

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/035872

発行日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(43) 国際公開日 平成15年5月1日(2003.5.1)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 25/00	1 O 1
A 6 1 P 25/00	C O 7 K 14/52	
C O 7 K 14/52	C O 7 K 16/24	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く	

出願番号	特願2003-538372(P2003-538372)	(71) 出願人	396023812 本庶 佑 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/010936		
(22) 国際出願日	平成14年10月22日(2002.10.22)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-325189(P2001-325189)	(71) 出願人	000185983 小野薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号
(32) 優先日	平成13年10月23日(2001.10.23)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人	100081086 弁理士 大家 邦久
		(72) 発明者	本庶 佑 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4
		(72) 発明者	田代 啓 京都府京都市北区小山東大野町93
		(72) 発明者	高橋 淳 京都府京都市左京区岡崎北御所町25-ベルシャトゥ岡崎北御所町501
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトおよび哺乳動物の幹細胞由来神経生存因子

(57) 【要約】

本発明は、ヒト、ラット、マウスの幹細胞由来神経生存因子ポリペプチド(SDNSF)、その製造方法、SDNSFをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、SDNSFの抗体、SDNSFまたは抗体を含有する薬学的組成物、SDNSFを測定する方法、SDNSFを測定する試薬およびSDNSFを用いたスクリーニング方法に関する。

本発明のポリペプチドは、神経細胞の生存に有効であり、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷の治療に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

実質的に純粋な形である配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログ。

【請求項 2】

配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなる請求の範囲第 1 項記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドをコードする cDNA。

【請求項 4】

配列番号 1、2、5、6、9 または 10 で示される塩基配列を有する請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント。

【請求項 5】

請求の範囲第 3 項または第 4 項記載の cDNA からなる複製または発現ベクター。

【請求項 6】

請求の範囲第 5 項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドを発現させるための条件下で請求の範囲第 6 項記載の宿主細胞を培養することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法。

【請求項 8】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体。

【請求項 9】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 8 項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

【請求項 10】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドまたは請求の範囲第 8 項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする神経変性が係わる疾患の治療に有効な薬学的組成物。

【請求項 11】

神経変性が係わる疾患が中枢神経の損傷である請求の範囲第 10 項記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドの測定方法。

【請求項 13】

請求の範囲第 8 項記載の抗体を用いることを特徴とする請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドの免疫化学的測定方法。

【請求項 14】

請求の範囲第 1 2 項または第 1 3 項記載の方法を用いることを特徴とする請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドを検出する試薬。

【請求項 15】

請求の範囲第 1 2 項または第 1 3 項記載の方法を用いることを特徴とする腫瘍を検査する試薬。

【請求項 16】

腫瘍が脳腫瘍である請求の範囲第 1 4 項記載の試薬。

【請求項 17】

請求の範囲第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドを用いることを特徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドを有効成分とする中枢神経損傷治療剤。

【請求項19】

中枢神経損傷が脳梗塞による中枢神経損傷である請求の範囲第19項記載の試薬。

【請求項20】

中枢神経損傷が脳出血による中枢神経損傷である請求の範囲第19項記載の試薬。

【請求項21】

中枢神経損傷が脊髄損傷による中枢神経損傷である請求の範囲第19項記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

10

本発明はヒト、ラット、マウスの幹細胞由来神経生存因子 (Stem cell Derived-Neuron Survival Factor、以下、SDNSFと省略する。) に関する。

さらに詳しく言えば、ヒト、ラット、マウスのSDNSF、それらの製造方法、SDNSFをコードするcDNA、そのcDNAからなるベクター、そのベクターで形質転換された宿主細胞、SDNSFの抗体、SDNSFまたは抗体を含有する薬学的組成物、SDNSFを測定する方法、SDNSFを測定する試薬およびSDNSFを用いたスクリーニング方法に関する。

背景技術

成体脳では新しいニューロンは生まれにくいというのが長い間の定説であり、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患などでは、神経細胞の細胞死により運動機能が失われ、いったん失われた機能の回復は難しいとされていた。しかし近年、ヒトやサルなどの高等哺乳動物の成体脳 (海馬、大脳皮質連合野、側脳室) でもニューロンが新生することが見出され、これらの領域で新しく生まれるニューロンが神経幹細胞から発生することも示された。また、神経幹細胞が高齢者の脳内にも存在し、神経細胞に分化しうることも証明された。これらのことは、脳の再生治療が細胞を移植する細胞治療に限定されず、タンパク質医薬、薬物あるいは遺伝子治療などの方法により直接内在性の幹細胞を活性化する治療が可能であることを示唆している。

20

従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードするcDNAを得ようとする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチドの単離精製を経て、遺伝子をクローニングするという方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられてきた。しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、微量しか産生されなかったり、特別な生理条件でのみ発現する因子も多く、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

30

発明の開示

本発明者らは、中枢神経の損傷または神経変性に係わる疾患の治療、診断、脳腫瘍の診断あるいは研究上有益な新規な因子 (ポリペプチド)、特に分泌シグナルを有する分泌蛋白質および膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行った。その結果、神経幹細胞に係わる新規なペプチド分子を単離し、上記のような再生治療に使用すること、および神経細胞の特異的マーカーとなることを見出した。

40

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子 (例えば、各種サイトカイン等) のような分泌蛋白質やそのレセプターのような膜蛋白質 (以下、これらをまとめて分泌蛋白質等と呼ぶ。) の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドの有無を簡単に検索できる方法

50

(シグナルシーケンスストラップ (SST) 法) を見出した (日本国特許第 2, 879, 303号参照)。さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに大量かつ簡便にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法 (酵母 SST 法) も開発された (米国特許第 5, 536, 637号)。

本方法を用いて、成体ラット海馬由来神経幹細胞が産生している新規な分泌蛋白質、およびそれをコードする cDNA を同定することに成功し、その情報を基に全長 cDNA を成体ラット海馬由来神経幹細胞より見出した。

本ポリペプチドが、後に詳述するように、脳の一部のニューロン (海馬神経初代培養細胞および海馬由来幹細胞) に対し、生存支持活性を持つことを確認し、本発明を完成した。本ポリペプチドは、機能が特定された有用な因子である。

本発明が提供する cDNA 配列は、配列番号 1 または 2 で示されるラット SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 SST 法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号 1 で示されるラット SDNSF クローンは分泌蛋白質 (ここではラット SDNSF 蛋白として表される。) をコードする完全な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

本発明が提供する cDNA 配列は、配列番号 5 または 6 で示されるヒト SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 SST 法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号 5 で示されるヒト SDNSF クローンは分泌蛋白質 (ここではヒト SDNSF 蛋白として表される。) をコードする完全な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

本発明が提供する配列番号 9 または 10 で示される cDNA 配列は、マウス SDNSF クローンとして同定され、成体ラット海馬由来神経幹細胞から作製した cDNA ライブラリーより、酵母 SST 法を使用して得た情報をもとに単離された。配列番号 9 で示されるマウス SDNSF クローンは分泌蛋白質 (ここではマウス SDNSF 蛋白として表される。) をコードする完全な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して GenBank および NCBI を用いた BLASTN、FASTA および UNIGENE などにより、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTP、Fly Database、SwissProt などにより検索をした結果、本発明ポリペプチドであるラット SDNSF およびそれらをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

また、本発明者らは脳の一部のニューロンの生存支持活性を持つこと、分泌蛋白質でありながら EF ハンドモチーフを持ち、細胞外または分泌経路のオルガネラのカルシウムで調節を受けるサイトカインである可能性があること、および既知のいずれのニューロトロフィンとも相同性を有さないことから、既知のニューロトロフィン遺伝子欠損マウス解析からそれらへの依存性が知られている交感神経、知覚神経、脊髄運動神経核の神経、基底核コリン作動性神経以外のニューロンの形成や生存を支持するサイトカインである可能性と同時に、これまで原因不明であった神経変性疾患の病因解明および治療につながるものと考えられる。

本発明は、

1. 実質的に純粋な形である配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログ、
2. 配列番号 4、8 または 12 で示されるアミノ酸配列からなる前記第 1 項記載のポリペプチド、
3. 前記第 1 項または第 2 項記載のポリペプチドをコードする cDNA、
4. 配列番号 1、2、5、6、9 または 10 で示される塩基配列を有する前記第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメント、
5. 前記第 3 項または第 4 項記載の cDNA からなる複製または発現ベクター、

6. 前記第5項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞、
7. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを発現させるための条件下で前記第6項記載の宿主細胞を培養することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法、
8. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体、
9. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドまたは前記第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物、
10. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドまたは前記第8項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする神経変性が係わる疾患の治療に有効な薬学的組成物、
11. 神経変性が係わる疾患が、脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷である前記第10項記載の薬学的組成物、
12. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドの測定方法、
13. 前記第8項記載の抗体を用いることを特徴とする前記第1項または第2項記載のポリペプチドの免疫化学的測定方法、
14. 前記第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴とする前記第1項または第2項記載のポリペプチドを検出する試薬、
15. 前記第12項または第13項記載の方法を用いることを特徴とする腫瘍を検査する試薬、
16. 腫瘍が脳腫瘍である前記第14項記載の試薬、
17. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを用いることを特徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法、
18. 前記第1項または第2項記載のポリペプチドを有効成分とする中枢神経損傷治療剤、
19. 中枢神経損傷が脳梗塞による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬、
20. 中枢神経損傷が脳出血による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬、および
21. 中枢神経損傷が脊髄損傷による中枢神経損傷である前記第19項記載の試薬に関する。

10

20

30

詳細な説明

実質的に純粋な形である配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを意味する。

配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

さらに、配列番号4、8または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

40

配列番号1、2、5、6、9または10で示される塩基配列からなるcDNAに選択的にハイブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60、80または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなcDNAは、以後本発明のcDNAとして記載される。

配列番号1、2、5、6、9または12で示される塩基配列からなるcDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、3

50

0 または 40 塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明の cDNA に含まれる。

本発明の SDNSF 蛋白は、脳腫瘍のうち未分化なニューロblastoma とグリオblastoma 細胞株から大量に分泌されるが、分化したグリオblastoma からは分泌されないことと、血中や髄液中に分泌されるニューロblastoma とグリオblastoma 脳腫瘍マーカーは無いので、SDNSF 蛋白が、血中で検出可能な初の未分化脳腫瘍マーカーとすることができる。

さらに、本発明には、本発明の cDNA からなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori 領域と、必要により上記 cDNA の発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウイルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えば cDNA に対応する RNA の製造、宿主細胞の形質転換に用いることができる。

さらに、本発明には、配列番号 1、2、5、6、9 または 10 で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームからなる cDNA を含む本発明の cDNA を複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞が挙げられる。

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行われることが好ましい。本発明の cDNA は、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンス RNA を製造することもできる。このようなアンチセンス RNA は、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体をも含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法をも含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物 (例えば、ラットやウサギ等) に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

(A) 前記 1 の本発明のポリペプチドとしては、配列番号 4、8 または 12 で示されたアミノ酸配列からなるもの以外に、その一部が欠損したもの (例えば、配列番号 4 中、生物活性の発現に必須な部分だけからなる成熟ポリペプチド等)、その一部が他のアミノ酸と置換したもの (例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの)、および上記本発明のポリペプチドに他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは 1~6 種類 (例えば、Met は 1 種類、Leu は 6 種類) 知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく cDNA の塩基配列を変えることができる。

(B) 前記 3 で特定される本発明の cDNA には、(A) の配列番号 4、8 または 12 で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

(C) 配列番号 2、6 または 10 で特定される cDNA は、(B) で示される cDNA の一態様であり、天然型配列を表わす。

(D) 配列番号 1、5 または 9 で示される cDNA は、(C) で特定される cDNA に天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。

配列番号 1、5 または 9 で示される塩基配列からなる cDNA の作製は、以下の方法に従って行われる。

はじめに酵母 SST 法 (米国特許第 5, 536, 637 号に記載) の概要について説明す

10

20

30

40

50

る。

サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母がショ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない (インベルターゼはラフィノースをショ糖とメリビオースに、ショ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。)。また数多くの既知の哺乳類のシグナルペプチドは酵母のインベルターゼを分泌させることが知られている。

これらの知見から、酵母のインベルターゼの分泌を可能にする新規のシグナルペプチドを哺乳類のcDNAライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

10

翻訳開始点ATGを削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子SUC2 (GENBANK accession No. V01311) を酵母の発現ベクターに組み込んで酵母SST用ベクターpSUC2を作製した。発現ベクターには、AAH5プラスミド (Gammerer, Methods in Enzymol. 101, 192-201, 1983) 由来の発現用プロモーター (ADHプロモーター) およびターミネーター (ADHターミネーター) が組み込まれ、酵母複製起点としては 2μ ori、酵母選択マーカーにはTRP1、大腸菌複製起点としてはColE1 ori、大腸菌薬剤耐性マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子がそれぞれ組み込まれている。そのSUC2遺伝子の上流に哺乳類のcDNAを組み込んで、酵母SST cDNAライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。

20

組み込まれた哺乳類cDNAがシグナルペプチドをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対しても分泌作用をもつと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。そこで出現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサートcDNAの塩基配列を決定することによって、新規シグナルペプチドの検索を迅速かつ容易にした。

酵母SST cDNAライブラリーの作製は、

工程 (1) : 対象となる細胞よりmRNAを単離し、特定の制限酵素 (酵素I) サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成し、

工程 (2) : 酵素Iとは異なる特定の制限酵素 (酵素II) サイトを含むアダプターを連結して、酵素Iで消化した後、適当なサイズで分画し、

30

工程 (3) : 酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインベルターゼ遺伝子の上流に得られたcDNA断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

各工程を詳しく説明すると、工程 (1) では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法 (以下、公知の方法は特に記載がなければMolecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊) またはCurrent Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc. より発刊) に記載の方法に従って行われる。) に従ってmRNAの単離が行われる。

40

対象となる組織としては、マウス胎児心臓が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖cDNAの合成は公知の方法により行われる。

アダプターに連結される制限酵素 (酵素I) サイトと次の工程 (2) で用いられる制限酵素 (酵素II) サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素IとしてXhoI、酵素IIとしてはEcoRIが用いられる。

工程 (2) ではT4DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素IIアダプターを連結した後、酵素Iで消化し、アガロース電気泳動 (AGE) により300~800bpのcDNAを分画する。酵素IIは、前記したように酵素Iと異なるものなら何でもよい。

工程 (3) は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプチドを削除したインベルターゼの遺伝子の上流に (2) で得られたcDNA断片を組み込んで大腸菌に形

50

質転換する工程である。ここで酵母発現用プラスミドベクターとしては、種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内でも機能する Y E p 2 4 などが用いられるが、好適には前述したプラスミド p S U C 2 が用いられる。

形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ましくは D H 1 0 B のコンピテントセルである。また形質転換方法は公知の方法のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により行われる。形質転換体は公知の方法により培養され、酵母 S S T 用の c D N A ライブラリーが得られる。

この c D N A ライブラリーでは、すべてのクローン c D N A 断片が導入されているわけではないし、またすべてが未知の（新規の）シグナルペプチドをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。

遺伝子をもたない酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（例えば Y T 4 5 5 株など）またはインペルターゼ遺伝子を人為的に欠損させた株（公知の方法に従い作製可能）に、該 c D N A ライブラリーを導入し、シグナルペプチドをコードする配列を有する断片のスクリーニングを行なう。酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行われる。形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知の蛋白質をコードすることが明らかになった c D N A については、それをプローブとして全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行われる。

配列番号 1、5 または 9 で示される塩基配列が、一部、好ましくは全てが確定されると哺乳類に存在する本発明の蛋白質をコードする c D N A もしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードする c D N A を得ることができる。適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来の c D N A ライブラリーあるいは m R N A から P C R 法により、あるいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、他の哺乳類 c D N A ライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、他の哺乳類型の当該蛋白質をコードする c D N A を得ることができる。

このようにして得られた c D N A が、S S T で得られた c D N A 断片の塩基配列（またはその相同配列）を含んでいるならばシグナルペプチドをコードしていることになるので、該 c D N A が全長、またはほぼ全長であることは明らかである。

（シグナルペプチドは例外なく蛋白質の N 末端に存在することから、c D N A のオープンリーディングフレームの 5' 末端にコードされている。）

さらに公知の方法に従い、該 c D N A をプローブとしてノザン（Northern）解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られる m R N A のサイズと該 c D N A のサイズを比較し、ほぼ同じであれば該 c D N A はほぼ全長であると考えられる。

本発明は、開示されたタンパクの全長型並びに成熟型の両方を提供する。それらのタンパクの全長型は、配列番号 4、8 または 1 2 で示される塩基配列の翻訳されるアミノ酸配列で同定される。それらの成熟タンパクは、適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で開示された配列番号 1、5 または 9 で示される全長 D N A を適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で発現させることによって得られる。成熟型のタンパクの配列は、全長型のアミノ酸配列より予測可能である。

配列番号 1、2、5、6、9 または 1 0 で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、これをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の c D N A を得ることができる。さらに、本 c D N A を含有するベクター c D N A を適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とする c D N A を必要量得ることができる。

10

20

30

40

50

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1) 生体または培養細胞から精製単離する方法、
- (2) ペプチド合成する方法、または
- (3) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系(宿主-ベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードするcDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号1、2、5、6、9または10で示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、サルCOS-1細胞、COS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、分泌蛋白である本発明の蛋白は、その細胞上清中に目的とするポリペプチドとして発現される。さらに、その他のポリペプチド、例えば抗体の定常領域(Fc portion)をコードするcDNA断片と連結することによって、フュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドおよびそれをコードするcDNAは、一つあるいはそれ以上の効果あるいは生物活性(以下に列挙するアッセイに関連するものを含む。)を示すことが考えられる。

本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードするcDNAの投与あるいは使用(例えば、遺伝子療法(再生医療を含む。)やcDNA導入に適したベクター)により提供される。

本発明のポリペプチドが、脳の一部のニューロン(海馬神経初代培養細胞および海馬由来幹細胞)の生存維持活性を有していることから、神経変性に関わる疾患(脳梗塞や脳出血、脊髄損傷などによる中枢神経の損傷)の治療に有用である。

また、該ポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行え、これによって該ポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は該ポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて公知の方法により作製することができる。

また、該ポリペプチドを用いることにより、例えば、アフィニティーカラムを作製して、本ポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白(リガンド)の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行うことができる。

また、該ポリペプチドを用いて、例えば、ウエスツーウエスタン法により、または該cDNA(好ましくは該ポリペプチドをコードするcDNA)を用いて、例えば、酵母Two

-Hybrid法により該ポリペプチドと相互作用する分子の同定、遺伝子クローニングを行うこともできる。

さらに、本ポリペプチドを用いることによって、本ポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行うこともできる。

スクリーニングは、例えば、以下の方法により行なうことが出来る。すなわち、

(a) 本発明のポリペプチド、スクリーニングすべき化合物、及び細胞を含む反応混合物を、細胞が該ペプチドにより正常に刺激される条件下に一緒にし（該反応混合物は細胞が増殖するに従い細胞中に導入される標識および該ペプチドの機能を効果的に観察させるための該ペプチド以外のペプチドを含む）；ついで、

(b) 細胞の増殖の程度を測定して、該化合物が有効なアンタゴニストまたはアゴニストであるかどうかを決定する。

本発明のcDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを生産する際の重要かつ必須の鑄型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA（RNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。

また、本発明のcDNAをプローブとしてジェノミック（genomic）DNAを分離できる。

前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明のポリペプチドに対する抗体は通常、全身的または局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100 μ gから100mgの範囲で、一日一回から数回経口投与されるかまたは、成人一人あたり、一回につき、10 μ gから100mgの範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、安定化剤（ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（アルギニン、アスパラギン酸等）を含有していてもよい。

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤（例えば、精製水、エタノール等）を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。ス

10

20

30

40

50

プレー剤の製造方法は、例えば米国特許第2, 868, 691号および同第3, 095, 355号明細書に詳しく記載されている。

本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水溶性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水溶性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）等が挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明のSDNSFに関する実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

実施例1：poly(A)⁺RNAの調製

成体ラット海馬由来神経幹細胞をクローン化したPZ5細胞よりTRIzol reagent（商品名、Life Technologies, Incより購入）を用いて全RNAを抽出し、Oligotex dT30<Super>（商品名、Rocheより購入）を用いてpoly(A)⁺RNAを精製した。

実施例2：酵母SST cDNAライブラリーの作製

上記poly(A)⁺RNAを鋳型にXhoI部位を連結した9mer
5'-TCC CGA TTG AAT TCT AGA CCT GCC TCG AGN NNN NNN NN-3'

(配列番号13)

をプライマーとして、Super Script Choice System（商品名、Life Technologies, Incより購入）を用いて2本鎖cDNAの合成を行った。EcoRIアダプター（GIBCOERLより購入）をDNA ligation kit Ver. 2（商品名、宝酒造（株）より購入。以後、cDNAの連結はすべて本キットを使用した。）を用いて連結した後、XhoIで消化し、アガロース電気泳動で400～800bpのcDNAを切り出して分画し、pSuc2t7lori（米国特許5, 536, 637号参照）のEcoRI/XhoI部位に連結し、大腸菌DH10株にエレクトロポレーション法で形質転換して酵母SST用のcDNAライブラリーを得た。

実施例3：SSTによるスクリーニングおよびSST陽性クローンの塩基配列の決定

このcDNAライブラリーのプラスミドを調製し、酢酸リチウム法（Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1を参照）により酵母YTK12株を形質転換し、トリプトファン（Trp）不含の酵母形質転換体の選択培地（CMO-Trp培地）のプレート上にまいた。30℃で48時間インキュベートした後、Accutran Replica Plater（商品名、Schleicher & Schuellより購入）を用いて得られたコロニー（形質転換体）のレプリカををラフィノースを炭素源とするYRPプレートにとり、30℃で14日間インキュベートした。3日目以降、出現してきた各々のコロニーを一つずつ再度YPRプレートにストリークして、30℃で48時間インキュベーション後、シングルコロニーをYPD培地に植菌し、さらに、30℃で48時間インキュベーションした後、プラスミドを調製した。続いて、pSUC2のクローニングサイトの両端の配列の2種類のプライマー（センス鎖はビオチン化プライマー）を用いて公知の方法に従ってPCRを行い、インサートcDNAを増幅した後、Dynabeads（商品名、DYNALより購入）を用いてビオチン化1本鎖cDNAを精製し、塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定はDNA Sequencing kit（Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction）（商品名、Applied Bios

systems Inc. より購入) を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシーケンシング法で反応を行い、自動DNAシーケンサー373 (Applied Biosystems Inc.) で読み取りを行った (以下の塩基配列決定もすべて本方法で行った)

。得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてデータベースとの相同性検索を行い、SDNSFと名付けられたクローンがデータベースに登録されていない新規のcDNAであることが明らかとなった。そこで、このSDNSFクローンの断片cDNA (以後、SDNSF S S T断片cDNAと呼ぶ) について全長cDNAのクローニングを試みた。また、推定されるアミノ酸配列を既知のシグナルペプチドと比較することによりSDNSF S S T断片cDNAが機能的かつ構造的にもシグナルペプチドを有することを 10 確認した。

実施例4：全長cDNAのクローニングおよび塩基配列の決定

PZ5 cDNAライブラリーより得られた100万プラークをナイロンメンブレンにトランスファーした。³²P標識したラットSDNSF S S T断片cDNAをプローブとして、公知の方法に従いハイブリダイゼーションを行い、多数の陽性クローンを得た。その中の1クローンを単離して、大腸菌DH5αに形質転換してプラスミドを調製した。初めに5'側の塩基配列を決定してラットSDNSF S S T断片cDNAの塩基配列が存在することを確認した後、全塩基配列を決定し、配列番号1に示す配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号2に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号 4に示す推定アミノ酸配列を得た。 20

NCBIデータベース検索の結果、本発明のポリペプチド (ラットSDNSFポリペプチドと呼ぶ) およびコードする核酸配列と一致する配列はなかった。さらに、ラットSDNSFポリペプチドは膜貫通領域を持たないことも明らかとなり、本発明のラットSDNSFポリペプチドは新規の分泌蛋白質であることが判明した。

モチーフ検索の結果から、SDNSFはシグナルペプチドと下流に2つのEFハンドモチーフ (カルシウム結合モチーフ) を有することが判明した (第1図)。EFハンドモチーフはカルシウム分泌蛋白質であるcalmodulinのEFハンドモチーフと共通の配列を有している (第2図)。EFハンドモチーフは分泌蛋白質ではあまりみられない構造ではあるが、同様の構造を有する蛋白としてはBM-40とその関連蛋白が報告されている。BM-40においてはEFハンドモチーフが分泌小胞内のカルシウム濃度に応じて蛋白質 30 高次構造の変化に寄与し、分泌効率に関与しているのではないかとされている (文献1: Busch E et. al., Calcium affinity cooperativity and domain interaction of extracellular EF-hands present in BM-40., J. Biol. Chem., 275 (33), 25508-15 (2000))。

実施例5：ヒトおよびマウスSDNSF遺伝子の塩基配列の決定

他の哺乳類のESTsおよびUNIGENE DNAデータベースの相同性検索の結果、本発明者らはラットSDNSFと相同するヒトおよびマウスEST配列を見出した。そこで、本発明者らは、その配列情報を用いて、常法によりヒトおよびマウスSDNSFの全長遺伝子を単離し、全塩基配列を決定した。その結果、配列番号5および9に示す塩 40 基配列を得た。さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号8および12に示す推定アミノ酸配列を得た。以上のことから、該ヒトクローンおよびマウスクローンは全長であること、およびラットSDNSFに対してアミノ酸レベルで、それぞれ87%、90%一致していることが判明した。

このヒトSDNSFおよびマウスSDNSFについても核酸配列データベースおよびアミノ酸配列データベースを検索したが、ラットSDNSFと同様に一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリペプチドも、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

実施例6：哺乳類以外の動物との相同性検索

線虫、およびショウジョウバエの遺伝子データベース検索の結果から線虫の仮想的な蛋白質として報告されているF55A11.1あるいはショウジョウバエの遺伝子産物として 50

報告されているCG12817と20-30%のアミノ酸が一致する相同性を有することが確認された。このことから、種間の保存が保たれていると考えられた。

実施例7：抗SDNSF蛋白ポリクローナル抗体の作製

固相法により合成し、キーホール リムペット ヘモシアニン (Keyhole limpet hemocyanin; KLH) コンジュゲートした3種類のラットSDNSFポリペプチドの部分ペプチド

Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Cys-KLH

(配列番号4の15~30)

His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Val Pro Pro Met Ser Glu Asp Glu Cys-KLH

10

(配列番号4の74~89)

KLH-Cys Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu Gln

(配列番号4の106~119)

を免疫原としてウサギに免疫して、抗体価の測定後血清を採取した。得られた血清を各々免疫原としたペプチド断片を結合させたアフィニティーカラムにより抗SDNSF蛋白ポリクローナル抗体を精製した。

実施例8：SDNSFの分泌経路の検討

20

ラットSDNSFのアミノ基末端にFLAG構造を付加したSDNSF合成蛋白(FLAG-SDNSF)およびカルボキシル基末端にFLAG-6His構造を付加したSDNSF合成蛋白(SDNSF-CFLAG-6His)を293T細胞に強制発現させた。それぞれの培養上清中にSDNSF合成蛋白が分泌されていることを抗SDNSF抗体および抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロット(Western Blot)法により確認した(第3図)。

実施例9：ラットSDNSFの発現部位の同定

成体ラット脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、骨格筋、胸腺の組織よりTRIzol reagent(商品名、Life Technologies, Incより購入)を用いて全RNAを抽出し、Oligotex dT30<Super>(商品名、Rocheより購入)を用いてpoly(A)⁺RNAを精製した。

30

それぞれのpoly(A)⁺RNAをホルムアルデヒドゲル電気泳動し、(Sambrook, et al., 1989 [Molecular Cloning])の方法に従い、ブロットニングを行った。ゲル精製を行った、³²PラベルcDNAフラグメントをプローブとして、検出を行ったところ、第4図に示すように全ての臓器で発現が認められた。

ラット胎児の全身および脳、出生後7日までの脳の組織および神経系の初代培養細胞および細胞株よりTRIzol reagent(商品名、Life Technologies, Incより購入)を用いて全RNAを抽出し、RT-PCR法によりmRNAの発現量を調べた。第5図に示すように、培養幹細胞、神経初代培養細胞、神経幹細胞にSDNSFの発現が認められた。また、ヒト神経膠芽種細胞UG251およびマウス神経芽細胞N18ではSDNSFの発現を認めたが、グリア初代培養細胞およびラットグリオーマ細胞C6では発現を認めなかった。また、ウェスタンブロット(Western Blot)法によって、ヒト神経膠芽種細胞UG251およびマウス神経芽細胞N18でSDNSFタンパク質の発現が確認された(第6図)。

40

実施例10：SDNSFの神経細胞および幹細胞生存支持活性の測定

SDNSFの発現部位より、神経細胞および幹細胞に対する機能を調べた。

His構造を利用しNi-NTA法により精製した合成SDNSF蛋白(SDNSF-FLAG-6His)をラット海馬神経初代培養細胞およびラット海馬由来幹細胞の培養上清に加えて、それぞれの培養条件下における培養4日目の生存細胞数をWST redu

50

ction法を用いて検討したところ、第7図に示すように神経初代細胞においてはSDNSF 100 ng/mlの濃度において無添加群と比較して細胞生存に有効であった。また、神経幹細胞においてもSDNSF添加群において無添加群と比較して生存細胞数が多い傾向が認められた。また、FGF-2（線維芽細胞増殖因子2）を除いた培地でのラット海馬由来幹細胞の5日目での生存活性は、SDNSF添加濃度に依存して増強した（第8図および第9図）。

実施例11：SDNSFの神経幹細胞の自己再生および分化に対する効果の測定

ラット海馬由来幹細胞をSDNSF存在/FGF-2欠如培地で5日間培養後、さらに、非コート培養ディッシュ中にてFGF-2（20 ng/ml）添加培地で6日間培養した後の神経肝細胞のニューロスフェア（神経細胞塊）を計数した。また、神経細胞の分化マーカーであるTuj-1陽性細胞を計測した。第10図および第11図に示すように、SDNSF添加神経幹細胞は、無添加群（Control）と比較して有意なニューロスフェアの増加を呈した。さらに、そのうちの分化した神経細胞の割合は、無添加群（Control）と比較して有意な増加を示した。これらの結果から、SDNSFは、FGF-2と同様に神経幹細胞の自己再生能を維持し、神経細胞やグリア細胞への分化を促進する活性を有すると考えられる。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

HONJO Tasuku

<120> Stem cell Derived-Neuron Survival Factor of the Human and Mammal

<130> ONF-4356PCT

<150> JP2001-325189

10

<151> 2001-10-23

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Rattus rattus

20

<400> 1

gcgtcagggg gacgcagctg gcaaggttca tccacaagtg cttecgact gcgtcagga 60
 ttatcagggt actggaagca tggcatcct gcagctgctc agaggtcct tctgtgtgt 120
 tctgctctgg gccttttgtg ttcttggtgc cagggccag gagcatggg ctggtgtcca 180
 ccatggcagc gtggcctgg acaagagcac agtgcacgac caagagcaca ttatggaaca 240
 tctggaaggt gtcataacc agccagaggc ggagatgtcc ccacaggaac tacagctcca 300
 ttatttcaaa atgcatgatt acgatggcaa cagtttgctt gatggettag agctctcgac 360
 ggccatcact cacgtgcaca aggaggagg gagtgagcag gtcccaccca tgagcagga 420
 cgagctcacc agcatcatag acggtgtcct gagagacgac gacaagaaca atgacggcta 480
 catcgactat gcagagtttg ccaagtcgct gcagtaggcg gcaggccctt tctgtatgc 540
 acacgtgacc cttgctaata tgatggacat tctggtaata agaagcagct ttttctgtc 600
 tactgctgca gccttgtaa agcctgtggc agtctgttag actgggtag gaggaagcca 660
 caaggaatac ggagagaagt ggggcagtgt caatgtgtgt ttaaacctgt tggacaagag 720
 ctgaaacctt cgaaggggtg gtgggtatc tcaagctccc gggaacctga ctctagatgc 780
 cactctaact tcttgatgtt atttcatgct acctgaaaag taaagacagt ctgctttgcc 840
 aagtggagac ttcagtgacg gtggaggag agccaaaagc cgcgtatctt cccagttggg 900
 tctgctctg ggcagatgtg gtcagtatgc tgttccccag gcatacagca tcaogtcta 960

30

40

aagccacagc aggagaagaa tgtcaccac ggagtcacc agacacagag tgaagactcc 1020
ttaccactg gcatTTTgga agcgaagcac cactggcctg aatacttagc cttttcagat 1080
cttcagtTtc cttcacaact actgccacac cctgtgctct gtcatttcag cccgagagaa 1140
acettgaatt gggTgtgctc tccgctcacc accaccgtt tgagctccct gaccttTgt 1200
tttatccttg ctcccagggc tcccttcttg gcttatgaac tattaacttg gtatcgcagg 1260
tttaaactgt cagctgctct agcctaagtc agaccagaaa agatcagtca ttaagggtg 1320
tggttaacct tatccaagtt ttgaaggaat gtttttaaaa ttacctcttT gagcctgaat 1380
atgataattc ttttaatttc aggaagaac agaaaaggaa gagcagtagt agctgaaaga 1440
gaaacagcca tagtgctac tttgcgtTgt gaaacgtcat agacttactg taaacgaate 1500
cagaatgatg gtgggatcag aaaaagaaac tgaatcaaat ttgctttacg atgtatagag 1560
acttattTtc tttattaag tattcttTga agaaaactta cgtattTgta aaacagTttt 1620
ctgtgtcaag tattTgtgca atcggagctg actTgtaaac tattcttTga agatctcatt 1680
atTTTgaaag atttatataa tgaactctga ctatctgaca ataaaatgga tgaaaaagta 1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1771

10

20

<210> 2

<211> 435

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 2

atggcatccc tgcagctgct cagaggtccc ttctgtgtg ttctgctctg ggcctttTgt 60
gttctctggTg ccagggccca ggagcatggg gctggtgtcc accatggcag cgtgggctg 120
gacaagagca cagtgcacga ccaagagcac attatggaac atctggaagg tgtcatcaac 180
cagccagagg cggagatgtc cccacaggaa ctacagctcc attattTcaa aatgcatgat 240
tacgatggca acagttTgct tgatggetta gagetctcga cggccatcac tcacgtgca 300
aaggaggagg ggagtgagca ggtcccacce atgagcgagg acgagctcat cagcatcata 360
gacggTgtcc tgagagacga cgacaagaac aatgacggct acatcgacta tgcagagTtt 420
gccaagtcgc tgcag 435

30

40

<210> 3

<211> 1771

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(514)

<220>

<221> mat_peptide

10

<222> (158)..(514)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (80)..(157)

<400> 3

gcgtcagggg gacgcagctg gcaaggttca tccacaagtg cttcgcgact gcgtcagggg 60

ttatcagggt actggaagc atg gca tcc ctg cag etg etc aga ggt ccc ttc 112

20

Met Ala Ser Leu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Phe

-25

-20

ctg tgt gtt ctg etc tgg gcc ttt tgt gtt cct ggt gcc agg gcc cag 160

Leu Cys Val Leu Leu Trp Ala Phe Cys Val Pro Gly Ala Arg Ala Gln

-15 -10 -5 -1 1

gag cat ggg gct ggt gtc cac cat ggc agc gtg ggc ctg gac aag agc 208

Glu His Gly Ala Gly Val His His Gly Ser Val Gly Leu Asp Lys Ser

30

5

10

15

aca gtg cac gac caa gag cac att atg gaa cat ctg gaa ggt gtc atc 256

Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile

20

25

30

aac cag cca gag geg gag atg tcc cca cag gaa cta cag etc cat tat 304

Asn Gln Pro Glu Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr

35

40

45

40

ttc aaa atg cat gat tac gat ggc aac agt ttg ctt gat ggc tta gag 352

Phe Lys Met His Asp Tyr Asp Gly Asn Ser Leu Leu Asp Gly Leu Glu

50

55

60

65

tgaaagattt atataatgaa ctctgactat ctgacaataa aatggatgaa aaagtaaaaa 1744
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1771

<210> 4

<211> 145

<212> PRT

<213> Rattus rattus

10

<400> 4

Met Ala Ser Leu Gln Leu Leu Arg Gly Pro Phe Leu Cys Val Leu Leu

-25 -20 -15

Trp Ala Phe Cys Val Pro Gly Ala Arg Ala Gln Glu His Gly Ala Gly

-10 -5 -1 1 5

Val His His Gly Ser Val Gly Leu Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln

10 15 20

20

Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asn Gln Pro Glu Ala

25 30 35

Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His Asp

40 45 50

Tyr Asp Gly Asn Ser Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Thr Ala Ile

55 60 65 70

Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Val Pro Pro Met Ser

75 80 85

30

Glu Asp Glu Leu Ile Ser Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp Asp

90 95 100

Lys Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu

105 110 115

Gln

40

<210> 5

<211> 823

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tggtgaggcc cgaggcgttg gagggttcg cgtctgcttc ggagaccgta aggatattga 60
 tgaccatgag atccctgctc agaaccccct tcctgtgttg cctgctctgg gccttttgtg 120
 ccccaggcgc cagggctgag gagcctgcag ccagcttctc ccaacccggc agcatgggcc 180
 tggataagaa cacagtgcac gaccaagagc atatcatgga gcatctagaa ggtgtcatca 240
 acaaaccaga ggcggagatg tcgccacaag aattgcagct ccattacttc aaaatgcatg 300
 attatgatgg caataatttg cttgatggct tagaactctc cacagccate actcatgtcc 360
 ataaggagga agggagtga caggcaccac taatgagtga agatgaactg attaacataa 420
 tagatggtgt tttgagagat gatgacaaga acaatgatgg atacattgac tatgctgaat 480
 ttgcaaaatc actgcagtag atgttatttg gccatctcct ggttatatac aaatgtgacc 540
 cgtgataatg tgattgaaca ctttagtaat gcaaaataac tcatttccaa ctactgctgc 600
 agcatttttg taaaaacctg tagcgattcg ttacactggg gtgagaagag ataagagaaa 660
 tgaaagagaa gagaaatggg acatetaata gtccctaagt gctattaaat acctatttg 720
 acaaggaaaa acaacaaaaa aaaatattag tctgtattaa tgctgctgat aaagacgtac 780
 ccaagactgg gaagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 823

10

20

<210> 6

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atgaccatga gatecctgct cagaaccccc ttctgtgtg gcctgctctg ggccttttgt 60
 gcccaggcgc ccagggctga ggagcctgca gccagcttct cccaacccgg cagcatgggc 120
 ctggataaga acacagtgca cgaccaagag cataatcatgg agcatctaga aggtgtcacc 180
 aacaaaccag aggcggagat gtcgccacaa gaattgcage tccattactt caaaatgcat 240
 gattatgatg gcaataattt gcttgatggc ttagaactct ccacagccat cactcatgtc 300
 cataaggagg aaggagatga acaggacca ctaatgagtg aagatgaact gattaacata 360
 atagatggtg ttttgagaga tgatgacaag acaatgatg gatacattga ctatgctgaa 420
 ttgcaaaat cactgcag 438

30

40

```

<210> 7
<211> 823
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (60)..(497) . 10
<220>
<221> sig_peptide
<222> (60)..(137)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (138)..(497)
<400> 7 20
tggtgaggcc cgaggcgttg gagggettgc cgtctgcttc ggagaccgta aggatattg 59
atg acc atg aga tcc ctg ctc aga acc ccc ttc ctg tgt ggc ctg ctc 107
Met Thr Met Arg Ser Leu Leu Arg Thr Pro Phe Leu Cys Gly Leu Leu
-25 -20 -15
tgg gcc ttt tgt gcc cca ggc gcc agg gct gag gag cct gca gcc agc 155
Trp Ala Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ser
-10 -5 -1 1 5
ttc tcc caa ccc ggc agc atg ggc ctg gat aag aac aca gtg cac gac 203
Phe Ser Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Asp Lys Asn Thr Val His Asp
10 15 20
caa gag cat atc atg gag cat cta gaa ggt gtc atc aac aaa cca gag 251
Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asn Lys Pro Glu
25 30 35
gcg gag atg tcg cca caa gaa ttg cag ctc cat tac ttc aaa atg cat 299
Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His
40 45 50

```

gat tat gat ggc aat aat ttg ctt gat ggc tta gaa ctc tcc aca gcc 347

Asp Tyr Asp Gly Asn Asn Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Thr Ala

55 60 65 70

atc act cat gtc cat aag gag gaa ggg agt gaa cag gca cca cta atg 395

Ile Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Leu Met

75 80 85

agt gaa gat gaa ctg att aac ata ata gat ggt gtt ttg aga gat gat 443

Ser Glu Asp Glu Leu Ile Asn Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp

90 95 100

gac aag aac aat gat gga tac att gac tat gct gaa ttt gca aaa tca 491

Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser

105 110 115

ctg cag tagatgttat ttggccatct cctggttata tacaaatgtg acccgtgata 547

Leu Gln

120

atgtgattga acactttagt aatgcaaaat aactcatttc caactactgc tgcagcattt 607

tggtaaaaac ctgtagegat tcgttacact ggggtgagaa gagataagag aatgaaaga 667

gaagagaaat gggacatcta atagtcecta agtgctatta aataccttat tggacaagga 727

aaaacaacaa aaaaaaatat tagtctgtat taatgctgct gataaagaag tacccaagac 787

tgggaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 823

<210> 8

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Thr Met Arg Ser Leu Leu Arg Thr Pro Phe Leu Cys Gly Leu Leu

-25 -20 -15

Trp Ala Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ser

-10 -5 -1 1 5

Phe Ser Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Asp Lys Asn Thr Val His Asp

10

20

30

40

gaaacaactt atttccgtct actgctcage actttggtaa gagcctgtgg cagtctgtaa 660
 gagggggtg aggaagaagc cacatgactg tggagagaag tgggacaggc ctcagtcct 720
 agagggtgtg ttaagcttgt tgggcaagag cgggatgagg atcttcggaa gggcgggtgg 780
 tateccgagt tetcaggaat ccgactgtag aatgccacte tgacttcttg atgttaatec 840
 atgctaccta aagtaaagac aggctgcttg gccaaagtga cacacttgag aaacagtgga 900
 gggagagtgt gaaagccaca cgcttgcctt ggttggtcct gtcttttaggc agatgtggtc 960
 agtattctgt tcccaggca tacagatca tatattaaag ccacagcaga agaggaatgt 1020 10
 cgcccactga ggccaccag atgcagagtc taggattcct tgcccactgg ctttttgaa 1080
 atgaagcacc actggcctga ataattagca ttttcagat cttcagtatc ttccacaact 1140
 actgccatac cctgtgttgt atcatttgac caggaggaa acctgaatt ggggtgtgtt 1200
 ctctaateac ttccactgt ctgagcttcc ctgaccctg tattgtatcc ttgctcccag 1260
 ggctcccttc atggcttgtg aactgttaac ttggtatctc aggttaaact gtcagctggt 1320
 ctagcctgag cgaggcctga gaccatcagt cactaagagc agtggctaac ctcategaag 1380
 ttggaaggaa tgtttttaa attacctctt cgagcctgaa tacaagaat aaaagaataa 1440 20
 aagaattctt ttaatttcag ggaagatcag aaaagaaagc ctaaagccct ttagcgttgt 1500
 gaacctcagt agtagctgaa agagaagctg ccacagggtg tacttgcctc gtgagatgtt 1560
 gtagacattc cgtaagagaa tccagaatga tagcaggatc aggaaagaaa tggagccaaa 1620
 tctgctctaa ggtgaataga gacttatttt tctttattaa agtattcttg taagacagtt 1680
 ttctgtgtca agtatttgg aaatcagagc tgacatgtaa gctattcttg taatatctca 1740
 ttattttgaa agatttatat aatgaactct ggctatctga caataaaatg gatgaaaaag 1800
 caaaaaaaaa aaaaa 1815 30

<210> 10

<211> 435

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

atggcaacc tacagctgct cagagctccc ttgctgtgtg tectgctttg ggtcttttgt 60 40
 gctccagggt ccagagccca tgaccatggg gctgatgtcc atcatggcag cgtgggcctg 120
 gataagagca cagtgcacga ccaagagcac atcatggaac atctggaagg tgcategac 180
 cagccagagg cggagatgtc cccacaggaa ctgcagctcc attacttcaa aatgcatgat 240

taagacggca acagtttget tgacggccta gagctotcca tagccatcac tcacgtgca 300
aaggaggagg ggagtgagca ggcgccagtc atgagcgagg atgagctcgt cagcatcata 360
gatggtgtcc tgagggacga tgacaagaac aatgacggct acatcgacta cgctgagttt 420
gcaaagtcac tgcag 435

<210> 11

<211> 1815

10

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(532)

<220>

<221> sig_peptide

20

<222> (98)..(175)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (176)..(532)

<400> 11

gtgcggagaa aagcgtccca gggacggcag ctggcaaggt tcacgttggg gtgcttcgag 60

actgcgtcgg ggattatcgg ggtaccacc cggaaagc atg gca acc cta cag ctg 115

30

Met Ala Thr Leu Gln Leu

-25

ctc aga gct ccc ttg ctg tgt gtc ctg ctt tgg gtc ttt tgt gct cca 163

Leu Arg Ala Pro Leu Leu Cys Val Leu Leu Trp Val Phe Cys Ala Pro

-20 -15 -10 -5

ggt gcc aga gcc cat gac cat ggg gct gat gtc cat cat ggc agc gtg 211

Gly Ala Arg Ala His Asp His Gly Ala Asp Val His His Gly Ser Val

40

-1 1 5 10

ggc ctg gat aag agc aca gtg cac gac caa gag cac atc atg gaa cat 259

Gly Leu Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln Glu His Ile Met Glu His

15	20	25	
ctg gaa ggt gtc atc gac cag cca gag gcg gag atg tcc cca cag gaa	307		
Leu Glu Gly Val Ile Asp Gln Pro Glu Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu			
30	35	40	
ctg cag ctc cat tac ttc aaa atg cat gat tac gac ggc aac agt ttg	355		
Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His Asp Tyr Asp Gly Asn Ser Leu			
45	50	55	60
ctt gac ggc cta gag ctc tcc ata gcc atc act cac gtg cac aag gag	403		10
Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Ile Ala Ile Thr His Val His Lys Glu			
65	70	75	
gag ggg agt gag cag gcg cca gtc atg agc gag gat gag ctc gtc agc	451		
Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Val Met Ser Glu Asp Glu Leu Val Ser			
80	85	90	
atc ata gat ggt gtc ctg agg gac gat gac aag aac aat gac ggc tac	499		20
Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr			
95	100	105	
atc gac tac gct gag ttt gca aag tca ctg cag tagaccgttg gctctttcct	552		
Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser Leu Gln			
110	115		
ttgtgcacat gtgaccettg ctaatgtgat ggacgtgtct ggtaatgcga aacaacttat	612		
ttcogtctac tgctcagcac tttggtaaga gcctgtggca gtctgtaaga gtggggtgag	672		30
gaagaagcca catgactgtg gagagaagtg ggacaggcct cagtcctag aggtgtgttt	732		
aagcttgttg ggcaagagcc ggatgoggat cttcggaagg gcggtgggta tcccgagtc	792		
tcaggaatcc gactgtagaa tgccactetg acttettgat gttaatccat gctacctaaa	852		
gtaaagacag gctgcttggc caagtggaca cacttgagaa acagtggagg gagagtgtga	912		
aagccacacg cttgccctgg ttggtcctgt ctttaggcag atgtggtcag tattctgttc	972		
cccaggcata cagcatcata tattaaagcc acagcagaag aggaatgtcg cccactgagg	1032		
ccaccagat gcagagteta ggattcettg cccactggcc ttttgaaat gaagcaccac	1092		40
tgccctgaat aattagcatt ttccagatct tcagtatctt ccacaactac tgccatacce	1152		
tgtgttztat catttgacca ggagggaaac cttgaattgg ggtgtgttct ctaatcaatt	1212		
tccactgtct gagctttcct gaccctgta ttgtatcctt gotcccaggg ctcccttcat	1272		

ggcttgtaa ctgttaactt ggtatctcag gttaaactgt cagctggtct agcctgagcg 1332
 agcctgaga ccatcagtea ctaagagcag tggctaacct categaagt ggaaggaatg 1392
 tttttaaat tacctcttcg agcctgaata caaagaataa aagaataaaa gaattctttt 1452
 aatttcaggg aagatcagaa aagaaagcct aaagcccttt agcgttgatga acctcagtag 1512
 tagctgaaag agaagctgcc acaggttgta cttgctctgt gagatggtgt agacattccg 1572
 taagagaatc cagaatgata gcaggatcag gaaagaaatg gagccaaate tgctctaagg 1632
 tgaatagaga cttatcttctc tttattaaag tattcttgta agacagtttt ctgtgtcaag 1692
 tatttgtaa atcagagctg acatgtaagc tattcttgta atatctcatt attttgaag 1752
 atttatataa tgaactctgg ctatctgaca ataaaatgga tgaaaaagca aaaaaaaaaa 1812
 aaa 1815

10

<210> 12

<211> 145

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Ala Thr Leu Gln Leu Leu Arg Ala Pro Leu Leu Cys Val Leu Leu
 -25 -20 -15

Trp Val Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala His Asp His Gly Ala Asp
 -10 -5 -1 1 5

Val His His Gly Ser Val Gly Leu Asp Lys Ser Thr Val His Asp Gln
 10 15 20

30

Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asp Gln Pro Glu Ala
 25 30 35

Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His Asp
 40 45 50

Tyr Asp Gly Asn Ser Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Ile Ala Ile
 55 60 65 70

40

Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Val Met Ser
 75 80 85

Glu Asp Glu Leu Val Ser Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp Asp

	90	95	100												
Lys	Asn	Asn	Asp	Gly	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Glu	Phe	Ala	Lys	Ser	Leu
	105		110				115								

Gln

<210> 13

<211> 38

10

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> n=a, t, c or g

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n=a, t, c or g

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> n=a, t, c or g

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> n=a, t, c or g

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> n=a, t, c or g

<400> 13

tcccgattga attctagacc tgcctcgagn nnnnnnnn

38

10

20

【図面の簡単な説明】

第1図 (A) はヒト、マウスおよびラットSDNSFのアミノ酸配列の相同性アライメントを示し、(B) はシグナルペプチドの下流に2つのEFハンドモチーフ (カルシウム結合モチーフ) を有することを示す。

第2図は、SDNSFのEFハンドモチーフがカルシウム分泌蛋白であるカルモデュリン (calmodulin) のEFハンドモチーフと共通の配列を有していることを示す。

第3図は、培養上清中にSDNSF合成蛋白が分泌されていることを抗SDNSF抗体および抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロット (Western Blot) 法により確認した様子を示す。

第4図は、ゲル精製を行った、³²PラベルcDNAフラグメントをプローブとして、検出を行った様子を示す。

第5図は、神経初代培養細胞 (Primary neuron)、神経膠星状細胞 (astrocyte)、神経幹細胞 (胎児神経幹細胞 (embryo NSC)、未分化成人神経幹細胞 (adult NSC undiff)、分化成人神経幹細胞 (adult NSC diff))、ラットグリオーマ細胞C6、マウス神経芽細胞N18、ヒト神経膠芽種細胞UG251でのSDNSF mRNAの発現を示す。

第6図は、初代神経膠星状細胞 (primary astrocyte)、神経初代培養細胞 (Primary neuron)、成人神経幹細胞 (adult NSC)、マウス神経芽細胞N18、ヒト神経膠芽種細胞UG251でのSDNSFタンパク質の発現を示す。

第7図 (A) (B) は、神経初代細胞 (hippocampal neuron) および神経幹細胞 (neuron stem cells) におけるSDNSF添加による細胞生存活性に対する効果を示す。

第8図は、SDNSFの添加が、濃度依存的に神経初代細胞の生存活性に有効であることを示す (*は、SDNSF非添加群に対する統計的有意差 (P<0.01) を示す。)

第9図は、FGF-2非存在下で培養した神経幹細胞の生存活性に対するSDNSFの効

50

果を示す (*は、無添加群 (C t r l) に対する統計的有意差 (P < 0. 0 1) を示す。)

第 1 0 図は、F G F - 2 非存在下で培養した神経幹細胞のニューロスフェア (神経細胞塊) を計数することによる神経幹細胞の自己再生能に対する S D N S F の効果を示す (*は、無添加群 (C t r l) に対する統計的有意差 (P < 0. 0 1) を示す。)

第 1 1 図は、F G F - 2 非存在下で培養した神経幹細胞のニューロスフェア (神経細胞塊) の神経細胞への分化能に対する S D N S F の効果を示す (*は、S D N S F 添加群、F G F - 2 添加群および無添加群 (C t r l) 間それぞれの統計的有意差 (P < 0. 0 1) を示す。)

【図 1】

第 1 図

(A)

rSDNSF	1	SAAGLEKLPKPKVLEWAEV	PCARAOE	-----	HOA	31
mSDNSF	1	SAALQLRAHLLEWLEWYVGA	PCARAHQ	-----	HOA	31
hSDNSF	1	SAIRSLKRTPLKGLKAFKA	PCARAE	-----	PAE	31
NP_505967	1	SAANTVVS	ELLEGSAHQPPQK	ASNOQSPQGGQAEK		40
CG12817	1	SAAGSMALNPLI	LASPSQNF	-----	DATL	31
rSDNSF	32	GVVH-SVYGLK-TLKEKHSERLEGT	INQ	FEAAMSFOELQ		72
mSDNSF	32	DVYH-SVYD-DNSTVHEKCHMGR	EEY	IDEAAMSFOELQ		72
hSDNSF	32	SFSQPLKPLKLNITVHEKCHMGR	EEY	IDEAAMSFOELQ		73
NP_505967	41	QHAQPLQQQFCGEQARDEH	IRREHEDKYD	-----	PTANMTRDQL	81
CG12817	32	JHPRGETRRVQHL	TRSEHKIDDIKIMGV	ANLDDLSEEEK	I	74
EP head 1						
rSDNSF	73	LQYFKMDATKNSLEDDHET	STAIHYHSE	-----		104
mSDNSF	73	LQYFKMDATKNSLEDDHET	STAIHYHSE	-----		104
hSDNSF	74	LQYFKMDATKNSLEDDHET	STAIHYHSE	-----		105
NP_505967	82	PPYFMDLIDKNGKIDGVE	IKALITHLAENP	PGHYQNNANA		124
CG12817	75	PYMKALHFNANALDGG	EMIQSAMHENVYDIPK	-----	N	108
EP head 2						
rSDNSF	103	SEK	-----	AVRSEDE	LSRTPLRDDIANDVYTRAEK	141
mSDNSF	103	SEK	-----	AVRSEDE	LSRDDGADCYDYAEK	141
hSDNSF	104	SEK	-----	AVRSEDE	LSRDDGADCYDYAEK	142
NP_505967	125	NHG	-----	PPHLEVEE	LETMTKSIKDDPNAKFTDYAEEL	162
CG12817	109	NERDAYL	-----	GNATDLEHFMALDKFL	LIAHNNKLLIDPEV	150
rSDNSF	142	KSLO	-----			145
mSDNSF	142	KSLO	-----			145
hSDNSF	143	KSLO	-----			146
NP_505967	163	SAQKLREDQARSHQEQMKAGGTQ				186
CG12817	151	SAITGKKEQFVDRNILLR				168

(B)



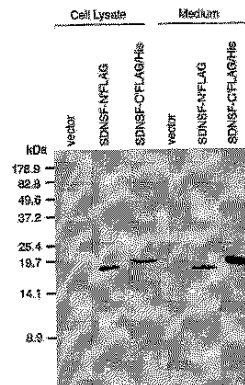
【図 2】

第 2 図

		HELIX	LOOP	HELIX	
rSDNSF	1	LQYFKMDATKNSLEDDHET	STAIHYHSE		
rSDNSF	2	IIDGVLRDDKNDGYSVA	FAKSLQ*		
calmodulin 1		EPKEAFALFKIKDGT	TKSLGTVHRS		
calmodulin 2		ELQDMINEVADGDT	FFRFLSLMARK		
calmodulin 3		ELIEAKVFRDREL	AAELRHWNTL		
calmodulin 4		EVDENREAHIKDGNHVE	EPYRHWAK		
consensus EF		XXXXXXXXXX			

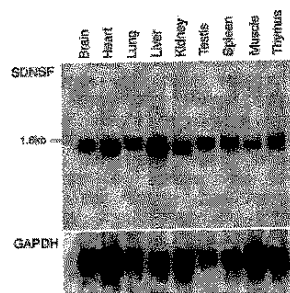
【図 3】

第 3 図



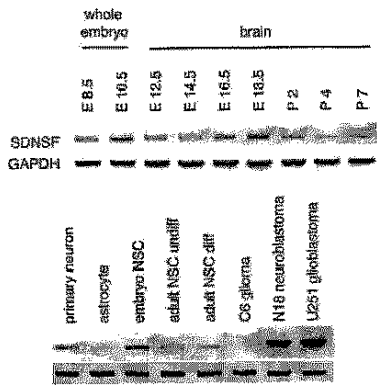
【図 4】

第 4 図



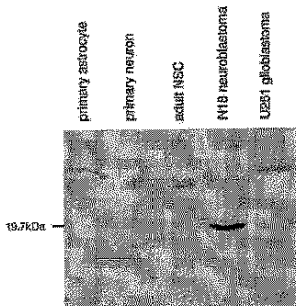
【図 5】

第 5 図



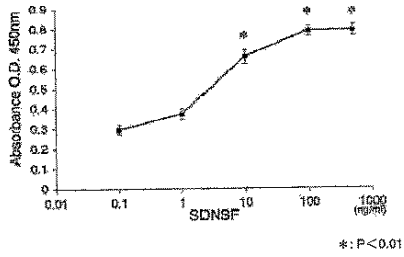
【図 6】

第 6 図



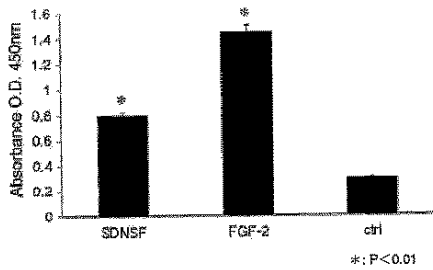
【図 8】

第 8 図



【図 9】

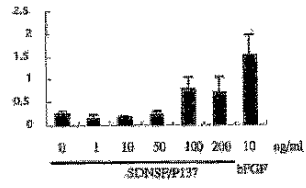
第 9 図



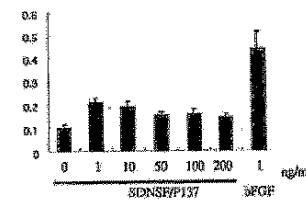
【図 7】

第 7 図

(A) 神経初代細胞

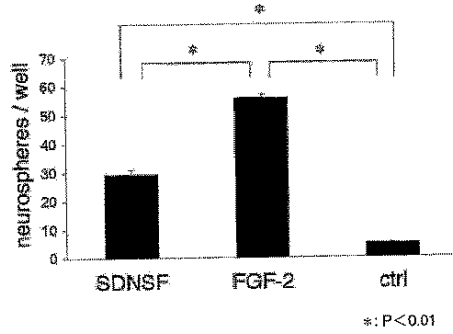


(B) 神経幹細胞



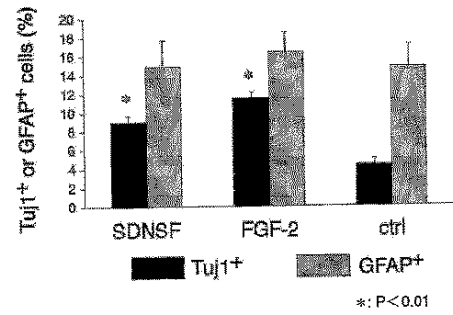
【図 10】

第 10 図



【図 11】

第 11 図



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/10936
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/09, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P23/00, A61P35/00, G01N35/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/09, C12Q1/68, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P23/00, A61P35/00, G01N35/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/18204 A2 (Protegene Inc.), 15 April, 1999 (15.04.99), & EP 1040188 A2 & JP 2001-519155 A Sequence No. 3	1-21
X	WO 01/21658 A1 (Human Genome Sciences), 29 March, 2001 (29.03.01), & EP 1218408 A1 & US 2002/0968319 A1 Sequence No. 94	1-9, 12-14, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "P" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 December, 2002 (03.12.02)		Date of mailing of the international search report 17 December, 2002 (17.12.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer:
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JPO2/10936
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, C12Q1/68, A61K39/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P25/00, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	WO 99/18204 A2 (Protegene Inc) 1999.04.15 & EP 1040188 A2 & JP 2001-519155 A 配列番号 3	1-21	
X	WO 01/21658 A1 (Human Genome Sciences) 2001.03.29 & EP 1218408 A1 & US 2002/0068319 A1 配列番号 9 4	1-9, 12-14, 17	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に基拠する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 03.12.02		国際調査報告の発送日 17.12.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照 電話番号 03-35581-1101 内線 3448	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
C 0 7 K 16/24	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/577	A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 戸田 弘紀

アメリカ合衆国、94301-1518、カリフォルニア州、バロアルト、エベレット通#313
、535号

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】 第1部門第1区分
 【発行日】 平成18年1月5日(2006.1.5)

【国際公開番号】 WO2003/035872
 【年通号数】 公開・登録公報2005-006
 【出願番号】 特願2003-538372(P2003-538372)
 【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/52	(2006.01)
C 0 7 K	16/24	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/577	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/00	1 0 1
C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K	16/24	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/577	B
C 1 2 N	5/00	A
A 6 1 K	37/02	
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】
 【提出日】 平成17年6月13日(2005.6.13)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】 明細書
 【補正対象項目名】 特許請求の範囲
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に純粋な形である配列番号4または12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはそれらの100個以上の連続したアミノ酸領域で90%以上相同性を有するポリペプチド。

【請求項2】 配列番号4または12で示されるアミノ酸配列からなる請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号8で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項4】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドをコードするcDNA。

【請求項5】 配列番号1、2、9または10で示される塩基配列を有する請求項3記載のcDNA、またはそれらの100個以上の連続した塩基配列領域で95%以上相同性を有するcDNA。

【請求項6】 配列番号5または6で示される塩基配列を有するcDNA。

【請求項7】 請求項4乃至6のいずれかの項記載のcDNAからなる複製または発現ベクター。

【請求項8】 請求項7記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項9】 請求項1または2記載のポリペプチドを発現させるための条件下で請求項8記載の宿主細胞を培養することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法。

【請求項10】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体。

【請求項11】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドまたは請求項10記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

【請求項12】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドまたは請求項10記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および/または担体を含有することを特徴とする神経変性が係わる疾患の治療に有効な薬学的組成物。

【請求項13】 神経変性が係わる疾患が中枢神経の損傷である請求項12記載の薬学的組成物。

【請求項14】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドの測定方法。

【請求項15】 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドの免疫化学的測定方法。

【請求項16】 請求項14または15記載の方法を用いることを特徴とする請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドを検出する試薬。

【請求項17】 請求項14または15記載の方法を用いることを特徴とする腫瘍を検査する試薬。

【請求項18】 腫瘍が脳腫瘍である請求項16記載の試薬。

【請求項19】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドを用いることを特徴とする該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項20】 請求項1乃至3のいずれかの項記載のポリペプチドを有効成分とする中枢神経損傷治療剤。

【請求項21】 中枢神経損傷が、脳梗塞による中枢神経損傷、脳出血による中枢神経損傷、または脊髄損傷による中枢神経損傷である請求項20記載の中枢神経損傷治療剤。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2003035872A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003538372	申请日	2002-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	本庶 佑 小野药品工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	本庶 佑 小野制药有限公司		
[标]发明人	本庶佑 田代啓 高橋淳 戸田弘紀		
发明人	本庶 佑 田代 啓 高橋 淳 戸田 弘紀		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P25/00 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/505 A61P19/08 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N2500/00 G01N2500/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61P25/00.101 C07K14/52 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
代理人(译)	大家 邦久		
优先权	2001325189 2001-10-23 JP		
其他公开文献	JPWO2003035872A1		

摘要(译)

本发明是人，大鼠，小鼠的干细胞源性神经存活因子多肽 (SDNSF)，其制备方法，编码SDNSF的cDNA，包含该cDNA的载体，用该载体转化的宿主细胞，SDNSF的抗体。包含SDNSF或抗体的药物组合物，SDNSF的测定方法，SDNSF的测定试剂以及使用SDNSF的筛选方法。本发明的多肽对于神经细胞的存活有效，并且对于治疗由于脑梗塞，脑出血，脊髓损伤等引起的中枢神经损伤有效。