

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

**特開2003 - 164290**

(P2003 - 164290A)

(43)公開日 平成15年6月10日(2003.6.10)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/74	B 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/74		35/76	4 B 0 6 3
35/76		39/395	D 4 B 0 6 4
38/00			N 4 B 0 6 5
39/395		45/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 367093(P2001 - 367093)

(22)出願日 平成13年11月30日(2001.11.30)

(71)出願人 000002831

第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72)発明者 横田 博

栃木県下都賀郡石橋町下石橋519第一製薬株式会社栃木研究センター内

(72)発明者 佐藤 一紀

東京都江戸川区北葛西一丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミロイド誘導 L i b 遺伝子

(57)【要約】

【課題】 アミロイド刺激により発現が誘導される新規遺伝子を見出し、アルツハイマー病などの神経疾患を制御すること。

【解決手段】 アミロイド刺激により発現が誘導される新規遺伝子を c D N A サブトラクション法により取得し、新規 D N A、該 D N A がコードするポリペプチド、該 D N A を含有する組換えベクター、該組換えベクターを有する形質転換体、当該ポリペプチドに対する抗体、当該ポリペプチドの製造法、上記のものを利用した該遺伝子の発現および活性を調節する化合物の同定法、該方法で得られる化合物を提供し、さらに、これらを利用して アミロイドに関連した神経疾患に用いる医薬組成物・診断手段および診断用キットなどを提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の群より選ばれるDNAまたはその相補鎖；

配列表の配列番号1に記載のDNA配列で示されるDNA、

配列表の配列番号2に記載のDNA配列で示されるDNA、

配列表の配列番号1または2に記載のDNA配列を含有するDNA、

前記 または のDNAと少なくとも約70%のDNA配列上の相同性を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA、および

前記 から のDNAのDNA配列において、1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA。

【請求項2】請求項1に記載のDNAまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA。

【請求項3】請求項1または2に記載のDNAがコードするポリペプチド。

【請求項4】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【請求項5】pCMV-Tag4-rLib(FERM BP-7811号)。

【請求項6】請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミドを用いて形質転換させた形質転換体。

【請求項7】請求項6に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項3に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項8】請求項3に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項9】細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有する化合物の同定方法であって、請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体および請求項8に記載の抗体のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法。

【請求項10】請求項9に記載の同定方法により同定される化合物。

【請求項11】請求項9に記載の同定方法により同定される細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節剤。

【請求項12】請求項1または2に記載のDNAまたは

その相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つからなる医薬。

【請求項13】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する医薬組成物。

【請求項14】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する疾病の防止/治療に用いる医薬組成物。

【請求項15】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の防止/治療剤。

【請求項16】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の防止/治療剤。

【請求項17】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する疾病の診断手段。

【請求項18】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の診断手段。

【請求項19】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の診断手

段。

【請求項20】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する疾病の診断用キット。

【請求項21】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の診断用キット。

【請求項22】請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖、請求項3に記載のポリペプチド、請求項4に記載の組換えベクターまたは請求項5に記載のプラスミド、請求項6に記載の形質転換体、請求項8に記載の抗体および請求項10に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アルツハイマー病に与する蛋白質 アミロイドにより、発現が誘導される新規遺伝子に関する。さらに詳しくは、新規遺伝子のDNA配列を有するDNA、該DNAがコードするポリペプチド、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を用いたポリペプチドの製造方法、該ポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物の同定方法、該同定方法により得られる化合物、該ポリペプチドもしくは該DNAに作用する該ポリペプチドの活性および/または発現の阻害剤、これらに係する医薬組成物、およびこれらに係する疾病の診断手段に関する。

【0002】

【従来の技術】 アミロイドは、アルツハイマー病患者の脳で観察される老人斑の構成因子であり、アルツハイマー病の初期発症段階において最も重要な意味を持つ因子と考えられている。アミロイドは、アミロイド前駆体が、ある種のプロテアーゼによりプロセッシングを受けることにより生成し、不溶性のシート構造の凝集体を形成する。アミロイドは神経細胞に対し、直接的、間接的に作用することにより、アルツハイマー病の進行を促すと考えられている。アミロイドの間接的作用として、アストログリア細胞の活性化が知られている。アストログリア細胞は、アミロイドにより活性化されると、いくつかの機能因子を生産することが知られている (Mark, R. E. et al., Human Pathol. 26, pp 816-823 (1995), McGee, P. L. et al., Brain R 50

es. Rev. 21, pp 195-218 (1995), Eddleston, M. et al., Neuroscience 54, pp 15-36 (1993))。本発明者らはアミロイドにより発現が誘導される遺伝子としてプロスタグランジンE2合成酵素 (特開2001-258575号公報)、ADAMTS-4 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-4) をすでに見出している (特願2000-181599号明細書)。アストログリア細胞とアミロイドの協調作用により、アルツハイマー病が増悪すると考えられており、アルツハイマー病患者脳の病変部において、活性化アストログリア細胞が老人斑周辺に局在しその突起を老人斑に伸長させていることも知られている。

【0003】しかしながら、アミロイドがアストログリア細胞の活性化を介してアルツハイマー病を増悪化する機構およびアミロイドによりアストログリア細胞において発現が誘導あるいは抑制される因子についての解析は未だ十分でない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、アストログリア細胞においてアミロイドにより発現が誘導される新規遺伝子を見出すことであり、見出された遺伝子をアルツハイマー病変等の神経疾患の診断・制御を目的とする手段として使用することである。さらには、該新規遺伝子がコードするポリペプチドを提供し、該新規ポリペプチドに対する抗体を提供することである。また、他の本発明の課題は、上記のものを利用する、該新規ポリペプチドの作用および/または発現を調節する化合物の同定方法を提供し、さらには、該同定方法で同定される化合物を提供することであり、また、これらを利用した疾病の診断手段、疾病診断用キット、疾病治療薬を提供するものである。

【解決するための手段】課題解決のため、本発明者は、アミロイド処理および未処理のラット胎児脳由来アストログリア細胞の発現遺伝子を用いたcDNAサブトラクション処理を実施し、アミロイド処理により発現が誘導される新規遺伝子を同定し、その塩基配列および該新規遺伝子がコードするアミノ酸配列を決定することにより、本発明を完成した。さらに、ヒトにおける該新規遺伝子のオーソログを見出し、配列を決定した。

【0005】すなわち、本発明は、

(1) 下記の群より選ばれるDNAまたはその相補鎖；  
配列表の配列番号1に記載のDNA配列で示されるDNA、

配列表の配列番号2に記載のDNA配列で示されるDNA、

配列表の配列番号1または2に記載のDNA配列を含有するDNA、

前記 または のDNAと少なくとも約70%のDNA配列上の相同性を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA、および

前記 から のDNAのDNA配列において、1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA。

【0006】(2)(1)に記載のDNAまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションし、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するペプチドをコードするDNA。

【0007】(3)(1)または(2)に記載のDNAがコードするポリペプチド。

【0008】(4)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖を含有する組換えベクター。

【0009】(5)pCMV-Tag4-rLib(FERM BP-7811号)。

【0010】(6)(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミドを用いて形質転換させた形質転換体。

(7)(6)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項3に記載のポリペプチドの製造方法。

【0011】(8)(3)に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【0012】(9)細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有する化合物の同定方法であって、(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体および(8)に記載の抗体のうち、少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法。

【0013】(10)(9)に記載の同定方法により同定される化合物。

【0014】(11)(9)に記載の同定方法により同定される細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節剤。

【0015】(12)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つからなる医薬。

【0016】(13)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の

抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する医薬組成物。

【0017】(14)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する疾病の防止/治療に用いる医薬組成物。

【0018】(15)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の防止/治療剤。

【0019】(16)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の防止/治療剤。

【0020】(17)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する疾病の診断手段。

【0021】(18)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の診断手段。

【0022】(19)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の診断手段。

【0023】(20)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する疾病の診断用キット。

【0024】(21)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプ

ラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有する神経細胞死の診断用キット。

【0025】(22)(1)または(2)に記載のDNAまたはその相補鎖、(3)に記載のポリペプチド、(4)に記載の組換えベクターまたは(5)に記載のプラスミド、(6)に記載の形質転換体、(8)に記載の抗体および(10)に記載の化合物のうち、少なくともいずれか1つを含有するアルツハイマー病の診断用キット。を提供することである。

【0026】

【発明の実施の形態】(アストログリア細胞のアミロイド処理)アストログリア細胞は各種動物の脳から調製できる。胎児脳が好適に用いられ、用いる動物としては、比較的胎児脳を採取し易いラット、マウス、モルモット、ウサギ等のげっ歯類が好ましく、特にラットは好適に用いられる。胎児脳からのアストログリア細胞の調製は自体公知の方法が用いられるが、その方法は実験医学別冊神経生化学マニュアル(伊藤仁一ら 羊土社(1989))などに開示されている。

【0027】アストログリア細胞に作用させるアミロイドは市販されており、Anaspec社などから入手できるが、遺伝子工学的手法により作成することもできる。アミロイドは処理させる前に遠心処理等により凝集させてもよい。アミロイドの添加濃度および処理時間は生理活性を示す範囲で適宜選択されるが、濃度としては25~50μM、処理時間としては10~20時間が好ましい。アミロイド処理と並行して、同一条件下で他の培養容器にアストログリア細胞を播種し、アミロイドの希釈に用いた緩衝液を等量添加することにより

アミロイド未処理アストログリア細胞を調製できる。

【0028】(発現遺伝子の調製)アミロイド処理および未処理のアストログリア細胞の発現遺伝子は通常用いられるRNAの採取法により採取できる。発現遺伝子は、mRNAのままで用いてもcDNA化して用いてもよい。mRNAからcDNAへの変換は逆転写酵素等を用いた方法が適用できる。全RNAの採取には例えば、酸性グアニジニウム-フェノール-クロロホルム法(AGPC法; Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162, pp156-159 (1986))が適用でき、全RNAからのmRNAの採取にはオリゴdTカラム等を用いたpolyA(+)RNAの精製等が挙げられる。RNAサンプルは複数回採取したものを混合して用いることもできる。採取ロットの品質を解析する目的では、アストログリアでの発現が知られているいくつかの遺伝子の発現をモニターするとよい。例えば、神経成長因子(NGF)、腫瘍壊死因子-(TNF-)、インターロイキン-6(IL-6)、p75などをモニター遺伝子として用い、これらの発現が同等であるサンプルを使用するとよい。

【0029】(サブトラクション処理)アミロイド処理により発現が誘導される遺伝子を獲得するためには、サブトラクション処理が適用できる。サブトラクション処理では差し引かれる側の遺伝子群(テスター)と差し引く側の遺伝子群(ドライバー)の二組の遺伝子群を用いる。例えば、アミロイドにより発現が誘導される遺伝子を獲得するためには、テスターとしてアミロイド処理細胞から得られた遺伝子(アミロイド処理遺伝子)、ドライバーとして未処理細胞から得られた遺伝子(未処理遺伝子)を用いたサブトラクションを行うとよい。サブトラクション処理の方法としては、既知の各種手段を利用可能であり(特開平3-117488号)、好ましくはcDNAサブトラクション法が挙げられる。cDNAサブトラクション法としては、RDA法、PCR-選択(select)cDNA法などが特に好ましい。

【0030】サブトラクション処理では、サブトラクションの陽性対照として、テスター側に適当なDNAフラグメントを加え、その濃縮を確認することにより、サブトラクション処理の効率を確認できる。また、アミロイド処理により発現が誘導されることが知られている遺伝子をプローブとして、サブトラクション前およびサブトラクション後のPCR産物についてサザンプロット・ハイブリダイゼーションを行うと、同様にサブトラクション処理の成否を確認できる。現在、アミロイド処理により、発現が誘導されることが知られている遺伝子としては、NGF、inducible Nitric Oxide Synthase(iNOS)、Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted(RANTES)等が挙げられる。

【0031】サブトラクション処理後のPCR産物を適当なベクターへ挿入し、プラスミドライブラリーなどを作成する。ベクター挿入部分をPCRにより増幅し、それらの遺伝子をメンブレンにドットプロットしたものを2セット作製する。このドットメンブレンに対して、テスターとしてアミロイド処理遺伝子、ドライバーとして未処理遺伝子を用いたサブトラクション処理後のPCR産物〔以下、サブトラクション処理を(テスター)-(ドライバー)の式で表す。〕と(未処理遺伝子)-(アミロイド処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物プローブでそれぞれハイブリダイゼーションを実施する。(未処理遺伝子)-(アミロイド処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物と比較して、(アミロイド処理遺伝子)-(未処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物において特異的に濃縮が認められるクローンを、アミロイド処理によって発現が誘導される遺伝子として判断すればよい。ベクター挿入部分は自体公知のDNAシーケンス法によりその配列を決定することができる。

【0032】(ラット遺伝子の取得)本発明において提供される遺伝子は、ラット胎児脳由来アストログリアを用いたcDNAサブトラクション処理により、新規な蛋白質をコードする遺伝子としてそのcDNAが取得されたものである。ヌクレオチドデータベース(DDBJ/EMBL/GenBank)を検索した結果、新規であることが確認されたため、作製したアミロイド処理ラットアストログリア細胞由来cDNAライブラリーを用いて、該cDNAフラグメントをプローブとしてスクリーニングしたところ5.6KbのcDNAを得た。このcDNAはノーザンブロットで認められるバンドとほぼ同ヌクレオチド数となることと、5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-race)法で5'側の配列が得られなかったことからmRNA全長を含んだものであると考えられた。蛍光色素(Cy5;ファルマシア)標識M13ユニバーサルおよびリパースプライマーを用いてシークエンス反応を行い、ALF Express 蛍光シークエンサー(ファルマシア社製)などでORF領域の配列を決定したところ、本遺伝子はORF1734bp、578アミノ酸をコードする、新規LRRスーパーファミリー(Buchanan, S.G. et al., Prog Biophys Mol. Biol. 65, pp1-44 (1996) Shishido, E. et al., Science 280, pp2118-2121 (1998))に属する蛋白であることが明らかになった(図1)。

【0033】本遺伝子がコードする蛋白質はシグナル配列(1-19アミノ酸)、Leucine Rich Repeat(LRR) N-フランキンク領域(25-53アミノ酸)、15回LRR領域(54-413アミノ酸)、LRR C-フランキンク領域(423-475アミノ酸)、膜貫通領域(535-557アミノ酸)、細胞内領域(558-578アミノ酸)から成る。それぞれのLRRは24アミノ酸のコンセンサス残基を持つ(図2)。本蛋白質をLibと名づけた。Flaタグを付加したLibをCos7細胞に発現させたところ計算上の62kDaより大きく、これは糖鎖付加の影響と考えられた。アミロイド処理によりLibはラットアストログリア細胞で13倍の発現上昇を示した(図3)。

【0034】(ヒトオソログの取得)Libのヒトのオソログを見出すために、ヒトゲノムデータベースの検索を行ったところ、ヒトの対応遺伝子はNCBIゲノムデータベース上に見出された。RT-PCR法によりヒト脳由来ポリA(+)RNA(CLONTECH)からクローニングし、配列を決定し、DDBJ/EMBL/GenBankにアクセシオンナンバーAB071037で登録(未公開)した。ヒトLibはラットとアミノ酸レベルで84%、ヌクレオチドレベルで81%のホ

モロジーを示した(図2)。ヒトLibはクロモソーム3q29領域に存在し、この遺伝子がmRNAとして転写されていることは本発明者らがはじめて示した。ヒトLibの組織分布を調べたところ胎盤で強い発現が認められ、脳では検出レベルを下回った(図4)。

【0035】(Libの機能)LRRは20~29アミノ酸からなる短い配列の繰り返しであり、その最も典型的な長さは24アミノ酸である。LRRドメインは、接着、ターゲット認識、レセプター・リガンド結合を含む蛋白質・蛋白質間の特異的相互作用に機能する。LibはLRRスーパーファミリーに属する新規の分子である。さらに、ある種の接着因子とレセプターの細胞外ドメインに特徴的であり、システインに富むN端・C端の両LRRフランキンク領域(結合モチーフとしてジスルフィド結合を形成していると考えられている)を有している。これらのLRRの特性および、アミロイド処理によるLibの発現が顕著に誘導されることから判断すると、アミロイドによりアストログリア細胞で発現誘導されたLibはニューロン・アストログリア細胞間、もしくはグリア細胞間の相互作用を強めることが推測され、結果としてこれがアルツハイマー病の進行に関わると本発明者らは考えている。

【0036】LRRファミリーのメンバーの中には、シヨウジョウバエ発生段階の特定の筋肉への神経軸索の伸長時にターゲット認識分子として働く蛋白質(Carpriious)(Shishido, E. et al., Science 280, pp2118-21 (1998), Taniguchi, H. et al., J. Neurobiol. 42, pp104-16 (2000))、また、血小板接着、活性化に関与するGPIb-V-IX複合体の構成分子である蛋白質(Glycoprotein V)(Hickey, M.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, pp8327-8331 (1993), Lanza, F. et al., J. Biol. Chem. 268, pp20801-20807 (1993), Modderman, P.W. et al., J. Biol. Chem. 267, pp364-369 (1992), Lopez, J.A. et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 5, pp97-119 (1994))が存在する。Libは上記蛋白質と同様なドメイン構成を示すとともにほぼ同数のリピート数を持つ。上記蛋白質の機能もすべてが明らかになってはいないが、Libも同様に発生段階もしくは神経傷害時に、細胞・細胞間、細胞・細胞外マトリックス間の相互作用に関与する分子であると発明者は考えている。

【0037】Libは常発現性遺伝子ではなく誘導遺伝子であり、サイトカイン類でも発現上昇を示したことから、新規炎症関連因子である。TNF-、IL-1

はアルツハイマー病脳に検出されており (McGeer, P. L., et al., Brain Res. Rev. 21, pp195-218 (1995))、またIFN- $\gamma$  もアルツハイマー病悪化への関与が指摘されている (Blasko, I. et al., J. Neuroimmunol. 116, pp1-4 (2001))、Ii, M. et al., Brain Res. 720, pp93-100 (1996))。アルツハイマー病その他の神経疾患で認められるように、グリア細胞は炎症時に患部へ移動し、それを取り囲み突起を内部に伸長している。Libは、定常時には低い発現に押さえられているが、炎症性刺激に対応して発現が誘導され (図6)、グリアに見られる細胞・細胞間、もしくは細胞・細胞外マトリックス間の動的変化に関わる分子であると考えられる。

【0038】(DNAおよびその相補鎖)本発明のDNAおよびその相補鎖は、配列表の配列番号1または2に示すDNA配列からなるDNAおよびその相補鎖、配列表の配列番号1または2に示す部分配列を有するDNAおよびその相補鎖およびこれらのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするDNAを意味する。「DNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするDNA」は、例えば、Molecular Cloning第2版 (J. Sambrook et al. (1989)) に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする」とは、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$  および  $50\% \text{ホルムアミド}$  の溶液中で42 にて加温した後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$  の溶液中で68 にて洗浄する条件でも判別可能な陽性のハイブリダイゼーションのシグナルが観察されることを表す。

【0039】また、本発明のDNAは配列表の配列番号1または2のDNA配列で示されるDNAと少なくとも約70%のDNA配列上の相同性を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するポリペプチドをコードするDNAから選択される。

【0040】その選択されるDNAは、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有する。DNA配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばDNA配列を直接決定する方法を使用することができる。コードするポリペプチドの細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能の確認は本発明のDNAを用いてポリペプチドを適当な細胞に発現させることにより行うことができる。ポリペプチドの発現には公知の蛋白質発現系、例えば、無細胞蛋白質発現系を利用できる。無細胞蛋白質発現系としては、例えば、胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム

系の技術を利用できる (Nature, 179, pp160-161 (1957))。該ポリペプチドを発現させた細胞同士あるいは、該ポリペプチドを発現させた細胞の細胞外マトリックスへの接着能を視覚的あるいは物理的手段により測定すればよい。

【0041】さらに本発明のDNAは上記DNAのDNA配列において1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異を有し、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能有するポリペプチドをコードするDNAを意味する。DNAの欠失、置換、付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、エキソヌクレアーゼを用いた欠失変異体の作製法、部位特異的突然変異誘発法などが挙げられる。

【0042】これらのDNAは、いずれも本発明の新規ポリペプチドの製造に有用な遺伝子を提供するものであり、これをコードする遺伝子等の核酸、またはmRNA検出のためのプローブもしくはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を調節するアンチセンスオリゴマーとして使用することができる。例えば、本発明のDNAをアンチセンスとして使用する場合、本発明の新規ポリペプチドの発現が特異的に阻害される。さらに、本発明のDNAは、核酸に関する試薬としても利用できる。

【0043】(ポリペプチド)本発明のポリペプチドは配列表の配列番号1または2のDNA配列で示されるDNAおよび配列表の配列番号1または2に記載のDNA配列で示されるDNAを含有するDNAによりコードされるポリペプチドである。さらに配列表の配列番号1または2に記載のDNA配列で示されるDNAと少なくとも約70%のDNA配列上の相同性を有するDNAによりコードされ、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するポリペプチドである。また、上記DNAまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするDNAによりコードされ、かつ細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着を調節する機能を有するポリペプチドである。さらに上記DNAのDNA配列において1ないし数個のDNAの欠失、置換、付加などの変異を有するDNAによりコードされ、かつ細胞・細胞間の接着調節機能および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着調節機能を有するポリペプチドである。また、これらのポリペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0044】本発明のポリペプチドは、それら自体で、それら自体の生体内での機能を調節するための医薬組成物に使用できる。また、本発明のポリペプチドは、それらの機能を調節し得る化合物、例えば、阻害剤、拮抗剤、賦活剤等を得るためのスクリーニングや、それらに

対する抗体の取得に用いることができる。さらに、本発明のポリペプチドは、試薬としても使用可能である。

【0045】(組換えベクター)本発明のDNAを適当なベクターDNAへ組み込むことにより、組換えベクターを得ることができる。ベクターDNAとしては、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、Col E1から派生するベクター、ラムダファージから派生するベクターがある。前記ベクターDNAに本発明のDNAを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。後述の実施例中に示すpCMV-Tag4-rLib(図5)では、ベクターDNAとしてpCMV-Tag4(STRATAGENE社製)を用いたが、むしろこれに限定されない。また、pCMV-Tag4-rLibは特許生物寄託センターにFERM BP-7811号として寄託されている。

【0046】(形質転換体)上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規ポリペプチドおよびその由来物を提供可能である。

【0047】形質転換は、自体公知の手段を応用することができ、例えば、レプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換を行う。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自律複製系を利用する。ベクターは、宿主の種類により選択され、発現目的遺伝子配列とその複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。構成要素は宿主が原核細胞か真核細胞かによって選択し、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組み合わせて使用する。

【0048】形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養することにより、本発明のポリペプチドの製造に用いることができる。培養は、発現産生される新規ポリペプチドの生理活性を指標に行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチによって行う。

【0049】なお、上記pCMV-Tag4-rLibを用いてコンピテントセルE.coli DH5の形質転換を行うことにより得た形質転換体を用いて、pCMV-Tag4-rLibの増幅を行った。

【0050】(新規ポリペプチドおよびその由来物の回収)培地からの新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドの回収は、分子篩、イオンカラムクロ

マトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合わせるか、溶解度差に基づく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0051】(抗体)抗体は、本発明の新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドの抗原決定基を選別し、作製する。抗原決定基は、少なくとも、5個、より好ましくは少なくとも8~10個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1のDNAがコードするポリペプチド配列と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であることも有効である。抗体は、免疫学的に新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドを認識する限り特に限定されない。この認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定する。

【0052】抗体を産生するためには、本発明の新規ポリペプチドおよびその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合して、動物に対して体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用を起こさなければ特に限定されず、例えば、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫する動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得する。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

【0053】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

【0054】ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、直接本発明のポリペプチドと結合し、その活性を制御可能であり、本発明のポリペプチドの活性が関与する疾病の治療・防止のために有用である。

【0055】(化合物の同定)かくして調製されたDNAおよびその相補鎖、ポリペプチド、組換えベクター、形質転換体および抗体は、単独または複数手段を組み合わせることによって、本発明のポリペプチドの発現または活性を調節する化合物の同定に有効な手段を提供する。すなわち、本発明のDNAまたはその相補鎖、組換えベクター、形質転換体、または抗体のうちの少なくとも1つを用いることにより、本発明のポリペプチドの発現を阻害もしくは増強する化合物の同定が、また、本発明のポリペプチド、または抗体のうちの少なくとも1つ

を用いることにより、本発明のポリペプチドの活性を阻害もしくは増強する化合物の同定が可能である。例えば、ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質発現系を利用した遺伝子レベルでの発現調節剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて利用可能である。また、本同定方法により得られた化合物は後述する医薬組成物、疾病の治療剤として有用である。

【0056】(化合物、医薬組成物、診断手段)上記の同定方法で得られた化合物は、細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着を調節する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物として利用可能である。上記の阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としては、蛋白質、ポリペプチド、抗原性を有さないポリペプチド、低分子化合物が挙げられ、好ましくは低分子化合物である。

【0057】かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性を毒性等を考慮して選別することによって、細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する疾病の治療に用いる医薬組成物として調製可能である。また、本発明からなる新規DNAまたはその相補鎖、これらがコードするポリペプチド、上記DNAまたはその相補鎖を含む組換えベクター、これら組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体、および上記ポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それら自体が、本発明のポリペプチドの活性、発現に対する阻害、拮抗、賦活等の機能を有し、細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する疾病の治療・防止に用いる医薬手段として使用できる。

【0058】細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する疾病としては、神経細胞死が関与する疾病、例えばアルツハイマー病等の神経疾患が挙げられる。Libの特徴的構造であるLRRの特性および、アミロイド処理によるLibの発現が顕著に誘導されることから判断すると、アミロイドによりアストログリア細胞で発現誘導されたLibはニューロン・アストログリア細胞間、もしくはグリア細胞間の相互作用を強めることが推測され、結果としてこれがアルツハイマー病の進行に関わると本発明者らは考えている。したがって、Libの発現阻害または機能阻害は、アルツハイマー病の治療応用にできると発明者は考えている。

【0059】製剤化にあたっては、化合物、ポリペプチド、蛋白質、ポリヌクレオチド、抗体等、各対照に応じた自体公知の製剤化手段を導入すればよい。

【0060】本発明の新規DNAまたはその相補鎖、これらがコードするポリペプチド、上記DNAまたはその相補鎖を含む組換えベクター、これら組換えベクターを用いて形質転換した形質転換体、および上記ポリペチ

ドを免疫学的に認識する抗体は、細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着が関与する神経細胞死、疾患等の診断手段として有用である。特に、アルツハイマー病の診断マーカーおよび/または試薬等の診断手段として有用である。診断は本発明のDNAとの相互作用・反応性を利用して、本発明のポリペプチドの存在量を決定すること、および/または本発明のポリペプチドの試料中での存在量を決定することによって行う。試料としては血液、ずい液、脳生検サンプル等が好適であり、特に脳脊ずい液が好ましい。診断に用いる測定法は、自体公知の抗原抗体反応、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。なお、ここで言う手段とは、目的達成のために使用する方法および/または媒体を意味する。すなわち、例えば、診断手段には、診断するための方法、診断に用いる試薬、キットなどが含まれる。

【0061】

【実施例】(グリア細胞の培養)アストログリア細胞はラット大脳皮質から得た。Wister系ラット胎児(チャールスリバー、17Days)の大脳を採取し、トリプシン処理により細胞を分散させた。得られた細胞を20%の牛胎児血清(FCS)、抗生物質液を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で1週間培養後、10%FCSを含むDMEM中でさらに二次培養した。90%以上の細胞がグリア線維酸性蛋白陽性であることが、蛍光抗体法により確認された。C6ラットアストログリオーマ細胞はAmerican Type Culture Collection(ATCC)から入手し、10%FCSを含むDMEM中で維持した。

【0062】(アミロイドの調製およびアストログリア細胞のアミロイド処理)アミロイド(Anaspec社製、アミロイド1-40)を滅菌水に溶解し、70℃で保存し用時融解して用いた。アミロイドの凝集は、1mMのアミロイドをEarle's緩衝液に溶解し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで1週間保持後、10000×gで10分間遠心処理することにより行った。ペレットをB27サプリメント(Gibco BRL)を含むDMEM中に再懸濁し、適宜の濃度に調製して用いた。二次培養後のアストログリア細胞をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、B27サプリメントを含む無血清培地に変換し、2日間培養後、25μMの凝集アミロイドを添加してさらに15時間培養した。

【0063】(cDNAサブトラクションおよびライブラリースクリーニング)アミロイド処理および未処理のアストログリア細胞(6cmプラスチックディッシュ各20枚)よりAGPC法にて9回にわたり全RNAを抽出した。poly A(+)RNAはオリゴdTラテックス(ロシユ社製)を用いて調製した。

【0064】アミロイド処理および未処理のアストログリア細胞由来のpoly A(+)RNA各2μgを

出発原料として(アミロイド処理遺伝子)(未処理遺伝子)および(未処理遺伝子)(アミロイド処理遺伝子)のcDNAサブトラクション処理を、Diatchenkoらの方法(Proc. Natl. Acad. USA 93, pp6025-6030(1996))に準じて、PCR-select cDNA subtraction kit (CLONTECH)を用いて行った。サブトラクション処理のポジティブコントロールとして、Rsa I消化後のテスターに 174/Hae III消化DNAフラグメントをテスト中の重量比で約 $2.5 \times 10^{-5}$ になるように加えた。

【0065】実施したサブトラクション処理の効率を検証するため、陽性対照である 174/Hae III消化DNAフラグメントをプローブとして、サブトラクション後のPCR産物およびサブトラクション前のPCR産物についてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを実施した。

【0066】(アミロイド処理遺伝子)(未処理遺伝子)のPCR産物のベクター[pBluescript SK+(Stratagene)]へのライゲーションを行い、プラスミドライブラリーを作製し、DH5コンピテントセル(Gibco BRL)のトランスフォーメーションを行った。

【0067】プラスミドライブラリーの960クローンのベクター挿入部分をPCR法により増幅し、それらの遺伝子を60~100ngずつメンブレン(Hybrid-N+; Amersham社製)にドットブロットしたものを2セット作製した。このドットブロットメンブレンに対して、(アミロイド処理遺伝子)(未処理遺伝子)および(未処理遺伝子)(アミロイド処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物のプローブで、0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH6.8)、10μg/ml サケ精子DNAを含む7% SDS液中68、16時間のハイブリダイゼーションをそれぞれ実施した。メンブレンを0.1% SDSを含む0.1x SSCで68、30分の洗浄を行った。(未処理遺伝子)(アミロイド処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物と比較して(アミロイド処理遺伝子)(未処理遺伝子)のサブトラクション後のPCR産物において特異的に濃縮が認められるクローンを選択した。

【0068】(ノーザンブロットハイブリダイゼーションによる解析)選択したクローン群のそれぞれのベクター挿入部分を<sup>32</sup>Pで標識後プローブとし、アミロイド処理および未処理アストログリア細胞由来poly A(+)RNAを用いたノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを実施した。上記方法により、アミロイド処理および未処理のアストログリアから、それぞれのpoly A(+)RNAサンプルを調製した。常発現性遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲ

ナーゼ(G3PDH)cDNA、アクチンcDNA(CLONTECH社製)を内部標準プローブとして用いた。検出はBAS2000(富士フィルム社製)を用いて行った。G3PDH遺伝子、アクチン遺伝子は、アミロイド処理時および未処理時において発現量に差が認められないのに対し、本発明の新規遺伝子は、アミロイド未処理時では低レベルで維持されていた発現量が、アミロイド処理により約1.3倍増加した(図3)。

【0069】(塩基配列解析およびホモロジー検索)アミロイドにより発現が誘導されるクローンはCy5標識M13ユニバーサルおよびリバースプライマーを用いてシーケンス反応を行い、ALF Express 蛍光シーケンサー(ファルマシア)でベクター挿入部分の塩基配列を解析した。得られた配列について、NCBIデータベースでホモロジー検索を実施した。得られた全長cDNAのうちの1クローンはホモロジーを示す遺伝子はなく、新規と考えられた。作製したアミロイド処理ラットアストログリアcDNAライブラリーよりこのcDNAフラグメントをプローブとしてスクリーニングしたところ、5.6KbのcDNAを得た。このcDNAはノーザンブロットで認められるバンドとほぼ同ヌクレオチド数となることと、5'race法で5'側の配列が得られなかったことから、新規遺伝子のmRNA全長を含んだものと考えられた。ORF領域の配列を決定したところ本遺伝子はORF1734bp、578アミノ酸をコードする、新規LRRスーパーファミリーに属する蛋白質であることが明らかになった(図1)。本蛋白質はシグナル配列(1-19アミノ酸)、LRR N-フランキンク領域(25-53アミノ酸)、15回LRR領域(54-413アミノ酸)、LRR C-フランキンク領域(423-475アミノ酸)、膜貫通領域(535-557アミノ酸)、細胞内領域(558-578アミノ酸)から成る。それぞれのLRRは24アミノ酸のコンセンサス残基を持つ。本蛋白質をLibと名づけた(図1)。Flagタグを付加したLibをCos7細胞に発現させたところ計算上の62kDaより大きく、これは糖鎖付加の影響と考えられた。

【0070】(新規遺伝子発現の組織分布およびヒトオーソログのクローニング)ヒトのオーソログを見出すために、ヒトゲノムデータベースの検索を行った。ヒトの対応遺伝子はNCBIゲノムデータベース上に見つかったため、ヒト胎児脳由来poly A(+)RNA(1μg, CLONTECH)からSuperScript II(GIBCO)を用いて、プライマーをオリゴdT(12-18)とするRT-PCR法によるクローニングを実施した。逆転写産物は5'-TG TGCTCTCTCCCTTG CACAG-3'(5'側フランキンク領域)と5'-ATCACGGGAAAGCTCCATGGAC-3'(3'側フランキンク領域)をプライマ

ーとして設定しPCRによる増幅を行った。PCR産物はpCR2.1(Invitrogen)に組み込み、シークエンスを行った。

【0071】PCRエラーによる配列決定ミス为了避免のため、独立した5つのクローンの配列を決定してそれらを総合判断して本遺伝子の配列を決定した。ヒトLibはラットとアミノ酸レベルで84%、ヌクレオチドレベルで81%のホモロジーを示した(図2)。

【0072】ヒトLibはクロモソーム3q29領域に存在し、この遺伝子がmRNAとして転写されていることは本発明者らがはじめて示した。ヒトオゾンログの組織分布を調べるため、ヒトの各組織から抽出したpoly A(+)RNAのノーザンプロット(CLONTECH)に、ヒトLibのcDNAを<sup>32</sup>P標後識ハイブリダイゼーションさせた。胎盤で強い発現が認められ、脳では検出レベルを下回った(図4)。

【0073】(本発明の遺伝子の炎症性サイトカインによる発現誘導)ラットC6細胞をラットTNF-(400U/ml、Peprotech, UK)、ラットIL-1(100U/ml、Peprotech, UK)およびラットインターフェロン(IFN)-(200U/ml、Peprotech, UK)を含む混合液で処理した。全RNAはRNAeasy minicolumn(Qiagen)を用いて精製した。本発明の遺伝子の発現レベルはTaqMan Gold RT-PCRキット(Applied Biosystems)を用いてquantitative RT-PCR(ABI PRISM7700)により解析した。

【0074】TNF-、IL-1 およびIFN-の混合液を添加することで6時間をピークにして約1.8倍(0時間に対する倍率)の遺伝子の発現上昇が認め\*

\*られた。TNF-、IL-1 それぞれ単独でも若干の発現上昇を示すが、それらを同時に添加する方がより発現を誘起し、IFN-を加えることでさらなる上昇(1.8倍)が認められた(図6)。

【0075】(本発明の遺伝子の細胞内分布解析)ラットLib遺伝子のC末端にDs-Redを融合したプラスミドをラットアストロサイト-MAC6に一過的に発現させたのち、位相差顕微鏡下で、Libの細胞内分布を観察したところ、融合蛋白は細胞表面に発現していることが確認できた。

(プラスミドpCMV-Tag4-rLib(FPRMBP-号)の作製)A処理ラットアストロサイト由来cDNAライブラリーよりスクリーニングして得たrat Lib cDNAをテンプレートとし、rat LibのORF部位をORFの両端に制限酵素サイト(5'側BglII、3'側BamHI)を付加した形でPCRを用いて増幅した。

【0076】得られた増幅断片を上記2制限酵素で処理したものをBamHI処理したpCMV-Tag4(STRATAGENE)にライゲーションしpCMV-Tag4-rLibを得た(BglII、BamHIはコンバージョンにライゲートできる。)(図5)。

【0077】

【発明の効果】本発明は アミロイド処理により発現が誘導される新規遺伝子を提供するものである。本遺伝子は特徴的なLRR領域を有し、細胞・細胞間および/または細胞・細胞外マトリックス間の接着に関与すると考えられる。この特性を利用した新規医薬組成物、診断手段の提供は、アルツハイマー病等の アミロイドに関連した疾患の臨床・基礎の医用領域において大きな有用性を提供する。

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```

<110> Daiichi Pharmaceutical co
. ltd
<120> Novel gene induced by beta
-amyloid
<130> N01113001A
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1737
<212> DNA
<213> rat
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1737)
<400> 1
atg ccg ctg aaa cat tac ctc ctc ttg ctg
gtg ggc tgc cag gcc tgg 48
Met Pro Leu Lys His Tyr Leu Leu Leu Leu

```

gct cta ggt ttg gcc tac tat ggc tgc ccc  
agt gaa tgc acc tgt tcc 96  
Ala Leu Gly Leu Ala Tyr Tyr Gly Cys Pro  
Ser Glu Cys Thr Cys Ser  
20 25 30  
cgg gcc tcc cag gtg gag tgc aca gga gcg  
cgg att gtg gcg atg cct 144  
Arg Ala Ser Gln Val Glu Cys Thr Gly Ala  
Arg Ile Val Ala Met Pro  
35 40 45  
acc ccc ctg ccc tgg aat gct atg agc ctg  
cag gtc gtt aac acg cac 192  
Thr Pro Leu Pro Trp Asn Ala Met Ser Leu  
Gln Val Val Asn Thr His  
50 55 60  
att act gag ctc cct gag aac ctg ttc ctc  
aac att tca gcg ctc att 240  
Ile Thr Glu Leu Pro Glu Asn Leu Phe Leu  
Asn Ile Ser Ala Leu Ile  
65 70 75 80  
gcc cta aag atg gag aag aat gag ctg tca  
acc atc atg ccg ggt gcc 288  
Ala Leu Lys Met Glu Lys Asn Glu Leu Ser  
Thr Ile Met Pro Gly Ala  
85 90 95  
ttc cgc aat ctg ggc tct ctg cgc tac ctc  
agc ctc gcc aac aac aaa 336  
Phe Arg Asn Leu Gly Ser Leu Arg Tyr Leu  
Ser Leu Ala Asn Asn Lys  
100 105 110  
ctg agg atg ctg ccc atc agg gtc ttc cag  
gac gta aac aat ctg gag 384  
Leu Arg Met Leu Pro Ile Arg Val Phe Gln  
Asp Val Asn Asn Leu Glu  
115 120 125  
tcc ctt ctg ctc tcc aat aac cag ctg gtg  
cag atc cag cca gcc cag 432  
Ser Leu Leu Leu Ser Asn Asn Gln Leu Val  
Gln Ile Gln Pro Ala Gln  
130 135 140  
ttc tcc cag ttt agt aat ctt agg gaa ctc  
cag ttg cat ggc aac aat 480  
Phe Ser Gln Phe Ser Asn Leu Arg Glu Leu  
Gln Leu His Gly Asn Asn  
145 150 155 1  
60  
ctg gaa tcc att ccc gaa gaa gcc ttc gac  
cac cta gta gga ctc acc 528  
Leu Glu Ser Ile Pro Glu Glu Ala Phe Asp

Lys Leu Thr Leu Phe Gly Asn Ser Leu Arg  
 Glu Leu Ser Pro Gly Val  
 275 280 285

ttc ggg ccc atg ccc aac ctg agg gag ctt  
 tgg ctc tac aac aac cac 912  
 Phe Gly Pro Met Pro Asn Leu Arg Glu Leu  
 Trp Leu Tyr Asn Asn His  
 290 295 300

atc acc tcc ctc gcc gac aac acc ttc agc  
 cac ctg aac cag ctg cag 960  
 Ile Thr Ser Leu Ala Asp Asn Thr Phe Ser  
 His Leu Asn Gln Leu Gln  
 305 310 315 3

20  
 gtc ctg att ctc agt cac aac cag ctc act  
 tac atc tcc cca gga gcc 1008  
 Val Leu Ile Leu Ser His Asn Gln Leu Thr  
 Tyr Ile Ser Pro Gly Ala  
 325 330 335

ttc aat ggg ctg acg aac ctc cga gaa ctg  
 tcc ctc cac acc aac gct 1056  
 Phe Asn Gly Leu Thr Asn Leu Arg Glu Leu  
 Ser Leu His Thr Asn Ala  
 340 345 350

cta cag gac ctg gac agc aac gtc ttc cga  
 tcg ctg gcc aac ctg cag 1104  
 Leu Gln Asp Leu Asp Ser Asn Val Phe Arg  
 Ser Leu Ala Asn Leu Gln  
 355 360 365

aac atc tcg ctc cag agt aac cgc ctc cga  
 cag ctt ccg ggc agc atc 1152  
 Asn Ile Ser Leu Gln Ser Asn Arg Leu Arg  
 Gln Leu Pro Gly Ser Ile  
 370 375 380

ttt gcc aac gtc aac ggc ctc aca acc atc  
 caa ctg cag aac aac aat 1200  
 Phe Ala Asn Val Asn Gly Leu Thr Thr Ile  
 Gln Leu Gln Asn Asn Asn  
 385 390 395 4

00  
 cta gaa aac ttg cct ttg ggc atc ttt gat  
 cac ttg gtg aac ctg tgt 1248  
 Leu Glu Asn Leu Pro Leu Gly Ile Phe Asp  
 His Leu Val Asn Leu Cys  
 405 410 415

530	535	540	
atc ata gct ttg gcc tgt tcc cta gcc gcc			
tgc atc tgc tgc tgc tgc 1680			
Ile Ile Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Ala			
Cys Ile Cys Cys Cys Cys			
545	550	555	5
60			
tgc aaa aag agg agc caa gca gtc ctg atg			
cag atg aag gct ccc aat 1728			
Cys Lys Lys Arg Ser Gln Ala Val Leu Met			
Gln Met Lys Ala Pro Asn			
	565	570	575
gag tgc tag			
1737			
Glu Cys			
<210> 2			
<211> 1746			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(1746)			
<400> 2			
atg cca ctg aag cat tat ctc ctt ttg ctg			
gtg ggc tgc caa gcc tgg 48			
Met Pro Leu Lys His Tyr Leu Leu Leu Leu			
Val Gly Cys Gln Ala Trp			
1	5	10	15
ggg gca ggg ttg gcc tac cat ggc tgc cct			
agc gag tgt acc tgc tcc 96			
Gly Ala Gly Leu Ala Tyr His Gly Cys Pro			
Ser Glu Cys Thr Cys Ser			
	20	25	30
agg gcc tcc cag gtg gag tgc acc ggg gca			
cgc att gtg gcg gtg ccc 144			
Arg Ala Ser Gln Val Glu Cys Thr Gly Ala			
Arg Ile Val Ala Val Pro			
35	40	45	
acc cct ctg ccc tgg aac gcc atg agc ctg			
cag atc ctc aac acg cac 192			
Thr Pro Leu Pro Trp Asn Ala Met Ser Leu			
Gln Ile Leu Asn Thr His			
50	55	60	
atc act gaa ctc aat gag tcc ccg ttc ctc			
aat atc tca gcc ctc atc 240			
Ile Thr Glu Leu Asn Glu Ser Pro Phe Leu			
Asn Ile Ser Ala Leu Ile			
65	70	75	80
gcc ctg agg att gag aag aat gag ctg tcg			
cgc atc acg cct ggg gcc 288			

aag ctc aat ctg ggc aag aat agc ctc acc  
cac atc tca ccc agg gtc 576  
Lys Leu Asn Leu Gly Lys Asn Ser Leu Thr  
His Ile Ser Pro Arg Val  
180 185 190

ttc cag cac ctg ggc aat ctc cag gtc ctc  
cgg ctg tat gag aac agg 624  
Phe Gln His Leu Gly Asn Leu Gln Val Leu  
Arg Leu Tyr Glu Asn Arg  
195 200 205

ctc acg gat atc ccc atg ggc act ttt gat  
ggg ctt gtt aac ctg cag 672  
Leu Thr Asp Ile Pro Met Gly Thr Phe Asp  
Gly Leu Val Asn Leu Gln  
210 215 220

gaa ctg gct cta cag cag aac cag att gga  
ctg ctc tcc cct ggt ctc 720  
Glu Leu Ala Leu Gln Gln Asn Gln Ile Gly  
Leu Leu Ser Pro Gly Leu  
225 230 235 2  
40

ttc cac aac aac cac aac ctc cag aga ctc  
tac ctg tcc aac aac cac 768  
Phe His Asn Asn His Asn Leu Gln Arg Leu  
Tyr Leu Ser Asn Asn His  
245 250 255

atc tcc cag ctg cca ccc agc atc ttc atg  
cag ctg ccc cag ctc aac 816  
Ile Ser Gln Leu Pro Pro Ser Ile Phe Met  
Gln Leu Pro Gln Leu Asn  
260 265 270

cgt ctt act ctc ttt ggg aat tcc ctg aag  
gag ctc tct ctg ggg atc 864  
Arg Leu Thr Leu Phe Gly Asn Ser Leu Lys  
Glu Leu Ser Leu Gly Ile  
275 280 285

ttc ggg ccc atg ccc aac ctg cgg gag ctt  
tgg ctc tat gac aac cac 912  
Phe Gly Pro Met Pro Asn Leu Arg Glu Leu  
Trp Leu Tyr Asp Asn His  
290 295 300

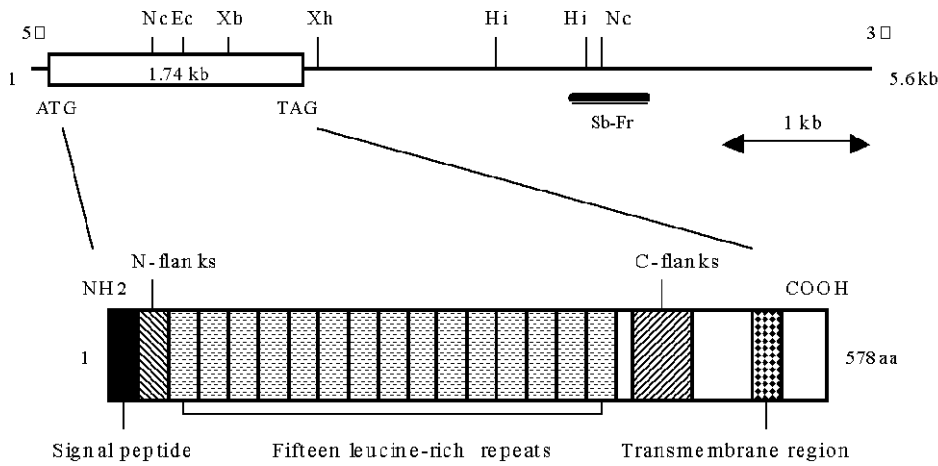
atc tct tct cta ccc gac aat gtc ttc agc  
aac ctc cgc cag ttg cag 960  
Ile Ser Ser Leu Pro Asp Asn Val Phe Ser  
Asn Leu Arg Gln Leu Gln  
305 310 315 3



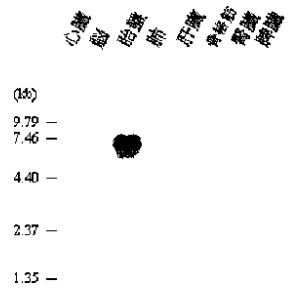
【図6】 ラットC6細胞におけるサイトカイン処理によるLibmRNAの発現量変化を示す図である。Aは0時間時のLibmRNA発現量を1とした場合の、TNF-、IL-1およびIFN-の混合液処理後、各時間におけるLibmRNAの相対発現量を示す図である。Bは、TNF-単独( )、IL-1単\*

\*独( )、IFN-( )、TNF-とIL-1の混合液(+ )、TNF-とIL-1とIFN-の混合液(++ )処理6時間後のLibmRNA発現量をG3PDHmRNA発現量を基準とする相対値として表した図である。

【図1】



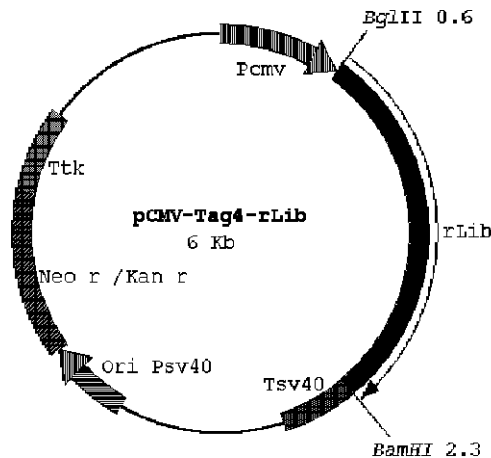
【図4】



【図3】



【図5】



【図2】

```

1  MPLKHYLLLLLVGQAWALGLAYY 23
   *****
   MPLKHYLLLLLVGQAWGAGLAYH

25  GCPSECTCSRASQVECTGARIVAMPTPLPW 53
   *****
   GCPSECTCSRASQVECTGARIVAVPTPLPW

54  NAMSLOVVNTHITELPENLFLNLS 77
   *****
   NAMSLOQLNTHITELNESPLNLS

78  ALIALKMEKNELSTIMPGAFRNLG 101
   *****
   ALIALRIEKNELSRITPGAFRNLG

102 SLRYLSLANNKLRMLPIRVFQDVN 125
   *****
   SLRYLSLANNKLVLPVIGLFGGLD

126 NLESLLLSNNQLVQIQFAQFSQFS 149
   *****
   SLESLLLSNNQLVQIQFAHFSQCS

150 NLRELQLHGNLLESIPFEAFDHLV 173
   *****
   NLKELQLHGNHLEYIPDGAFDHLV

174 GLTKLNLGRNSFTHLSPRLEFHLG 197
   *****
   GLTKLNLGKNSLTHISPRVFEHLG

198 NLQVLRRLHENRLSDIPMGTFDALG 221
   *****
   NLQVLRRLYENRLTDIPMGTFDGLV

222 NLQELALQENQIGTLPSPGLFHNNR 245
   *****
   NLQELALQONQIGLSPGLFHNNH

(Pfam -L--L-L--N-L--IP-----L-)

414 NLCELRLYD 422
   *****
   KLCELRLYD

423 NPWRCDSDILPLHNWLLLNRRALGDTLPCSSPANVRGQSLVIIINFPGPS 475
   *****
   NPWRCDSDILPLRNWLLLNQPRLGDTVPVCFSPANVRGQSLIIINNVAVPS

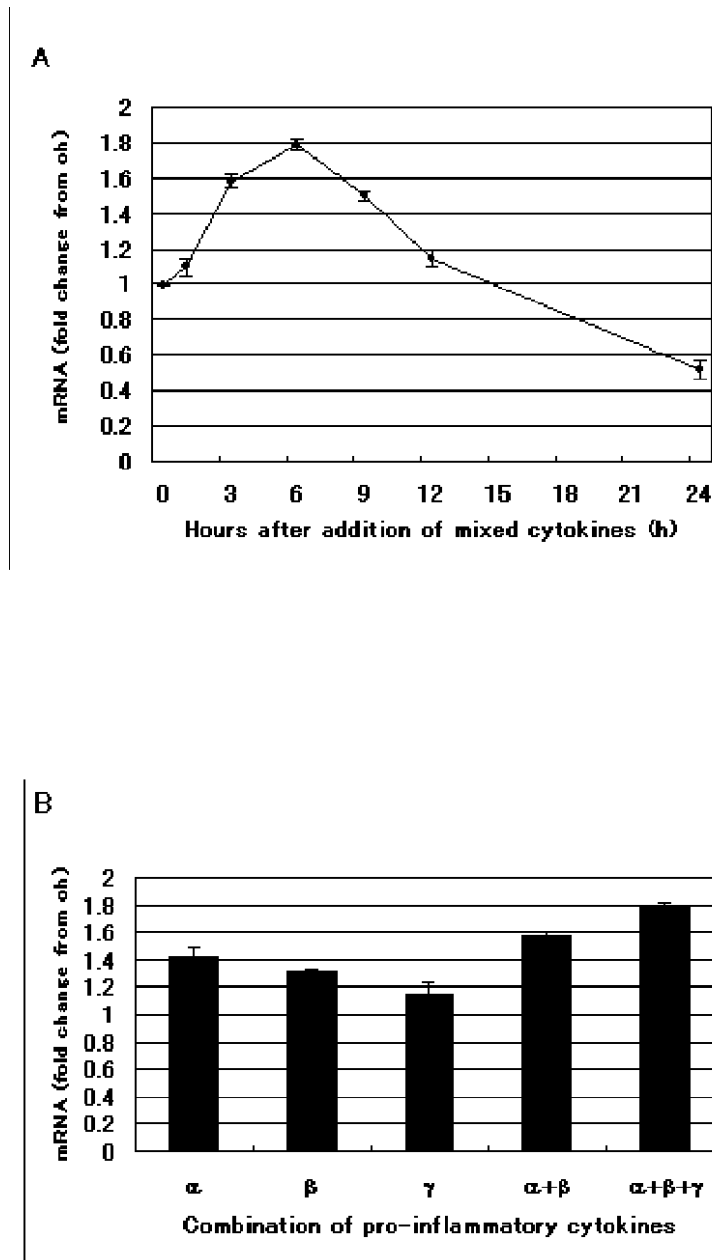
476 VQGPETP--EVPSPYDTPSYDPTTSVVSSTTEITSAVDDYDLDLTTIEATDDDRNTWGMTEAQS 534
   *****
   VHVPEVPSPYDTPWYDTPSYDPTTSVVSSTTELTSPVEDYDLDLTTIQVTDLDRSVWGMTQAQS

535 GLAIAAIVIGIIVALACSLAACIC 557
   *****
   GLAIAAIVIGIVALACSLAACVG

558 CCCCKRSQAVLMQMKAPNEC 578
   *****
   CCCCKRSQAVLMQMKAPNEC

```

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 39/395  
 45/00  
 48/00  
 A 6 1 P 25/28  
 29/00  
 43/00  
 C 0 7 K 14/47  
 16/18

識別記号

1 0 5

F I

A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 25/28  
 29/00  
 43/00  
 C 0 7 K 14/47  
 16/18  
 C 1 2 N 1/15  
 1/19

テ-マコード (参考)

4 C 0 8 5  
 4 C 0 8 7  
 4 H 0 4 5

1 0 5

C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 P	21/02			Z
C 1 2 Q	1/02		33/566	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

F ターム(参考)

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA11  
 HA11 HA17

4B063 QA18 QQ05 QQ42 QQ79 QR32  
 QR48 QR74

4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01  
 BA01 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17  
 BA01 BA08 BA22 CA18 CA23  
 CA53 DA01 DA45 DB01 DB70  
 NA14 ZA16 ZB11 ZB21

4C085 AA12 AA13 BB07 BB11 CC02  
 CC05 CC07 CC08 CC21 CC28  
 DD23 DD62 DD63 EE01

4C087 AA02 AA03 BB45 BC34 BC83  
 CA12 CA16 CA20 NA14 ZA16  
 ZB11 ZB21

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
 CA45 DA75 EA22 EA28 EA50

专利名称(译)	β淀粉样蛋白诱导的Lib基因		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003164290A</a>	公开(公告)日	2003-06-10
申请号	JP2001367093	申请日	2001-11-30
申请(专利权)人(译)	第一制药有限公司		
[标]发明人	横田博 佐藤一纪		
发明人	横田 博 佐藤 一纪		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/74 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/19 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/566		
FI分类号	A61K35/74.B A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33/53.Z G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 A61K35/74.D A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 A61K38/19 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR74 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA23 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/DA45 4C084/DB01 4C084/DB70 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C084/ZB11 4C084/ZB21 4C085/AA12 4C085/AA13 4C085/BB07 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC28 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB45 4C087/BC34 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/CA16 4C087/CA20 4C087/NA14 4C087/ZA16 4C087/ZB11 4C087/ZB21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50		
其他公开文献	JP2003164290A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：获得一种新基因，其中β-淀粉样蛋白刺激诱导表达并控制阿尔茨海默病等神经系统疾病。解决方案：本发明提供了具有新基因的DNA序列的新DNA，其中通过β-淀粉样蛋白刺激诱导表达，通过cDNA扣除法获得表达，由DNA编码的多肽，含有该DNA的重组载体，a具有重组载体的转化体，抗多肽的抗体，产生多肽的方法，利用DNA，多肽，载体，转化体或抗体鉴定用于调节基因表达和活性的化合物的方法，通过该方法获得的化合物，还提供用于与β-淀粉样蛋白有关的神经障碍的药物组合物，诊断手段和利用DNA，多肽，重组载体，转化体或抗体进行诊断的试剂盒。Z

