公開日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(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	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 E	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-418804 (P2003-418804)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社
(22) 出願日	平成15年12月17日 (2003.12.17)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(31) 優先権主張番号	特願2002-366732 (P2002-366732)	(74) 代理人	100114041 弁理士 高橋 秀一
(32) 優先日	平成14年12月18日 (2002.12.18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100106323 弁理士 関口 陽
(31) 優先権主張番号	特願2003-73974 (P2003-73974)	(72) 発明者	田中 浩史 茨城県つくば市二の宮4丁目6-3-404
(32) 優先日	平成15年3月18日 (2003.3.18)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	海江田 功 茨城県取手市白山1丁目1-28-301
		(72) 発明者	本田 弘平 茨城県つくば市春日3丁目15-19-302
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

## (57) 【要約】

【課題】 優れた癌などの予防・治療剤およびそのスクリーニングなどの提供。

【解決手段】 本発明のタンパク質またはポリヌクレオチドは、例えば癌、神経変性疾患、自己免疫疾患などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質またはポリヌクレオチドを用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性もしくは該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物は、例えば癌などの予防・治療剤、アポトーシス促進剤として使用することができる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号：1 または配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

## 【請求項 2】

配列番号：1 または配列番号：2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

## 【請求項 4】

請求項 1 記載のタンパク質または請求項 3 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

DNA である請求項 4 記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

配列番号：3 または配列番号：4 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

請求項 4 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

## 【請求項 8】

請求項 7 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質または請求項 3 記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

## 【請求項 10】

請求項 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

## 【請求項 11】

請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

## 【請求項 12】

請求項 11 記載の抗体を含有してなる医薬。

## 【請求項 13】

請求項 11 記載の抗体を含有してなる診断薬。

## 【請求項 14】

請求項 4 記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

## 【請求項 15】

請求項 14 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

## 【請求項 16】

請求項 4 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

## 【請求項 17】

請求項 4 記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項 1 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

## 【請求項 18】

請求項 11 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の定量方法。

## 【請求項 19】

癌の予防・治療剤である請求項 12 または請求項 15 記載の医薬。

## 【請求項 20】

癌の診断薬である請求項 10 または請求項 13 記載の診断薬。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 1】

アポトーシス促進剤である請求項 1 2 または請求項 1 5 記載の医薬。

## 【請求項 2 2】

配列番号：1 5 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、癌の予防・治療剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 2 3】

配列番号：1 5 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤。

10

## 【請求項 2 4】

哺乳動物に対して、請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌の予防・治療法。

## 【請求項 2 5】

請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療法。

## 【請求項 2 6】

癌の予防・治療剤を製造するための請求項 1 記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の使用。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、新規タンパク質、その DNA、該タンパク質遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物、該化合物を含有する医薬（例、癌の予防・治療剤、アポトーシス促進剤など）などに関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

最近の研究の進展によって癌は複数の遺伝子変異が体細胞に蓄積し、その結果として細胞の増殖制御ができなくなる遺伝子の病気であることが証明されてきている。これらのうち、p53は、ヒト癌で最も高頻度に異常が検出されている癌抑制遺伝子であり、G1 arrest、apoptosisの誘導、DNAに傷を受けた場合のチェックポイント機構などの多様な生理機能を有していることが明らかにされている。これらの機能は、p53タンパク質が転写因子として作用し、その標的遺伝子の発現制御を行うことにより発揮されるものと考えられている。そのため、このp53に異常が生じる（変異型p53）と、上記作用が発揮されなくなり、細胞は癌化に進んでいくと考えられる。一方、p53を欠失している癌細胞に変異型p53を導入すると、癌細胞が軟寒天中でもコロニーを形成する、または胆癌ヌードマウスモデルで腫瘍を形成するようになる（ネイチャー・ジェネティクス、4巻、42-46頁、1993年）等の報告から、変異型p53は、ただ単に正常なp53（野生型p53）の機能を失うだけではなく、変異型p53自身が、積極的に癌化に関わっていることが示唆されている。変異型p53には、変異している位置の相違によりいくつかのタイプに分かれ、175番目のアルギニン（R）がヒスチジン（H）に置換した変異型p53を有する癌が、最も予後が悪いという報告がある（キャンサーリサーチ、55巻、5217-5221頁、1995年）。さらに、この変異型p53も野生型p53と同様に、下流遺伝子を誘導することが報告されている（オンコジーン、12巻、1941-1952頁、1996年）。変異型p53より誘導される遺伝子の中には細胞増殖、薬剤耐性、アポトーシスの制御に関する遺伝子が報告されており（ジーン、277巻、15-30頁、2001年）、これらの異常は癌化に密接に関与していると考えられる。また、p53の変異は癌のみでなく、関節リウマチ（Semin Arthritis Rheum 4月号、31(5)巻、299-310頁、2002年）でも報告されている。

30

40

## 【0 0 0 3】

ヒトを含めた大部分の生物の細胞にはアポトーシス機構が備わっており、これは胚発生

50

期の形態形成、組織の恒常性の維持、有害・不要細胞の除去といった多彩な生命現象に関与している。その反面、アポトーシスの異常は、癌や神経変性疾患などの多くの疾患発症の原因にもなっていることから、アポトーシスの研究は疾患治療の面からも注目を集めている。アポトーシスシグナルはアポトーシス促進に働く分子と抑制に働く分子のバランスで制御されている。さらに、このシグナルに細胞増殖シグナルが関与することで、細胞の生死が決定されていると考えられる。現在までに多数の細胞増殖あるいはアポトーシス制御分子が報告されているが、未知の制御分子の存在も考えられる。

遺伝子発現を網羅的に解析するために、cDNAやオリゴヌクレオチドを固定化したマイクロアレイ法が開発され、疾患特異的な遺伝子発現の変化を見出す技術が普及し、その有用性が確認されている。例えば、Affymetrix社のGeneChipシステムは各種の疾患の診断や創薬標的遺伝子の発見に多用されつつある。しかし、GeneChipのプロープの多くはEST配列を基に作製されており、そのEST配列を含むcDNAがコードするタンパク質が不明なことが多い。

ヒト由来TSLRP (testis specific leucine rich repeat protein) はGenbank Accession No. NM\_012472 (非特許文献1) で報告されている遺伝子であり、精巣で発現が上昇していること、不妊薬への応用について、WO 97/26001号公報 (特許文献1) に記載されている。

ヒト由来TSLRP遺伝子はマウスLRTP遺伝子と高い相同性を有している。このマウスLRTP遺伝子はtestisに特異的に発現が高く、そのタンパク質はN末側にleucine rich repeat領域を持つ。この領域はタンパク-タンパク相互作用に関与していると考えられているが、詳細な機能については明らかになっていない (非特許文献2 バイオロジー オブ リプロダクション、62号、1278-1284頁、2000年)。

【特許文献1】WO 97/26001号公報

【非特許文献1】Genbank Accession No. NM\_012472

【非特許文献2】バイオロジー オブ リプロダクション、62号、1278-1284頁、2000年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

新たな細胞増殖やアポトーシスの制御に関する遺伝子は、その遺伝子の発現亢進や発現減少に起因する種々の疾患、例えば癌、神経変性疾患、自己免疫疾患などの予防や治療に役立つ医薬品の開発を可能にする。これより、ヒト由来の新規な細胞増殖やアポトーシスの制御に関する遺伝子を見出すことが望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、癌細胞株から新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質が細胞増殖やアポトーシスに関係することを見出した。本発明者は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、
- (2) 配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、
- (3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- (5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (6) 配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

- (7) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (8) 上記(7)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (9) 上記(8)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、
- (10) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、
- (11) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (12) 上記(11)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (13) 上記(11)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (14) 上記(4)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、
- (15) 上記(14)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (16) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (17) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (17a) 上記(16)記載のスクリーニング方法または上記(17)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、
- (17b) 上記(17a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (17c) 癌の予防・治療剤である上記(17b)記載の医薬、
- (17d) アポトーシス促進剤である上記(17b)記載の医薬、
- (18) 上記(11)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の定量方法、
- (19) 癌の予防・治療剤である上記(12)または(15)記載の医薬、
- (20) 癌の診断薬である上記(10)または(13)記載の診断薬、
- (21) アポトーシス促進剤である上記(12)または(15)記載の医薬、
- (22) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、癌の予防・治療剤のスクリーニング方法、
- (22a) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、癌の予防・治療作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (22b) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、アポトーシス促進剤のスクリーニング方法、
- (22c) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、アポトーシス促進作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (22d) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、癌の予防・治療剤のスクリーニング用キット、
- (22e) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、アポトーシス促進剤のスクリーニング用キット、
- (23) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなる癌の予防・治療剤、
- (23a) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部

10

20

30

40

50

分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス促進剤

(24) 哺乳動物に対して、上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の有効量を投与することを特徴とする、癌の予防・治療法、

(24a) 哺乳動物に対して、上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の有効量を投与することを特徴とする、アポトーシス促進法、

(25) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療法、 10

(25a) 上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害することを特徴とするアポトーシスの促進法、

(26) 癌の予防・治療剤を製造するための上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の使用、

(26a) アポトーシス促進剤を製造するための上記(1)記載のタンパク質またはその塩の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩の使用などを提供する。

#### 【発明の効果】

#### 【0007】

本発明のタンパク質、本発明のポリヌクレオチド、本発明の抗体、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を調節(好ましくは阻害)する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節(好ましくは阻害)する化合物もしくはその塩は、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などの予防・治療剤/診断薬、好ましくは癌の予防・治療剤/診断薬、アポトーシス調節(好ましくは促進)剤などとして安全に使用することができる。 20 30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0008】

配列番号：1、配列番号：2または配列番号：15で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。 40

配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と99.5%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。 50

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と例えば約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1、配列番号：2または配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1、配列番号：2または配列番号：15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1、配列番号：2または配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理的に）同質であることを示す。例えば活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、この活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

#### 【0009】

また、本発明のタンパク質としては、例えば、(1)(i)配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～3個、好ましくは1～2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号：1または配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2)(i)配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii)配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv)配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインなども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

#### 【0010】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)、アミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソブ

ロピル、 $n$ -ブチルなどの $C_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $C_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $p$ -ナフチルなどの $C_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $C_{1-2}$ アルキル基もしくは $p$ -ナフチルメチルなどの $p$ -ナフチル- $C_{1-2}$ アルキル基などの $C_{7-14}$ アラルキル基、ピパロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイルなどの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $C_{1-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の例としては、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

#### 【0011】

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1~5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

#### 【0012】

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

#### 【0013】

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、

10

20

30

40

50

塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

10

#### 【0014】

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、-アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

20

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT, HOOBT)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

30

#### 【0015】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~50の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

40

#### 【0016】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z

50

、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

10

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C<sub>1-6</sub>）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

20

#### 【0017】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HObt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20~40の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

30

40

#### 【0018】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の-カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の-アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法

50

によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の - カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様に、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

#### 【0019】

本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(i)~(v)に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) Schroeder および Luecke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前記法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

#### 【0020】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば(1)配列番号: 3もしくは配列番号: 4で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 3もしくは配列番号: 4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号: 1または配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(2)配列番号: 14で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 14で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号: 15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのもでもよい。

#### 【0021】

配列番号: 3または配列番号: 4で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下

でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3または配列番号：4で表される塩基配列と99.5%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：14で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：14で表される塩基配列と約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70、好ましくは約60~65の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：14で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

#### 【0022】

本発明の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(例、DNA)としては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：14で表される塩基配列を含有するDNAの一部を有するDNA、または配列番号：3、配列番号：4または配列番号：14で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：3、配列番号：4または配列番号：14で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

#### 【0023】

本発明のタンパク質、部分ペプチド(以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終了コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終了コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10

#### 【0024】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

20

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

30

#### 【0025】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

40

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF<sup>r</sup>・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

50

## 【0026】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 · D H 1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)], J M 1 0 3 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)], J A 2 2 1 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)], H B 1 0 1 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)], C 6 0 0 [Genetics, 39巻, 440(1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [Gene, 24巻, 255(1983)], 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)]などが用いられる。 10

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2 , A H 2 2 R<sup>-</sup> , N A 8 7 - 1 1 A , D K D - 5 D , 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3 , N C Y C 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1 などが用いられる。

## 【0027】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、Trichoplusia niの中腸由来の M G 1 細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞または *Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞)などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。 20

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、Nature, 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S - 7 , V e r o , チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記)、d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r<sup>-</sup>)細胞と略記)、マウス L 細胞、マウス A t T - 2 0 , マウスミエローマ細胞、マウス A T D C 5 細胞、ラット G H 3 , ヒト F L 細胞などが用いられる。 30

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えばProc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110 (1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

## 【0028】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。 40

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール .263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードする D N A を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ 50

抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

#### 【0029】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー（Miller）, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー（Burkholder）最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium（Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)）に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔Science, 122巻, 501 (1952)〕, DMEM培地〔Virology, 8巻, 396 (1959)〕, RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association 199巻, 519 (1967)〕, 199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73巻, 1 (1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

#### 【0030】

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を

利用する方法などが用いられる。

【0031】

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどにより測定することができる。 10

【0032】

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕 20

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔Nature、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。 30

【0033】

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40、好ましくは30～37で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。 40

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合 50

したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0034】

##### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアー蛋白質とハプテンとの混合比は、キャリアー蛋白質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアー蛋白質のカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

#### 【0035】

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、（ロ）RNaseHによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

10

具体的には、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）が挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

20

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

#### 【0036】

30

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

40

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」で

50

あるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2 - デオキシ - D - リボースを含有しているポリヌクレオチド、D - リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基の N - グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーは DNA や RNA 中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2 本鎖 DNA、1 本鎖 DNA、2 本鎖 RNA、1 本鎖 RNA、さらに DNA : RNA ハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1 個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したものの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ - L - リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1 個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の 3' 端あるいは 5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオチド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の 3' 端あるいは 5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAse などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレ

ングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

#### 【0037】

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）（以下、本発明のポリヌクレオチド、本発明のDNAなどと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

10

#### 【0038】

本発明のタンパク質は、アポトーシス作用を調節（好ましくは阻害・抑制）するので、本発明のタンパク質、本発明のポリヌクレオチド、本発明の抗体などは、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）、好ましくは癌、などの疾患マーカー、上記疾患の予防・治療剤として有用である。さらに、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節（好ましくは阻害）する化合物またはその塩なども、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの予防・治療剤、好ましくは癌の予防・治療剤として有用である。

20

30

また、本発明のタンパク質の遺伝子は、正常組織での発現が低いことから、副作用の少ない癌の予防・治療剤のスクリーニングが可能になる。また、変異型 p53 を保持している癌は、臨床で抗癌剤が効きにくい、予後が悪い等、悪性度が高いことが知られている。本発明のタンパク質遺伝子は、変異型 p53 の下流で働くことより、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体などは、悪性度の高い癌にも効果的である。

40

#### 【0039】

##### (1) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質の活性や発現を阻害すると癌細胞がアポトーシスを起こす。従って、本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの

50

予防・治療剤として使用することができる。好ましくは癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）などの予防・治療剤である。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、例えば、(i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の活性と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の活性との比較することを特徴とする本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。 10

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上、細胞内に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。 20

例えば、上記(ii)の場合における活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物として、上記(ii)の場合における活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物としてそれぞれ選択することができる。

#### 【0040】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。 30

#### 【0041】

さらに、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物またはその塩は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）などの予防・治療剤である。 40

したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げら 50

れる。

上記方法において、(iii)と(iv)の場合における、前記遺伝子の発現量(具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量)を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：3または配列番号：4またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：3または配列番号：4またはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、上記(iv)の場合における遺伝子の発現を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を促進する化合物として、上記(iv)の場合における遺伝子の発現を、上記(iii)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物としてそれぞれ選択することができる。

#### 【0042】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を調節(好ましくは阻害)する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節(好ましくは阻害)する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などの予防・治療剤、好ましくは癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)などの予防・治療剤などの安全な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

#### 【0043】

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗

10

20

30

40

50

糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene(50mol)aduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

10

20

30

#### 【0044】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の活性もしくはタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の活性もしくはタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を癌病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり換算した量を投与することができる。

#### 【0045】

（2）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

40

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する

50

抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であることが望ましい。

#### 【0046】

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

#### 【0047】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

#### 【0048】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗

10

20

30

40

50

体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

#### 【0049】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)(好ましくは癌)などである、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 【0050】

##### (3) 遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics, 第5巻, 874~879頁(1989年)、Proceedings

10

20

30

40

50

of the National Academy of Sciences of the USA,第86巻,2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)など、好ましくは癌などである可能性が高いと診断することができる。

10

【0051】

(4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは、癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)などの予防・治療剤である。

20

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチド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、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

30

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤(注射剤)化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人(体重60kg)においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1~100mg投与する。

40

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明のタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、

50

脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは、癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）などの予防・治療剤である。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

10

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

#### 【0052】

##### (5) 本発明の抗体を含有する医薬

20

本発明の抗体は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの予防・治療剤（例、ワクチン、抗体医薬など）として使用することができる。好ましくは、癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）などの予防・治療剤である。

30

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与することができる。好ましくはワクチンとして定法に従って投与することができる。

本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体およびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤（例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射

40

50

液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常5～500mg程度、とりわけ注射剤では5～100mg程度、その他の剤形では10～250mg程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

本発明の抗体を含有する上記予防・治療剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の乳癌の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### 【0053】

##### (6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

#### 【0054】

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、

モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

#### 【0055】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

#### 【0056】

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1（EF-1）、

アクチン、およびミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VN<sub>P</sub>）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋アクチン、プレプロエンケファリンA、パソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1

10

20

30

40

50

( E F - 1 ) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNA の転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

【0057】

その他、目的とする外来性DNA をさらに高発現させる目的で各DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNA および市販の各種ゲノムDNA ライブラリーよりゲノムDNA の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNA より公知の方法により調製された相補DNA を原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNA は、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNA コンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA 工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNA が存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNA を保持することを意味する。本発明の外来性DNA を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNA を有する。

本発明の外来性正常DNA を転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNA を安定に保持することを確認して、該DNA 保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA 転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNA が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNA を過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNA を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNA を過剰に有する。

導入DNA を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNA を過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0058】

本発明の正常DNA を有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNA が高発現させられており、内在性の正常DNA の機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA 転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNA を転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマ

10

20

30

40

50

または血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

10

#### 【0059】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

20

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害(dominant negative作用)を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

30

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- (i) 組織培養のための細胞源としての使用、
- (ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- (iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- (iv) 上記(iii)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- (v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

40

#### 【0060】

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢

50

献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

10

#### 【0061】

##### (7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の - ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20

30

#### 【0062】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

40

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

#### 【0063】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネ

50

オマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは *lacZ* ( - ガラクトシダーゼ遺伝子)、*cat* (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) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソソンの機能を破壊するか、あるいはエキソソンのイントロン部分に遺伝子の転写を終結させる DNA 配列 (例えば、*polyA* 付加シグナルなど) を挿入し、完全なメッセージ RNA を合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築した DNA 配列を有する DNA 鎖 (以下、ターゲティングベクターと略記する) を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られた ES 細胞について本発明の DNA 上あるいはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上の DNA 配列とターゲティングベクター作製に使用した本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列をプライマーとした PCR 法により解析し、本発明のノックアウト ES 細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明の DNA を不活化させる元の ES 細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufman の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスの ES 細胞の場合、現在、一般的には 129 系の ES 細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかな ES 細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6 マウスや C57BL/6 の採卵数の少なさを DBA/2 との交雑により改善した BDF<sub>1</sub> マウス (C57BL/6 と DBA/2 との F<sub>1</sub>) を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub> マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6 マウスを背景に持つので、これを用いて得られた ES 細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6 マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景を C57BL/6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES 細胞を樹立する場合、一般には受精後 3.5 日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に 8 細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれの ES 細胞を用いてもよいが、通常雄の ES 細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

#### 【0064】

ES 細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR 法により Y 染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その 1 例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約  $10^6$  個の細胞数を要していたのに対して、1 コロニー程度の ES 細胞数 (約 50 個) で済むので、培養初期における ES 細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られる ES 細胞の染色体数は正常数の 100% が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES 細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞 (例えば、マウスでは染色体数が  $2n = 40$  である細胞) に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で LIF (1 ~ 10000 U/ml) 存在下に炭酸ガス培養器内 (好ましくは、5% 炭酸ガス、95% 空気または 5% 酸素、5% 炭酸ガス、90% 空気) で約 37 °C で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA 溶液 (通常 0.001 ~ 0.5% トリプシン / 0.1 ~ 5 mM EDTA、好ましくは約 0.1% トリプシン / 1 mM EDTA) 処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常 1 ~ 3 日毎に行な

うが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature 第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

10

#### 【0065】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをロックアウトさせることができる。

20

本発明のDNAがロックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

30

#### 【0066】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に

40

比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNA

50

を有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

#### 【0067】

(7a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

#### 【0068】

例えば癌(例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など)、神経変性疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など)、自己免疫疾患(例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど)、腎疾患(例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など)などに対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治療度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸など)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このよ

10

20

30

40

50

うな塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり換算した量を投与することができる。

#### 【0069】

(7b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法 20

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。 30

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド(X-gal)のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してよい。 40

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

#### 【0070】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので例えば癌（例、大腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、メラノーマまたは血液腫瘍など）、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群など）、自己免疫疾患（例、重症筋無力症、糸球体腎炎、多発性硬化症、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど）、腎疾患（例、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、腎性浮腫、間質性腎疾患など）などの予防・治療剤として有用である。

10

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

20

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり換算した量を投与することができる。

30

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

40

#### 【0071】

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

50

D N A	: デオキシリボ核酸	
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸	
A	: アデニン	
T	: チミン	
G	: グアニン	
C	: シトシン	
R N A	: リボ核酸	
m R N A	: メッセンジャーリボ核酸	
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸	
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸	10
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸	
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸	
A T P	: アデノシン三リン酸	
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸	
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム	
G l y	: グリシン	
A l a	: アラニン	
V a l	: バリン	
L e u	: ロイシン	
I l e	: イソロイシン	20
S e r	: セリン	
T h r	: スレオニン	
C y s	: システイン	
M e t	: メチオニン	
G l u	: グルタミン酸	
A s p	: アスパラギン酸	
L y s	: リジン	
A r g	: アルギニン	
H i s	: ヒスチジン	
P h e	: フェニルアラニン	30
T y r	: チロシン	
T r p	: トリプトファン	
P r o	: プロリン	
A s n	: アスパラギン	
G l n	: グルタミン	
p G l u	: ピログルタミン酸	
S e c	: セレノシステイン ( selenocysteine )	
<b>【 0 0 7 2 】</b>		
また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。		
M e	: メチル基	40
E t	: エチル基	
B u	: ブチル基	
P h	: フェニル基	
T C	: チアゾリジン - 4 ( R ) - カルボキサミド基	
T o s	: p - トルエンсульフォニル	
C H O	: ホルミル	
B z l	: ベンジル	
C l <sub>2</sub> -Bzl	: 2, 6 - ジクロロベンジル	
B o m	: ベンジルオキシメチル	
Z	: ベンジルオキシカルボニル	50

C l - Z	: 2 - クロロベンジルオキシカルボニル	
B r - Z	: 2 - ブロモベンジルオキシカルボニル	
B o c	: t - ブトキシカルボニル	
D N P	: ジニトロフェニル	
T r t	: トリチル	
B u m	: t - ブトキシメチル	
F m o c	: N - 9 - フルオレニルメトキシカルボニル	
H O B t	: 1 - ヒドロキシベンズトリアゾール	
H O O B t	: 3, 4 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシ - 4 - オキソ - 1, 2, 3 - ベンゾトリアジン	10
H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド	
D C C	: N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド	

## 【 0 0 7 3 】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔 配列番号 : 1 〕

実施例 1 で得られた MTP53TSLRPH(Ile) タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔 配列番号 : 2 〕

実施例 1 で得られた MTP53TSLRPH(Thr) タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔 配列番号 : 3 〕

配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を示す。

20

〔 配列番号 : 4 〕

配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 5 〕

実施例 1 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 6 〕

実施例 1 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 7 〕

実施例 1 および実施例 2 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 8 〕

実施例 1 および実施例 2 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

30

〔 配列番号 : 9 〕

実施例 3 で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 1 0 〕

実施例 3 で用いられたコントロールオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 1 1 〕

実施例 3 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 1 2 〕

実施例 3 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 1 3 〕

GenBank Accession No. NM\_012472 の塩基配列を示す。

40

〔 配列番号 : 1 4 〕

GenBank Accession No. NM\_012472 の ORF の塩基配列を示す。

〔 配列番号 : 1 5 〕

配列番号 : 1 4 で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す。

後述の実施例 1 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/MTP53TSLRPH(Ile) は、2003年3月12日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の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に、寄託番号 FERM BP-8329 として寄託されている。

後述の実施例 1 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/MTP53TSLRPH(Thr) は、2003年3月12日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行

50

政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8330として寄託されている。

#### 【0074】

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### (1) 変異型p53ベクターの構築

野生型p53 (GenBank Accession No. AF307851) の翻訳開始コドンATGのAから数えて524番目の塩基をGからAに置換したフォワード側およびリバース側のプライマー (配列番号: 5 および配列番号: 6) を作製した。Bam HI- Eco RIサイトに野生型p53 (Wtp53) をpcDN A3.1 (Invitrogen) に組み込んだpcDNA3.1-Wtp53ベクターを鋳型として、上記2種類のプライマーを使用し、QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE)を用いて変異型p53 (Mtp53) 遺伝子を作製した。方法は添付プロトコールに従った。Mtp53遺伝子をBam HI とEco RIで制限酵素処理し、同酵素で処理したpINDベクター (Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System (Invitrogen) に添付) に組み込み、pIND-Mtp53ベクターを得た。この変異型p53は175番目のアミノ酸配列がアルギニン (R) からヒスチジン (H) に置換している。コントロールとして野生型p53遺伝子をpINDベクターに組み込んだpIND-Wtp53ベクターも調製した。もう一つのコントロールとしてCAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) が組み込まれたpIND-CATベクター (Invitrogen) も使用した。

10

20

#### 【0075】

##### (2) 変異型p53遺伝子発現制御細胞の構築

p53が欠失している肺がん由来細胞株H1299 (ATCC) を6cmシャーレに $4 \times 10^5$ 個播種し、一晚培養後Fugene6 (Roche) を用いて、添付プロトコールに従い上記(1)で得られたpIND-Mtp53ベクター、pIND-Wtp53ベクターまたはpIND-CATベクターと、pVgRXRベクター (Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System (Invitrogen) に添付) とをそれぞれco-transfectionした。ジェネティシン (GIBCO BRL) とZeosin (Invitrogen) により、それぞれの遺伝子の導入細胞株 (H1299-Mtp53, H1299-Wtp53, H1299-CAT) を選択した。これら3種の安定発現株に、5  $\mu$ MのMuristerone A (上記キットに添付) を添加したところ、H1299-Mtp53ではMtp53の発現が、H1299-Wtp53ではWtp53の発現が、H1299-CATではCATの発現がそれぞれ誘導された。さらに、抗p53抗体 (Oncogene) を用いたウェスタンブロッティング法により、H1299-Mtp53ではMtp53の発現が、H1299-Wtp53ではWtp53の発現が誘導されたことを確認した。

30

#### 【0076】

##### (3) GeneChip解析

変異型p53によって発現誘導される遺伝子群を明らかにするため、5  $\mu$ M Muristerone AをH1299-Mtp53、H1299-Wtp53およびH1299-CATにそれぞれ添加後、0、12、24および48時間後のこれらの3種の細胞株から調製したtotal RNAを材料とし、GeneChip (Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社) を用いて遺伝子発現解析を行った。実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical manual) に従った。

40

その結果、変異型p53によってのみ発現が上昇し、野生型p53では誘導されない遺伝子 (Affymetrix番号36738\_at; GenBank Accession No. NM\_012472の部分配列) を見出した。

#### [表 1]

細胞株 (培養時間)	Affymetrix番号36738_atの相対的発現量
H1299-Mtp53 (0時間)	0.15
H1299-Mtp53 (12時間)	0.25
H1299-Mtp53 (24時間)	0.33
H1299-Mtp53 (48時間)	0.21

50

H1299-WTp53 ( 0時間 )	0.00
H1299-WTp53 ( 12時間 )	0.00
H1299-WTp53 ( 24時間 )	0.02
H1299-WTp53 ( 48時間 )	0.00

## 【 0 0 7 7 】

## ( 4 ) 新規遺伝子の単離

上記 ( 3 ) で得られた GenBank Accession No. NM\_012472 の塩基配列をもとに、各々異なる制限酵素認識部位 ( Hind III および Xba I ) を持つプライマー 3 ( 配列番号 : 7 ) およびプライマー 4 ( 配列番号 : 8 ) を作製し、Marathon-ready human testis cDNA ( CLONTECH 社 ) または上記 ( 2 ) で構築した MTP53 を誘導した H1299 細胞 ( H1299-MTP53 ) から調整した cDNA を鋳型として、PCR 反応を行った。該反応は 94 で 1 分反応後、98 5 秒 - 65 10 秒 - 72 3 分の反応サイクルを 30 回行った。得られた cDNA 断片を Hind III および Xba I で digestion し、プラスミド p3 × FLAG-CMV-14 Expression Vector ( SIGMA 社 ) を上記制限酵素で digestion した部位に挿入したのち、シークエンス反応を行った。シークエンスの結果、GenBank Accession No. NM\_012472 配列の ORF ( 配列番号 : 1 4 ) の開始コドンの A から数えて、723 番目の塩基と 724 番目の塩基の間に in frame で 9bp の挿入が認められた。得られた塩基配列を、配列番号 : 3 および配列番号 : 4 に示す。

10

配列番号 : 3 で表される塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p3 × FLAG-CMV-14-MTP53TSLRPH (Ile) と、配列番号 : 4 で表される塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p3 × FLAG-CMV-14-MTP53TSLRPH (Thr) とそれぞれ命名した。これらのプラスミドを大腸菌 JM109 に導入し、形質転換体 Escherichia coli JM109/MTP53TSLRPH (Ile) および Escherichia coli JM109/MTP53TSLRPH (Thr) をそれぞれ得た。

20

配列番号 : 3 で表される塩基配列の 695 番目の塩基は、対応する GenBank Accession No. NM\_012472 配列と同様に T であるが、配列番号 : 4 で表される塩基配列の 695 番目の塩基は C である。この塩基置換はアミノ酸置換を伴う。

配列番号 : 3 で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列 ( 配列番号 : 1 ) を含有するタンパク質を MTP53TSLRPH (Ile) タンパク質と、配列番号 : 4 で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列 ( 配列番号 : 2 ) を含有するタンパク質を MTP53TSLRPH (Thr) タンパク質とそれぞれ命名する。

配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列の 232 番目は Ile であり、配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列の 232 番目は Thr である。

30

## 【 0 0 7 8 】

## 実施例 2

ヒト乳がん matched pair における MTP53TSLRPH 遺伝子発現量の検討

以下、MTP53TSLRPH (Ile) タンパク質、MTP53TSLRPH (Thr) タンパク質および配列番号 : 1 5 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の遺伝子を、まとめて MTP53TSLRPH 遺伝子と称す。

ヒト乳がん患者の癌組織および正常組織由来の Human Breast Matched cDNA Pair Panel ( Clontech 社 ) を鋳型として用い、MTP53TSLRPH 遺伝子発現量の検討を行った。実施例 1 で用いられたプライマー 3 およびプライマー 4 を用いて PCR 反応を行うことにより、がん組織と正常組織での TSLRP 遺伝子の発現量比較を行った。該反応は 94 で 1 分反応後、98 5 秒 - 65 10 秒 - 72 3 分の反応サイクルを 40 回行った。

40

その結果、MTP53TSLRPH 遺伝子の癌組織での発現が、正常組織に比較し顕著である患者が確認された。

## 【 0 0 7 9 】

## 実施例 3

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞死

MTP53TSLRPH 遺伝子のアポトーシスに及ぼす影響を解析するために、MTP53TSLRPH アンチセンスオリゴヌクレオチド導入実験を行った。

まず、配列番号 : 1 3 で表される塩基配列に対するアンチセンス ( 配列番号 : 9 ) を設

50

計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製 (Amersham Pharmacia Biotech) して導入実験に用いた。コントロールオリゴヌクレオチドとしては、配列番号 : 9 で表される塩基配列のリバース配列 (配列番号 : 10) を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製 (Amersham Pharmacia Biotech) して用いた。

被験細胞として肺がん細胞株A549 (大日本製薬) を用い、オリゴヌクレオチド導入前日に  $3.3 \times 10^3$  個の細胞を96ウェルプレート (Falcon社) に播種した。オリゴヌクレオチド導入にはOligofectAMINE (Invitrogen社) を使用し、そのプロトコールに従った。導入後20時間でRNeasy mini kit (Qiagen社) のプロトコールに従ってRNAを抽出し、SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (GIBCO BRL社) を用いてcDNAを調製した。2種のプライマー (配列番号 : 11 および配列番号 : 12) を用いてMTP53TSLRPH遺伝子の発現量を、また補正のためにTaqMan human  $\beta$ -actin control reagent (Applied Biosystem社) を用いて  $\beta$ -actin発現量を見ることとし、ABI7700 (Applied Biosystem社) マニュアルに従いPCRを行った。MTP53TSLRPH遺伝子の発現量を測定する際の上記PCR反応における反応液の組成は、SYBR PCR Master Mix (Applied Biosystem社) を  $7.5 \mu\text{l}$ 、上記で調製したcDNAテンプレートを滅菌蒸留水で3倍に希釈したものを  $5 \mu\text{l}$ 、2種のプライマー (配列番号 : 11 および配列番号 : 12) を各  $0.5 \mu\text{M}$  となるように加え、 $15 \mu\text{l}$  の液量とした。PCR反応は、50 2分、95 10分の後、95 15秒、60 1分のサイクルを40回繰り返した。MTP53TSLRPH遺伝子の発現量は  $\beta$ -actin発現量で補正して比較した。

10

一方、アポトーシスに及ぼす影響は、アンチセンスオリゴヌクレオチド導入後3日目にCell death detection ELISA (Roche社) を用いてコントロールオリゴヌクレオチド導入細胞と比較した。

20

その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチド導入後20時間でMTP53TSLRPHの発現 (RNA) はコントロール (リバース) オリゴヌクレオチド導入時 (100%) に比べ37%に減少していた。

導入後3日目の時点で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した場合のアポトーシスは、コントロールオリゴヌクレオチドを導入した場合 (100%) に比べ204%に増加していた。

これより、MTP53TSLRPH遺伝子の発現を抑制すると、癌細胞はアポトーシスを起こして細胞死を起こすことが確認された。

30

【配列表】

[2004298175000001.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)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/82	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 14/82	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

Fターム(参考)	2G045	AA34	AA35	AA40	BA11	BB50	DA12	DA13	DA14	DA36	FB02
											FB03
	4B024	AA01	AA12	BA80	CA01	CA04	CA09	HA14	HA17		
	4B063	QA18	QA19	QQ58	QR55	QS34					
	4B064	AG01	CA19	CC24	DA05	DA14					
	4B065	AB01	BA02	CA24	CA44	CA46					
	4C084	AA13	AA17	NA13	ZB21	ZB26	ZC54				
	4C085	AA13	AA14	BB01	BB11	CC02	CC21	CC29	CC31	DD23	DD62
		DD63	EE01								
	4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZB21	ZB26	ZC54	
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	CA41	DA75	EA21	EA22	EA23
		EA28	EA51	FA74							

专利名称(译)	新型蛋白质及其DNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004298175A</a>	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2003418804	申请日	2003-12-17
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	田中浩史 海江田功 本田弘平		
发明人	田中 浩史 海江田 功 本田 弘平		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ58 4B063 /QR55 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA13 4C084 /ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZC54 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC29 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045 /DA75 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	高桥修一 啾关口		
优先权	2002366732 2002-12-18 JP 2003073974 2003-03-18 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：获得优良的癌症预防/治疗剂并提供其筛选方法。解决方案：蛋白质或多核苷酸可用作诊断癌症，神经退行性疾病，自身免疫性疾病等的诊断标记等。使用所述蛋白质的抑制活性的化合物或通过所述多核苷酸或抑制所述蛋白质的基因表达的化合物筛选癌症的方法获得的蛋白质用作癌症的预防/治疗剂和凋亡启动子。 ㄹ

