

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/007701

発行日 平成24年1月5日(2012.1.5)

(43) 国際公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2010-520730 (P2010-520730)	(71) 出願人	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/072743	(71) 出願人	591122956 三菱化学メディエンス株式会社 東京都港区芝浦四丁目2番8号
(22) 国際出願日	平成20年12月15日(2008.12.15)	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(31) 優先権主張番号	特願2008-187851 (P2008-187851)	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(32) 優先日	平成20年7月18日(2008.7.18)	(72) 発明者	工藤 明 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国 立大学法人東京工業大学内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	Fターム(参考)	2G045 AA40 CB01 DA36 FA11 FB01 FB03 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋壊死を伴う疾患の治療薬及び検査薬

(57) 【要約】

ペリオスチンバリエント(b e)ポリペプチド若しくはその改変体、又はそれをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬；ペリオスチンバリエント(b e)ポリペプチドをコードするDNA若しくはその部分断片、又はペリオスチンバリエント(b e)ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドを有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 2】

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

を有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 3】

前記医薬が心臓機能改善作用を有する、請求項 1 又は 2 に記載の医薬。

【請求項 4】

前記医薬が心臓再生促進作用を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 5】

治療に有効量のペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

【請求項 6】

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

からなる群から選んだ、治療に有効量のポリペプチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

【請求項 7】

前記方法が心臓機能改善作用を有する、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が心臓再生促進作用を有する、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドの使用。

【請求項 10】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記医薬が心臓機能改善作用を有する、請求項 9 又は 1 0 に記載の使用。

【請求項 1 2】

前記医薬が心臓再生促進作用を有する、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 3】

ペリオスチンバリエント (b e) をコードするポリヌクレオチドを含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 1 4】

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

10

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 6 0 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

20

【請求項 1 5】

前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の医薬。

【請求項 1 6】

前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 1 7】

治療に有効量のペリオスチンバリエント (b e) をコードするポリヌクレオチドを、治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

【請求項 1 8】

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

30

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 6 0 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

40

からなる群から選んだ、治療に有効量のポリヌクレオチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

【請求項 1 9】

前記方法が、心臓機能改善作用を有する、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記方法が、心臓再生促進作用を有する、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリエント (b e) をコードするポリヌクレオチドの使用。

50

【請求項 2 2】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペ

10

プチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

の使用。

【請求項 2 3】

前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 4】

前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 5】

20

[a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

【請求項 2 6】

ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

30

【請求項 2 7】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は c DNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

40

を用いて、前記検査検体由来 DNA 又は c DNA における、ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA の変異を検出する工程、及び

(3) 前記変異に基づいて、心筋壊死を伴う疾患のリスク、種類、程度、及び / 又は状態を判定する工程

を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

【請求項 2 8】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は c DNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若

50

しくはその部分断片であるDNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなるDNA、若しくはその部分断片であるDNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を用いて、前記検査検体由来DNA又はcDNAにおける、ペリオスチンバリエーション (b e) ポリペプチドをコードするDNAを特異的に増幅し、その発現量を分析する工程、及び

(3) 前記発現量に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の程度及び / 又は状態を判定する工程を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

10

【請求項 29】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検体を調製する工程、

(2) ペリオスチンバリエーション (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、前記検体中のペリオスチンバリエーション (b e) ポリペプチドの発現量及び / 又は構造変化を検出する工程、及び

(3) 前記発現量及び / 又は構造変化に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の危険性、原因、程度、及び / 又は状態を判定する工程を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

【請求項 30】

20

(i) 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞における前記ポリペプチドの発現量と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の前記ポリペプチドの発現量とを比較し、前記ポリペプチドの発現量を増大させる物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

【請求項 31】

(i) 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞の機能と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の細胞の機能とを比較し、細胞の機能を制御する活性を有する物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

30

【請求項 32】

前記細胞が、ペリオスチンをコードする遺伝子を欠如している細胞である、請求項 30 又は 31 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 33】

心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓機能改善作用を有する物質である、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓再生促進作用を有する物質である、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

40

請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法によって得られる化合物、又はその薬理的に許容される塩。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の化合物、又はその薬理的に許容される塩を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 37】

心臓機能改善作用を有する医薬である、請求項 36 に記載の心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 38】

修復心臓再生促進作用を有する医薬である、請求項 36 に記載の心筋壊死を伴う疾患の

50

治療又は予防のための医薬。

【請求項 39】

治療に有効量の請求項 35 に記載の化合物、又はその薬理的に許容される塩を治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

【請求項 40】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、請求項 35 に記載の化合物、又はその薬理的に許容される塩の使用。

【請求項 41】

ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の抗体を用いることを特徴とする、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質の免疫学的検出又は定量方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質、あるいは、該タンパク質をコードする遺伝子 (DNA 又は RNA) を含有する心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬及び検査薬に関する。また、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子 (DNA 及び RNA) を利用した心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬のスクリーニング方法、該スクリーニング方法により得られる医薬に関する

【背景技術】

【0002】

心筋梗塞は先進諸国において最も大きな問題となっている生活習慣病の一種である。心筋梗塞は、発症率及び致死率の高い疾患であり、日本において、急性心筋梗塞発症数は年間約 15 万人おり、そのうち約 3 割が死亡していると推定されている。心不全患者の回復率も依然として悪く、効果的な治療法の確立が求められている。更に、心筋梗塞を起こした組織がどのように修復されるのかについて、その詳細な機序は不明であった。

【0003】

ペリオスチンは、重力や荷重による刺激を受けると骨を再生する機構において、重要な役割を果たすと考えられているタンパク質である (非特許文献 1)。更に、ヒトペリオスチン抗体を使用して、ヒトの病理組織を網羅的に調べたところ、ヒトやマウスの心筋梗塞を起こした組織にもペリオスチンが作られていることがわかった (非特許文献 2)。

【0004】

非特許文献 1 において、ペリオスチンの C 末端側の欠如を有する数種類のバリエントが存在していることが報告された。また、ペリオスチンは骨芽細胞のリクルートメントと接着において重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、いずれのペリオスチンバリエントにおいても、機能との関係は考慮も示唆もされていない。

【0005】

特許文献 1 において、数種の正常組織において、ペリオスチンの C 末端側の欠如を有する数種類のバリエントが存在していることが報告された。また、骨転移を有する乳癌患者や子癪前症、多様な肺癌において、ペリオスチンの発現量が非常に高いことが報告された。しかし、いずれのペリオスチンバリエントにおいても、それらの癌における機能、あるいは、診断用途との関係は考慮も示唆もされていない。

【0006】

一方、非特許文献 3 において、ペリオスチン欠如マウスで心破裂が起きやすくなることが報告された。次いで、非特許文献 4 において、ラットの心筋細胞にペリオスチンタンパク質を反応させると、心筋細胞が増えることが報告された。このことから、ペリオスチンは、心臓において、重要な役割を果たしていることが予想されている。しかし、数種類存在していると考えられるペリオスチンバリエントの心臓における役割については指摘され

10

20

30

40

50

ていない。

【0007】

【特許文献1】特表2005-500059号公報

【非特許文献1】「ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ (Journal of bone and mineral research)」, (米国), 1999年, 第14巻, 第7号, p. 1239-1249

【非特許文献2】「アーカイブス・オブ・オーラル・バイオロジー (Archives of oral biology)」, (英国), 2005年, 第50巻, 第12号, p.1023-1031

【非特許文献3】「サーキュレーション・リサーチ (Circulation research)」, (米国), 2007年, 第101巻, 第3号, p. 313-321

【非特許文献4】「ネイチャー・メディシン (Nature medicine)」, (米国), 2007年, 第13巻, 第8号, p. 962-969

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

心筋梗塞後の、心破裂の防止及び/又は梗塞部位の修復を促進することができれば、心筋梗塞からの改善や回復を早めることができ、死亡率を低下させることへと繋がる。こうした活性を有する分子の特定とそれを利用した心臓機能を改善する薬剤及び検査薬の開発が望まれている。これは、梗塞部位で起こっているような心筋壊死を伴う心筋炎や心筋症(例えば拡張型心筋症)にとっても有効であると考えられる。

即ち、本発明は、心筋梗塞後の心破裂の防止及び/又は心筋壊死部位の修復を促進する物質を心筋梗塞、又は心筋壊死を伴う公知の疾患(心筋梗塞や心筋炎や心筋症など)の治療のための医薬及び検査薬として提供することを解決すべき課題とした。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究し、細胞外マトリックスタンパク質であるペリオスチンに着目し、その機構の一端を明らかにした。

まず、ペリオスチンの心臓での発現を調べてみると、ペリオスチンタンパク質は、マウスの発生過程においては心臓に発現しているが、成獣の心筋層ではその発現は消失していた。次に、マウスに対して左室下行冠動脈を結さつする心筋梗塞モデルを作製した。結さつ後3日後からペリオスチンタンパク質は心筋層と梗塞層の境界部位に発現が見られるようになり、7日目には心筋梗塞層内における発現が急激に増加した。ペリオスチンにはスプライシングバリエーションが多数報告されており、その検討を行ったところ、心筋梗塞急性期にはC末端を一部欠いた b e というアイソフォーム[以下、ペリオスチンバリエーション(b e)タンパク質と称する。また、別称として、ペリオスチンバリエーション(b e)ポリペプチド、ペリオスチンバリエーション(b e)、 b e の名称も併用することがある]が特異的に発現していることが明らかとなった。

30

【0010】

更に、ペリオスチンが心筋梗塞発症時に果たす役割を検討するため、ペリオスチン遺伝子欠損マウスを作製した。ペリオスチン遺伝子欠損マウスでは、少なくとも16週齢までには心臓の機能・形態に異常は見られなかったが、このマウスに急性心筋梗塞を誘導したところ、急性期における梗塞修復能力が低く、野生型マウス(31.3%)と比較して著しく心臓破裂を頻発した(68.1%)。更に、心筋層の剛性を調べてみると、生理的条件下では野生型と欠損マウスに差は見られないものの、心筋梗塞が起こった部位の剛性は欠損マウスにおいて顕著に減少していることがわかった。その一方で、慢性期においては心室拡張が抑制された。以上のことから、ペリオスチンの欠損は心臓の形態形成や心機能に関して生理的条件下では影響をあたえないものの、ペリオスチンが心筋梗塞後の梗塞修復及び心室リモデリングに対して重要な役割を果たしていることが示された。

40

【0011】

この原因を調べたところ、ペリオスチン欠損マウスの心筋梗塞部位では、細胞外基質タンパク質であるI型コラーゲンやフィブロネクチンの沈着が減少し、コラーゲン細線維形

50

成も未熟であるだけでなく、細胞外基質の産生源であるビメンチン / S M A (smooth muscle actin) 陽性の心臓線維芽細胞数自体も減少していた。更に、ペリオスチン欠損マウスの心筋梗塞部位のこうした現象が、ペリオスチンによって直接回復させることができるかどうかを確かめるため、梗塞部位に b e 遺伝子を導入したところ、梗塞部位での S M A 陽性の心臓線維芽細胞が増加して、心破裂の発症頻度を改善することができた。これらの結果より、ペリオスチンは梗塞部位への心臓線維芽細胞の細胞移動とコラーゲンの細線維形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

【 0 0 1 2 】

細胞移動には F A K (Focal Adhesion Kinase) のリン酸化が重要であるといわれていることから、本発明者らはペリオスチン欠損マウスの心筋梗塞部位でのリン酸化に注目した。すると、興味深いことに、梗塞時には、野生型に比べて F A K のリン酸化が大きく減少していることがわかった。より詳細にペリオスチンと F A K との関係を検討するため、培養条件下で b e を添加して検討を行った。その結果、添加時には F A K のリン酸化亢進が見られたが、 V インテグリンを阻害することで F A K のリン酸化、及びペリオスチンによって誘導される線維芽細胞の遊走も阻害された。こうした実験結果から、ペリオスチンが関係するシグナル伝達機構には V インテグリンや F A K が関っており、急性心筋梗塞の修復において、ペリオスチンによる線維芽細胞の梗塞部位への移動・活性化とコラーゲンの細線維形成が重要であることが明らかとなった。

以上の知見に述べたように、ペリオスチンバリエーション (b e) が梗塞部位の修復に特異的な活性を有していることを示すことを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の (1) ~ (4 2) を提供するものである。

【 0 0 1 3 】

(1) ペリオスチンバリエーション (b e) ポリペプチドを有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(2) [a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 6 0 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

を有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(3) 前記医薬が心臓機能改善作用を有する、(1) 又は (2) の医薬。

(4) 前記医薬が心臓再生促進作用を有する、(1) ~ (3) の医薬。

(5) 治療に有効量のペリオスチンバリエーション (b e) ポリペプチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

(6) [a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 6 0 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

からなる群から選んだ、治療に有効量のポリペプチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

(7) 前記方法が心臓機能改善作用を有する、(5) 又は (6) の方法。

(8) 前記方法が心臓再生促進作用を有する、(5) ~ (7) の方法。

(9) 心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドの使用。

(1 0) 心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドの使用。

(1 1) 前記医薬が心臓機能改善作用を有する、(9) 又は (1 0) の使用。

(1 2) 前記医薬が心臓再生促進作用を有する、(9) ~ (1 1) の使用。

(1 3) ペリオスチンバリアント (b e) をコードするポリヌクレオチドを含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(1 4) [a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(1 5) 前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、(1 3) 又は (1 4) の医薬。

(1 6) 前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、(1 3) ~ (1 5) の医薬。

(1 7) 治療に有効量のペリオスチンバリアント (b e) をコードするポリヌクレオチドを、治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

(1 8) [a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

からなる群から選んだ、治療に有効量のポリヌクレオチドを治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

(1 9) 前記方法が、心臓機能改善作用を有する、(1 7) 又は (1 8) の方法。

(2 0) 前記方法が、心臓再生促進作用を有する、(1 7) ~ (1 9) の方法。

(2 1) 心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリアント (b e) をコードするポリヌクレオチドの使用。

(2 2) 心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

10

20

30

40

50

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドの使用。

(2 3) 前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、(2 1) 又は (2 2) の使用。

(2 4) 前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、(2 1) ~ (2 3) の使用。

(2 5) [a] ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

(2 6) ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

(2 7) (1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は c DNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を用いて、前記検査検体由来 DNA 又は c DNA における、ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA の変異を検出する工程、及び

(3) 前記変異に基づいて、心筋壊死を伴う疾患のリスク、種類、程度、及び / 又は状態を判定する工程

を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

(2 8) (1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は c DNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を用いて、前記検査検体由来 DNA 又は c DNA における、ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA を特異的に増幅し、その発現量を分析する工程、及び

、及び

10

20

30

40

50

(3) 前記発現量に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の程度及び/又は状態を判定する工程を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

(29) (1) 検査対象より取得した生体試料から検体を調製する工程、
(2) ペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、前記検体中のペリオスチンパリアント (b e) ポリペプチドの発現量及び/又は構造変化を検出する工程、及び

(3) 前記発現量及び/又は構造変化に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の危険性、原因、程度、及び/又は状態を判定する工程を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

(30) (i) (1) 又は(2)に記載のポリペプチドを発現する細胞における前記ポリペプチドの発現量と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の前記ポリペプチドの発現量とを比較し、前記ポリペプチドの発現量を増大させる物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

(31) (i) (1) 又は(2)に記載のポリペプチドを発現する細胞の機能と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の細胞の機能とを比較し、細胞の機能を制御する活性を有する物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

(32) 前記細胞が、ペリオスチンをコードする遺伝子を欠如している細胞である、(30) 又は(31)のスクリーニング方法。

(33) 心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓機能改善作用を有する物質である、(30) ~ (32)の方法。

(34) 心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓再生促進作用を有する物質である、(30) ~ (32)の方法。

(35) (30) ~ (34)の方法によって得られる化合物、又はその薬理学的に許容される塩。

(36) (35)の化合物、又はその薬理学的に許容される塩を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(37) 心臓機能改善作用を有する医薬である、(36)の心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(38) 修復心臓再生促進作用を有する医薬である、(36)の心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

(39) 治療に有効量の(35)の化合物、又はその薬理学的に許容される塩を治療対象に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防方法。

(40) 心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、(35)の化合物、又はその薬理学的に許容される塩の使用。

(41) ペリオスチンパリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体。

(42) (41)の抗体を用いることを特徴とする、ペリオスチンパリアント (b e) タンパク質の免疫学的検出又は定量方法。

【0014】

本発明の更に別の側面によれば、治療に有効量の上記(1)又は(2)に記載のポリペプチドを、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療のための方法が提供される。

本発明の更に別の側面によれば、心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、上記ポリペプチドの使用が提供される。

【0015】

本発明の更に別の側面によれば、治療に有効量の上記(6)に記載のポリヌクレオチド(好ましくはDNA)を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、心筋壊死を伴う疾患の治療のための方法が提供される。

本発明の更に別の側面によれば、心筋壊死を伴う疾患の治療のための遺伝子治療剤の製

10

20

30

40

50

造における、上記ポリヌクレオチド（好ましくはDNA）の使用が提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、ペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質を有効成分として含有する心筋壊死を伴う疾患の治療剤、該タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する心筋壊死を伴う疾患の治療剤、該タンパク質又は該DNAを利用した心筋壊死を伴う疾患の治療剤のスクリーニング方法、該DNA又は該タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた心筋壊死を伴う疾患の検査薬及び検査方法及びモニタリング方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【0017】

【図1】ペリオスチンの全長構造と、C末端のCTドメインにおける各種スプライシングバリエーションの各構造を模式的に示すと共に、急性心筋梗塞後の各種バリエーションの発現量を示す説明図である。

【図2】ペリオスチンノックアウトマウスの作成のために、ペリオスチン遺伝子のエクソン1の欠失方法を説明する説明図である。

【図3】急性心筋梗塞を引き起こしたペリオスチンノックアウトマウス（ペリオスチン-/-）において、ペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質又は全長ペリオスチンの効果を示すグラフである。直線aは、Ad-nls LacZベクター（コントロール）を投与したマウスの結果を示し、直線bは、Ad-b eウイルスを投与したマウスの結果を示し、直線cは、Ad-Fullウイルスを投与したマウスの結果を示す。

20

【図4】ヒト・全長ペリオスチンのCTドメインの塩基配列（配列番号14）及びアミノ酸配列（配列番号15）を示すと共に、各領域a1～f2の位置を示す説明図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明の医薬に含有されるタンパク質としては、天然体であるペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質、又はそれらの改変体（modified proteins）を挙げることができる。ペリオスチンのC末端に位置するCTドメインは、図1（マウス・ペリオスチン）又は図4（ヒト・ペリオスチン）に示すように、領域a1（塩基番号1～69）、領域a2（塩基番号70～115）、領域b（塩基番号116～196）、領域c1（塩基番号197～286）、領域c2（塩基番号287～376）、領域d（塩基番号377～454）、領域e（塩基番号455～538）、領域f1（塩基番号539～579）、領域f2（塩基番号580～615）からなる。なお、各領域の後に示す括弧内の数値は、ヒト・ペリオスチンのCTドメインをコードする塩基配列（図4及び配列番号14）における塩基番号である。ペリオスチンのC末端におけるバリエーションとして、領域bがスプライシングにより除去されたペリオスチンバリエーション（b）タンパク質、領域eがスプライシングにより除去されたペリオスチンバリエーション（e）タンパク質、領域b及び領域eがスプライシングにより除去されたペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質等が知られている。

30

【0019】

ペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質、又はその改変体は、心筋壊死部位を修復する活性を有するタンパク質であれば、天然物由来のタンパク質でも、遺伝子工学的手法により製造されたタンパク質であってもよく、例えば、天然由来の該タンパク質としては、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ラット、マウスなどあらゆる哺乳動物由来のペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質を挙げることができる。なお、天然体のペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質は、N末端にシグナル配列を有する前駆体として翻訳されるが、本発明においては、前駆体、あるいは、シグナル配列が切断された成熟体のいずれも使用可能である。

40

【0020】

ペリオスチンバリエーション（b e）タンパク質の具体例としては、例えば、配列番号

50

2 (前駆体)又は配列番号3 (成熟体)で表されるヒト・ペリオスチンバリエーション (b e) タンパク質、配列番号5 (前駆体)又は配列番号6 (成熟体)で表されるマウス・ペリオスチンバリエーション (b e) タンパク質、配列番号8 (前駆体)又は配列番号9 (成熟体)で表されるラット・ペリオスチンバリエーション (b e) タンパク質を挙げる
ことができる。

【0021】

また、本発明の医薬に含有されるペリオスチンバリエーション (b e) タンパク質、又はそれらの改変体としては、例えば、

[a] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド (好ましくは、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド、より好ましくは、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド) ;

[b] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み (好ましくは、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり)、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド ; 又は

[c] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列との同一性が60%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド (好ましくは、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列との同一性が60%以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチド)

を挙げる
ことができる。

【0022】

配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドとしては、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列に様々なポリペプチド配列又はオリゴペプチド配列を付加した融合タンパク質を挙げる
ことができる。融合タンパク質の例としては、マルトース結合タンパク質、オリゴ・ヒスチジン、抗体ペプチドエピトープ、ヒト免疫グロブリン定常領域、プロテインA、シグナル配列などを結合した融合タンパク質を挙げる
ことができる。また、融合タンパク質は公知の手法により特異的に切断可能な配列を有することもできる。

【0023】

配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドを構成するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、

Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc.Natl.

Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

【0024】

欠失、置換、若しくは付加されるアミノ酸の数は1以上であり、上限は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換、及び/又は付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、更に好ましくは1~5個である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

本発明の医薬に含有されるタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、若しくは付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1又は複数のアミノ酸残基の欠失、置換、及び/又は付加があることを意味し、欠失、置換、及び/又は付加が同時に生じてもよく、置換若しくは付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどが挙げられる。

10

【 0 0 2 6 】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン。

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸。

C群：アスパラギン、グルタミン。

20

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸。

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン。

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン。

G群：フェニルアラニン、チロシン。

【 0 0 2 7 】

配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列との同一性が60%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドにおいては、配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有していることが好ましい。

30

【 0 0 2 8 】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin

and Altschulによるアルゴリズム B L A S T [Pro. Natl. Acad. Sci. USA,

90, 5873 (1993)] や F A S T A [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] を用いて決定す

ることができる。このアルゴリズム B L A S T に基づいて、B L A S T N や B L A S T X

とよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]。B L A S T

に基づいて B L A S T N によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば

Score = 100、wordlength = 12 とする。また、B L A S T に基づいて B L A S T X によって

アミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score = 50、wordlength = 3 とす

る。B L A S T と G a p p e d B L A S T プログラムを用いる場合には、各プログラムの

デフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (ht

tp://www.ncbi.nlm.nih.gov.)。

40

【 0 0 2 9 】

本発明の医薬に含有されるポリペプチドが、心破裂の防止及び/又は心筋壊死部位を修復する活性を有しているか否を確認する方法としては、以下の方法に限定されるものではないが、予めペリオスチン遺伝子をノックアウトしたペリオスチンノックアウト動物を使用すること以外は、公知の心筋梗塞モデルの手法を利用して確認することができる。例えば、後述の実施例に示すように、左室下行冠動脈の結紮 (LAD ligation; Michael, 1995

50

Am J Physiol

Heart Circ Physiol. 269:H2147-2154) により急性心筋梗塞を引き起こすことができる。上記活性の確認を行うポリペプチド(以下、評価対象ポリペプチドと称する)、あるいは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子を、ペリオスチンノックアウト動物に投与した後、上記手法により心筋梗塞を発症させ、梗塞部位(心筋壊死部分)の状態を目視により、あるいは、公知の各種指標に基づいて、観察・測定することにより、心筋壊死部位を修復する活性を有しているか否かを確認することができる。なお、評価対象ポリペプチド又はその遺伝子を投与する時期は、前記のように、心筋梗塞発症前に行うこともできるし、あるいは、心筋梗塞発症後(又は同時)に行うこともできる。

【0030】

梗塞部位の修復の具体的指標としては、ウイルスを用いた遺伝子移入、又はペリオスチンタンパク質の投与による心筋梗塞部の修復を、例えば、SMA(smooth muscle actin)陽性細胞数、コラーゲンの量とその架橋度合い、組織学的解析による組織修復の度合いに基づいて、あるいは、心筋梗塞後の生存率に基づいて、検討することができる。例えば、心筋梗塞後の生存率を指標とした場合、心筋梗塞から1週間経過後の生存率として40%以上(好ましくは50%以上)である場合に、心筋壊死部位を修復する活性を有していると判定することができる。

【0031】

本発明の医薬においては、ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質又はそれらの改変体に加えて、例えば、ペリオスチンバリエント(b)タンパク質、ペリオスチンバリエント(e)タンパク質、完全長ペリオスチン(Full)タンパク質を含有させることもできる。ペリオスチンバリエント(b)タンパク質、ペリオスチンバリエント(e)タンパク質、完全長ペリオスチン(Full)タンパク質は、心筋壊死部位を修復する活性を有するタンパク質であれば、天然物由来のタンパク質でも、遺伝子工学的手法により製造されたタンパク質であってもよく、例えば天然由来の該タンパク質としては、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ラット、マウスなどあらゆる哺乳動物由来のペリオスチンタンパク質及びペリオスチンバリエントタンパク質を挙げることができる。

【0032】

完全長ペリオスチン(Full)タンパク質の具体例としては、例えば、配列番号10(前駆体)又は配列番号11(成熟体)で表されるヒト・完全長ペリオスチン(Full)タンパク質、配列番号12(前駆体)又は配列番号13(成熟体)で表されるマウス・完全長ペリオスチン(Full)タンパク質を挙げることができる。

【0033】

以下、本発明で用いるポリペプチドの具体的態様として、ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質を用いる場合を例にとって本発明を更に説明するが、本発明はこれらの態様に限定されるものではなく、これまで説明した種々のポリペプチドを用いて実施することができる。

【0034】

1. ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質の取得方法

ペリオスチンバリエント(b e)のように、完全長cDNAが公知である場合、該完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製しても良いし、該完全長cDNAの配列情報を基に、例えばヒト胎盤あるいは肺由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ヒトペリオスチンバリエント(b e)をコードするcDNAを単離することができる。得られたcDNAが全長cDNAでない場合は、このクローンをプローブとしたcDNAライブラリーのスクリーニングや、RACE法[rapid amplification of cDNA ends; Frohman MA et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)]により全長のcDNAを取得することができる。

【0035】

得られたcDNAクローンの塩基配列をDNAシーケンサー等を用いて決定し、その

10

20

30

40

50

塩基配列について各フレームでアミノ酸配列に翻訳した後、公知のペリオスチンバリエーション (b e) のアミノ酸配列と比較することにより、取得された c D N A がペリオスチンバリエーション (b e) をコードする D N A であるかを確認することができる。取得されたペリオスチンバリエーション (b e) をコードする D N A を用いて、上記したように必要に応じて適当な長さの D N A 断片を調製する。

【 0 0 3 6 】

該 D N A 断片、あるいは完全長 c D N A を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該タンパク質の組換え発現ベクターを作製する。具体的には、例えば、配列番号 2 (ヒト配列)、配列番号 5 (マウス配列)、配列番号 8 (ラット配列) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする c D N A であって、配列番号 1 (ヒト配列)、配列番号 4 (マウス配列)、配列番号 7 (ラット配列) で表される塩基配列を含む完全長 c D N A が挿入された発現ベクターを作製する。

10

【 0 0 3 7 】

該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。宿主細胞としては、目的とする D N A を発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等に属する細菌、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

20

【 0 0 3 8 】

発現ベクターとしては、宿主細胞において自律複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、該 D N A を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【 0 0 3 9 】

細菌を宿主細胞として用いる場合は、該 D N A 組換え発現ベクターは該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、該ポリペプチドの D N A 及び転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。ベクターにはプロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

30

【 0 0 4 0 】

発現ベクターとしては、例えば、p B T r p 2、p B T a c 1、p B T a c 2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社製)、p K K 2 3 3 - 2 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、p S E 2 8 0 (Invitrogen 社製)、p G E M E X - 1 (Promega 社製)、p Q E - 8 (QIAGEN 社製)、p K Y P 1 0 [特開昭58-110600]、p K Y P 2 0 0 [Agricultural Biological

Chemistry, 48, 669 (1984)]、p L S A 1 [Agric. Biol.

Chem., 53, 277 (1989)]、p G E L 1 [Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、p Bluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、p G E X (Amersham

40

Pharmacia Biotech 社製)、p E T - 3 (Novagen 社製)、p T e r m 2 (USP4686191、US P4939094、USP5160735)、p S u p e x、p U B 1 1 0、p T P 5、p C 1 9 4、p E G 4 0 0 [J.

Bacteriol., 172, 2392 (1990)] 等を例示することができる。

【 0 0 4 1 】

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン - ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 1 8 塩基) に調節したものをを用いることが好ましい。

【 0 0 4 2 】

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例

50

例えば、*trp*プロモーター (*P_{trp}*)、*lac*プロモーター (*P_{lac}*)、*P_L*プロモーター、*P_R*プロモーター、*T7*プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、*SPO1*プロモーター、*SPO2*プロモーター、*penP*プロモーター等を挙げることができる。また *P_{trp}*を2つ直列させたプロモーター (*P_{trp}x2*)、*tac*プロモーター、*letI*プロモーター [Gene, 44, 29 (1986)]、*lacT7*プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0043】

ペリオスチンバリエント (*b e*) をコードする部分のDNAの塩基配列を、宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように置換することにより、目的とするポリペプチド又はタンパク質の生産率を向上させることができる。上記ポリペプチド又はタンパク質をコードするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

10

【0044】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュドモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium ammoniagenes*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110等を挙げることができる。

20

【0045】

組換え発現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [特開昭63-248394]、又はGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等を挙げることができる。

30

【0046】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、*YEp13* (ATCC37115)、*YEp24* (ATCC37051)、*YcP50* (ATCC37419)、*pHS19*、*pHS15*等を例示することができる。

【0047】

プロモーターとしては、酵母中で機能するものであればいかなるものでもよく、例えば、*PHO5*プロモーター、*PGK*プロモーター、*GAP*プロモーター、*ADH*プロモーター、*gal1*プロモーター、*gal10*プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、*MF1*プロモーター、*CUP1*プロモーター等を挙げることができる。

40

【0048】

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)等を挙げることができる。

【0049】

組換え発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. in Enzymol., 194, 1

50

82 (1990)、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)に記載の方法等を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A 1 . 1 (Invitrogen社製)、p C D M 8 (Invitrogen社製)、p A G E 1 0 7 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p A S 3 - 3 (特開平2-227075)、p c D N A 1 . 1 / A m p (Invitrogen社製)、p R E P 4 (Invitrogen社製)、p A G E 1 0 3 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p A G E 2 1 0等を例示することができる。

10

【 0 0 5 1 】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、SRプロモーター等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 0 5 2 】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 [特開昭63-299]等を挙げることができる。

20

【 0 0 5 3 】

組換え発現ベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)]等を用いることができる。

【 0 0 5 4 】

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスペッション・ベクターズ, ア・ラボラトリー・マニュアル(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント 1 - 3 8 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチド又はタンパク質を発現することができる。

30

【 0 0 5 5 】

即ち、組換え遺伝子導入ベクター及びバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、更に組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチド又はタンパク質を発現させることができる。遺伝子導入用ベクターとしては、例えば、p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3、p B l u e B a c I I I (ともにInvitrogen社製)等を挙げることができる。バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

40

【 0 0 5 6 】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるS f 9、S f 2 1 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual、W.H.Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるH i g h 5 (Invitrogen社製)等を用いることができる。

【 0 0 5 7 】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記

50

バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げる
ことができる。

【 0 0 5 8 】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞又は昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチド又はタンパク質を得ることができる。

【 0 0 5 9 】

該タンパク質のDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地中で培養し、培養物中に目的ポリペプチド又は目的タンパク質を生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチド又はタンパク質を採取することにより、目的ポリペプチド又は目的タンパク質を製造することができる。ペリオスチンバリエント (b e) を製造するための形質転換体を培地中で培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

10

【 0 0 6 0 】

上記形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母等の真核生物を宿主細胞とする場合、これら形質転換体を培養する培地は、該宿主細胞が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含
有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでも
よい。

20

【 0 0 6 1 】

炭素源としては、それぞれの宿主細胞が資化し得るものであればよく、グルコース、フ
ラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物
等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコ
ール類を用いることができる。

【 0 0 6 2 】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウ
ム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素
化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加
水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等が用いられる。

30

【 0 0 6 3 】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫
酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム
等を用いることができる。

【 0 0 6 4 】

培養は、振盪培養又は深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15 ~
40 がよく、培養時間は、通常16時間 ~ 7日間である。培養中pHは、3.0 ~ 9.
0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシ
ウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサ
イクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

40

【 0 0 6 5 】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを有する発現ベクターを用いた形質転換体を
培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、l a
cプロモーターを有する発現ベクターを用いた形質転換体を培養するときにはイソプロピ
ル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) 等を、t r pプロモーターを有する発
現ベクターを用いた形質転換体を培養するときにはインドールアクリル酸 (I A A) 等を
培地に添加してもよい。

【 0 0 6 6 】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用さ
れているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 1

50

99, 519

(1967)]、E a g l e の M E M 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 M E M 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] 又はこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【 0 0 6 7 】

培養は、通常 pH 6 ~ 8、30 ~ 40、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 0 6 8 】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている T N M - F H 培地 (Pharmingen社製)、S f - 9 0 0 I I S F M 培地 (Life Technologies社製)、E x C e l l 4 0 0、E x C e l l 4 0 5 (いずれも JRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。培養は、通常 pH 6 ~ 7、25 ~ 30 等の条件下で、1 ~ 5 日間行う。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【 0 0 6 9 】

形質転換体の培養物から、目的ポリペプチド又は目的タンパク質を単離精製するには、通常のポリペプチド又はタンパク質の単離、精製法を用いればよい。例えば、ポリペプチド又はタンパク質が、細胞内に溶解状態で産生した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のポリペプチド又はタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (D E A E) - セファロース、D I A I O N H P A - 7 5 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - S e p h a r o s e F F (Amersham Pharmacia Biotech社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせ用い、ポリペプチド又はタンパク質の精製標品を得ることができる。

【 0 0 7 0 】

また、ポリペプチド又はタンパク質が細胞内に不溶体を形成して産生した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分としてポリペプチド又はタンパク質の不溶体を回収する。回収したポリペプチド又はタンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。可溶化液を希釈あるいは透析して、可溶化液中のタンパク質変性剤の濃度を下げることにより、ポリペプチド又はタンパク質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチド又はタンパク質の精製標品を得る。

【 0 0 7 1 】

ポリペプチド又はタンパク質あるいはその糖修飾体等が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該ポリペプチド又はタンパク質あるいはその糖修飾体等を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【 0 0 7 2 】

このようにして取得されるポリペプチド又はタンパク質として、例えば、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド等を挙げることができる。

【 0 0 7 3 】

また、該ポリペプチド又はタンパク質を、F m o c 法 (フルオレニルメチルオキシカル

10

20

30

40

50

ボニル法)、t B o c法(t - ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国Advanced ChemTech社製、Perkin-Elmer社製、Amersham Pharmacia Biotech社製、米国Protein

Technology Instrument社製、米国Synthecell-Vega社製、米国PerSeptive社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

【0074】

2. ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体の作製

上記1で取得されるポリペプチド又はタンパク質の部分断片精製標品、あるいは配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9で表されるアミノ酸配列を用いて、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を認識する抗体を作製することができる。

10

【0075】

(1) ポリクローナル抗体の作製

ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質又は該タンパク質の部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは該タンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。特に完全長のペリオスチン配列と異なる領域を抗原とすることが好ましいが、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を特異的に認識できれば、共通する配列を抗原としても良い。投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

20

【0076】

該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0077】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法 [酵素免疫測定法 (E L I S A 法) : 医学書院刊 (1 9 7 6 年) 、 Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

30

【0078】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory,

(1988)]、又はD E A E - セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインA又はG - カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独又は組み合わせて処理する方法があげられる。作製した抗体の特異性を上げるために、ペリオスチンバリエント (b e) カラムでアフィニティー精製を行ったり、完全長ペリオスチンや他のペリオスチンバリエントで吸収精製を行うことが好ましい。

40

【0079】

(2) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫原としては、前記ポリクローナル抗体の作製で使用可能なタンパク質やペプチドが使用できる。前記免疫に用いたタンパク質又は部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス又はラットを抗体産生細胞の供給源として供する。該抗体価を示したマウス又はラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。

【0080】

該脾臓をM E M培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 2 0 0 r

50

p mで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス - 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0081】

(b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウス又はラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8 - アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (以下、P3 - U1と略す) [Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)]等を用いることができる。これらの細胞株は、8 - アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mmol/L)、2 - メルカプトエタノール (5×10^{-5} mol/L)、ジェンタマイシン (10 µg/mL) 及び牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、更に8 - アザグアニン (15 µg/mL) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

10

【0082】

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髄腫細胞をMEM培地又はPBS (リン酸二ナトリウム1.83 g、リン酸一カリウム0.21 g、食塩7.65 g、蒸留水1 L、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髄腫細胞 = 5~10 : 1になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

20

【0083】

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37 °C で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール - 1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 mL 及びジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 mL を混合した溶液を0.2~1 mL 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地1~2 mL を数回添加する。

【0084】

添加後、MEM培地を加えて全量が50 mL になるように調製する。該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mol/L)、チミジン (1.5×10^{-5} mol/L) 及びアミノプテリン (4×10^{-7} mol/L) を加えた培地] 100 mL 中に懸濁する。

30

【0085】

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 µL / 穴ずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中、37 °C で7~14日間培養する。

【0086】

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、ペリオスチンバリアント (b e) の全長あるいは部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

40

【0087】

酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法を挙げるることができる。免疫の際、抗原に用いたペリオスチンバリアント (b e) の全長あるいは部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、更に第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラット又は抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、ペリオスチンバリアント (b e) に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。更に、完全長ペリオスチンや他のペリオスチンバリアントとの反応性を検討し、該タンパク質に

50

反応しないハイブリドーマを選択することが好ましい。

【0088】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し[1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明で用いるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

【0089】

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウス又はヌードマウスに、(c)で取得したモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞5~20×10⁶細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

10

【0090】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0091】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキット又はラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

20

【0092】

3.ペリオスチンバリアント(b e)をコードするDNAを用いたペリオスチンバリアント(b e)遺伝子のmRNAの検出方法

該検出方法に用いられるDNAとしては、例えば、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列からなるDNA、もしくはそれらから得られるDNA断片等が挙げられる。以下、これらを本発明に用いるDNAとも称する。該遺伝子のmRNAの発現量や構造変化を検出する方法としては、例えば(1)ノーザンプロット法、(2) i n s i t uハイブリダイゼーション法、(3)定量的PCR法、(4)デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、(5)DNAチップ法、(6)RNAse保護アッセイ法などの方法等があげられる。

30

【0093】

上記方法による分析に供する検体としては、心筋壊死を伴う疾患の患者並びに健常者より取得した心臓組織、血液(末梢血、冠状静脈洞採血等)、その血清、唾液等の生体試料、あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したmRNAあるいは全RNAが用いられる(以後、該mRNA及び全RNAを検体由来RNAと称する)。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0094】

ノーザンプロット法では、検体由来RNAをゲル電気泳動で分離後、ナイロンフィルター等の支持体に転写し、本発明に用いるDNAより調製した標識プローブを用いて、ハイブリダイゼーション並びに洗浄を行うことで、該遺伝子mRNAに特異的に結合したバンドを検出することにより、該遺伝子mRNAの発現量並びに構造の変化を検出することができる。ハイブリダイゼーションを行う際には、プローブと検体由来RNA中の該遺伝子mRNAが安定なハイブリッドを形成する条件でインキュベーションする。偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーション並びに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、及びホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えば、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている。

40

【0095】

ノーザンプロット法に用いる標識プローブは、例えば、公知の方法(ニック・トランス

50

レーション、ランダム・プライミング又はキナーゼ)により放射性同位体、ビオチン、蛍光基、化学発光基等を、本発明に用いるDNAあるいは該DNAの配列から設計したオリゴヌクレオチドに取り込ませることで調製することができる。標識プローブの結合量は該遺伝子mRNAの発現量を反映することから、結合した標識プローブの量を定量することで該遺伝子mRNAの発現量を定量することができる。また、標識プローブ結合部位を分析することで、該遺伝子mRNAの構造変化を知ることができる。

【0096】

i n s i t uハイブリダイゼーション法は、上記標識プローブと、生体から取得した組織をパラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いてハイブリダイゼーション及び洗浄の工程を行うことにより、該遺伝子のmRNAの発現量を検出する方法である。i n

s i t uハイブリダイゼーション法で、偽陽性を防ぐためには、ハイブリダイゼーション並びに洗浄工程は高ストリンジェントな条件で行うことが望ましい。この条件は、温度、イオン強度、塩基組成、プローブの長さ、及びホルムアミド濃度等の多数の因子により決定される。これらの因子は、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載されている。

【0097】

定量的PCR法、デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法又はDNAチップ法等の該遺伝子のmRNAの検出法は、検体由来RNAに、オリゴdTプライマーあるいはランダムプライマー及び逆転写酵素を用いてcDNAを合成することに基づいた方法で行うことができる(以後、該cDNAを検体由来cDNAと称する)。検体由来RNAがmRNAの場合は、上記いずれのプライマーも用いることができるが、該検体由来RNAが全RNAである場合は、オリゴdTプライマーを用いる。

【0098】

定量的PCR法では、検体由来cDNAをテンプレートとし、ペリオスチンバリアント(b e)をコードするDNAの塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行うことで、該遺伝子のmRNA由来のDNA断片を増幅する方法である。増幅DNA断片の量は該遺伝子のmRNAの発現量を反映することから、アクチンやG3PDH(glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等をコードするDNAを内部コントロールとして置くことで該遺伝子のmRNAの量を定量することが可能である。また、増幅DNA断片をゲル電気泳動により分離することで、該遺伝子のmRNAの構造の変化を知ることができる。本検出法では、標的配列を特異的にかつ効率的に増幅する適当なプライマーを用いることが望ましい。適当なプライマーは、プライマー間の結合やプライマー内の結合を起こさず、アニーリング温度で標的cDNAと特異的に結合して、変性条件で標的cDNAからはずれる等の条件に基づき設計することができる。増幅DNA断片の定量は増幅産物が指数関数的に増加しているPCR反応の内に行うことが必要である。このようなPCR反応は、各反応ごとに生産される該増幅DNA断片を回収してゲル電気泳動で定量分析することで知ることができる。

【0099】

デファレンシャル・ハイブリダイゼーション法[Trends in Genetics, 7, 314-317 (1991)]やDNAチップ法[Genome Research, 6, 639-645 (1996)]は、検体由来cDNAをプローブとして、本発明に用いるDNAを固定化させたフィルター又はスライドガラスあるいはシリコンなどの基板に対して、ハイブリダイゼーション並びに洗浄を行うことにより、該遺伝子mRNAの発現量の変動を検出する方法である。いずれの方法もフィルター又は基板上に、アクチンやG3PDHなどの内部コントロールを固定化することで、対照検体と標的検体間での該遺伝子のmRNAの発現の違いを正確に検出することができる。また対照検体と標的検体由来のRNAを基にそれぞれ異なる標識dNTPを用いて標識cDNA合成を行い、フィルター又は基板に二つの標識cDNAプローブを同時にハイブリダイズさせることにより正確な該遺伝子のmRNAの発現量の定量を行うことができる。

10

20

30

40

50

【0100】

R N a s e 保護アッセイ法は、以下の方法により行う。まず、本発明に用いる DNA の 3' 末端に T7 プロモーター、SP6 プロモーターなどのプロモーター配列を結合し、RNA ポリメラーゼを用いた in vitro の転写系により標識した rNTP を用いて、標識したアンチセンス RNA を合成する。該標識アンチセンス RNA を検体由来 RNA と結合させて、RNA-RNA ハイブリッドを形成させた後、RNase で消化し、消化から保護された RNA 断片をゲル電気泳動によりバンドを形成させ検出する。得られたバンドを定量することで、該遺伝子の mRNA の発現量を定量することができる。

【0101】

4. ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた免疫学的検出又は定量方法

ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体 (ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体) を用いて、微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞又は組織の細胞内あるいは細胞外に発現したペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を免疫学的に検出及び定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (E L I S A 法)、放射性物質標識免疫抗体法 (R I A)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (A B C 法、C S A 法等)、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチ E L I S A 法、免疫凝集法 [単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック) (1987)、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法 (東京化学同人) (1986)] などが挙げられる。

【0102】

上記方法による分析に供する検体としては、心筋壊死を伴う疾患の患者並びに健常者より取得した心臓組織、血液 (末梢血、冠状静脈洞採血等)、その血清、唾液等の生体試料、あるいは該生体試料から細胞を取得して試験管内の適当な培地中で培養した初代培養細胞試料から取得したタンパク質、また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

【0103】

蛍光抗体法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物に、本発明で用いる抗体を反応させ、更にフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質でラベルした抗マウス I g G 抗体あるいはその断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0104】

酵素免疫測定法 (E L I S A 法) とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物に、本発明で用いる抗体を反応させ、更にペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗マウス I g G 抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

【0105】

放射性物質標識免疫抗体法 (R I A) とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物に、本発明で用いる抗体を反応させ、更に放射線標識を施した抗マウス I g G 抗体あるいはその断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

【0106】

免疫細胞染色法、免疫組織染色法などの免疫組織化学染色法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物に、本発明で用いる抗体を反応させ、更に F I T C などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウス I g G 抗体あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0107】

ウェスタンブロッティング法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の

10

20

30

40

50

存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)] で分画した後、該ゲルを P V D F 膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に本発明で用いる抗体を反応させ、更に FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウス Ig G 抗体あるいはその断片を反応させた後、確認する方法である。

【0108】

ドットブロッティング法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物をニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜にペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体を反応させ、更に FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗マウス Ig G 抗体あるいは結合断片を反応させた後、確認する方法である。

10

【0109】

免疫沈降法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物をペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体と反応させた後、プロテイン G - セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

【0110】

サンドイッチ ELISA 法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体で、抗原認識部位の異なる 2 種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体をプレートに吸着させ、もう一方の抗体を FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物を反応させた後、標識した抗体を反応させ、結合した標識物質により検出を行う方法である。

20

【0111】

免疫凝集法とは、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体で、抗原認識部位の異なる 2 種類の抗体 (もしくは 1 種類) をラテックス粒子、あるいはリポソームに固定化させ、ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の存在の有無を検討するために、上記試料あるいは抽出物を反応させた後、凝集した粒子の濁度を吸光度等により検出を行う方法である。

30

【0112】

5 . ペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA の変異同定方法

当該方法に用いられる DNA としては、例えば、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA、もしくはそれらから得られる DNA 断片等があげられる。

【0113】

ペリオスチンバリアント (b e) 遺伝子座中に存在する心筋壊死を伴う疾患の患者の原因となる変異の存在の有無を評価するための最も明確な試験は、対照集団からの遺伝子と心筋壊死を伴う疾患の患者からの遺伝子とを直接比較することである。

【0114】

具体的には心筋壊死を伴う疾患の患者ならび健常人から、心臓組織、血液 (末梢血、冠状静脈洞採血等)、その血清、唾液等のヒト生体試料あるいは、該生体試料から樹立した初代培養細胞由来の試料を集め、該生体試料並びに該初代培養細胞由来試料中から DNA を抽出する (以後、該 DNA を検体由来 DNA と称する)。該検体由来 DNA は、直接あるいは配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いて増幅したペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA を試料 DNA として用いることができる。別法として、該検体由来 c DNA をテンプレートとして、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の塩基配列に基づき設計したプライマーにより PCR を行うことで増幅した DNA 断片を試料 DNA として用いることができる。

40

50

【 0 1 1 5 】

ペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA に心筋壊死を伴う疾患の原因となる変異があるかどうかを検出する方法として、野生型対立遺伝子を有する DNA 鎖と変異対立遺伝子を有する DNA 鎖とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法を用いることができる。

【 0 1 1 6 】

ヘテロ二本鎖を検出する方法としては、(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法 [Trends Genet., 7, 5 (1991)]、(2) 一本鎖コンフォメーション多型解析法 [Genomics, 16, 325-332 (1993)]、(3) ミスマッチの化学的切断法 (CCM, chemical cleavage of mismatches) [Human Genetics (1996), Tom Strachan and Andrew P. Read, BIOS Scientific Publishers Limited]、(4) ミスマッチの酵素的切断法 [Nature Genetics, 9, 103-104 (1996)]、(5) 変性ゲル電気泳動法 [Mutat. Res., 288, 103-112 (1993)] 等の方法を挙げることができる。

10

【 0 1 1 7 】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法は、検体由来 DNA あるいは検体由来 c DNA をテンプレートとして、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いた PCR によって、200 bp よりも小さい断片としてペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA の断片を増幅し、該増幅 DNA 断片を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、変異を有さないホモ二本鎖と泳動度を比較する方法である。ペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA の変異によりヘテロ二本鎖が形成された場合は、変異を持たないホモ二本鎖よりもゲルの移動度が遅く、それらはホモ二本鎖と異なるバンドとして検出することができる。該電気泳動には、市販のゲル [Hydro-link, MDE (FMC 社製) など] を用いることもできる。また、200 bp よりも小さい DNA 断片を用いたヘテロ二本鎖検出法では、1塩基の挿入、欠失及び置換を検出可能である。ヘテロ二本鎖解析は、次に述べる一本鎖コンフォメーション多型解析と組み合わせた 1 枚のゲルで行うことが望ましい。

20

【 0 1 1 8 】

一本鎖コンフォメーション多型解析 (S S C P 解析 ; single strand conformation polymorphism analysis) は、検体由来 DNA 又は検体由来 c DNA をテンプレートに、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の塩基配列に基づき設計したプライマーを用いた PCR により、200 bp よりも小さい断片として増幅したペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA を変性後、未変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動する方法である。DNA の増幅を行う際にプライマーを放射性同位体あるいは蛍光色素で標識するか、又は未標識の増幅産物を銀染色することにより、増幅したペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA をバンドとして検出することができる。野生型の泳動パターンとの相違を明らかにするために、コントロールの検体も同時に電気泳動すると、塩基配列に変異を持った断片を移動度の違いから検出することができる。

30

40

【 0 1 1 9 】

ミスマッチの化学的切断法 (C C M 法) は、検体由来 DNA あるいは検体由来 c DNA をテンプレートに、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA の塩基配列に基づき設計したプライマーでペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA 断片を増幅させ、該増幅 DNA 断片と配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA に放射性同位体あるいは蛍光色素をとり込ませた標識 DNA とをハイブリダイズさせ、四酸化オスミウムで処理することでミスマッチしている場所の DNA の一方の鎖を切断させ塩基配列の変異を検出する方法である。CCM 法は最も感度の高い検出法の 1 つであり、キロベースの長さの検体にも適応できる。

【 0 1 2 0 】

50

上記の四酸化オスミウムの代わりに T 4 フェージリゾルベースとエンドヌクレアーゼ V I I のような細胞内でミスマッチの修復に関与する酵素と R N a s e A と組み合わせることで、酵素的にミスマッチを切断することもできる。

【 0 1 2 1 】

変性ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis : DGGE法) は、検体由来 D N A 又は検体由来 c D N A をテンプレートとして、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する D N A の塩基配列に基づき設計したプライマーで増幅したペリオスチンパリアント (b e) をコードする D N A 断片を化学的変性剤の濃度勾配や温度勾配を有するゲルを用いて電気泳動する方法である。増幅した D N A 断片はゲル内を一本鎖に変性する位置まで移動し、変性後は移動しなくなる。ペリオスチンパリアント (b e) をコードする D N A に変異がある場合とない場合では増幅した D N A のゲル内での移動度が異なることから、変異の存在を検出することが可能である。P C R に使用するそれぞれのプライマーにポリ (G : C) 末端を付けて検出感度を上げることもできる。

10

【 0 1 2 2 】

心筋壊死を伴う疾患の原因遺伝子を検出する別の方法として、タンパク質短縮試験 (protein truncation test : P T T 法) [Genomics, 20, 1-4 (1994)] がある。該試験によりタンパク質の欠損を生み出すフレームシフト突然変異、スプライス部位突然変異、ナンセンス突然変異を特異的に検出することができる。P T T 法は、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する D N A の 5 ' 末端に T 7 プロモーター配列と真核生物翻訳開始配列をつないだプライマーを設計し、該プライマーを用いて検体由来 R N A より逆転写 P C R (R T - P C R) 法でペリオスチンパリアント (b e) をコードする c D N A を作製する。該 c D N A を用い、*in vitro* 転写、翻訳を行うとタンパク質が生産される。該タンパク質をポリアクリルアミド電気泳動して、該タンパク質の泳動位置が完全長タンパク質に相当する位置にあれば欠損を生み出す変異は存在せず、該タンパク質に欠損がある場合は、完全長タンパク質より短い位置に該タンパク質は泳動され、該位置より欠損の程度を知ることができる。

20

【 0 1 2 3 】

検体由来 D N A 及び検体由来 c D N A の塩基配列を決定するために配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する D N A に基づいて設計したプライマーを用いることが可能である。決定された塩基配列を解析することにより、検体由来 D N A 又は検体由来 c D N A に心筋壊死を伴う疾患の原因となる変異があるか否かを判別することができる。

30

【 0 1 2 4 】

ペリオスチンパリアント (b e) 遺伝子のコード領域以外の変異は、該遺伝子の付近又はその中のイントロン及び調節配列などの、非コード領域を検査することによって検出することができる。非コード領域中の変異に起因する心筋壊死を伴う疾患は、上記に記載した方法と同様の方法により検出することができる。

【 0 1 2 5 】

このようにして非コード領域における変異の存在が示唆された該遺伝子については、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する D N A をハイブリダイゼーションのプロープとして用いることにより、クローン化することができる。非コード領域における変異は上述のいずれかの方法に準じて探索することができる。

40

【 0 1 2 6 】

見出された変異は、Handbook of Human Genetics Linkage. The John Hopkins University Press, Baltimore (1994) に記載された方法に従い統計処理を行うことで、心筋壊死を伴う疾患との連鎖がある S N P s (シングル・ヌクレオチド・ポリモルフィズム) として同定することができる。また、心筋壊死を伴う疾患の病歴を持つ家族から、先に示した方法に従い D N A を取得し、変異を検出することで、心筋壊死を伴う疾患の原因遺伝子を同定することができる。

50

【 0 1 2 7 】

6. ペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA を用いた心筋壊死を伴う疾患の検査方法

上記方法に用いられる DNA としては、例えば、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA、もしくはそれらから得られる DNA 断片等があげられる。

心筋壊死を伴う疾患の原因は、ヒトのいずれかの組織における遺伝子の変異を検出することによって確認することができる。例えば、生殖細胞系に変異がある場合、当該変異を遺伝した個人は、心筋壊死を伴う疾患を発症し易い傾向である可能性がある。当該変異は、該個人の体のいずれかの組織から抽出した DNA を試験することによって検出することができる。例えば、ヒトから採血した血液の細胞から DNA を抽出し、該 DNA を用いて、遺伝子の変異を検出することにより、心筋壊死を伴う疾患のリスクを検査することができる。また、羊膜細胞を採取して DNA を抽出し、該 DNA を用いて、遺伝子の変異を検出することにより、出生前の心筋壊死を伴う疾患のリスクを検査することができる。

10

【 0 1 2 8 】

また、心筋壊死を伴う疾患を発症した患者の、病巣部位の生体組織から DNA を取得し、遺伝子の変異を検出することにより、心筋壊死を伴う疾患の種類を検査し、投与する薬物の選択などに利用することができる。生体組織からの DNA は、周囲の正常組織から遊離した病巣部位の組織を単離してトリプシンなどで処理し、得られた細胞を適当な培地で培養し、培養した細胞から染色体 DNA 並びに mRNA を抽出することにより取得することができる。

20

【 0 1 2 9 】

また、心筋壊死を伴う疾患を発症した患者より取得した心臓壊死部位の組織、血液（末梢血、冠状静脈洞採血等）、その血清、尿、便、唾液などの生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞から DNA あるいは mRNA を抽出し、該 DNA あるいは mRNA を用いて、遺伝子の発現量を検出することにより、心筋壊死を伴う疾患の程度や状態を検査し、適時、検査を行うことで、その状態をモニタリングすることができる。

具体的には、該遺伝子の発現量が、統計的有意差をもって健常人よりも高いときには、心筋壊死を伴う疾患を発症したとみなすことができる。また、心筋梗塞のような心筋壊死を伴う疾患のモニタリングとしては、該遺伝子の発現量が非常に高い時には心破裂などの危険な状態であり、減少している時には安定期にあること等から、適当な治療方針を決定することができる。

30

【 0 1 3 0 】

以下、検査を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得した DNA を検査検体由来 DNA と称する。また、検査を目的としてヒト検体から上記いずれかの方法で取得した RNA より合成した cDNA を検査検体由来 cDNA と称する。

配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA、及び検査検体由来 DNA あるいは検査検体由来 cDNA を用い、上記 5 のペリオスチンバリアント (b e) をコードする DNA の変異を検出する方法に準じた方法により心筋壊死を伴う疾患の検査を行うことができるが、上記 5 の方法により、心筋壊死を伴う疾患との因果関係が見出された変異を検査検体由来 DNA 又は検査検体由来 cDNA が有しているか否かを検査する方法としては、(1) 制限酵素部位の検出、(2) 対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを利用する方法 (ASO : allele specific oligonucleotide hybridization)、(3) 対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いた PCR (ARMS : amplification refractory mutation system)、(4) オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (OLA : oligonucleotide ligation assay)、(5) PCR-PHFA 法 (PCR-preferential homoduplex formation assay)、(6) オリゴ DNA アレイを用いる方法 [タンパク質核酸酵素、43、2004-2011 (1998)] 等の方法が挙げられる。

40

【 0 1 3 1 】

50

以下、(1)～(6)について記す。制限酵素部位の検出は、以下に記載の方法に従うことができる。すなわち、単一塩基の変化により制限酵素部位が消失又は発生する場合は、検査検体由来DNAあるいは検査検体由来cDNAを、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRで増幅したのち、制限酵素で消化し、得られた制限酵素切断DNA断片を正常人の場合と比較することで簡便に変異を検出することができる。更に詳細に塩基の変化を検査する方法としては、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列情報並びに上記5の方法により同定された変異の情報を組合せることでオリゴヌクレオチドプローブを設計し、該オリゴヌクレオチドプローブをフィルターに結合させてハイブリダイズを行うリバースドットプロット法で変異を検出する方法を挙げることができる。

10

【0132】

対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブ(ASO)を利用する方法は、短い合成DNAプローブが、完全に対合する塩基配列とのみハイブリダイズする特徴を利用した方法で、1塩基の変異を容易に検出することができる。具体的には、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列と、上記5で同定された塩基の変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドをフィルターに結合させ、検査検体由来DNAあるいは検査検体由来cDNAをテンプレートとして用い、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列を用いて設計したプライマーと標識したdNTPを用いたPCRにより得られる増幅DNA断片をプローブに用いてハイブリダイズを行うリバースドットプロット法を挙げることができる。

20

【0133】

リバースドットプロットとは、スライドガラス又はシリコンなどの基盤に直接、測定対象とするDNAに対応する変異のないDNAの塩基配列と別途同定された該DNAの変異に基づき設計したオリゴヌクレオチドを合成して、高密度のアレイであるDNAチップを用いて、少量の検査検体由来DNAあるいは検査検体由来cDNAを反応させて多様な変異をより簡便に検出する方法である。本方法は、大規模な診断目的に適した変異検出法である。

【0134】

塩基の変異は、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ(OLA)法によって以下に示す方法によっても検出できる。

30

調べようとするペリオスチンバリエーション(b e)をコードするDNAの変異部位をその3'末端に有する20塩基程度のオリゴヌクレオチド、及び該変異部位に続く20塩基程度のオリゴヌクレオチドを、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に基づき設計、合成する。このとき、例えば、前者のオリゴヌクレオチドの5'末端にはビオチンを、後者のオリゴヌクレオチドの3'末端にはジゴケシゲニンなどの異なる標識体を付加しておく。次に検査検体由来DNAあるいは検査検体由来cDNAをテンプレートとして、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAの塩基配列に基づき設計したプライマーを用い、PCRによりペリオスチンバリエーション(b e)をコードするDNAを増幅する。次に該増幅DNA断片と上記2本のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後、DNAリガーゼで2本のオリゴヌクレオチドを連結させる。連結反応後、2本鎖DNAを熱変性させて得られるビオチン標識一本鎖DNAを、例えばアビジンに結合するDNAとして回収する。変位部位を有する増幅DNA断片とハイブリダイズした上記2種類のオリゴヌクレオチドは上記連結反応により連結しているので、その3'末端にジゴケシゲニンを有するDNAとして得られ、該結合DNAを簡単に検出することができる。よって、変位を有するペリオスチンバリエーション(b e)をコードするDNAを迅速、簡便に検出可能である。OLAは電気泳動や遠心分離操作が不要なために、多数のサンプルを効果的に短時間で検査するのに適した変異検出法である。

40

【0135】

50

また、以下のPCR-PHFA法により微量な変異遺伝子を定量的かつ容易に検出することができる。

PCR-PHFA法は、遺伝子増幅法(PCR)、非常に高い特異性を示す液相でのハイブリダイゼーション、及びELISAと同様の操作でPCR産物を検出するED-PCR(enzymatic detection of PCR product)の3つを組み合わせた方法である。DNP(dinitrophenyl)標識及びビオチン標識したプライマーセットを用いて、配列番号1、配列番号4、配列番号7で表される塩基配列を有するDNAをテンプレートにPCRを行い、両末端標識増幅DNA断片を調製する。次に、標識プライマーと同じ塩基配列を有する未標識プライマーセットを用いて、検査検体由来DNAあるいは検査検体由来cDNAをテンプレートに増幅して得られる非標識増幅DNA断片を、該標識増幅DNA断片と混合する。このとき非標識増幅DNA断片は標識増幅DNA断片に対し、20~100倍の大過剰量を用いる。そして該混合物を熱変性処理後、1/5分~10分間程度の緩やかな温度勾配で冷却し、完全な相補鎖を優先的に形成させる。こうして再形成された標識DNAは、ビオチンを介してストレプトアビジン固定化ウエルに捕獲吸着させ、DNPを介して酵素標識抗DNP抗体を結合させて酵素による発色反応により検出する。検体中に標識DNAと同じ配列の遺伝子が存在しない場合は、元の2本鎖の標識DNAが優先的に再形成されて発色を示す。これに対し、同じ塩基配列の遺伝子が存在する場合は、相補鎖の置換がランダムに生じるため再形成される標識DNAは減少するので、発色は著しく低下する。これにより、既知の変異・多型遺伝子の検出・定量が可能となる。

10

20

【0136】

また、心筋壊死を伴う疾患の程度や状態を検査するために、検査検体由来DNA又は検査検体由来cDNA中の遺伝子の発現量を検査する方法としては、前記3に記載の方法が挙げられる。例えば、ペリオスチンパリアント(b e)を特異的に増幅することができるプライマーを使用して、定量PCR法やマイクロアレイ法など、公知の技術を使用することができる。具体的には、配列番号20と配列番号21を組み合わせを行うことができる。

【0137】

7. ペリオスチンパリアント(b e)タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた心筋壊死を伴う疾患の検査方法

ヒト生体試料での、ペリオスチンパリアント(b e)タンパク質の発現量の変化並びに発現しているタンパク質の構造変化を同定することは、心筋壊死を伴う疾患を発症する危険性を知るためや既に発症した心臓機能低下の原因やその程度や状態を知り、その状態をモニタリングして治療に役立てる上で有用である。

30

具体的には、該タンパク質の発現量あるいは構造変化の程度が、統計的有意差をもって健常人よりも高いときには、心筋壊死を伴う疾患を発症したとみなすことができる。また、心筋梗塞のような心筋壊死を伴う疾患のモニタリングとしては、該タンパク質の発現量あるいは構造変化の程度が非常に高い時には心破裂などの危険な状態であり、減少している時には安定期にあること等から、適当な治療方針を決定することができる。

【0138】

ペリオスチンパリアント(b e)タンパク質の発現量や構造変化を検出して検査する方法としては、上記4に記載した蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CASA法等)、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法、免疫凝集法などがあげられる。

40

【0139】

上記方法による診断に供する検体としては、患者より取得した心臓病巣部位の組織、血液(末梢血、冠状静脈洞採血等)、その血清、尿、便、唾液などの生体試料そのものあるいは、該生体試料から取得した細胞並びに細胞抽出液が用いられる。また、生体試料から取得した組織を、パラフィンあるいはクリオスタット切片として単離したものをを用いることもできる。

50

【0140】

8. ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質、該タンパク質をコードする DNA、又は該タンパク質のいずれかを認識する抗体を用いた心筋壊死治療薬のスクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法に用いられるタンパク質としては、ペリオスチンバリエント (b e) を挙げることができる。ペリオスチンバリエント (b e) としての活性を有するタンパク質であれば、天然物由来のタンパク質でも、遺伝子工学的手法により製造されたタンパク質であってもよく、例えば天然由来の該タンパク質としては、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ラット、マウスなどあらゆる哺乳動物由来のペリオスチンバリエント (b e) を挙げることができる。

ペリオスチンバリエント (b e) の具体的例としては、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。

【0141】

本発明のスクリーニング方法に用いられる DNA としては、ペリオスチンバリエント (b e) をコードする DNA を挙げることができる。該 DNA は、上記本発明のスクリーニング方法に用いられるタンパク質をコードする DNA であればいずれでもよい。

ペリオスチンバリエント (b e) をコードする DNA の具体的例としては、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7 で表される塩基配列を有する DNA を挙げることができる。

【0142】

本発明のスクリーニング方法に用いられる抗体としては、上記本発明のスクリーニング方法に用いられるタンパク質、又はそのポリペプチド断片を認識する抗体を挙げることができる。

【0143】

(1) ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質に特異的に作用する化合物のスクリーニング

ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を発現するように形質転換した微生物、動物細胞、又は昆虫細胞、及び精製したペリオスチンバリエント (b e) タンパク質は、ペリオスチンバリエント (b e) に特異的に作用する化合物をスクリーニングするために有用である。スクリーニングにより得られた化合物は、心筋壊死治療薬として有用である。

【0144】

上記スクリーニングの 1 つの方法は、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を生産するように形質転換した動物細胞 (以後、探索用形質転換体と称する) において、ペリオスチンバリエント (b e) の活性化を特異的に誘導する化合物を選択することである。ペリオスチンバリエント (b e) の活性化を検出する方法としては、該探索用形質転換体の細胞応答を測定する方法を挙げることができる。

【0145】

具体的な細胞の応答としては、例えば、(1) 細胞遊走活性、(2) F A K (Focal Adhesion Kinase) のリン酸化、(3) コラーゲン産生などを指標とすることができる。

前記 (1) では、初代培養したマウスの心筋繊維芽細胞の細胞遊走能に対するペリオスチンの効果を、例えば、インビトロ細胞遊走アッセイ (in-vitro cell migration assay) で検定する。その際、ペリオスチンとしては、精製タンパク質か、あるいは、細胞に発現ベクターを移入した形質転換体 (トランスフェクタント) が分泌する細胞上清を用いることができる。ペリオスチンバリエントは細胞遊走活性があるため、細胞遊走能でその活性を検定することができる。

前記 (2) では、例えば、マウス胎児由来細胞 (例えば、C3H10T1/2) の血清除去した細胞培養液中にペリオスチンタンパク質を加えて 1 時間処理し、ペリオスチンが細胞に与える効果として、F A K のリン酸化をウェスタンブロットで検出する。ペリオスチンバリエント

10

20

30

40

50

アントは細胞上のインテグリンに結合し、細胞を活性化するが、その細胞応答はF A Kのリン酸化の度合いで検定できる。

前記(3)では、例えば、マウス胎児由来細胞(例えば、C3H10T1/2)、マウス骨芽細胞様細胞(例えば、MC3T3-E1)、マウス歯根膜細胞株(例えば、A9)にペリオスチン遺伝子を導入し、その形質転換体によるコラーゲンの産生を市販キット(例えば、Sircol Collagen Assay Kit; フナコシ)で測定する。また、同じ3種類の細胞を用いて、ペリオスチンとして精製タンパク質か、細胞に発現ベクターを移入した形質転換体が分泌する細胞上清でこれらの細胞を処理し、コラーゲンの架橋量を検定することができる。

【0146】

また、精製したペリオスチンバリエント(b e)タンパク質、又は該タンパク質の一部を構成するポリペプチドは、ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質に特異的に結合する標的化合物を選択するのに用いることができる。例えば、該タンパク質を固相担体等に固定しておき、被験試料を接触させた後、十分に該プレートを洗浄し、ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質に結合している化合物を該タンパク質から遊離させることにより、標的化合物を選択することができる。

10

【0147】

上記スクリーニングのもう1つの方法としては、ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質の一部を構成するペプチドを多数、プラスチックピン又はある種の固体支持体上で高密度に合成し、該ペプチドに選択的に結合する化合物あるいはタンパク質を効率的にスクリーニングする方法がある(WO84/03564)。

20

【0148】

(2)ペリオスチンバリエント(b e)をコードするDNAの転写あるいは翻訳を調節する化合物のスクリーニング方法

心臓由来の初代培養細胞又は分化誘導させた心筋細胞で、ペリオスチンバリエント(b e)遺伝子のmRNAあるいはペリオスチンバリエント(b e)タンパク質の発現を促進する活性を有する化合物も、心筋壊死治療薬として有用である。

【0149】

心臓由来の初代培養細胞(心筋細胞及び心臓線維芽細胞を含む)又は分化誘導させた心筋細胞(例えば、骨髄細胞などの前駆細胞から分化誘導させた心筋細胞、ES細胞から分化誘導させた心筋細胞、体細胞を多能性幹細胞とした後更に分化誘導させた心筋細胞)と種々の被験試料を接触させた場合と、被験試料を接触させない場合での該細胞におけるペリオスチンバリエント(b e)遺伝子のmRNAの発現量を測定、比較することでペリオスチンバリエント(b e)遺伝子の転写を抑制又は促進する物質をスクリーニングすることができる。ペリオスチンバリエント(b e)遺伝子のmRNAの発現量は、上記3のPCR法、ノーザンブロット法、RNase保護アッセイ法により検出することができる。

30

【0150】

また、心臓由来の初代培養細胞又は分化誘導させた心筋細胞と種々の被験試料を接触させた場合と、被験試料を接触させない場合での該細胞におけるペリオスチンバリエント(b e)タンパク質の発現量を測定、比較することでペリオスチンバリエント(b e)遺伝子の転写もしくは翻訳を抑制又は促進する物質をスクリーニングすることができる。ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質の発現量は、上記4のペリオスチンバリエント(b e)タンパク質を特異的に認識する抗体を用いた蛍光抗体法、酵素免疫測定法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法や免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CASA法等)、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA法、免疫凝集法により測定することができる。

40

【0151】

上記の方法により取得した化合物は、左室下行冠動脈結紮(LAD ligation)を行った後、再灌流を行う虚血再灌流(Ishemia-reperfusion)などの心筋梗塞モデル動物に薬剤と

50

して投与し、該動物の心筋壊死部位の修復度や心機能低下の抑制度合いなどを、公知の方法に従って測定することにより、該化合物のその心筋梗塞への治療効果を評価することが可能である。

【0152】

9. ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を有効成分として含有する心筋壊死の治療及び/又は予防のための医薬

ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質又はそれらの改変体は、心筋壊死を伴う種々の疾患において、壊死部位の修復をすることや、その修復を促進して心機能の低下を抑制することに用いることができる。心筋壊死を伴う疾患としては、心筋梗塞や心筋炎 (例えばウイルス性心筋炎) や心筋症 (例えば拡張型心筋症) など、公知の疾患を挙げることができる。

10

【0153】

本発明の医薬では、先述した上記ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質又はそれらの改変体であれば、天然由来のものでも、遺伝子工学的手法によって製造された組み換えタンパク質であってもよい。天然由来のペリオスチンバリアント (b e) タンパク質としては、例えばヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウス、ラット、マウスなどあらゆる哺乳動物由来のペリオスチンバリアント (b e) を挙げることができるが、ヒト心筋壊死の治療及び/又は予防のための医薬、すなわち心臓機能改善剤、心臓再生促進剤として用いる場合は、ヒト由来のペリオスチンバリアント (b e) とアミノ酸配列が一致するタンパク質を用いることが好ましい。

20

【0154】

ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質を有効成分として含有する心筋壊死の治療のための医薬は、有効成分として該タンパク質のみを含むものであってもよいが、他のペリオスチンバリアントや完全長のペリオスチンを共含有しても良い。また、通常は薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件下に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

30

【0155】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内及び静脈内等の非経口投与を挙げることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0156】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤及びシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

40

【0157】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注

50

射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪又はカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該ポリペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔及び気道粘膜を刺激せず、かつ該ポリペプチドを微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該ポリペプチド及び用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0158】

投与量又は投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ である。

10

【0159】

10. 上記8のスクリーニング方法により得られた化合物を有効成分として含有する心筋壊死の治療のための医薬

上記8のスクリーニング方法により得られた化合物を有効成分として含有する心筋壊死の治療及び/又は予防のための医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましい医薬製剤形態等は、及び投与方法等は、上記9のとおりである。

【0160】

20

11. ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質をコードするDNAを含有する心筋壊死用遺伝子治療剤

ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質をコードするDNAを心筋壊死の遺伝子治療薬として用いる方法としては、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記9に記載した常法に従って製剤化、処方及び投与方法、あるいは非ウイルス遺伝子移入法により投与方法を挙げることができる。

【0161】

組換えウイルスベクターは、以下に記載の方法に従い作製することができる。ペリオスチンバリアント (b e) タンパク質の完全長cDNAをもとに、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。該DNA断片、あるいは完全長cDNAをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクターを造成する。

30

【0162】

RNAウイルスベクターの場合には、ペリオスチンバリアント (b e) の完全長cDNAに相同なRNA断片を調製し、それらをウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスを造成する。RNA断片は、2本鎖のほか、ウイルスベクターの種類に応じて、センス鎖もしくはアンチセンス鎖のどちらか一方の鎖を選択する。例えば、レトロウイルスベクターの場合には、センス鎖に相同なRNAを、センスウイルスベクターの場合には、アンチセンス鎖に相同なRNAを選択する。

40

【0163】

該組換えウイルスベクターを、該ベクターに適合したパッケージング細胞に導入する。パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクターの該欠損するタンパク質を補給できる細胞であればいかなるものでもよい。例えば、ヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス繊維芽細胞NIH3T3などを用いることができる。パッケージング細胞で補給するタンパク質としては、レトロウイルスベクターの場合にはマウスレトロウイルス由来のgag、pol、envなど、レンチウイルスベクターの場合にはHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nefなど、アデノウイルスベクターの場合にはアデノウイルス由来のE1A、E1Bなど、アデノ随伴

50

ウイルスの場合は R e p (p 5 , p 1 9 , p 4 0)、V p (C a p) などのタンパク質があげられる。

【 0 1 6 4 】

ウイルスベクターとしては、上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、標的細胞でペリオスチンパリアント (b e) をコードする D N A を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。プラスミドベクターとしては M F G [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、p B a b e P u r o [Nucleic Acids Res., 18, 3587-3596 (1990)]、L L - C G、C L - C G、C S - C G、C L G [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、p A d e x 1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)] 等が用いられる。プロモーターとしては、ヒト組織中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト C M V) の I E (immediate early) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、S R プロモーター等を挙げることができる。また、ヒト C M V の I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

パッケージング細胞への組換えウイルスベクターの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075号公報]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等を挙げることができる。

【 0 1 6 5 】

また、上記組換えウイルスベクターの投与方法としては、上記 9 の方法に加え、リポソームデリバリーを用いる直接的イン・ビボ (in vivo) 遺伝子移入と組み合わせることにより、心臓病巣にウイルスベクターを指向させるようにすることもできる。

すなわち、適当なサイズのペリオスチンパリアント (b e) をコードする D N A を、アデノウイルス・ヘキソタンパク質に特異的なポリリジン - コンジュゲート抗体と組み合わせてコンプレックスを作製し、得られたコンプレックスをアデノウイルスベクターに結合させることにより、ウイルスベクターを調製することができる。該ウイルスベクターは安定に標的細胞に到達し、エンドソームにより細胞内に取り込まれ、細胞内で分解され効率的に遺伝子を発現させることができる。

【 0 1 6 6 】

ペリオスチンパリアント (b e) 遺伝子の D N A は、非ウイルス遺伝子移入法によっても病巣に輸送することができる。

当該分野で公知の非ウイルス遺伝子移入法には、リン酸カルシウム共沈法 [Virology, 52, 456-467 (1973) ; Science, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980) ; Cell, 27, 223-231 (1981) ; Nature, 294, 92-94 (1981)]、リポソームを介した膜融合 - 介在移入法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987) ; Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989) ; J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989) ; Hum. Gene Ther., 3, 267-275, (1992) ; Science, 249, 1285-1288 (1990) ; Circulation, 83, 2007-2011 (1992)] あるいは直接 D N A 取り込み及び受容体 - 媒介 D N A 移入法 [Science, 247, 1465-1468 (1990) ; J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991) ; J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989) ; BioTechniques, 11, 474-485 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990) ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991) ; Hum

10

20

30

40

50

. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)]等を挙げることができる。

【 0 1 6 7 】

リポソームを介した膜融合 - 介在移入法ではリポソーム調製物を標的とする組織に直接投与することにより、当該組織の局所的な遺伝子の取り込み及び発現が可能であることが腫瘍に関する研究において報告されている [Hum. Gene Ther. 3, 399-410 (1992)]。従って同様の効果が心臓病巣でも期待される。DNAを心臓病巣に直接標的化するには、直接DNA取り込み技術が好ましい。受容体 - 媒介DNA移入は、例えば、ポリリジンを介して、タンパク質リガンドにDNA (通常、共有的に閉環したスーパーコイル化プラスミドの形態をとる) をコンジュゲートすることによって行う。リガンドは、標的細胞又は組織の細胞表面上の対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択する。当該リガンド - DNAコンジュゲートは、所望により、血管に直接注射することができ、受容体結合及びDNA - タンパク質コンプレックスの内在化が起こる標的組織に指向し得る。DNAの細胞内破壊を防止するために、アデノウイルスを同時感染させて、エンドソーム機能を崩壊させることもできる。

10

【 実施例 】

【 0 1 6 8 】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 1 6 9 】

《 実施例 1 : 急性心筋梗塞後の梗塞部位における種々のペリオスチンバリエントの発現検討 》

20

急性心筋梗塞後の梗塞部位におけるペリオスチンバリエントの発現を検討するために、C57BL/6マウスに急性心筋梗塞を起こさせた後(0、1、2、3、4、5、6、7、14、28日後)のこの梗塞部位におけるmRNAを精製し、RT-PCRを行った。PCR産物は電気泳動により分析した。急性心筋梗塞は、実施例2の(3)に記載する方法に従って、左室下行冠動脈の結さつにより引き起こした。

【 0 1 7 0 】

図1に示すように、ペリオスチンはC末端において種々バリエントが存在しており、各バリエントとペリオスチンの機能との相関が考えられたことから、C末端に注目して、ペリオスチンバリエント (b) : 領域 b の位置にスプライシングがあるもの
ペリオスチンバリエント (e) : 領域 e の位置にスプライシングがあるもの
ペリオスチンバリエント (b e) : 領域 b 及び領域 e の位置にスプライシングがあるもの

30

完全長ペリオスチン : スプライシングがないもの

が判別できるように、下記プライマーを設計した。なお、配列番号12 [マウス・全長ペリオスチンのcDNA配列 (シグナル含む)] において、塩基番号1900 ~ 1968が領域 a 1、1969 ~ 2013が領域 a 2、2014 ~ 2094が領域 b、2095 ~ 2184が領域 c 1、2185 ~ 2274が領域 c 2、2275 ~ 2352が領域 d、2353 ~ 2436が領域 e、2437 ~ 2478が領域 f 1、2479 ~ 2514が領域 f 2である。

40

【 0 1 7 1 】

配列番号 1 6 :

P 1 F 5 ' - g a t a a a a t a c a t c c a a a t c a a g t t t g t t c g - 3 '

配列番号 1 7 :

P 1 R 5 ' - c g t g g a t c a c t t c t g g t c a c c g t t t c g c - 3 '

配列番号 1 8 :

P 2 F 5 ' - c t g a a a a a c a g a c t c g g g a a g a a c g - 3 '

配列番号 1 9 :

P 2 R 5 ' - a a a c t c t g t g g t c t g g c c t c t g g g - 3 '

50

配列番号 20 :

P 3 F 5' - g a t a a a a t a c a t c c a a a t c a a g t t t g t t c g - 3'

配列番号 21 :

P 3 R 5' - a a a c t c t g t g g t c t g g c c t c t g g g - 3'

配列番号 22 :

g a p d h F 5' - a c t t t t g t c a a g c t c a t t t c c - 3'

配列番号 23 :

g a p d h R 5' - t g c a g c g a a c t t t a r r g c t g - 3'

【0172】

領域 b のスプライシングの有無は、上記プライマー P 1 F 及びプライマー P 1 R の組合せ (プライマーセット 1) を使用して判別することができる。図 1 において、236 bp に検出されるバンドは、b の位置にスプライシングが起こっていないものであり、155 bp に検出されるバンドは、b の位置にスプライシングが起こっているものである。

領域 e のスプライシングの有無は、上記プライマー P 2 F 及びプライマー P 2 R の組合せ (プライマーセット 2) を使用して判別することができる。325 bp に検出されるバンドは、e の位置にスプライシングが起こっていないものであり、241 bp に検出されるバンドは、e の位置にスプライシングが起こっているものである。

領域 b 及び領域 e の同時スプライシングの有無は、上記プライマー P 3 F 及びプライマー P 3 R の組合せ (プライマーセット 3) を使用して判別することができる。685 bp に検出されるバンドは、b 及び e のいずれの位置にもスプライシングが起こっていないものであり、493 bp に検出されるバンドは、b 及び e の位置に同時にスプライシングが起こっているものである。なお、493 bp と 685 bp の間に薄く検出されているバンドは、b 又は e の位置にスプライシングが起こっているものである。

コントロールとして、G A P D H の発現を、プライマー g a p d h F 及びプライマー g a p d h R の組合せを使用して確認した。

【0173】

図 1 に示すように、急性心筋梗塞後 3 日後及び 4 日後では、b 及び e の位置にスプライシングが起こっているペリオスチンバリエーション (b e) のみが発現していた。次いで 5 日後及び 7 日後では、ペリオスチンバリエーション (b e) に加え、ペリオスチンバリエーション (b) あるいはペリオスチンバリエーション (e) の発現も少し増加した。28 日後には、ペリオスチンバリエーション (b e) の発現は減少し、ペリオスチンバリエーション (b) あるいはペリオスチンバリエーション (e) あるいは完全長ペリオスチンの発現が増加した。

このことから、急性心筋梗塞から回復される過程で、各スプライスバリエーションの機能の違いがあり、特に、傷害の回復初期には、ペリオスチンバリエーション (b e) が重要な役割を果たしていることが予想された。

【0174】

《実施例 2 : ペリオスチンノックアウトマウスの作製と性状観察》

本実施例では、Kitajima et al, 2000 development. 127:3215-3226 に記載された方法に従って、ペリオスチンノックアウトマウスを、C r e 組み換えによって作製した。具体的な手順を以下に示す。

【0175】

(1) ターゲティングベクターの作製

ペリオスチン遺伝子のエクソン 1 を含む B A C クローンは、定法に従って、マウス C 5 7 B L 6 / J B A C ライブラリーから単離した。ターゲティングの工程を図 2 に示す。まず、7.3 kb (XhoI-EcoRI) 断片及び 1.2 kb (XbaI-BglII) 断片の二つの相同遺伝子断片を、PGK-Neo-PGK-DT-A カセットにサブクローニングした。直鎖化されたベクター (50 µg) を、Yagi et al., 1993 Anal Biochem.

214:70-76 に記載の方法に従って、T T 2 E S 細胞にエレクトロポレーションした。この中から、G 4 1 8 耐性 E S クローンを 2 クローン選択し (#51 及び #1051)、neo 特異

10

20

30

40

50

的プライマー P G K - R 及びペリオスチングノミックプライマー P e r i - R 4 を使用して、P C R により相同組み換えが起きていることを確認した。更に、これらのクローンについて、定法に従ってサザンプロット法によっても確認した。

これらの検討により、ペリオスチンノックアウトマウス作製のターゲティングベクターが作製できていることがわかった。

配列番号 2 4 :

P G K - R 5 ' - C T A A A G C G C A T G C T C C A G A C T - 3 ' ,

配列番号 2 5 :

P e r i - R 4 5 ' - G C A C C T G C C T C T T C C C A A T T A C A G G - 3 ' ,

【 0 1 7 6 】

(2) ペリオスチンノックアウトマウスの作製

次に、Kitajima et al,

2000 Development. 127:3215-3226に記載の方法に従って、凝集方法によって、キメラマウスを作製した。キメラのジャームラインは、上記で作製した E S 細胞クローン (#51あるいは#1051) を使用して作製した。T T 2 遺伝子バックグラウンド (アグーチコート色素によってモニターされる) の高い寄与によって、I C R マウスに育種された。# 5 1 キメラマウスは、n e o カセットを除くために、Sakai and Miyazaki, 1997 Biochem. Biophys. Res. Commun. 237:318-324に記載の C A G - C r e マウスと交配させ、それらの樹立マウスは、C 5 7 B L / 6 マウスに育種された。その結果、ペリオスチン遺伝子を欠如した対立遺伝子を持つマウスは、少なくとも 6 世代の間に、C 5 7 B L 6 / J マウスに戻し交配された。

【 0 1 7 7 】

ペリオスチン + / + マウス (ペリオスチン野生マウス) 及びペリオスチン - / - マウス (ペリオスチンノックアウトマウス) の遺伝子型を調べるために、ペリオスチン遺伝子のイントロン内の特異的なプライマーを使用して P C R を行った。ペリオスチン野生マウスの検出のためには、プライマー W i l d - F とプライマー W i l d - R との組合せを使用した。ペリオスチンノックアウトマウスの検出のためには、プライマー N o c k - F とプライマー N o c k - R との組合せを使用した。

この検討により、ノックアウトマウスが作製できていることを確認した。

配列番号 2 6 :

W i l d - F 5 ' - g t t c t t a c a g a a a g c a g a a g g a t a c - 3 ' ,

配列番号 2 7 :

W i l d - R 5 ' - t t a a a t c a c t c c a c a g c a g a a c a c g - 3 ' ,

配列番号 2 8 :

N o c k - F 5 ' - c a t g a t a g c t t c t c t c c c a g t t c t c - 3 ' ,

配列番号 2 9 :

N o c k - R 5 ' - c t t g c a a t a a g t a a a a c a g c t c c c c - 3 ' ,

【 0 1 7 8 】

(3) ペリオスチンノックアウトマウスの性状観察

上記のようにして作製したペリオスチンノックアウトマウスの性状を検討した。ペリオスチンノックアウトマウスの胚形成は、見かけ上正常であった。生まれた後も、切歯の萌出 (eruption) 以外は、繁殖性を含めて健康に見えた。更に、これらのマウスは、2, 3 週間以上生存した。また、成長した心臓において検討したが、8 週令あるいは 10 週令のマウスでも、心筋・心室運動・弁機能・脈動・血圧における心筋細胞の異常はなく、大人の心筋においても重要な症状は認められなかった。

【 0 1 7 9 】

そこで、上記のノックアウトマウスに、左室下行冠動脈の結さつにより、急性心筋梗塞を引き起こした (LAD ligation法)。前記操作は、Michael, 1995 Am J

10

20

30

40

50

Physiol Heart Circ Physiol. 269:H2147-2154に記載の方法に従って行ったが、具体的手順を以下に示す。麻酔下において、8週令マウスに挿管し、げっ歯類用の人工呼吸器(SAR-830AP, CWE社製)に固定した。中程度の胸開術を行い、左室下行冠動脈を選び、7-0ナイロン縫合糸で動脈の周りを回り縛った。梗塞は、左室(LV)の変色から明らかであった。最後に、胸穴を閉じた。生理的な測定、組織学的、生物学的分析は、生き残っているマウスでのみ検討した。少なくとも5匹のマウスから心中央部(mid-part)セクションを使用して、上記文献(Michael et al, 1995)に記載の方法によって、梗塞の大きさ決定したり、危険性のある領域を調べた。

【0180】

正常なコントロールの状態と、急性心筋梗塞の後において、ペリオスチン-/-マウス(ペリオスチンノックアウトマウス)と、ペリオスチン+/+マウス(ペリオスチンキメラマウス)と、ペリオスチン+/+マウス(ペリオスチン正常マウス)の間で、体重や心拍数に大きな違いはなかった。更に、急性心筋梗塞の後、1日後、7日後、28日後において、ペリオスチンノックアウトマウスとペリオスチン正常マウスの間で梗塞の大きさに違いはなかった。これらの結果を表1に示す。

表1における各測定項目に関して、BWは体重(g)を意味し、以下、同様に、HRは心拍数(拍/分)を、LVEDDは左室拡張末期径(mm)を、LVESDは左室収縮末期径(mm)を、AWは前壁厚(mm)を、PWは後壁厚(mm)を、FSは左室径短縮率(%)を、ISは梗塞の大きさ(%)を、それぞれ、意味する。また、表1に示す記号「a」は、急性心筋梗塞を引き起こしたペリオスチン+/+マウスに対して $P < 0.05$ であることを示す。

【0181】

【表1】

ペリオスチン	対照		1日後		7日後		28日後	
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
BW (g)	20.4 ± 0.3	20.3 ± 0.3	20.4 ± 0.5	20.4 ± 0.6	20.1 ± 0.3	19.7 ± 0.4	24.3 ± 0.4	24.3 ± 0.5
HR (beats/min)	458 ± 14	461 ± 9	425 ± 14	415 ± 14	397 ± 23	408 ± 15	458 ± 12	461 ± 21
LVEDD (mm)	3.44 ± 0.05	3.41 ± 0.03	3.82 ± 0.06	3.82 ± 0.06	4.66 ± 0.19	4.15 ± 0.03 ^a	5.19 ± 0.17	4.48 ± 0.23 ^a
LVESD (mm)	1.76 ± 0.03	1.73 ± 0.02	2.88 ± 0.08	2.88 ± 0.08	3.66 ± 0.24	3.09 ± 0.04 ^a	4.47 ± 0.20	3.53 ± 0.29 ^a
AW (mm)	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.02
PW (mm)	0.60 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.63 ± 0.02
FS (%)	48.9 ± 0.6	49.2 ± 0.3	24.7 ± 1.0	24.6 ± 1.5	21.9 ± 2.4	25.6 ± 0.9	14.3 ± 1.5	22.1 ± 2.9 ^a
IS (%)	-	-	50.9 ± 2.4	51.1 ± 3.7	50.1 ± 2.7	49.4 ± 3.3	46.8 ± 2.1	45.5 ± 2.4

【0182】

一方、急性心筋梗塞の後、ペリオスチンノックアウトマウスの生存率は、ペリオスチン正常マウスよりも非常に低かった。なお、ペリオスチンキメラマウスは、ペリオスチン正常マウスと同程度であった。これらの結果を図3に示す。この結果から、ペリオスチンノックアウトマウスでは有意に心破裂が観察され、該ノックアウトマウスではペリオスチンが無いために、梗塞部位が修復されずに力学的に弱い組織になっており、その結果として心破裂しやすくなっていたことを明らかにした。

【0183】

《実施例3：ペリオスチンノックアウトマウスへのペリオスチンバリエント(b e)の発現》

(1) ペリオスチンバリエント(b e)発現用アデノウイルスの作製

市販の発現用キット(Adeno-X

expression system2; BD Bioscience社製)を使用して、ペリオスチンバリエント(b e)発現用アデノウイルスベクターとしてAd-b eベクターを、全長ペリオスチン発現用ウイルスベクターとしてAd-Fullベクターを、コントロール用としてAd-nls LacZベクターを、それぞれ、作製した。ペリオスチンバリエント(b e)タンパク質をコードするcDNAとしては、配列番号4で表される塩基配列からなるcDNAを使用し、全長ペリオスチンをコードするcDNAとしては、配列番号12で表さ

れる塩基配列からなる c D N A を使用した。

ウイルスの精製は、Ugai, 2005

BBRC. 331:1053-1060の記載の方法に従って、塩化セシウム法により行った。

【 0 1 8 4 】

(2) ペリオスチンノックアウトマウスでのペリオスチンバリエーション (b e) の発現と性状観察

急性心筋梗塞 (LAD ligation法による) を起こさせる 1 日前に、上記で作製した各ウイルス (A d - b e ウイルス、A d - F u l l ウイルス、又は A d - n l s L a c Z ウイルス) を含む溶液 (1.6×10^{10} pfu, 100 μ L) をペリオスチンノックアウトマウスに尾静脈注射にて投与した。

10

【 0 1 8 5 】

急性心筋梗塞を起こさせた後、それぞれのウイルスを投与したペリオスチンノックアウトマウスの性状を観察した。ペリオスチンノックアウトマウスに A d - b e ウイルスを投与すると心破裂が約 5 0 % まで回復した。一方で、A d - F u l l ウイルスを投与した場合は、約 3 0 %、A d - n l s L a c Z ウイルスを投与した場合は、約 2 0 % 程度しか回復しなかった。

全長ペリオスチンでは、心破裂の度合いも梗塞の修復も改善されなかったが、ペリオスチンバリエーション (b e) では、いずれも有意に改善された。このことから、急性心筋梗塞からの回復において、特にペリオスチンバリエーション (b e) が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

20

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 8 6 】

本発明は、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防、更には、心筋壊死を伴う疾患の検査やモニタリングの用途に適用することができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

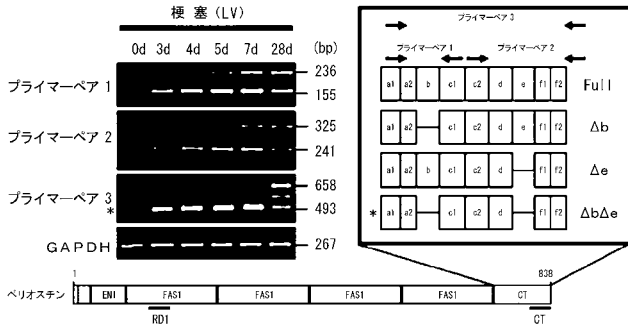
【 配列表フリーテキスト 】

【 0 1 8 7 】

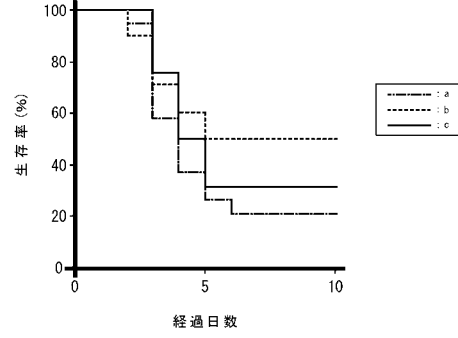
配列表の配列番号 1 6 ~ 2 9 の各塩基配列はプライマー配列であり、具体的には、プライマー P 1 F (配列番号 1 6)、プライマー P 1 R (配列番号 1 7)、プライマー P 2 F (配列番号 1 8)、プライマー P 2 R (配列番号 1 9)、プライマー P 3 F (配列番号 2 0)、プライマー P 3 R (配列番号 2 1)、プライマー g a p d h F (配列番号 2 2)、プライマー g a p d h R (配列番号 2 3)、プライマー P G K - R (配列番号 2 4)、プライマー P e r i - R 4 (配列番号 2 5)、プライマー W i l d - F (配列番号 2 6)、プライマー W i l d - R (配列番号 2 7)、プライマー N o c k - F (配列番号 2 8)、プライマー N o c k - R (配列番号 2 9) である。

30

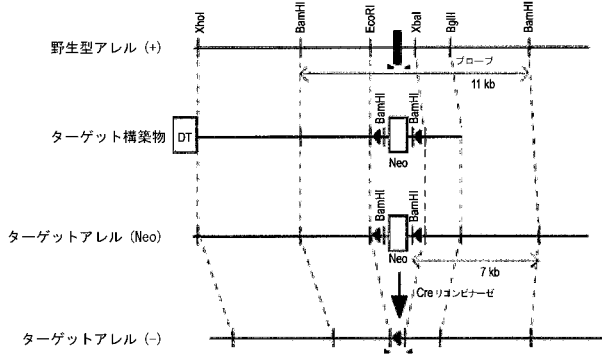
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】

```

          →a1
          GACACACCTGTTGGAA
          D--T--P--V--G--
          →a2
ATGATCAACTGCTGGAAACTTAATAAATTAATCAAATACATCCAAATTAAGTTGTTC
N--D--Q--L--L--E--I--L--N--K--L--I--K--Y--I--Q--I--K--F--V--
          →b
GTGGTAGCACCTTCAAAGAAATCCCGTGACTGCTATACAACATAAAATTAACAACAAG
R--G--S--T--F--K--E--I--P--V--T--V--Y--T--T--K--I--I--T--K--
          →c1
TTGTGGAACCAAAAATTAAGTGATTGAAGGCAGCTTCAGCCTATTATCAAACGAAG
V--V--E--P--K--I--K--V--I--E--G--S--L--Q--P--I--I--K--T--E--
          →c2
GACCCACACTAACAAAAGTCAAATTAAGGTGAACCTGAATTCAGACTGATTAAGAAG
G--P--T--L--T--K--V--K--I--E--G--E--P--E--F--R--L--I--K--E--
          →d
GTGAAACAATAACTGAAGTGATCCATGGAGAGCCAAATTAATAAAAATACACCAAAATCA
G--E--T--I--T--E--V--I--H--G--E--P--I--I--K--K--Y--T--K--I--
          →e
TTGATGGAGTGCCTGTGAAATAACTGAAAAAGAGACACGAGAAGAACAATCATTACAG
I--D--G--V--P--V--E--I--T--E--K--E--T--R--E--E--R--I--I--T--
          →f1
GTCCTGAAATAAATAACATAGGATTTCTACTGGAGTGGAGAAACAGAAGAACTCTGA
G--P--E--I--K--Y--T--R--I--S--T--G--G--G--E--T--E--E--T--L--
          →f2
AGAAATGTTACAAGAAGGTCACCAAGGTCACCAATTCATTGAAGGTGGTATGGTTC
K--K--L--L--Q--E--E--V--T--K--V--T--K--F--I--E--G--G--D--G--
          →f3
ATTTATTTGAAGATGAAGAAATTAAGGACTGCTTCAGGGAGACACCCCTGAGGAAGT
H--I--F--E--D--E--E--I--K--R--L--L--Q--G--D--T--P--V--R--K--
          →f4
TGCAAGCCACAAAAGTTCAGGATCTAGAAGACGATTAAGGGAAGTCTGTTCTCAGT
L--Q--A--N--K--K--V--Q--G--S--R--R--R--L--R--E--G--R--S--Q--
GA

```

【配列表】

2010007701000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年4月21日(2011.4.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペリオスチンバリエーション(b e)ポリペプチドを有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項2】

[a] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列との同一性が60%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

を有効成分として含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項3】

前記医薬が心臓機能改善作用を有する、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項4】

前記医薬が心臓再生促進作用を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項5】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリエーション(b e)ポリペプチドの使用。

【請求項6】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

[a] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

[b] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド；又は

[c] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列との同一性が60%以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチド

の使用。

【請求項7】

前記医薬が心臓機能改善作用を有する、請求項5又は6に記載の使用。

【請求項8】

前記医薬が心臓再生促進作用を有する、請求項5～7のいずれか一項に記載の使用。

【請求項9】

ペリオスチンバリエーション(b e)をコードするポリヌクレオチドを含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項10】

[a] 配列番号3、配列番号6、又は配列番号9で表されるアミノ酸配列を含むポリペプ

チドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 1 1】

前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、請求項 9 又は 10 に記載の医薬。

【請求項 1 2】

前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項 1 3】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、ペリオスチンバリアント (b e) をコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 1 4】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、

[a] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[b] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

[c] 配列番号 3、配列番号 6、又は配列番号 9 で表されるアミノ酸配列との同一性が 60 % 以上であるアミノ酸配列を含み、且つ、心筋壊死部位を修復する活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

[d] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド

の使用。

【請求項 1 5】

前記医薬が、心臓機能改善作用を有する、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記医薬が、心臓再生促進作用を有する、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 7】

[a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA；

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA；又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

【請求項 1 8】

ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含有する、心筋壊死を伴う疾患の検査薬。

【請求項 19】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は cDNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA ;

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA ; 又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を用いて、前記検査検体由来 DNA 又は cDNA における、ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA の変異を検出する工程、及び

(3) 前記変異に基づいて、心筋壊死を伴う疾患のリスク、種類、程度、及び / 又は状態を判定する工程

を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

【請求項 20】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検査検体由来 DNA 又は cDNA を調製する工程、

(2) [a] ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA、若しくはその部分断片である DNA ;

[b] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列からなる DNA、若しくはその部分断片である DNA ; 又は

[c] 配列番号 1、配列番号 4、又は配列番号 7 で表される塩基配列における連続した 5 ~ 60 塩基からなる配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体、前記オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド若しくはその誘導体

を用いて、前記検査検体由来 DNA 又は cDNA における、ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドをコードする DNA を特異的に増幅し、その発現量を分析する工程、及び

(3) 前記発現量に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の程度及び / 又は状態を判定する工程を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

【請求項 21】

(1) 検査対象より取得した生体試料から検体を調製する工程、

(2) ペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、前記検体中のペリオスチンバリアント (b e) ポリペプチドの発現量及び / 又は構造変化を検出する工程、及び

(3) 前記発現量及び / 又は構造変化に基づいて、心筋壊死を伴う疾患の危険性、原因、程度、及び / 又は状態を判定する工程

を含む、心筋壊死を伴う疾患の検査方法。

【請求項 22】

(i) 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞における前記ポリペプチドの発現量と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の前記ポリペプチドの発現量とを比較し、前記ポリペプチドの発現量を増大させる物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

【請求項 23】

(i) 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞の機能と、(ii) 前記ポリペプチドを発現する細胞と試験物質を接触させた場合の細胞の機能とを比較し、細胞の機能を制御する活性を有する物質を選択することを特徴とする、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬のスクリーニング方法。

【請求項 24】

前記細胞が、ペリオスチンをコードする遺伝子を欠如している細胞である、請求項 2 2 又は 2 3 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 2 5】

心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓機能改善作用を有する物質である、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬が、心臓再生促進作用を有する物質である、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法によって得られる化合物、又はその薬理的に許容される塩。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の化合物、又はその薬理的に許容される塩を含有する、心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 2 9】

心臓機能改善作用を有する医薬である、請求項 2 8 に記載の心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 3 0】

修復心臓再生促進作用を有する医薬である、請求項 2 8 に記載の心筋壊死を伴う疾患の治療又は予防のための医薬。

【請求項 3 1】

心筋壊死を伴う疾患の治療のための医薬の製造における、請求項 2 7 に記載の化合物、又はその薬理的に許容される塩の使用。

【請求項 3 2】

ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質を特異的に認識する抗体。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の抗体を用いることを特徴とする、ペリオスチンバリエント (b e) タンパク質の免疫学的検出又は定量方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/072743
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
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) A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P9/10, C07K16/18, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07K14/47, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shimazaki M. et al., Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction, Journal of Experimental Medicine, 2008, Vol.205, No.2, pages 295 to 303, ISSN: 0022-1007	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	Kuhn B. et al., Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair, Nature Medicine, 2007, Vol.13, No.8, pages 962 to 969, ISSN: 1078-8956	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	Stanton L.W. et al., Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction, Circulation Research, 2000, Vol.86, No.9, pages 939 to 945, ISSN: 0009-7330	1-4,9-16, 21-34,41,42
<input checked="" 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	"T" 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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 February, 2009 (24.02.09)	Date of mailing of the international search report 10 March, 2009 (10.03.09)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/072743

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kim C.J. et al., Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis, International Journal of Oncology, 2008, Vol.32, No.1, pages 161 to 169, ISSN: 1019-6439	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	KIM Chol Jang et al., "Periostin no alternative splicing variants to Akuseika Oyobi Shinjun·Ten'i tonon Kanren", Nihon Gan Gakkai Gakujutsu Sokai Kiji, 28 August, 2006 (28.08.06), Vol.65th, page 302, P-572	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	KIM Chol Jang et al., "Periostin no alternative splicing to Bokogan no Akuseika Oyobi Shinjun·Ten'i tonon Kanrensei no Kaiseki", The Japanese Journal of Urology, 10 March, 2006 (10.03.06), Vol.97, No.2, page 234, APP-023, ISSN: 0021-5287	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	Litvin J. et al., Expression and function of periostin-isoforms in bone, Journal of Cellular Biochemistry, 2004, Vol.92, No.5, pages 1044 to 1061, ISSN: 0730-2312	1-4,9-16, 21-34,41,42
Y	Horiuchi K. et al., Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta, Journal of Bone and Mineral Research, 1999, Vol.14, No.7, pages 1239 to 1249, ISSN: 0884-0431	1-4,9-16, 21-34,41,42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/072743

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n,
C12N15/09(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/072743

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5-8, 17-20, 39
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5 to 8, 17 to 20 and 39 include the methods for treatment or diagnosis of the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) (Continued to extra sheet)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/072743

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/072743									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照											
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. A61K38/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P9/10, C07K16/18, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, C07K14/47, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使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) BIOSIS (STN), Caplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)											
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	Shimazaki M. et al., Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction, Journal of Experimental Medicine, 2008, Vol.205, No.2, pages 295 to 303, ISSN: 0022-1007	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42									
<input checked="" 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」優先権主張に疑義を提起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		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 24.02.2009		国際調査報告の発送日 10.03.2009									
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 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小森 潔	4C 3762								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 7 2 7 4 3
C (続き) . 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
Y	Kuhn B. et al., Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair, Nature Medicine, 2007, Vol.13, No.8, pages 962 to 969, ISSN: 1078-8956	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	Stanton L.W. et al., Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction, Circulation Research, 2000, Vol.86, No.9, pages 939 to 945, ISSN: 0009-7330	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	Kim C.J. et al., Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis, International Journal of Oncology, 2008, Vol.32, No.1, pages 161 to 169, ISSN: 1019-6439	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	金哲将他, Periostin の alternative splicing variants と悪性化および浸潤・転移との関連, 日本癌学会学術総会記事, 2006.08.28, Vol.65th, page 302, P-572	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	金哲将他, Periostin の alternative splicing と膀胱癌の悪性化および浸潤・転移との関連性の解析, 日本泌尿器科学会雑誌, 2006.03.10, Vol.97, No.2, page 234, APP-023, ISSN: 0021-5287	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	Litvin J. et al., Expression and function of periostin-isoforms in bone, Journal of Cellular Biochemistry, 2004, Vol.92, No.5, pages 1044 to 1061, ISSN: 0730-2312	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42
Y	Horiuchi K. et al., Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta, Journal of Bone and Mineral Research, 1999, Vol.14, No.7, pages 1239 to 1249, ISSN: 0884-0431	1-4, 9-16, 21-34, 41, 42

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/072743

発明の属する分野の分類

A61K38/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i,
C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i,
C07K14/47(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 7 2 7 4 3

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5-8, 17-20, 39 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 5-8, 17-20, 39 は、人体の治療方法あるいは診断方法を包含するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 35-38, 40 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページ参照
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2007年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/072743

第 I I 欄 2. について

請求の範囲 35-38, 40 に記載の化合物、あるいは、該化合物を含有する医薬は、「請求の範囲 30-34 に記載されるスクリーニング方法」によって特定されており、当該スクリーニング方法で得られるあらゆる化合物及び医薬を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法で得られる化合物及び医薬としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲 35-38, 40 は、PCT 第 5 条の意味での開示を欠き、また、PCT 第 6 条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。

さらに、出願時の技術常識を勘案しても、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、請求の範囲 35-38, 40 は著しく不明確であり、PCT 第 6 条における明確性の要件も欠いている。

したがって、請求の範囲 35-38, 40 に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA02 EA02
 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 HA08 HA09 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QR08 QR32 QR33 QR42 QR48 QR56
 QR59 QR62 QR66 QR69 QR77 QR80 QR82 QS03 QS05 QS12
 QS16 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX02
 4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA02 BA35 DA40 NA14 ZA362 ZB212
 4C085 AA13 AA19 BB11 CC21 DD62 DD63 DD88 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZB21
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 GA26

(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。

专利名称(译)	用于治疗伴随心肌坏死和试验药物的疾病的药物		
公开(公告)号	JPWO2010007701A1	公开(公告)日	2012-01-05
申请号	JP2010520730	申请日	2008-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京工业大学 三菱化学美迪恩斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京工业大学 三菱化学有限公司Medience		
[标]发明人	工藤明		
发明人	工藤 明		
IPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K39/395 A61P9/10 A61K31/7088 C07K16/18 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09 C07K14/47		
CPC分类号	C12Q1/6883 A61K38/00 A61K48/00 A61K48/005 C07K14/47 C12N2799/022 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2500/10 G01N2800/324		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K48/00 A61K39/395 A61P9/10 A61K31/7088 C07K16/18 C12Q1/68.A C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA35 4C084/DA40 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZB212 4C085/AA13 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZB21 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2008187851 2008-07-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

骨膜素变体 ($\Delta b\Delta e$) 多肽或其变体, 或包含编码其的多核苷酸作为活性成分的药物, 用于治疗或预防与心肌坏死相关的疾病; 编码骨膜素变体 ($\Delta b\Delta e$) 多肽 公开了一种与心肌坏死有关的疾病的测试剂, 其包含特异性识别DNA或其部分片段的抗体, 或骨膜素变体 ($\Delta b\Delta e$) 多肽。

【表1】

	対照		1日後		7日後		28日後	
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
ペリオステシ								
BW (g)	20.4 ± 0.3	20.3 ± 0.3	20.4 ± 0.5	20.4 ± 0.6	20.1 ± 0.3	19.7 ± 0.4	24.3 ± 0.4	24.3 ± 0.5
HR (beats/min)	458 ± 14	461 ± 9	425 ± 14	415 ± 14	397 ± 23	408 ± 15	458 ± 12	461 ± 21
LVEDD (mm)	3.44 ± 0.05	3.41 ± 0.03	3.82 ± 0.06	3.82 ± 0.06	4.66 ± 0.19	4.15 ± 0.03 ^a	5.19 ± 0.17	4.48 ± 0.23 ^a
LVESD (mm)	1.76 ± 0.03	1.73 ± 0.02	2.88 ± 0.08	2.88 ± 0.08	3.66 ± 0.24	3.09 ± 0.04 ^a	4.47 ± 0.20	3.53 ± 0.29 ^a
AW (mm)	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.02
PW (mm)	0.60 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.63 ± 0.02
FS (%)	48.9 ± 0.6	49.2 ± 0.3	24.7 ± 1.0	24.6 ± 1.5	21.9 ± 2.4	25.6 ± 0.9	14.3 ± 1.5	22.1 ± 2.9 ^a
IS (%)	-	-	50.9 ± 2.4	51.1 ± 3.7	50.1 ± 2.7	49.4 ± 3.3	46.8 ± 2.1	46.5 ± 2.4