

(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2004-321179

(P2004-321179A)

(43) 公開日 平成16年11月18日(2004.11.18)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) | |
|---------------------------------------|---------------|-------------|-----------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | Z N A A | 2 G O 4 5 |
| C O 7 K 14/47 | C O 7 K 14/47 | | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 | A | 4 B O 6 3 |
| G O 1 N 33/50 | G O 1 N 33/50 | T | 4 H O 4 5 |
| G O 1 N 33/53 | G O 1 N 33/53 | D | |
| 審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 20 頁) 最終頁に続く | | | |

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2004-104812 (P2004-104812) | (71) 出願人 | 000003975 日東紡績株式会社 |
| (22) 出願日 | 平成16年3月31日 (2004. 3. 31) | | 福島県福島市郷野目字東1番地 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2003-102891 (P2003-102891) | (74) 代理人 | 100066692 弁理士 浅村 皓 |
| (32) 優先日 | 平成15年4月7日 (2003. 4. 7) | (74) 代理人 | 100072040 弁理士 浅村 肇 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | (74) 代理人 | 100088926 弁理士 長沼 暉夫 |
| | | (74) 代理人 | 100102897 弁理士 池田 幸弘 |
| | | (72) 発明者 | 清川 巖 福島県郡山市富久山町福原字塩島1番地 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質およびそれを利用した炎症性腸疾患診断方法

(57) 【要約】

【課題】新たな炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質およびそれを利用した炎症性腸疾患診断方法を提供することを課題とする。

【解決手段】大腸癌細胞を低酸素状態で培養した時に発現が亢進される C8FW 遺伝子または C8FW 蛋白質が炎症性腸疾患診断用マーカーとなり得、従って、患者から採取した検体中の C8FW 遺伝子または C8FW 蛋白質の有無もしくは量を調べることにより、炎症性腸疾患を診断することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C8FW 遺伝子もしくはその変異体または C8FW 蛋白質もしくはその変異体からなる炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質。

【請求項 2】

C8FW 遺伝子が配列表の配列番号 3 もしくは 4 の塩基配列を有する遺伝子であり、その変異体が配列番号 3 もしくは 4 の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子であって炎症性腸疾患診断マーカーとしての機能を有する遺伝子である、請求項 1 の炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質。

【請求項 3】

C8FW 蛋白質が配列表の配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、その変異体が配列番号 1 3 のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有しかつ炎症性腸疾患診断マーカーとしての機能を有する蛋白質である、請求項 1 の炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質。

【請求項 4】

検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体または C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べて、炎症性腸疾患を診断する診断方法。

【請求項 5】

検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体から発現する mRNA の量を測定し、その量から炎症性腸疾患を診断する、請求項 4 の診断方法。

【請求項 6】

検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体から発現する mRNA の有無もしくは量を、PCR 法、RT-PCR 法、ノーザンブロット解析または DNA チップにより測定する、請求項 5 の診断方法。

【請求項 7】

請求項 4 から 6 のいずれかの診断方法のための診断用キットであって、C8FW 遺伝子もしくはその変異体またはその一部とハイブリダイズすることができる DNA 断片をプローブとして含む、上記診断用キット。

【請求項 8】

検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体を、C8FW 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体と反応させ、該抗体と抗原抗体反応した検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量から炎症性腸疾患を診断する、請求項 4 の診断方法。

【請求項 9】

組織免疫染色法または酵素結合免疫ソルベントアッセイ法(ELISA)により、抗体と抗原抗体反応した検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べる、請求項 8 の診断方法。

【請求項 10】

請求項 8 または 9 の診断方法のための診断用キットであって、C8FW 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体を含む、上記診断用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質およびそれを利用した炎症性腸疾患診断方法に関する。更に詳細には、細胞を低酸素状態で培養したときにその発現レベルが上昇する C8FW 遺伝子もしくは該遺伝子から発現される C8FW 蛋白質からなる炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質およびそれを利用した、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性炎症性大腸疾患等の炎症性腸疾患の診断方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

10

20

30

40

50

組織が虚血に陥ると、酸素濃度の低下が引き起こされ生体に強いストレスを与える。例えば、虚血状態が腸組織で生じると種々の炎症性腸疾患を起こすと考えられている。中でも、潰瘍性大腸炎やクローン病は原因不明で特発性炎症性腸疾患として区分され、厚生省の難治性疾患として特定されている。診断は厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班で作製された診断基準案に従ってなされている。具体的には、便培養などで感染性腸炎を除外した後、臨床所見、消化管造影検査、内視鏡検査、組織検査を組み合わせられている。しかし、これらの方法によっても診断が困難な症例も見られる。また、診断の中心となる消化管造影検査や内視鏡検査は、患者の肉体的・精神的な苦痛を伴うことが多く、熟練した医師が必要とされている。このため潰瘍性大腸炎やクローン病等の炎症性腸疾患の診断のための簡便で迅速かつ高精度で行える特異的な臨床検査法が当業界で世界的に所望されている。

10

一方、RT-PCR 分析が、低酸素状態に暴露された組織細胞や虚血性疾患を検出することができる超高感度な方法として研究が進められており、特異的な臓器や低酸素状態に暴露された細胞の中に限定される mRNA の発現である分子マーカーは、種々のタイプの虚血性疾患の存在を試験するための RT-PCR 増幅の標的となりうると考えられる。低酸素応答で発現が増幅する遺伝子として HIF-1 や低分子量 G 蛋白質 Rho が報告されている（非特許文献 1 および非特許文献 2）。しかしながらこれらの遺伝子または遺伝子体は動脈硬化症や血管新生との関連性について注目が集まり、必ずしも炎症性腸疾患との関連は報告されていない。

20

【0003】

【非特許文献 1】医学のあゆみ Vol.194, No. 10, 2000.9.2, p.752-756

【非特許文献 2】細胞工学 Vol.19, No.8, 2000, p.1142-1145

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従って、本発明は、炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質およびそれを利用した、潰瘍性大腸炎、クローン病、虚血性炎症性大腸疾患等の炎症性腸疾患の診断方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、DNA アレイを用いたディファレンシャル・ディスプレイ分析によって、その遺伝子の発現が通常条件（5%CO₂、95%空気、37℃）で培養した大腸癌由来細胞株よりも低酸素状態（5%CO₂、0%O₂、90%N₂、5%H₂、37℃）で培養した際に発現の上昇が見られた C8FW 遺伝子の単離、同定に成功した。また、本発明者らは C8FW 遺伝子の転写体が組織・細胞が低酸素状態に暴露されたことを検出するため RT-PCR 分析の標的（マーカー）分子として評価できることを見出し、更に、このマーカーを利用した上記遺伝子産物に対する抗体が、炎症性腸疾患の検出のための可能性ある診断ツールとして有用であることを確認した。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

30

【0006】

従って、本発明は、C8FW 遺伝子もしくはその変異体または C8FW 蛋白質もしくはその変異体からなる炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子もしくは蛋白質である。

40

更に、本発明は、検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体または C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べて、炎症性腸疾患を診断する診断方法である。

更に、本発明は、検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体から発現する mRNA の有無もしくは量を測定し、その量から炎症性腸疾患を診断する診断方法である。

更に、本発明は、検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体を、C8FW 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体と反応させ、該抗体と抗原抗体反応した検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量から炎症性腸疾患を診断する診断方法である。

更に、本発明は、上記診断方法のための診断用キットであって、C8FW 遺伝子もしくはその変異体またはその一部とハイブリダイズすることができる DNA 断片をプローブとし

50

て含む、上記診断用キットである。

更に、本発明は、上記診断方法のための診断用キットであって、C8FW 蛋白質もしくはその変異体に対する抗体を含む、上記診断用キットである。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、炎症性腸疾患組織に発現の亢進が見られる C8FW 遺伝子および該遺伝子産物である C8FW 蛋白質を利用して虚血性腸疾患の診断に用いることができる。該遺伝子および該遺伝子産物は、正常腸組織より炎症性腸疾患部位においてその発現量が高い。それ故、該遺伝子および該遺伝子産物、さらには該遺伝子産物に対する抗体の利用によって、炎症性腸疾患を高感度に検出可能な検出法が提供できる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明者らは、低酸素状態で培養した大腸細胞と、通常状態で培養した大腸細胞との間で遺伝子の発現状態を比較することによって、低酸素状態で発現レベルの変化している遺伝子を見出すことができると考えた。具体的には、低酸素チャンバーで培養した大腸癌細胞に由来する mRNA の発現レベルと通常の CO₂ インキュベーターで培養した大腸癌細胞に由来する mRNA の発現レベルを、DNA アレイを用いたディファレンシャルディスプレイ法で解析することで網羅的に解析することにより比較した。

【0009】

DNA アレイは、予め塩基配列がわかっている数万から数 10 万種類におよぶオリゴヌクレオチド、あるいはポリヌクレオチドを高密度に固定したアレイで構成されている。分析すべきターゲットを蛍光標識し、このプローブアレイと接触させる。ターゲットには、一般に様々な細胞に由来する cDNA や cDNA を鋳型として合成された cRNA が用いられる。ハイブリダイズ後にアレイを良く洗浄し、アレイ上に残る蛍光標識をスキャンして、どのプローブにターゲットがハイブリダイズしているのか、またその量はどの程度であるのかが明らかにされる。一連の操作は、ごく短時間に、しかも簡単に行うことができる。また 1 回の分析で数万から数 10 万種類におよぶ塩基配列について、ここの塩基配列の有無と量に関する情報が得られる。このようにして得られた情報は、発現プロファイル (expression profile) と呼ばれている。DNA アレイを用いてディファレンシャル解析を行うには、異なる細胞間で発現プロファイルを比較し、発現パターンの違っている塩基配列を選択すれば良い。

20

30

【0010】

このような DNA アレイを用いたディファレンシャル解析により、生体内に近い状態で培養した大腸癌細胞と低酸素状態で培養した大腸癌細胞との間で遺伝子の発現レベルを比較し、発現パターンの違っている塩基配列を選択し、選択された塩基配列をもとに、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、最終的に低酸素状態で特異的に発現レベルが変化している遺伝子を単離することに成功した。cDNA ライブラリーは、癌細胞や正常細胞等から公知の方法によって合成し、本発明者らは一般的な方法で合成された cDNA ライブラリーを用いたクローニングと、公知のデータベース (GenBank/EMBLのBLAST 検索(Altschul, S. F., et al., J.Mol. Biol., 215, 403-410 (1990))) を利用し、登録番号 NM025195 に含まれる遺伝子であってホスホプロテイン C8FW 蛋白質をコードする C8FW 遺伝子が低酸素状態により発現上昇することを見出した。

40

かくして、C8FW 遺伝子または C8FW 遺伝子によってコードされる C8FW 蛋白質が、炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子または蛋白質となり得ることが明らかになった。より具体的には、C8FW 遺伝子は、配列表の配列番号 4 に示される塩基配列を全長配列として有する遺伝子であり、その蛋白翻訳部分は 274 番目から 1392 番目までの塩基配列に相当し、配列番号 3 に示される塩基配列を有する遺伝子である。C8FW 蛋白質は、配列番号 3 に示される塩基配列によってコードされる配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質である。

【0011】

50

本発明において、C8FW 遺伝子とは、広義には、リーダー配列、コード領域、エキソン、イントロンなどを含むことができ、対応する RNA および DNA が包含される。該 DNA には、cDNA、ゲノム DNA が含まれる。

また、本発明では、C8FW 遺伝子の変異体も炎症性腸疾患診断用マーカー遺伝子となり得る。変異体には、天然に存在するアレル変異体、突然変異などによる変異体などがある。変異体としては、より具体的には、例えば、C8FW 遺伝子の塩基配列である配列表の配列番号 3 もしくは 4 の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有しかつ炎症性腸疾患診断マーカーとしての機能を有する遺伝子が挙げられる。ここでストリンジェントな条件としては、例えば、0.1%SDS を含む 2×SSC 中 50 または 0.1% SDS を含む 1×SSC 中 60 の条件下でハイブリダイズすることが挙げられる。

10

また、本発明では、C8FW 蛋白質の変異体も炎症性腸疾患診断用マーカー蛋白質となり得る。かかる変異体は、C8FW 遺伝子の突然変異や C8FW 遺伝子の翻訳後の修飾、C8FW 蛋白質の発現後のプロテアーゼなどによる分解などにより生じ得ると考えられるものである。変異体としては、より具体的には、例えば、C8FW蛋白質のアミノ酸配列である配列番号 1 3 のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有しかつ炎症性腸疾患診断マーカーとしての機能を有する蛋白質が挙げられる。

【0012】

本発明では、このような炎症性腸疾患診断マーカー遺伝子もしくは蛋白質に基づいて、炎症性腸疾患の診断を行うことができる。即ち、検体中の C8FW 遺伝子もしくはその変異体または C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を調べて、炎症性腸疾患を診断することができる。

20

検体としては、炎症性腸疾患患者もしくは炎症性腸疾患が疑われる患者からの

血液、血清、リンパ球、組織、細胞、リンパ節、尿などの生物学的試料が挙げられる。

本発明においては、C8FW 遺伝子もしくはその変異体の有無もしくは量は、例えば、配列番号 3 または 4 の塩基配列に基づきプローブとして用いる DNA 断片を作成し、このプローブを用いた各種スクリーニング法により調べることができる。プローブとして用いられる DNA 断片は、配列番号 3 または 4 に示された塩基配列の内で、少なくとも 10 個の連続した塩基配列、好ましくは 20 個の連続した塩基配列、より好ましくは 30 個の連続した塩基配列、最も好ましくは 50 個の連続した塩基配列を有するものである。

30

これらのプローブを用いてスクリーニングするには、遺伝子の検出を容易にするために、上記した検体を、例えば変性処理、制限酵素消化、電気泳動、ドットプロットングなどに付して核酸試料を得てスクリーニングを行うことができる。

【0013】

スクリーニング法としては、PCR 法を用いるのが感度の点から好ましく、PCR法は、C8FW 遺伝子断片をプライマーとして用いる方法であればとくに制限されず、従来公知の方法 (Science, 230, 1350-1354 (1985))や新たに開発された、或いは将来使用される PCR 変法(神 佳之、ほか編、羊土社、実験医学、増刊, 8(9)(1990); 蛋白質・核酸・酵素、臨時増刊、共立出版(株), 35(17)(1990))のいずれも利用することが可能である。PCR 法による場合、C8FW をコードする 1 本鎖 DNA (ペアーとなる正鎖および逆鎖)の断片を PCR プライマーとして用い、被験用の組織、細胞などの検体から得られた全 RNA またはポリ (A) RNA を鋳型として、PCR により定量を行うことができる。PCR による場合、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989) 等の基本書に基づき行うことができる。PCR による定量の具体的な手法としては、例えば、まず、プライマー用 DNA を常法により合成し、次に被験用の組織・細胞などから、常法にて全 RNA またはポリ (A) RNA を調製し、これを鋳型として MMTV-RT 等の逆転写酵素により 1 本鎖 cDNA を調製する。1 本鎖 cDNA の調製は、例えばスーパースクリプトII 逆転写酵素等を用いることにより容易に行うことができる。その後、先のプライマーを添加し、常法により PCR 反応を行う。PCR 反応の条件としては、例えば、95 1 分、62 1 分、72 2 分を 35 サイクル行った後に、72 で 10 分間加熱するような条件が挙げられる。PCR

40

50

法の場合、例えば、この PCR 反応物を適当な濃度のアガロースゲルにて電気泳動することにより、C8FW 遺伝子、具体的には mRNA の発現の有無を検出することができる。

【0014】

さらに、臨床診断で用いられる PCR 法に基づく測定方法としては、以下の原理に基づくものが例示される。

まず、上記と同様に血液、組織等により RNA の抽出・生成を行い、ビオチン化プライマーを用いた対象検体の増幅 (PCR 反応) を前記と同様の手法により行う。その後、アルカリ処理により増幅産物の一本化を行い、相補的 DNA プローブを固定化した固相のハイブリダイゼーションを行う。その後固相を洗浄し、酵素標識アビジンを反応させる。固相を洗浄した後、酵素基質を添加して発色反応を行い、吸光度を測定することにより、C8FW 10
遺伝子、具体的には mRNA のレベルを検出することができる。

【0015】

また、ノーザンプロット解析法により、C8FW 遺伝子、具体的には mRNA を検出することができる。この場合、C8FW 遺伝子の 1 本鎖または 2 本鎖 DNA 断片を標識し、これをプローブとして、被験用の組織・細胞などの検体から得られた全 RNA またはポリ (A) RNA に対してノーザンプロット解析により発現した C8FW mRNA のレベルを測定し、診断することができる。ノーザンプロット解析による診断の具体的な手法としては、例えば次の方法が挙げられる。1 本鎖または 2 本鎖 DNA を放射標識やビオチン標識してプローブを作製する。2 本鎖 DNA の場合は、例えば上記の手法により調製された PCR 反応物を、ニックトランスレーション法またはランダムプライムラベリング法などで ³²P 標識すること 20
などにより作製される。次に、被験用の組織・細胞や血液、尿などの検体より、上記と同様の手法により全 RNA またはポリ (A) RNA を調製し、常法によりホルムアルデヒドゲル電気泳動及びナイロンメンブレンへのプロットングを行う。このメンブレンと、先のプローブとのハイブリダイゼーションを行うことにより、C8FW mRNA の発現のレベルを検出することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、2 本鎖 DNA をプローブとして用いる場合、例えば 50% (v/v) ホルムアミド、1M NaCl、10% (w/v) デキストラン、1% (w/v) SDS、100 μg/ml サケ精子 DNA の条件で 42、16-24 時間ハイブリダイズさせた後に、2×SSC 中で室温、10 分間 2 回洗浄し、更に 60、2×SSC、1% SDS 中で 20 分間 2 回洗浄するような条件が挙げられる。

【0016】

更には、DNA アレイを用いたスクリーニング法により発現した C8FW mRNA を測定することも可能である。即ち、まず、DNA アレイ上で C8FW DNA の断片を合成する。次に、被験用の組織・細胞や血液、尿などの検体により全 RNA 又はポリ (A) RNA を調製し、これを蛍光等でラベルする。そして、この両者をハイブリダイズさせて DNA アレイ上の蛍光を検出することなどにより、炎症性腸疾患の診断を行うことが可能である。ここで、C8FW DNA やポリヌクレオチドを結合させた DNA アレイは、米国 Affymetrix (アフィメトリックス) 社に注文することにより入手可能であり、また、上記した診断法の個々の具体的な手段については、Nature Genetics, 21, 1-60 (1999) 等を参考にして行うことができる。

【0017】

また、RT-PCR 法 [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1989)] によるスクリーニング法により C8FW 遺伝子の発現レベルを測定することができる。例えば、C8FW mRNA を標的として、プライマー結合領域を一致させ、且つ塩基配列上も類似した既知量の内部標準物質とともに同一チューブ内で競合的に RT-PCR 反応を行い、両者の濃度比より C8FW mRNA の初期量を判定するような競争的 RT-PCR 法などが挙げられる。競争的 RT-PCR 法による検出としては、例えば、次の方法が挙げられる。被験用の組織・細胞や血液、尿などの検体より、前記と同様の手法により全 RNA 又はポリ (A) RNA を調製し、この全 RNA を対象として、逆転写酵素を用いて、25 で 10 分間、48 で 30分間、95 で 5 分間のプログラ 50

ムにより逆転写する。この溶液を鋳型として、例えば、配列番号 9 と 10 または 11 と 12 の組み合わせによる各種プライマー、プローブ等の試薬を規定量加え、PCR 反応を行い、発現量を測定する。PCR は、1 サイクルの 94 で 3 分間変性に続き、45 サイクルの 94 15 秒間、60 15 秒間、72 30 秒間の条件で行なう。C8FW mRNA の定量は C8FW mRNA に対する相対的な値を計算するために、試験サンプルの基準線遺伝子発現として、各反応における内部標準、例えば、GAPDH を用いることによって C8FW 遺伝子の発現量を比較する。

【0018】

その他、Multicycle リアルタイム-PCR 法、Simultaneously & independently RT-PCR 法（日本臨床病理学会 臨床検査項目分類コード測定法コード適用細則）などの手法を用いても C8FW mRNA の発現レベルを測定できる。 10

また、これらのポリヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりゲノム DNA や RT-PCR により C8FW の DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP（遺伝子工学キーワードブック、羊土社）、シーケンシング等の方法により特に C8FW 遺伝子の変異体を検出することもできる。

【0019】

上記した本発明の測定は、検体中の C8FW 遺伝子またはその変異体を検出する診断用キットを利用することによって、簡便に実施することができる。診断用キットは、C8FW 遺伝子もしくはその変異体あるいはその一部とハイブリダイズする DNA 断片、例えば、配列番号 3 もしくは 4 に示される塩基配列の一部、又はその相補的塩基配列の一部、又は全てにハイブリダイズする DNA 断片を必須構成成分として含んでいればよく、これら DNA 断片はプローブとして使用される。具体的には、DNA 断片は、配列番号 3 または 4 に示された塩基配列の中で、少なくとも 10 個の連続した塩基配列、好ましくは 20 個の連続した塩基配列、より好ましくは 30 個の連続した塩基配列、最も好ましくは 50 個の連続した塩基配列を有する DNA 断片が挙げられる。他の成分としては、標識剤、PCR 法に必須な試薬（例えば、TaqDNA ポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、プライマーなど）、あるいはノーザンプロット、DNA チップ、または RT-PCR などに必要な試薬が含まれていてもよい。標識剤としては、放射性同位元素又は蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられるが、DNA 断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてもよい。更にキットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。 20 30

【0020】

本発明においては、検体中の C8FW 蛋白質もしくは変異体の有無もしくは量を測定することによっても炎症性腸疾患の診断を行うことができる。この場合、C8FW 蛋白質もしくは変異体に対する抗体を用いるのが好ましい。C8FW 蛋白質またはそのアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドを、C8FW 蛋白質もしくは変異体に対する特異抗体を作成するための免疫抗原として好適に利用できる。この抗原を利用することにより、所望の抗血清、ポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体を取得することができる。

【0021】

C8FW 蛋白質またはそのアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドは、それらをコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換え DNA（発現ベクター）を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から回収することにより得ることができる。発現ベクターとしては、通常の融合蛋白発現ベクターを利用でき、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合蛋白として発現させるための pGEX（Promega社）などを例示できる。これらの発現ベクターを用いた組換え DNA による蛋白質もしくはポリペプチドの調製法は、既に当業者に周知の技術であり、それらの技術をそのまま採用できる。また、C8FW 蛋白質またはその一部のポリペプチドは、一般的な化学合成法により製造することもでき、化学的合成方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が採用できる。 40

【0022】

これら蛋白質もしくはポリペプチドを抗原とする抗体の製造法自体は、当業者によく理解されているところであり〔例えば、続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）など参照〕、本発明においてもこれら常法に従うことができる。例えば、C8FW 蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを動物に免疫し、その動物から抗血清を採取することにより、また更に抗血清を精製することによりポリクローナル抗体を得ることができる。

【0023】

モノクローナル抗体を得るには次の方法が採用できる。即ち、上記の C8FW 蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを、公知のアジュバントと共に数回に分けてマウス、ラット等の動物にすることによって免疫する。次いで免疫された動物からの脾臓等に由来する抗体産生細胞と骨髄腫瘍細胞（ミエローマ細胞）等の試験管内で増殖能力を有する細胞とを融合する。融合法としては、既にそれ自体公知であるケーラーとミルスタインの定法（Nature.256,495.1975）によってポリエチレングリコール（PEG）を用いることで融合できる。センダイウィルス、電気融合法によっても融合を行うことができる。融合した細胞から C8FW 蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを認識する抗体を産生するハイブリドーマを、C8FW 蛋白質もしくはその一部のポリペプチドを固定化したアッセイプレートを用いた酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA）によりスクリーニングして選択できる。

10

かくして得られるモノクローナル抗体としては、配列番号 13 に示す C8FW 蛋白質のアミノ酸配列中 320～372 番目に相当する領域（以下、C8FWCTERM と記載することもある）のポリペプチドを抗原として得られたハイブリドーマ 1C8FW-119やハイブリドーマ 3C8FW-285 が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。ハイブリドーマ 1C8FW-119は、平成 15 年 1 月 28 日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、受託番号として FERM BP-8284 が付与されている。また、ハイブリドーマ 3C8FW-285 は、同センターに平成 16 年 3 月 16 日に寄託され、受託番号として FERM BP-8665 が付与されている。

20

【0024】

かくして得られる抗体を用いて検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体の有無もしくは量を測定し、その結果から、炎症性腸疾患の診断を行うことができる。

C8FW 蛋白質もしくはその変異体を測定する方法としては、組織免疫染色法やサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA）、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、免疫酵素法（IEMA）等が挙げられる。

30

【0025】

組織免疫染色法による C8FW 蛋白質もしくはその変異体を検出するときの具体例を以下に示す。例えば、大腸由来の組織細胞を検体とし、その検体を常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに抱埋をしてマイクロトームにて薄切し、組織検体として使用する。組織切片はキシレンの処理で完全にパラフィンを除き、アルコール溶液をくぐらせた後、水洗する。続いて、緩衝液中、121 等の高温で処理し、抗原を賦活化する。その後室温程度まで冷却し、流水にて水洗を行い、正常ヤギ血清にてブロッキングする。ブロッキング終了後の組織に、1次抗体溶液を反応させ、次いで、その組織を TBS にて洗浄した後、ビオチン標識 2次抗体を室温 30 分間反応させる。反応終了後 TBS にて洗浄し、更に、3% 過酸化水素加 TBS に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させる。続いて、ABC 試薬（和光純薬工業社）に浸漬させ、TBS 洗浄した後、DAB 試薬にて発色を行なう。このとき、対比染色としてヘマトキシリン核染色を行なう。次いでこれらの組織を水洗し、アルコール溶液、ついで、キシレン槽をくぐらせた後に染色後の組織に封入剤を滴下し、カバーガラスをかぶせて顕微鏡にて観察し、染色度を観察することにより、検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体を検出できる。それにより、炎症性腸疾患の診断、発見または臨床的重症度の判定に利用することができる。

40

【0026】

本発明においては、ELISA 法により C8FW 蛋白質もしくはその変異体を測定するには、

50

一次抗体でプレートのコートし、検体中に存在する C8FW 蛋白質もしくはその変異体を結合させた後、二次抗体と反応させることにより、C8FW 蛋白質もしくはその変異体を測定することが簡便である。また、抗体が認識するエピトープに対するポリペプチドまたはオリゴペプチドを用いた競争阻害による測定も可能である。ELISA 法による C8FW 蛋白質もしくはその変異体を検出するときの具体例を以下に示す。

初めにポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ナイロン、ポリメタクリレートなどのそれ自体公知である固相に直接または間接的に物理結合や化学結合、アフィニティーを利用して抗 C8FW 抗体（例えばモノクローナル抗体 3C8FW-285）を一次抗体として結合させる。感作抗体量は、通常、1ng ~ 100mg/ml の範囲である。物理結合や化学結合、アフィニティーなどによって固相に結合した一次抗体に、検体を加えて一次反応させる。一定時間反応させた後、固相を洗浄し、二次標識抗体（例えば HRP 標識モノクローナル抗体 1C8FW-119）を加えて二次反応させる。固相を再度洗浄し、固相に結合した標識部分を測定する。標識物質に HRP を用いた場合、基質には既知の DAB、TMB、OPD などを用いることができる。また、標識物質には、HRP のような酵素だけではなく、金コロイド、ユーロピウムなどの標識金属や FITC、ローダミン、Texas Red、Alexa、GFP などの化学的、生物的各種蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{51}Cr などの放射性物質など標識可能なあらゆる物質が挙げられる。

また、以下の方法でも C8FW は測定できる。まず、一次抗体として、抗 C8FW モノクローナル抗体、例えば、上記したハイブリドーマ 1C8FW-119 が産生するモノクローナル抗体をプレートに吸着させ、次いで、検体中の C8FW 蛋白質もしくはその変異体を上記モノクローナル抗体と反応させる。その際、陽性及び陰性対照についても同様の処理を施す。次いでビオチン化した 2 次抗体、例えば、C8FW 蛋白質に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、発色反応を行うことにより、C8FW 蛋白質もしくはその変異体を検出することができる。

本発明では、放射線免疫検定法 (RIA)、免疫放射線検定法 (IRMA)、免疫酵素法 (IEMA) 等の免疫測定法を採用することもでき、これらの測定法はそれ自体周知であり、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0027】

上記した本発明の測定は、検体中の C8FW 蛋白質もしくは遺伝子を検出する診断用キットを利用することによって、簡便に実施することができる。キットは、例えば、C8FW 蛋白質またはその一部のポリペプチドに対する抗体を必須構成成分として含んでいればよく、他の成分として、標識剤などが含まれていてもよい。標識剤としては、放射性同位元素又は蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられる。更にキットには、測定の実施の便益のために適当な、発色試薬、反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液などが含まれていてもよい。

以下本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例 1】

【0028】

DNA アレイによるディファレンシャル解析

低酸素条件 (5%CO₂、0%O₂、90%N₂、5%H₂、37)、低酸素チャンパー：東洋紡エンジニアリング社) と通常条件 (5%CO₂、95%空気、37) で培養した大腸癌細胞株について発現レベルを解析し、発現レベルが 3 倍以上変化している遺伝子とハイブリダイズするプローブを選択した。以下の RNA 抽出と標識、そしてアレイとのハイブリダイズは、原則として Affymetrix 社の指示書に従って行った。

【0029】

上記培養条件により培養した細胞株から、オリゴ (dT) セルローススピンカラム法 (QuickPrep mRNA Purification kit、ファルマシア社) により Poly(A)⁺RNA を調製した。1 μg を用いて T7 付加オリゴ (dT)24 をプライマーとして逆転写酵素 (Superscript RT II

10

20

30

40

50

、BRL)により 1 本鎖 cDNA を合成し、さらに E.coli DNA リガーゼと E.coli DNA ポリメラーゼを用いて 2 本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を常法に従いフェノール・クロロホルム抽出した。この 2 本鎖 cDNA を鋳型として T7RNA ポリメラーゼによって cRNA を合成した。合成には、MEGAscript T7 kit (ambion製) を用いた。このとき、標識ヌクレオチドとして Biotin-CTP および Biotin-16-UTP を加え、cRNA を標識した。合成した cRNA を RNeasy MiniKit (QUIAGEN製) によって回収し、SPIN-100 Columns (CLONETECH製) で精製した。精製 cRNA は、過熱によって断片化後、cDNA オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix社) とのハイブリダイゼーションに用いた。cRNA の断片化は、cRNA 20 μ g を含む RNase フリーの精製水 32 μ L に対して、以下の断片化緩衝液を 8 μ L 加え (cRNA 最終濃度 0.5 μ g/ μ L)、94 で 35 分間処理することによって行った。この加熱処理により、cRNA はおよそ 35-200bp の大きさに断片化される。

10

【0030】

5×断片化緩衝液

4.0mL 1M トリス - 酢酸緩衝液 (pH8.1)
 0.64g 酢酸マグネシウム
 0.98g 酢酸カルシウム
 DEPC 処理した H₂O で 20ml にする。

【0031】

断片化した cDNA サンプルは、以下の組成からなるハイブリダイゼーションカクテルとし、一旦 99 で 5 分間処理し、次いで 45 のヒートブロック上に 5分間置いた。その 200 μ L をアレイに加えて 45 で 16 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズに用いた 5 枚のアレイ、すなわち U95 A、B、C、D および E 上には、合わせておよそ 60000 種類の遺伝子あるいは EST に由来する塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドが合成されている。なおハイブリダイゼーション以降の洗浄から蛍光染色にいたる工程には、GeneChip Fluidic Station 400 (Affymetrix 社製) を用いた。

20

【0032】

ハイブリダイゼーションカクテル：

断片化 cRNA 15 μ g
 コントロールオリゴヌクレオチド B2 (5nM) 3 μ L
 100×コントロール cRNA カクテル 各3 μ L
 サケ精子 DNA (10 μ g/mL) 3 μ L
 アセチル化 BSA (50mg/mL) 3 μ L
 2×MES ハイブリダイゼーション緩衝液 150 μ L

30

total 300 μ L に調整

【0033】

ハイブリダイゼーション終了後、アレイからハイブリダイゼーションカクテルを除いて、250 μ L の洗浄液を加えた。非特異的なシグナルを洗浄除去した後、フィコエリスリン - ストレプトアビジン (streptoavidin phycoerythrin; SAPE) を結合させた。さらにアビジンに対する抗体、そして再びフィコエリスリン - ストレプトアビジンを用いて蛍光を増強した。洗浄液と蛍光染色に用いた反応液の組成は次のとおりである。

40

【0034】

洗浄液：

83.3mL 12×MES ストック緩衝液
 5.2mL 5M NaCl
 1.0mL 10% Tween20
 910.5mL H₂O

【0035】

蛍光染色用反応液：

300 μ L 2×染色緩衝液
 270 μ L H₂O

50

24 μ L 50mg/mL アセチル化 BSA

6 μ L 1mg/mL フィコエリスリン - ストレプトアビジン

【0036】

蛍光増強用抗ストレプトアビジン抗体 (600 μ L中)

300 μ L 2 \times 染色緩衝液

24 μ L 50mg/mLアセチル化 BSA

6.0 μ L 10mg/mL正常ヤギ IgG

3.6 μ L 0.5mg/mLビオチン化抗体

266.4 μ L H₂O

【0037】

蛍光増強用フィコエリスリン - ストレプトアビジン (1200 μ L中):

600 μ L 2 \times 染色緩衝液

48 μ L 50mg/mLアセチル化 BSA

12 μ L 1mg/mL フィコエリスリン - ストレプトアビジン

540 μ L H₂O

【0038】

蛍光染色した各アレイの蛍光強度を、共焦点レーザー装置 (HP Genearrayスキャナー) により測定した。5つのアレイ上の遺伝子あるいは EST について、2つの細胞由来の RNA の間で蛍光強度 (average difference)、すなわち遺伝子発現強度を比較し、その比 (fold change) を算出した。そして、対照試料すなわち通常条件で培養した大腸癌由来細胞株に比べ低酸素条件において GenBank 登録番号 AJ000480 の配列を含む遺伝子発現強度が ~8.6 倍の増加が確認され、アレイの注釈からヒト C8FW 遺伝子に相当した。

【実施例2】

【0039】

遺伝子の配列決定

大腸癌細胞株から単離したポリ (A)mRNA (0.2 μ g) を、ジエチルピロカーボネート処理された水 8 μ l 中で、3' - アンカード・オリゴ dT プライマー G(T) 15MA (M は G、A 及び C の混合液である) の 25 pmol と混合し、65 $^{\circ}$ で 5 分間加熱した。この溶液に 4 μ l の 5 \times ファースト・ストランド緩衝液 (BRL社製)、2 μ l の 0.1M DTT (BRL社製)、1 μ l の 250mM dNTPs (BRL社製)、1 μ l のリボヌクレアーゼ・インヒビター (40単位; TOYOBO社製) 及び 1 μ l のスーパースクリプト II 逆転写酵素 (200 単位; BRL 社製) を加えた。各反応液の最終容量は 20 μ l とした。各溶液を 37 $^{\circ}$ で 1 時間処理することにより cDNA を得た。得られた cDNA を鋳型として、制限酵素サイトを含む PCR 増幅用プライマー (配列番号 1 に示す塩基配列を有するセンスプライマー、及び配列番号 2 に示す塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用いて、94 $^{\circ}$ 1分、60 $^{\circ}$ 30秒、72 $^{\circ}$ 1 分の条件で 30 サイクル反応させた。この増幅された遺伝子をエタノール沈殿させた後、乾燥させ、滅菌蒸留水に再溶解して制限酵素 BamHI、EcoRI、37 $^{\circ}$ にて処理を行った。クローニングベクターとして pUC を用い、同様に BamHI、EcoRI にて処理を行った。処理された PCR 増幅産物及び pUC をエタノール沈殿させた後、乾燥させ、滅菌蒸留水に再溶解した後、ライゲーション反応させて PCR 増幅産物をクローニングベクターに導入した。さらに上記制限酵素サイト BamHI から Pst I (Nucleotide 1~203、Pst I から Xba I (Nucleotide 198~680)、Xba I から EcoRI (Nucleotide 675~1119) にそれぞれサブクローニングした。配列決定反応は、ABI プリズム・ダイ・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・レディー・リアクション・キットを用いて実施し、ABI373A DNA シーケンサーで分析した。配列決定された遺伝子配列は配列番号 3 に示すとおりであり、遺伝子データベース調査は GenBank/EMBL の BLAST 検索 (Altschul, S. F., et al., J.Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)) を用いて行った。調査の結果、遺伝子配列は配列番号 4 に示す登録番号 NM025195 に含まれており、ホスホプロテイン C8FW 蛋白質をコードする遺伝子であった。

【実施例3】

10

20

30

40

50

【0040】

ノーザンブロット解析

低酸素条件および通常条件で培養した大腸癌細胞株からの totalRNA の調製は、Trizol キット (BRL 社) を用いて行った。20 μ g の totalRNA をホルマリン含有 1%アガロースゲル電気泳動にかけ、ナイロンメンブレン (Hybond XL, Amersham Pharmacia Biotech社) に転写後、ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech社) 「1M NaCl、10% デキストラン、1% SDS、50% ホルムアミド、100 μ g/ml サケ精子 DNA」を用いてプレハイブリダイゼーションを行った。Ambion 社の Ssrip-EZTM DNA キットを用い 32 P で標識した C8FW cDNA (配列番号 3) の位置 643~1105 をプローブとし、常法によりノーザンハイブリダイゼーションを行った。洗浄は室温で 10 分間 2xSSC で 2 回、60 で 20 分間 2xSSC、1%SDS で 2 回、次いで室温で 10 分間 0.1xSSC、0.1% SDS で 1 回を行った。検出は、コダック社の BIOMAX MS フィルム (コダック社) を用いて行った。

【0041】

ノーザンブロット解析の結果 (図 1)、約 3300bp 付近にバンドが確認され GenBank/EMBL の登録番号 NM025195 の配列長に一致する。このことから、DNA アレイを用いたディファレンシャル・ディスプレイ法で低酸素条件において特異的に増幅する遺伝子として検出された産物を C8FW 蛋白質と決定した。

【実施例 4】

【0042】

半定量 RT-PCR

低酸素条件と通常条件で培養した大腸癌細胞株間の C8FW mRNA の量を比較するために、半定量的分析を行った。培養時間は低酸素条件では、経時的に 0h、2h、6h、24h、36h、48h と変化させ、一方、通常条件では 0h と 24h とした。PCR 混合液は、C8FW 遺伝子と GAPDH cDNA に対して 2 つのプライマーの組み合わせ (配列番号 5 と 6 及び配列番号 7 と 8、C8FW 遺伝子に対して各 0.2 μ M、GAPDH に対して各 0.1 μ M) を含んでいて、増幅された産物は C8FW 遺伝子に対して 463 塩基対であり、GAPDH に対して 550 塩基対であった。PCR の反応条件は、1 サイクルの 95 で 12 分間変性に続いて、35 サイクルの 95 1 分間、62 1 分間、72 1 分間を行い、最後に 72 で 10 分間伸長反応させるものとした。PCR 産物を常法のアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色して目視確認したところ、C8FW 遺伝子が経時に増加していた。

【実施例 5】

【0043】

定量 RT-PCR

低酸素条件および通常条件で培養した大腸癌細胞株より、上記方法で total RNA を回収した。この total RNA を対象として、パーキンエルマー社のキット (TaqMan Cold RT-PCR Reagents) を用いて定量 PCR を行った。100ng の total RNA をキット付属の試薬を用い、25 ; 10 分間、48 ; 30 分間、95 ; 5 分間のプログラムにより逆転写した。この溶液の 1/100 を鋳型として、配列番号 9 と 10 および配列番号 11 と 12 の組み合わせによる各種プライマー、プローブおよびキット付属の試薬を規定量加え、PCR 反応を行い、発現量を ABI PRISM 7700 (PE社) により測定した。PCR は、94 で 3 分間を 1 サイクルした後、94 で 15 秒間、60 で 15 秒間、72 で 30 秒間を 45 サイクルの条件で行った。C8FW の定量は C8FW 遺伝子に対する相対的な値を計算するために、試験サンプルの基準線遺伝子発現として、各反応における内部標準 (GAPDH) を用いることによって C8FW W 遺伝子の発現量を比較した (表 1、図 2)。表 1 から明らかのように、C8FW DNA の発現は、低酸素条件下では、通常条件に比べ、約 24 倍であった (24 時間後、mRNA 量比較)。

【0044】

(表 1)

| 培養時間 | 培養条件 | C8FW/GAPDH |
|------|------|------------|
| 0h | | 1.02 |

| | | |
|-----|-------|-------|
| 2h | 低酸素条件 | 0.52 |
| 6h | 低酸素条件 | 0.60 |
| 24h | 低酸素条件 | 37.01 |
| 36h | 低酸素条件 | 23.33 |
| 48h | 低酸素条件 | 14.41 |
| 24h | 通常条件 | 1.50 |

【実施例 6】

【0045】

遺伝子融合蛋白発現ベクターの構築と融合蛋白質の発現

C8FW 遺伝子が本発明により低酸素条件で培養された大腸癌細胞株で発現亢進すること
 が見出され、配列番号 3 に記載された C8FW 遺伝子の遺伝情報を基にして得られた、配列
 番号 1 3 に示すアミノ酸配列中 320~372 番目に相当する領域の遺伝子を選び、化学的に
 プライマーを合成した後、RT-PCR 法によって C8FWCTERM フラグメントをコードする遺伝
 子を増幅し、融合蛋白発現ベクターへ組み込んで発現させた。具体的には以下に述べる。
 サンプルには大腸癌細胞株を用いた。細胞から RNA を抽出し、Superscript (Gibco BRL
 社) にて作製した cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR 増幅用 5' プライマー及び 3'
 ' プライマーとして、それぞれ、配列表の配列番号 1 4 に示すセンスプライマー、配列番
 号 1 5 に示すアンチセンスプライマーを用いた。これらのプライマーを用いて、94 1
 分、60 30 秒、72 1 分の条件で 30 サイクル反応させた。この結果増幅された C8
 FW フラグメントをコードする遺伝子をエタノール沈殿させた後、乾燥させ、滅菌蒸留水
 に再溶解して制限酵素 BamHI、EcoRI、37 にて処理を行った。融合蛋白発現ベクター
 として pGEX を使い、同様に BamHI、EcoRI にて処理を行った。処理された C8FWCTERM
 フラグメントをコードする遺伝子及び pGEX をエタノール沈殿させた後、乾燥させ、滅菌
 蒸留水に再溶解した後、ライゲーション反応させて pGEX-C8FWCTERM を構築した。構築し
 た pGEX-C8FWCTERM は BL21 (DE3) pLysS にて形質転換し、アンピシリン選択 LB プレー
 トにまいて 37 で 1 晩恒温器にてインキュベートされた。得られたコロニーをアンピシ
 リンを含む LB 培地にて増殖させ、1mM IPTG 条件下で、3 時間培養して目的産物である
 GST-C8FWCTERM の induction を行った。

【実施例 7】

【0046】

抗原精製と免疫

上記の培養大腸菌を遠心分離し、Glutathion-Sepharoseゲル(アマシャム社)を用いて
 バッチ法にて GST-C8FWCTERM を精製した。この精製 GST-C8FWCTERM を PreScission Pro
 tease にて GST 部分を消化し、C8FWCTERM フラグメントを作製した。この C8FWCTERM フ
 ラグメントをフロイント完全アジュバントで乳化させて感作抗原とし、マウス Balb/c 6
 週齢 雌性に 10 µg を腹腔内投与した。2回目以降はフロイント不完全アジュバントを
 用い、2 週間おきに 3 回免疫を行い、最終回は PBS 溶液にて尾静脈投与した。

【実施例 8】

【0047】

細胞融合とスクリーニング

最終ブーストの 3 日後に外科的に脾臓を摘出し、細胞融合に用いた。融合はケーラー
 とミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) に従い、ポリエチレングリコール (シ
 グマ社) を用いて脾細胞とミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) を融合した。融合細胞
 は HAT 培地に分散し 96 穴マイクロタイターカルチャープレート (ファルコン社) に分
 注して、37、5% CO₂ 条件にて培養した。約 2 週間後にコロニーの生育を確認してスク
 リーニングを実施した。スクリーニングの実施法を以下に述べる。スクリーニング用プレ
 ートを作製するために上記 1. にて作製した融合ペプチド、C8FWCTERM を PBS 中に溶解
 し、0.5 µg/100 µl/well となるように 96 穴ウエルに分注した。同時にコントロールと
 して GST のみを同様に感作したプレートを作製した。プレートを 4 で 2 晩静置した後
 に、0.005% Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄し、非特異的反応を抑えるために、1.5%BSA

溶液を 200 μ l 分注して、更に 4 で 1 晩静置した。完成したプレートを 0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後に培養上清 100 μ l を 2 種類 (C8FWCTERM、GSTプレート) にそれぞれ反応させ、更に洗浄を行った後に 2 次抗体である HRP 標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (Zymed 社) を加えて反応させた。洗浄後に HRP の発色基質である OPD を加え、一定時間後に 1N 硫酸で反応を停止させ 492nm にて吸光度を測定した。上記の操作により C8FWCTERM プレートで陽性になり、GST プレートで陰性になったクローンは限界希釈法によって再クローニングされ、上清を再度確認した。かくして、目的とするハイブリドーマ 1C8FW-119 及びハイブリドーマ 3C8FW-285 を得た。このハイブリドーマ 1C8FW-119 及び 3C8FW-285 より得られたモノクローナル抗体 1C8FW-119 及びモノクローナル抗体 3C8FW-285 について、モノクローナル抗体タイピングキット (アマシャムファルマシア社) にて検定した。結果を表 2 に示す。

10

【0048】

(表2)

| | クラス | 軽鎖 |
|-----------|------|----|
| 1C8FW-119 | IgM | |
| 3C8FW-285 | IgG1 | |

【実施例9】

【0049】

モノクローナル抗体の腹水による製造

精製確立されたモノクローナル抗体の中から特にモノクローナル抗体 1C8FW-119 および 3C8FW-285 について、モノクローナル抗体を大量に得るために腹水による製造を試みた。以下にその方法を示す。限界希釈法によって数回リクローニングしたハイブリドーマ 1C8FW-119 又は 3C8FW-285 を 10% FCS (ライフテックオリエンタル社) を含む -MEM (大日本製薬) 培地を用いて増殖させ、 1×10^7 cells/0.5ml PBS/1匹にて予めプリスタン処理したマウス (日本クレーア社) 腹腔内に注射した。約 10 日後に麻酔下で腹腔内より腹水を採取し、40% 硫酸 (ナカライ) 分画により沈殿させ、得られる蛋白質を 5% SDA-PAGE とウエスタンブロッティングにより確認したところ、モノクローナル抗体 1C8FW-119 は分子量約 96 万の IgM、3C8FW-285 は分子量約 15 万の IgG であることが確認できた。そこで 1C8FW-119 では沈殿物を PBS で溶解し、PBS にて透析して硫酸を除き、S-300 によるゲルろ過、次いでアフィニティカラム等の精製を行なってモノクローナル抗体の精製を行なった。また 3C8FW-285 では沈殿物を PBS で溶解し、PBS にて透析して硫酸を除き、Protein Gカラム (Amersham Pharmacia) を用いて定法に従い抗体精製を行った。精製抗体は両方とも ELISA 法による確認実験で C 8 F W C T E R M と強い反応性を示し、陰性コントロールとして用いた G S T や B S A とは反応しなかった。得られた精製抗体はそれぞれ 14.7 mg/1匹、16.0 mg/1 匹であった。従って、腹水を作製することにより工業的にも十分量のモノクローナル抗体 1C8FW-119、3C8FW-285 を製造できることが確認できた。

20

30

【実施例10】

【0050】

モノクローナル抗体 1C8FW-119 を用いた組織免疫染色法による検体中の C8FW 蛋白質の検出

40

現在 C8FW 蛋白質は、12-Lipoxygenase と相互作用することが Two-Hybrid スクリーニング法により知られているが、その機能は未知である。また、C8FW 蛋白質は、BLAST を用いたモチーフ検索によりホスホプロテインドメインを有するものと推測される。しかし、ヒト組織中、とりわけ虚血性疾患により低酸素状態に暴露された炎症性腸組織における発現については知見が得られていない。そこでハイブリドーマ 1C8FW-119 の培養上清を用いてヒト組織の免疫染色により発現亢進を調べた。インフォームド・コンセントを行なった虚血性の腸疾患 (Ischemic Colitis:IC) 患者 4 例、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis:UC) 患者 4 例、クローン病 (Crohn Disease:CD) 患者 22例の病理解剖検体、および正常組織として同様にインフォームド・コンセントにより得られた大腸癌組織由来正常

50

部位 1 例について免疫組織化学的検討を行った。以下にその方法を述べる。ヒト組織は常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに抱埋をしてミクロトームにて薄切し、組織検体として使用した。組織切片はキシレン各 5 分ずつ 3 回の処理で完全にパラフィンを除き、100%エチルアルコールから 10% ずつ濃度を下げた 50% までの 6 段階下降系列のアルコール溶液をくぐらせた後、水洗した。続いて、pH6.0 のクエン酸緩衝液中、121、10 分間処理し、抗原を賦活化した。その後室温程度まで冷却し、流水にて水洗を行い、正常ヤギ血清にてブロッキングした。準備されたブロッキング終了後の組織に、1 次抗体溶液（ハイブリドーマ 1C8FW-119 の培養上清）を、室温にて 60 分反応させた。次いで、その組織を TBS にて洗浄した後、ビオチン標識 2 次抗体（抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体）（シグマ社）を室温 30 分間反応させた。反応終了後 TBS にて 5 分間、5 回洗浄した。更に、3% 過酸化水素加 TBS に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。続いて、ABC 試薬（和光純薬工業社）に室温中 20 分間浸漬させ、TBS 洗浄した後、DAB 試薬（和光純薬工業社）にて発色を行った。適度な発色が得られた後に組織を水洗した。また、対比染色としてヘマトキシリン核染色を行った。次いでこれらの組織を水洗し、50% エチルアルコール溶液から 10% ずつ濃度を上げた 100% までの 6 段階上昇系列のアルコール溶液をくぐらせ、続いてキシレン槽を 3 回くぐらせた後に染色後の組織に封入剤を滴下し、カバーグラスをかぶせて顕微鏡にて観察した。IC 手術例および CD 病の染色像をそれぞれ図 3、図 4 に示した。

【0051】

組織免疫染色化学法による結果から IC 3 例、UC 4 例、CD 2 例において陽性所見を認め、大腸正常組織中においては陰性所見であった。とりわけ、腺管の拡張蛇行部や粘膜深層に見られる顆粒を持った粘膜上皮細胞において発現の亢進が見られた。

すなわち、図 3 に示す IC 手術例では、虚血により上皮が脱落している部位の近傍で比較的上皮の障害が軽度の部位である。しかし、ゴブレット細胞の減少や軽度の腺管の乱れがみられ、虚血による影響を受けている。モノクローナル抗体 1C8FW-119 を用いた免疫染色ではこれらの細胞の細胞質内に顆粒状に陽性所見が認められる。陽性腺管でも基底膜側の細胞に陽性所見が強いが、これは表層近くの細胞は幹細胞から分化後より時間が経過しており、基底層側の細胞よりいわゆる老化し蛋白産生機能が落ちていること、循環動態から考えて表層の方が虚血の影響を強く受け、このため蛋白生産機能が低下していることが考えられる。現に虚血により上皮が脱落している部位の極近傍、すなわち虚血による影響の強いところでは、モノクローナル抗体 1C8FW-119 を用いた免疫染色において陽性像を示さない。これは障害が強い細胞では蛋白産生機能が低下し、炎症に特異な蛋白でも産生されなくなることを示している。

【0052】

また、図 4 は CD 手術例で、潰瘍形成部の近縁における残存上皮である。ここでも、腺管は疎で、走行は乱れ、ゴブレット細胞の減少が見られる。モノクローナル抗体 1C8FW-119 を用いた免疫染色の陽性所見は図 3 と同様である。

なお、間質の特に形質細胞や赤血球が染まっているように見えるが、陽性コントロールである肝組織や正常粘膜でも同様の所見が見られ、非特異な染色像と考えられ、有意な陽性所見とは考えられない。これは上述したリアルタイム RT-PCR の結果からも裏付けられる。

【実施例 11】

【0053】

モノクローナル抗体 1C8FW-119、3C8FW-285 を用いたサンドイッチ ELISA 法による検体中の C8FW の検出

モノクローナル抗体を用いて、血清などの試料中に存在する C8FW を測定する ELISA を検討した。測定方法は簡単には以下のとおりである。固層プレート（Nunc）上に実施例 9）で得られた精製モノクローナル抗体 3C8FW-285 を一次抗体として 2 μg/well になるように分注して 4 で 2 日間静置した。0.05% Tween 20 を含む 20mM Tris (pH7.0) 洗浄液にて 3 回洗浄した後、1.5% BSA Tris (pH7.0) を 200 μL 加えて 4 で一晩ブロッ

キングした。このようにして作製した一次抗体が吸着しているプレートを先の洗浄液で 1 回洗浄して 100 μ L のサンプル溶液を加えた。なお、サンプルとして下記 5 種類の測定をした。

(1)濃度 (0~50 μ g/mL) に調整した (実施例7) で作成された C8FWCTERM フラグメント。

(2)陰性コントロールとして融合蛋白質 C8FWCTERM フラグメントから切り離れた GST。

(3)バキュロウイルスを使用した昆虫細胞に産生させた完全長 C8FW (Bacroviral rhC8FW) を含む培養上清。

(4)C8FW 構造遺伝子を含まないコントロール pFastBac バクミドを感染させた細胞培養上清。 10

(5)SF21 細胞を培養していない未使用培地 (SF9001ISFM) (インビトロジェン)。

【0054】

ここで Native な抗原としてバキュロウイルスによる rhC8FW を利用しているが、バキュロウイルスによる rhC8FW 産生は簡単には下記の通りに行った。配列番号3を増幅するように設計されたプライマーセット (配列番号16、17) を利用して C8FW 遺伝子全長を増幅し、プライマー内に設計された制限酵素 BamHI、EcoRI で処理して pFastBac ベクター (インビトロジェン社) に組み込み、大腸菌を利用して相同組換えをおこした組換えバクミドベクターをセルフェクチンによって Sf21 (インビトロジェン社) に取り込ませて発現させた。以上の方法により作製した Sf21 細胞培養上清をサンプルとした。 20

上記各 5 種類のサンプルを一次抗体と室温、1 時間反応させた後、0.05% Tween 20 を含む 20mM Tris (pH7.0) 洗浄液にて 3 回洗浄し、HRP (西洋ワサビペルオキシオダーゼ) 標識二次抗体として、HRP 標識モノクローナル抗体 1C8FW-119 希釈溶液 100 μ L を加えて更に室温、1時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20 を含む 20mM Tris (pH7.0) 洗浄液にて 3 回洗浄して、3mg/mL OPD (オルソフェニレンジアミン) 基質溶液を 100 μ L 加えて発色させた。室温で 15分間反応させた後に 100 μ L の 1N 硫酸溶液を加えて反応を停止させ、吸光度測定器にて測光波長 492 nm で測定を行った。上記(1)、(2)を濃度変化させた吸光度の結果を図5に示す。また、(3)~(5)での吸光度の結果を表3に示す。結果として(1)C8FWCTERM フラグメントは感度よく測定され、検量線が作成されることが判明した。しかし、(2)タグである GST 蛋白質とは反応しなかった。一方、(3)により作製された Native な C8FW は約 8 μ g/mL の濃度で感度よくこの ELISA 測定系で測定できることが判明した。なお、コントロールである(4)、(5)では反応性が認められなかった。よって本発明による 2 種類のモノクローナル抗体は特異的に C8FW を捕らえ、それを測定することを可能にすることが証明された。 30

【0055】

【表3】

| | 測定値(OD) |
|-------------------|---------|
| (3) rh C8FW | 1.752 |
| (4) pFastBac Cont | 0.096 |
| (5) 未使用培地 | 0.089 |

40

【産業上の利用可能性】

【0056】

以上に詳細に説明した通り、本発明によれば、炎症性腸疾患組織に発現の亢進が見られる C8FW 遺伝子および該遺伝子産物である C8FW 蛋白質を利用して虚血性腸疾患の診断に用いることができる。該遺伝子および該遺伝子産物は、正常腸組織より炎症性腸疾患部位においてその発現量が高い。それ故、該遺伝子および該遺伝子産物、さらには該遺伝子産物に対する抗体の利用によって、炎症性腸疾患を高感度に検出可能な検出法が提供できる。

50

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1は、大腸癌細胞を低酸素条件で培養した時に発現する C8FW 遺伝子をノーザンブロット解析した結果を示す。

【図2】図2は、大腸癌細胞を 2 時間から 48 時間に渡って低酸素条件で培養した時に発現する C8FW 遺伝子の、基準遺伝子 (GAPDH) の発現に対する割合を示し、また、通常条件で 24 時間培養した時に発現する C8FW 遺伝子の、基準遺伝子 (GAPDH) の発現に対する割合を右端に示す。

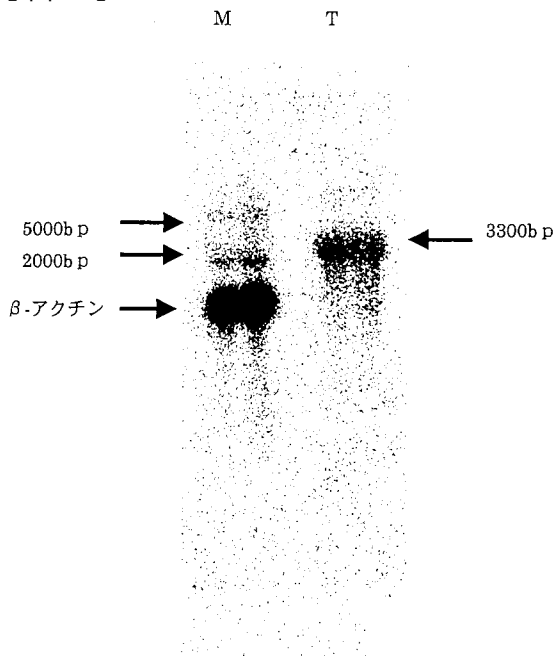
【図3】図3は、IC 症例に対して、C8FW 蛋白質に対するモノクローナル抗体 1C9FW-119 で免疫組織染色した時の結果を示す。

10

【図4】図4は、CD 症例に対して、C8FW 蛋白質に対するモノクローナル抗体 1C9FW-119 で免疫組織染色した時の結果を示す。

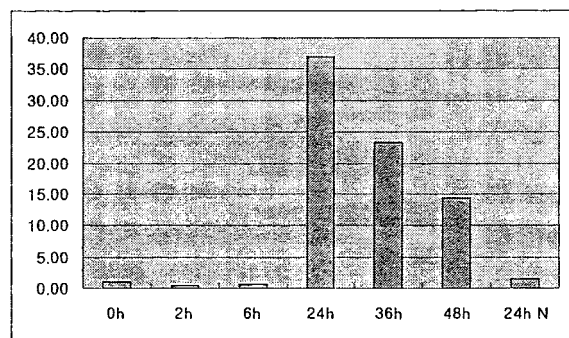
【図5】図5は、C8FWの検量線を表す。横軸は、C8FW C T E R Mフラグメントの濃度、縦軸は吸光度を示す。

【図1】



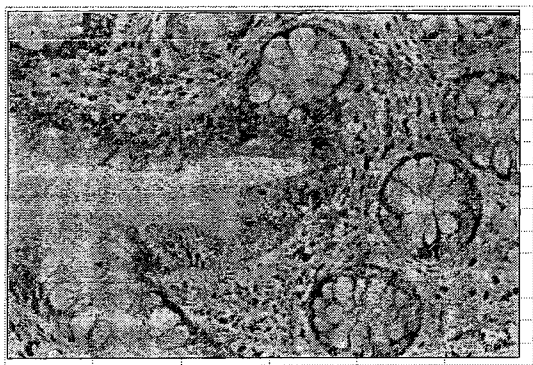
ノーザンブロット解析

【図2】



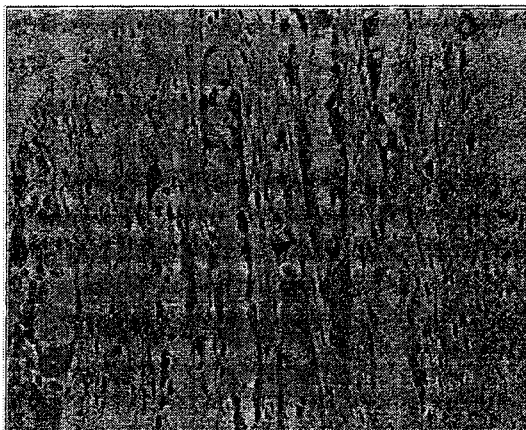
定量的PCR

【 図 3 】



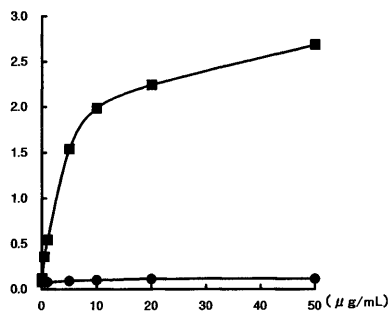
IC症例における免疫組織染色像

【 図 4 】



CD症例における免疫組織染色像

【 図 5 】



【配列表】

2004321179000001.app

フロントページの続き

| | | |
|--------------------------|---------------------|------------|
| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
| G 0 1 N 37/00 | G 0 1 N 33/53 M | |
| | G 0 1 N 37/00 1 0 2 | |

(72)発明者 和久井 世紀

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内

(72)発明者 大橋 建也

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社バイオケミカル研究所内

(72)発明者 油谷 浩幸

東京都目黒区駒場 4 - 6 - 1 東京大学先端科学技術研究センター内

(72)発明者 岡 裕之

東京都目黒区駒場 4 - 6 - 1 東京大学先端科学技術研究センター内

(72)発明者 谷口 裕和

東京都目黒区駒場 4 - 6 - 1 東京大学先端科学技術研究センター内

(72)発明者 鄭 子文

東京都文京区本郷 7 - 3 - 1 東京大学大学院医学系研究科内

(72)発明者 高梨 正勝

東京都板橋区加賀 2 - 1 1 - 1 帝京大学医学部内

(72)発明者 片山 勝博

福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社メディカル開発センター内

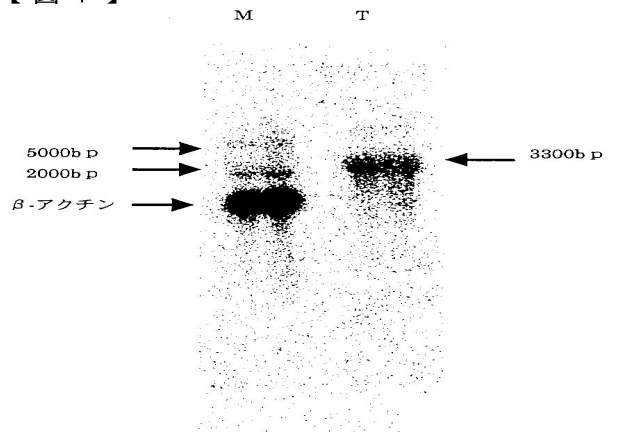
F ターム(参考) 2G045 AA35 BB50 BB51 CA26 DA13 DA36 FA11 FB01 FB02 FB03
 FB07 GC10
 4B024 AA11 BA54 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA06 EA04
 FA01 GA03 HA13 HA14 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35
 QR40 QR42 QR56 QR62 QR84 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36
 QX01 QX02
 4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA28 EA51 FA71 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于诊断炎性肠病的标记基因或蛋白质和使用其诊断炎性肠病的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004321179A | 公开(公告)日 | 2004-11-18 |
| 申请号 | JP2004104812 | 申请日 | 2004-03-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 日东纺绩株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 日东纺绩株式会社 | | |
| [标]发明人 | 清川巖 和久井世紀 大橋建也 油谷浩幸 岡裕之 谷口裕和 鄭子文 高梨正勝 片山勝博 | | |
| 发明人 | 清川 巖 和久井 世紀 大橋 建也 油谷 浩幸 岡 裕之 谷口 裕和 鄭 子文 高梨 正勝 片山 勝博 | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12Q1/68.A G01N33/50.T G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GC10 4B024/AA11 4B024/BA54 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA03 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 池田幸 | | |
| 优先权 | 2003102891 2003-04-07 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断炎性肠病的标记基因或蛋白质，并提供使用该方法诊断炎性肠病的方法。ZSOLUTION：低氧条件下结肠癌细胞培养中C8FW基因或C8FW蛋白表达的加速可作为炎症性肠病诊断的标志物，因此可以诊断炎症性肠病。通过检查从患者收集的太空人中是否存在C8FW基因或C8FW蛋白。Z

【 図 1 】



ノーザンプロット解析