

(19)日本国特許庁(J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 113200

(P2003 - 113200A)

(43)公開日 平成15年4月18日(2003.4.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド* (参考)
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 17/00		A 6 1 P 17/00	4 H 0 4 5
	17/02	17/02	
	17/06	17/06	

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 305690(P2001 - 305690)

(22)出願日 平成13年10月1日(2001.10.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年6月22日
発行の「第8回分子皮膚科学フォーラム」に発表

(71)出願人 301050902

株式会社ロコモジェン

東京都渋谷区渋谷三丁目29番22号

(72)発明者 中島利博

神奈川県横浜市都筑区中川1丁目2-5 港北ガ
ーデンヒルズA棟503号室

(72)発明者 川畑久

鹿児島県鹿児島市天保山町23-1 ロフティ
天保山公園1101

(72)発明者 丸山征郎

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6丁目45番地10

(74)代理人 100081994

弁理士 鈴木 俊一郎 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ケラチノサイトの核内シグナル伝達タンパク質とその臨床利用

(57)【要約】

【課題】カルシウム誘導性ケラチノサイト分化の調節に
関与する核内シグナル伝達タンパク質の機能を利用し
て、様々な臨床的な応用を実現すること。

【解決手段】ケラチノサイト分化調節シグナル伝達因子
およびその生理的機能を通じて、ケラチノサイト増殖・
分化の調節により角化を制御することが可能である。シ
グナル伝達に機能する核内タンパク質、その抗体、リガ
ンドおよびこれらを利用した皮膚の障害または疾患用の
検査・診断の医薬、予防/治療の医薬を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトまたはヒト以外の哺乳動物のケラチノサイトの核内で機能するシグナル伝達タンパク質。

【請求項2】カルシウム(1.2mM)処理した、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物のケラチノサイトから得られる全細胞抽出物を8~10% SDS-PAGE にかけて分離し、ついでニトロセルロース膜に移してウェスタンブロッティングを行い、抗アセチル化リジン抗体を用いる免疫ブロッティングにより検出される請求項1に記載のシグナル伝達タンパク質。

【請求項3】分子量が97kDと推定される請求項1または2に記載のシグナル伝達タンパク質。

【請求項4】分子量が78kDと推定される請求項1または2に記載のシグナル伝達タンパク質。

【請求項5】分子量が70kDと推定される請求項1または2に記載のシグナル伝達タンパク質。

【請求項6】請求項1~5の何れかに記載のタンパク質に対する特異的抗体。

【請求項7】請求項6に記載の特異的抗体を含有してなることを特徴とする診断薬。

【請求項8】請求項7に記載の診断薬を含むことを特徴とする診断検査用キット。

【請求項9】請求項1~5の何れかに記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることによって決定される該タンパク質のリガンド。

【請求項10】請求項9に記載のリガンドのスクリーニング方法。

【請求項11】請求項9に記載のリガンドを含有してなることを特徴とする医薬。

【請求項12】請求項1~5の何れかに記載のシグナル伝達タンパク質とそのリガンドとの結合性に变化を与えることができる化合物またはその塩。

【請求項13】請求項12に記載の化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項14】請求項12に記載の化合物またはその塩を含有してなることを特徴とする医薬。

【請求項15】請求項1~5の何れかに記載のタンパク質の発現量を変化させることができる化合物またはその塩。

【請求項16】請求項15に記載の化合物またはその塩を含有してなることを特徴とする医薬。

【請求項17】請求項1~5の何れかに記載のタンパク質の量を、該タンパク質に特異的な抗体を用いて決定することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、細胞核内のシグナル伝達において機能する核内タンパク質およびその臨床応用に関する。より詳しくは、カルシウム誘導性ケラチノサイト分化などの調節に関与する核内シグナル伝達タンパク

質とその診断的、治療的利用に関する。

【0002】

【発明の技術的背景】ケラチノサイトの増殖・分化は、細胞外カルシウム濃度を始めとする様々な細胞外因子、生理条件により厳密に制御されるが、その調節機構の詳細はこれまで不明であった。細胞外からの刺激、すなわち情報を細胞が受け止め、その情報を細胞核に伝達するまでの過程を、細胞質でのプロセッシングを含むシグナルの伝達と変換、核内へのシグナル伝達、そして遺伝子の発現と転写に繋がる過程としてその機構を解明する研究、およびこれらをケラチノサイトの増殖・分化と結びつける研究も精力的に進められている。

【0003】細胞の増殖および代謝の調節に果たすカルシウムの役割が最初に研究された間葉性細胞、たとえばマウス3T3、ヒトWI-38線維芽細胞(Boyntonら,1974; Boyntonら,1977)は、細胞内カルシウム濃度が0.5mMより低いとG1静止期に移行し、増殖は低下する。ところが表皮ケラチノサイト(角化細胞)は、カルシウム濃度が0.05~0.1mMに低下すると生育と分化を停止するが引き続き増殖し、0.1mMよりも高くなると分化を始める(Stanley and Yaspa, 1983)。低カルシウム培地で培養した表皮単層細胞は、通常の培養媒地でのカルシウム濃度である1.2mMに上げると最終分化に誘導された(Stanley and Yaspa, 1983)。ヒト表皮ケラチノサイトは、インヴォルクリン(involutrin)、フィラグリン(filaggrin)、ロリクリン(loricrin)といった表皮分化マーカーの発現変更を伴って増殖性の基底細胞から上部の角質細胞に分化する(Rice and Green,1979; Fuchs,1990)。細胞外カルシウム濃度が上昇すると、プロテインキナーゼC(PKC)活性化とともに(Dlugosz and Yuspa, 1994)、上記マーカーを誘導する(Henningsら,1980; Yuspaら,1989)。

【0004】真核細胞遺伝子の統合化された同調的転写において、いくつかの核内転写因子、いわゆるコアクチベーター(coactivator)が重要な役割を演ずる(Brownell and Allis, 1996; Janknecht and Hunter, 1996; Montminy, 1997)。性質がよく調べられたコアクチベーターである、CREB(cAMP response element binding protein)結合タンパク質(CREB binding protein; CBP)およびP300/CBP結合因子(P/CAF)は、次の2つの異なる機構により、多数の転写活性化因子とともに遺伝子発現を統合する。1つは、標的プロモーターへの転写装置の動員と関係している(Nakajimaら,1997a, 1997b; Choら, 1998)。他は、ヒストンのリジン残基のイブシロン()アミノ基にアセチル基を転移する固有の酵素活性であり、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT; histone acetyltransferase)として作用する(Ogryzkoら,1996; Grunstein,1997; Mizzen and Allis,1998; Struhl,1998)。これらのHAT活性は、転写調節に関連づけられて来た(Wolffe and

Pruss, 1996)。その関与は、過剰にアセチル化されたヒストンのDNAとの相互作用の非安定化および結果的に同種DNA結合部位への転写活性化因子の接近を促進するクロマチン構造の変化により説明されてきた(Hebbesら, 1988; Leeら, 1993)。HATもまた、p53、LEF、TFIIIEといったある種のDNA結合タンパク質をアセチル化して、因子アセチルトランスフェラーゼ(factor acetyltransferases; FATS)として機能し、これにより転写活性の増大をもたらす(Gu and Roeder, 1997; Imhofら, 1997; Lillら, 1997; Waltzer and B 10 ienz, 1998)。

【0005】ヒストンのアセチル化状態は、転写の調節に加えて細胞の増殖および分化にも影響を及ぼすと考えられている(Marksら, 2000; Zhouら, 2000)。核内のアセチル化/脱アセチル化と分化/発生との関連が多くの研究により示されてきた(Puriら, 1997; Kawasakiら, 1998; Shi and Mello, 1998; Sartorelliら, 1999; Thomasら, 2000)。カルシウムは、ヒストンデアセチラーゼと相互作用をするMEF2の転写抑制を調節することにより筋肉分化に重要な役割を担っている(Miskaら, 199 20 9; McKinseyら, 2000; Younら, 2000)。

【0006】本発明者らは、ケラチノサイトにおいてカルシウムが誘導する分化とHAT活性化との関係に着目し、カルシウム刺激に対応する核内アセチル化(nuclear acetylation; NA)について、アセチル化リジン(acetylated lysine; AK)に対する特別な抗体(Kawaharaら, 1999)を使用することにより鋭意研究を進めた。その結果、本発明者らはカルシウムが、PKCシグナル伝達経路を介してHAT活性ならびにNAパターンの変化を誘導することを見出した。さらに、CBPでは 30 なくむしろP/CAF(p300/CBP associated factor)のHAT活性が、FATとして振舞うことによりケラチノサイト分化に関与している可能性も見出した。多くの異なる細胞機能に関与していると示唆されている前骨髄性白血病(promyelocytic leukemia; PML)ヌクレアーボディー(nuclear body)(Seeler and Dejean, 1998)とNAとの関連も明らかにした。本発明はこれらの知見に基づき、ケラチノサイト分化の調節に関するシグナル伝達因子である核タンパク質およびその生理的機能を利用することにより、ケラチノサイトの増殖・分化 40 の調節を通じて、角化の制御、異常の診断薬、予防/治療する医薬を完成した。

【0007】

【発明の目的】本発明は、カルシウム誘導性ケラチノサイトの増殖・分化の調節に関与する細胞核内シグナル伝達タンパク質の機能を利用して、様々な臨床診断的な応用を実現することを目的とする。すなわち、シグナル伝達に機能する核内タンパク質に対する抗体、リガンド、該タンパク質の発現量を変化させ得る化合物などおよび 50 これらを利用した診断的利用を提供することを目的とす

る。

【0008】

【発明の概要】本発明のシグナル伝達タンパク質は、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物のケラチノサイトの核内で機能するタンパク質である。本発明の上記シグナル伝達タンパク質は、カルシウム(1.2mM)処理した、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物のケラチノサイトから得られる全細胞抽出物を8~10%SDS-PAGEにかけて分離し、ついでニトロセルロース膜に移してウェスタンブロッティングを行い、抗アセチル化リジン抗体を用いる免疫ブロッティングにより検出されるタンパク質である。

【0009】本発明の上記シグナル伝達タンパク質は、その分子量が97kDと推定されるタンパク質である。さらに、本発明のシグナル伝達タンパク質には、その分子量が70kDまたは78kDと推定されるタンパク質も含まれる。本発明に係る抗体は、上記タンパク質に対する特異的抗体である。

【0010】本発明の診断薬は、上記特異的抗体を含有してなることを特徴とする診断薬である。本発明の診断検査用キットは、上記診断薬を含むことを特徴とするキットである。本発明のシグナル伝達タンパク質のリガンドは、上記のいずれかのタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることによって決定されるリガンドである。

【0011】本発明は、上記リガンドのスクリーニング方法を提供する。本発明の医薬は、上記リガンドを含有してなることを特徴とする。本発明は、上記シグナル伝達タンパク質とそのリガンドとの結合性に変化を与えることができる化合物またはその塩を含む。本発明は、上記の化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0012】本発明の医薬は、上記化合物またはその塩を含有してなることを特徴とする医薬である。本発明は、上記いずれかに記載のタンパク質の発現量を変化させることができる化合物またはその塩を含む。本発明の医薬は、上記化合物またはその塩を含有してなることを特徴とする医薬である。

【0013】本発明は、上記タンパク質の量をそれに特異的な抗体を用いて決定する方法を提供する。ケラチノサイトの増殖・分化は、細胞外カルシウム濃度により影響を受けるが、本発明者らはその調節過程に、カルシウムシグナル伝達の下流にあるproteinkinase(PKC)を介したHAT活性の関与があること、さらに核内タンパク質の発現とそのアセチル化が関係していることを明らかにした。本発明は、これに基づきアセチル化される核内のシグナル伝達タンパク質の機能を利用した診断治療への応用を実現するものである。すなわち、ケラチノサイトの増殖・分化誘導とその調節に関与する核内タンパク質の発現およびその機能の調節を直接の標的とする生理活性物質の探索およびその決定により、これらの物

質を各種の皮膚疾患の診断薬、予防/治療薬として活用するものである。

【0014】

【発明の具体的説明】上記概要に示された本発明の詳細を、核内のシグナル伝達タンパク質、抗体、検査・診断薬、医薬製剤について順次説明する。なお、本明細書において使用する用語「リガンド」とは、核内シグナル伝達タンパク質に結合するかまたは相互作用し、あるいはP/C A Fによってアセチル化される程度を変更したりして、該タンパク質のシグナル伝達機能を調節する作用を有する低分子化合物または生理活性物質をいう。この場合の「調節」とは、正の作用、即ちシグナル伝達機能の亢進のほか、負の作用、すなわち伝達機能の低下、抑制の両方を含む。

【0015】また本明細書で「タンパク質」とは、その遊離体のほかその塩も含むものであり、両者は公知の方法により容易に相互に変換できる。なお、とくに指定しなくとも本発明にいう「タンパク質」の用語は、その部分ペプチドをも包含する概念で使用している。さらに、この「タンパク質」にはそのカルボキシル末端あるいは末端基以外のカルボキシル基がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR; Rはアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、またはビパロイルオキシメチル基など)の形であるもの、アミノ末端または分子内アミノ酸残基の側鎖(たとえば、アミノ基、水酸基、スルフヒドリル基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な基、たとえばホルミル基、アセチル基、公知の保護基などにより置換されているもの、あるいは糖鎖が結合しているものも含まれる。とくに本発明のタンパク質は、アセチル化の部位、程度がその生理機能と関連するが、アセチル化の有無と程度を問わず本発明の範囲に包含される。

核内シグナル伝達タンパク質

本発明のタンパク質は、P/C A Fによりアセチル化される細胞核内のタンパク質であり、ap97(分子量97kD)、ap78(分子量78kD)、ap70(分子量70kD)と表記する、分子量の異なる3種のタンパク質である。これらのタンパク質は、ケラチノサイトのカルシウム刺激によりその発現とアセチル化が誘導される。下記の方法によりその存在が検出されたこれらの核内タンパク質における発現の変動は、HAT(ヒストンアセチルトランスフェラーゼ)によるアセチル化の度合いである程度知ることができる。これらのタンパク質は、ケラチノサイト分化に関連したシグナル伝達(もしくは変換)機能を担うが、カルシウム刺激の際の動態の相違、PKC阻害剤、P/C A F変異型を使った実験の結果などから生理機能およびその調節は、異なるものと推測される。

・検出

所定のカルシウム処理をしたケラチノサイトから、全細胞抽出物または核抽出液を得る。そうした抽出物は、

一般に用いられる抽出方法に基づいて調製することができる。たとえば、適当な緩衝液(具体的には、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘブス緩衝液など)などにケラチノサイトを懸濁し、細胞を粉碎する。細胞の粉碎方法として、たとえばPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(登録商標)による粉碎、超音波による粉碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる粉碎などが挙げられる。核抽出液は、分画遠心分離法などにより細胞核画分を得て抽出することにより調製できる。このようにして得られた粗抽出物を、8~10%SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gelelectrophoresis)にかけて分離し、ついでニトロセルロース膜に移す。該膜は、0.02%Tween 20を有する25mM Tris-HCl緩衝液(生理食塩水(Tris-HCl buffer saline with 0.02% Tween 20; T-TBS)中に1%B S Aおよび5%ローファットミルクを含むブロッキング液)とともに1時間インキュベートし、つぎに25℃で1時間、抗アセチル化リジン(抗AK)抗体と反応させる。25℃で各10分間、上記T-TBSで3回洗浄後、該膜はペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ、抗マウスもしくは抗ラットIgG(1:3000希釈)で25℃、30分間インキュベートする。タンパク質は、高感度化学発光検出システムを使って可視化される。

【0016】なお、上記の抗アセチル化リジン(抗AK)抗体は、アセチル化リジン(acetylated lysine; AK)に対する特別の抗体であり、その調製法は後述する実施例に記載される。さらにKawaharaらによる既報論文(1999年発行のBiochem. Biophys. Res. Commun.誌、第266巻の417~424頁に掲載された、表題「Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells」の論文)に詳述されている。

・単離

本発明に係るタンパク質は、皮膚組織、ケラチノサイト培養物から抽出するか、あるいは公知技術を利用することにより本タンパク質をコードするmRNAそしてcDNAを得て、周知の遺伝子工学的手法により組替え体を得てクローン化し、発現系の宿主菌(細胞)から抽出して得ることができる。培養後、公知の方法により菌体または細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁する。緩衝液中にトリトンX-100(登録商標)などの界面活性剤、または尿素もしくは塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤を含めてもよい。懸濁液は超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などの処理により菌体または細胞を破壊したのち、遠心分離もしくは濾過により本タンパク質の粗抽出液を得ることができる。

【0017】上記粗抽出液から、本発明のタンパク質を分離精製するには、タンパク質の精製についての従来技術を用いる。とくに原理の異なる複数の方法を適切に組

合わせて行なうことにより、効率的に目的タンパク質を単離することができる。そうした精製技術には、塩析やアルコールまたはアセトンなどによる溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外濾過法、SDS-PAGE、ゲル濾過法など、おもに分子量の差を利用する方法；等電点沈殿法、等電点電気泳動法など、等電点の差を利用する方法；イオン交換体（DEAEなど）による吸脱着イオンクロマトグラフィーなど、荷電の差を利用する方法；特異的親和性を利用するアフィニティクロマトグラフィー；疎水性の差を利用する逆相高速液体クロ

マトグラフィーなどが含まれる。
【0018】このようにして精製単離される本発明のタンパク質の量は、後述する標識したリガンドとの結合実験または特異的抗体を利用したエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。当該特異的抗体とは、本発明のタンパク質を認識し得るものであれば、ポリクローナルもしくはモノクローナルいずれの抗体であつてもよい。

・生理機能

高濃度カルシウム刺激によりケラチノサイトのHAT活性が上昇する。HAT活性を発現する酵素の実体は、p300、CBP、P/CAFなどの転写統合装置であることが最近明らかにされた。これらの酵素のHAT活性は、シグナル伝達経路を介して細胞内外の刺激を受け、ヒストンを含め多様なタンパク質を様々にアセチル化する。アセチル化/脱アセチル化の形をとるシグナルの増幅、減衰または変換により、多くの生体機能を調節する役割を果たすと推測されている。たとえばヒストンのアセチル化（もしくはその程度）は、クロマチン高次構造に変化を及ぼし、転写活性の調節制御に関係すると信じられて

いる。
【0019】本発明者らの研究から、ap70はカルシウム刺激前から存在し、カルシウム刺激後は漸減消失する。逆にap78はカルシウム刺激後に誘導され長時間にわたって漸増する。ap97は、刺激後一時的に増幅されるがその後は消失へと変化する。ap97の誘導は、PKC阻害剤であるG06983、GF109202X（これらは、HAT活性を抑制する）のうち、GF109202X処理により阻害された。さらにHaCAT細胞においてCBPおよびP/CAFの野生型とHAT活性を欠失させた変異型を強制発現させて、高濃度カルシウムにより刺激すると、変異型ではインヴォルクリン誘導とap97発現の能力がほとんど発揮されなかった。

【0020】カルシウムはPKCを介したシグナル伝達によりケラチノサイトを分化誘導する調節因子である。本発明者らの研究結果からその経路にP/CAFによるap97の発現およびそのアセチル化が関与していることが明らかとなった。よってap97は、転写の調節因子でありアセチル化酵素でもあるP/CAFにより、その発現量およびアセチル化によるコントロールを受けてケラチノサイトのカルシウム誘導分化の調節に関与している。

【0021】残るap70およびap78の生理機能については、PKC阻害剤の処理に影響を受けず、CBPおよびP/CAFの変異型の強制発現の際にも変化がなかったことから、ap97とは異なるシグナル伝達経路に関係する。換言するとCBPおよびP/CAF以外のHATが、これらの核タンパク質発現の消長およびアセチル化に関係している。したがって、これらのアセチル化型核タンパク質の作用は、ap97とは作用のターゲットも異なり、別の細胞機能の調節に関与している可能性がある。高カルシウム刺激後、2時間までに消失するap70のアセチル型は、おそらく分化初期の細胞増殖の切り替えをおこなっている。これに対し、カルシウム刺激後、時間依存性の過剰発現をするap78は、16時間後には、ほとんどの細胞がG1期に拘束される状態（いわゆるG1アレスト）に至ることから、最終分化につながる細胞周期の同調または関連するシグナル伝達経路に関係があると示唆されている。かかる情報伝達経路もまた、HAT活性と相関がある。このことは、CBPがG1/S境界で、細胞周期依存キナーゼによるリン酸化を通じてHAT活性を上昇させるという報告（Ait-Si-Ali *et al.*, 1998）に基づく。16時間時点でPMLヌクレアーポディーと集合するアセチル化された核タンパク質は、ap78であると考えられる。このことはPMLヌクレアーポディーもまた、細胞増殖の抑制およびアポトーシスに関係するという観察（Seeler and Dejean, 1999）からも支持される。

抗体

本発明のタンパク質に対する抗体は、上記核タンパク質、ap97、ap70およびap78のいずれかを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであつてもよい。そのような抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用いて、公知技術である抗体または抗血清の製造方法に従って製造することができる。

・抗体の調製

モノクローナル抗体の調製のためには、抗原タンパク質を哺乳動物の抗体産生が可能な部位に、単独に、または担体、希釈剤とともに投与する。その際、抗体産生能力を高めるため、完全フロイントアジュバントなどを混ぜて投与してもよい。用いる哺乳動物として、マウス、モルモット、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌなどが挙げられるが、扱いやすさなどから、とくにマウスまたはウサギが好ましく用いられる。投与は、通常3～6ヶ月間の期間において、2～6週ごとに1回ずつ2～10回程度行なわれる。

【0022】抗体産生細胞の採取は、抗原を免疫された上記動物から抗体価が認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取する。それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。融合操作は公知の技術を使用することができる。たとえば、ケーラーとミルスタインの方法

が挙げられる。骨髄腫細胞として、P3U1、NS-1、SP2/0などが挙げられるが、とくにP3U1が好ましく用いられる。融合促進剤としてポリエチレングリコール(PEG)、センダイウィルスなどが挙げられ、好ましくは、PEGが用いられる。

【0023】形成されたハイブリドーマのスクリーニング方法として、本発明のタンパク質を直接に、または担体とともに吸着させたマイクロプレートなどの固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、次いで放射性物質、酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に使用する細胞がウサギの場合、抗ウサギ免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し標識抗原タンパク質を加えて、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが例示される。

【0024】モノクローナル抗体の選別は、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞培養基などで行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものであればとくに制限はない。たとえばハイブリドーマ培養用無血清培地、牛胎児血清(fetal calf serum; FCS)を含むRPMI培地、GIT培地などを用いることができる。培養は、通常5%の炭酸ガス下で、20~40℃、好ましくは34から38℃であり、期間は通常5日~3週間、好ましくは1~2週間である。

【0025】モノクローナル抗体の単離方法は、通常のポリクローナル抗体の精製方法と同じであり、免疫グロブリンの分離精製法による。すなわち、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、各種電気泳動法、イオン交換体(DEAE樹脂など)による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、特異的アフィニティ精製法などを適宜、組合わせて利用することによる。

【0026】本発明のポリクローナル抗体は、公知技術を利用して調製することができる。たとえば、免疫抗原を上記モノクローナル抗体の製造方法と同様に哺乳動物に免疫を行い、その免疫動物の血液、腹水など、好ましくは血液から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、上記した抗体の単離操作を行うことにより製造できる。免疫方法、投与回数などは、モノクローナル抗体について記載した方法に準じる。

【0027】なお、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体などの抗体価の決定は、抗血清中の抗体価測定の場合と同様である。具体的には、標識された本発明のタンパク質と抗血清または抗体を含む試料とを反応させたのち、抗体に結合した標識の活性を測定することによる。標識は、化学的または物理的手段により検出されるものであり、たとえば蛍光物質、酵素、放射性同位元素、発光物質などが用いられる。

・抗体の利用

本発明のタンパク質に対する抗体の中和活性とは、本発明のタンパク質ap97などの関与するシグナル伝達機能を不活性化する機能を有することをいう。したがって、該抗体が中和活性を有する場合、結合する当該タンパク質の関与するシグナル伝達を不活性化することができる。

【0028】上記した本発明の抗体は、本発明に係るタンパク質またはその部分ペプチドを特異的に認識することができるため、様々な利用形態が考えられる。その一部を例示すると、本発明の抗体は、上記本発明のタンパク質を精製するための抗体カラムの作成、精製時の各分画中に存在する本発明に係るタンパク質の検出、注目する細胞内における当該タンパク質の動態もしくは挙動の分析などのために使用することができる。また、本発明に係る抗体は、体液や組織などの検体中に存在する本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを特異的に検出したり、濃度分析をするために用いることができる。さらに本発明の抗体を利用して、生体内での本発明のタンパク質またはその部分ペプチドを分析または定量することにより、本タンパク質の機能不全または異常亢進、発現変動に関連する各種の皮膚系疾患の診断をすることができる。もっとも、これらの用途のみに限定されるものではない。

検査・診断薬

上記特異的抗体を利用した臨床応用として、たとえば角化異常症などの診断検査薬がある。この場合の適用は、主に生検、組織病理検査(バイオプシー)の検体となるが、全身性の皮膚疾患では、血中に本発明に係るタンパク質あるいはその特異抗体が存在する場合には血液そのものも対象となる。視診の限界を補完する手段として極めて有効な検査・診断薬となるであろう。

【0029】本発明の抗体は、本発明のタンパク質ap97などを特異的に認識できるため、検体中の本発明のタンパク質の定量、とくにサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、たとえば(i)本発明の抗体と検体および標識化タンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化タンパク質の割合を測定することを特徴とする検体中の本タンパク質の定量法、(ii)担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体と検体とを同時または連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする検体に存在する本発明のタンパク質の定量法がある。本発明のタンパク質ap97などに対するモノクローナル抗体を用いると本発明のタンパク質の量を測定できるほか、組織染色などによる該タンパク質の検出を行なうこともできる。

【0030】本発明のタンパク質ap97などに対する抗体を用いる測定法はとくに限定されるものではなく、検体中の抗原量、すなわち本発明に係るタンパク質の量に対応した抗体もしくは抗原-抗体複合体量を化学的または

物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準溶液を用いて作成した検量線から算出する測定方法であれば、いずれの方法を用いてもよい。具体的には競合法、イムノメトリック法、ネフェロメトリー (nephelometry)、サンドイッチ法などが好適に用いられるが、感度および特異性の見地から、サンドイッチ法がとくに好ましい。

【0031】サンドイッチ法では、不溶化した本発明に係るモノクローナル抗体に検体を反応させ(1次反応)、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ(2次反応)たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより、検体中の本タンパク質ap97などの量を定量できる。1次反応と2次反応は逆順序におこなってもよく、同時に行なってもよいし、時間をずらして行なってもよい。

【0032】固相用抗体または標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、2種類以上の抗体の混合物を用いて、たとえば測定感度を向上させてもよい。1次反応および2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質ap97などの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定法、たとえばイムノメトリック法、競合法、ネフェロメトリーなどに用いてもよい。イムノメトリック法では、検体中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応をさせた後に、固相と液相とを分離するか、あるいは検体中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ次いで固相化抗原を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相とを分離する。次に何れかの相の標識量を測定し検体中の抗原量を定量する。

【0033】競合法では、検体中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fのいずれかの標識量を測定し検体中の抗原量を定量する。この測定方法においては抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを使用する液相法、第1抗体として固相化抗体を用いるか、第1抗体は可溶性のものを用い、第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法が用いられる。

【0034】ネフェロメトリーでは、ゲル内または溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物を測定する。検体中の抗原量が少量であるため微量の沈降物しか得られない場合には、レーザー散乱を利用するレーザーネフェロメトリーなどが好ましく用いられる。上記の免疫学的測定方法を本発明のタンパク質、抗体に適用する場合、特別の条件、操作などは必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作に準じて行なわれ、必要であれば若干の修飾を加えて測定が実施できる

測定系が構築できる。そのためのもっとも簡便かつ効率的に測定を行なうことを可能とするのは、本発明に係る検査診断キットである。このキットを用いるならば、通常の検査室または実験室で、特殊な分析機器、熟練した操作、高度の知識は必要とせずに、効率的に定量を行なうことができる。

・検査診断キット

本アッセイキットの構成および形態は、とくに限定されるものでなく所定の目的を達成できるものであればその内容は限定されない。一般には上記検体試料について、アッセイ方法を実行し得られた結果を解釈するための使用説明書、反応試薬、反応が行なわれる場となる反応媒体、アッセイの場を提供する基材、などから構成される。さらに所望により、比較基準とするためのあるいは検量線を作成するための照合サンプル、検出器なども含んでもよい。

【0035】反応試薬は適当な化学的または物理的検出手段により検出可能な標識を有する。そのような標識物質を用いる測定法に使用される標識剤として、たとえば蛍光物質、酵素、放射性同位元素、発光物質などが用いられる。蛍光物質として、フルオレスカミン、フルオレッセインイソチオシアネートなど、酵素として、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸脱水酵素、 α -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなど、放射性同位元素として、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C など、発光物質として、ルシフェリン、ルシゲニン、ルミノール、ルミノール誘導体などが例示される。

【0036】さらに抗体または抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いてもよい。抗原または抗体の不溶化には、物理的吸着を用いてもよく、あるいは通常タンパク質または酵素などを不溶化、固定化するために用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体として、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、あるいはガラスなどが用いられる。

【0037】検出手段としては、分光器、放射線検出器、光散乱検出器といった上記標識を検出可能なものである。反応媒体は、反応の至適条件を与えるか、反応生成物質の安定化などに有用な緩衝液、反応物質の安定化剤などを含む。

医薬製剤

本発明のタンパク質であるap97、ap70およびap78、あるいはその部分ペプチドは、(1)本発明のタンパク質のリガンド(アゴニスト)の探索または決定するための方法、(2)上記リガンドの定量法、(3)本発明のタンパク質の機能亢進または不全に関連する前記リガンドを含む疾病の予防および/または治療剤、(4)本発明のタンパク質と当該リガンドの結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法、(5)前記(4)の化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(6)本発明のタン

パク質の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(7)前記(6)の化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(8)本発明のタンパク質の定量において有用である。

・リガンドおよびその結合を変化させる化合物

本発明に係るリガンドの決定方法は、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させることにより、当該タンパク質などに結合してケラチノサイトの分化あるいはこれに関連したシグナル伝達機能を促進または抑制する活性を示す化合物またはその塩を決定する方法である。該化合物としては、合成化合物、ペプチド、非ペプチド性化合物、タンパク質、発酵生産物などが挙げられ、これらの化合物は公知の物質でもあってもよく、あるいは新規な化合物であってもよい。

【0038】本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドに結合するリガンドのスクリーニング方法として、具体的には(i)本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドと標識したリガンドとを接触させた場合における、標識したリガンドの当該タンパク質に対する結合量を測定することを特徴とする方法、(ii)本発明のタンパク質を含有する細胞と標識したリガンドとを接触させた場合における、標識したリガンドの当該細胞に対する結合量を測定することを特徴とする方法、(iii)本発明のタンパク質を含有する細胞と標識したリガンドとを接触させた場合における、標識したリガンドによる当該タンパク質に対する機能・活性(たとえば、シグナル伝達機能、分化作用など)に対する作用(たとえば、抑制もしくは促進)を測定することを特徴とする方法などがある。

【0039】上記方法において、本発明のタンパク質を含有する細胞を用いる場合、その細胞を常法に従い、グルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。該細胞は、ヒトケラチノサイトであってもよく、あるいは本発明のタンパク質を発現した宿主細胞であってもよい。このような宿主細胞として、具体的には大腸菌、枯草菌、酵母菌、昆虫細胞、動物細胞などが好ましく用いられる。上記方法において、本タンパク質などと結合した試験化合物の結合量または活性の変化を測定するためには、好ましくは標識試験化合物が用いられる。標識は、検出の特異性、容易性などを考慮して、既存の常套方法から適宜選択される。通常は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S などの放射性標識が好ましく用いられる。

【0040】リガンド決定のより具体的な方法として、次のようにしておこなってもよい。本発明のタンパク質ap97などを含有する細胞または核画分を、決定方法に適した緩衝液に懸濁することにより標品を調製する。緩衝液は、当該タンパク質とリガンドとの結合を阻害しないものであれば、種類は問わないが、一般には、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液などが用いられる。非特異的結合を低減するため、界面活性剤(たとえば、Tween-8

0、CHAPSなど)、各種タンパク質(たとえば、ゼラチン、牛血清アルブミンなど)などを緩衝液に添加してもよい。またプロテアーゼ阻害剤(たとえば、ロイペプチン、ペプスタチン、PMSFなど)などを共存させて、プロテアーゼ作用による分解を阻止することが好ましい。上記標品溶液0.01~10mlに、一定量(5,000~500,000cpm)の ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量を知るために大過剰の未標識試験化合物を加えた反応チューブも用意する。結合反応は、0~50、好ましくは4~37で、約15分間~24時間行なう。反応後、ガラス繊維紙などで濾過し、適量の緩衝液で洗浄後、該紙に残存する放射活性を、シンチレーションカウンターまたはガンマ-カウンターで計測する。全結合量から非特異的結合量を差し引いたカウントが、0cpmを超える試験化合物を本発明のタンパク質に対するリガンドとして選択することができる。

【0041】このようなリガンド決定の方法を簡便かつ効率的に行なうことを可能とするリガンド決定用キットを組み立てることも有用である。その構成、仕様などは、上記の検査診断キットに準じる。さらに本発明は、本発明のタンパク質と上記リガンドとの結合性を变化させる、すなわち低下させるか、または結合力を増強する化合物をも対象とする。該化合物としては、合成化合物、ペプチド、非ペプチド性化合物、タンパク質、発酵生産物などが挙げられ、これらの化合物は公知の物質でもあってもよく、あるいは新規な化合物であってもよい。

【0042】このような化合物は、本発明のタンパク質との結合を巡るリガンドとの拮抗試験を実施することによりスクリーニングすることができる。すなわち、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとを接触させた場合と、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことによる。その比較は、本発明のタンパク質などリガンドとの結合量、本タンパク質の機能、活性の変化量などを測定することに基づく。

【0043】本発明のタンパク質とそのリガンドとの結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法として、具体的には(i)本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドと標識したリガンドとを接触させた場合と、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドおよび試験化合物とを接触させた場合における、標識したリガンドの当該タンパク質に対する結合量を測定し比較することを特徴とする方法、(ii)本発明のタンパク質を含有する細胞と標識したリガンドとを接触させた場合と、本発明のタンパク質を含有する細胞とリガンドおよび試験化合物とを接触させた場合における、標識したリガンドの当該細胞に対する結合量を測定し比較することを特徴とする方法、(iii)本発明のタンパク質を

有する細胞と標識したリガンドとを接触させた場合と、本発明のタンパク質を含有する細胞とリガンドおよび試験化合物とを接触させた場合における、標識したリガンドによる当該タンパク質に対する機能・活性（たとえば、シグナル伝達機能、分化作用など）に対する作用を測定し比較することを特徴とする方法などがある。

【0044】上記方法において、本発明のタンパク質を含有する細胞を用いる場合、その細胞を常法に従い、グルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。該細胞は、ヒトケラチノサイトであってもよく、あるいは本発明のタンパク質を発現した宿主細胞であってもよい。標識したリガンドとしては、上記した放射性同位元素標識のリガンドが用いることができる。本発明のタンパク質、標識リガンド、試験化合物の結合試験のより具体的な手法は、上記リガンドの決定方法に記載した手法に準じる。

【0045】さらに上記リガンドまたはそのリガンドの結合性を变化させる化合物の定量は、本発明のタンパク質がリガンドに対して結合性を有しているため、生体内におけるリガンド濃度を感度よく定量する方法に適用することができる。具体的には、例えば競合法と組み合わせることにより用いることができる。

・タンパク質の発現量を変化させる化合物

他方、本発明は、カルシウムなどの外界からの刺激に対応して本発明のタンパク質の発現量を調節する物質、およびその物質を探索し、決定することを特徴とする方法を提供する。該化合物としては、合成化合物、ペプチド、非ペプチド性化合物、タンパク質、発酵生産物などが挙げられ、これらの化合物は公知の物質でもあってもよく、あるいは新規な化合物であってもよい。

【0046】そのための方法として、たとえば正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（たとえば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、サル、ウシなど）に対し、薬剤または物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分～24時間前、好ましくは30分前から12時間前、より好ましくは60分前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは60分後から2日後、より好ましくは60分後～1日後）あるいは、薬剤（たとえば、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）または物理的ストレス（たとえば、明暗、低温、電気ショック、浸水ストレスなど）と同時に被検化合物を投与し、投与して一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは60分後から2日後、より好ましくは60分後～1日後）、血液、または脳、肝臓、腎臓、皮膚などの特定の臓器から単離した組織または細胞を得る。これらの組織または細胞に含まれる本発明のタンパク質のmRNAを通常の方法により抽出し、公知の手法を用いることにより定量、解析することにより行なうことができる。あるいは、上記細胞から分離した核画分に含まれる本発明のタンパク質を特異的に認識できる抗体を利用して、その定

量を行なってもよい。具体的には、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウェスタンブロット解析などの手法による。

【0047】そのような定量の方法を簡便かつ効率的に行なうことを可能とするタンパク質定量用キットを組み立てることも有用である。その構成、仕様などは、抗体の項の記載に基づいて上記検査診断キットに準ずるものが考えられる。

・予防および/または治療薬への利用

10 本発明のタンパク質の機能に対するリガンド、該リガンドの結合性を变化させる化合物あるいはそのタンパク質の発現に影響を及ぼす化合物が明らかになれば、そうしたリガンドまたは化合物は、それを含む安全で低毒性な医薬として利用することができる。すなわち、そのリガンドなどが該タンパク質の発現量またはその機能に及ぼす作用に応じて、常套手段にしたがって製剤化することにより、本発明のタンパク質の機能不全または亢進に関連する疾患の予防および/または治療の医薬として用いることができる。たとえば、生体内において本発明のタンパク質のシグナル伝達機能を亢進または遮断することによりその機能を調節したり、あるいは発現量の増減による調節を通じて、ケラチノサイトが部位的、時間的に誤った角化を起こすことにより引き起こされる疾患の予防および/または治療に有用である。

・対象となる疾患

本発明のタンパク質であるap97、ap78などの発現量に影響を与えるか、あるいは核内におけるそのシグナル伝達機能を調節する化合物、生理活性物質（リガンド）などは、本タンパク質の存在量、その機能の調節を通してケラチノサイトの分化に影響を及ぼし、結果的に角化障害、皮膚疾患の治療効果を発揮する作用を有する。

【0048】対象となる皮膚疾患には、角化異常または角化障害、皮膚疾患、火傷・熱傷が含まれる。角化異常とは、角質層に何らかの異常がみられるか、あるいは正常な角化過程に亢進、減退などの障害がある場合をいい、具体的には次の皮膚疾患が挙げられる。すなわち尋常性魚鱗癬、胼胝腫（たこ）/鶏眼（うおのめ）、汗孔角化症、掌蹠角化症などである。炎症を伴うものとして、乾癬、類乾癬、扁平苔癬、光沢苔癬、毛孔性紅色糠疹などが知られている。これらは角質が異常に厚くなり肥厚、鱗屑の形態、過大増殖の症状を呈する。角質の過形成、角質細胞の脱落遅延が特徴的であることが多い。

【0049】ケラチノサイトの増殖と移動、最終分化の促進が必要とされるのは、皮膚損傷、たとえば外傷、火傷・熱傷、凍傷などである。この場合には、外界からの刺激、細菌、異物などから保護する役割を担う皮膚を再生・修復することが創傷治癒の鍵となる。とくに重篤な火傷・熱傷は、免疫機能の低下に加え、過大侵襲に対する応答として著しい全身的な異化代謝亢進を伴うため、

水分逸失の抑制、感染防止の観点から迅速な皮膚再生、角質層形成が求められる。このため皮膚移植または人工皮膚の適用などの外科的対症治療に加え、栄養代謝的療法が併用される。それには、ケラチノサイトの増殖、角質の形成亢進を図るため本発明の内用製剤の適用が好適である。

【0050】投与経路は、外用経路に加え、経口投与が最も好ましい。場合により経胃腸内投与、経静脈内投与、皮下投与などであってもよい。本発明の核タンパク質に対するリガンド、その結合性を变化させる化合物、発現量を変化させる化合物を、角化異常疾患などの上記皮膚障害あるいは皮膚疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、それらを含む医薬として常法に従い製剤化することができる。本発明の製剤は、適用態様から内用製剤と外用製剤に大別される。

・内用製剤

内用製剤として、上記の化合物、すなわち本発明のタンパク質であるap97、ap78などの発現量に影響を与えるか、あるいは核内におけるそのシグナル伝達機能を調節する化合物、生理活性物質(リガンド)などは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、散剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に使用できる。あるいは水もしくはそれ以外の製薬的に許容し得る液との無菌性溶液または懸濁液剤などの注射剤の形で、非経口的に使用できる。薬剂的に許容できる担体には、一般に当業界で知られている適切な賦形剤(基剤、溶剤、希釈剤、増量剤、補形剤など)のほか、結合剤(たとえば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムなど)、膨化剤(たとえば、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸など)、潤滑剤(たとえば、ステアリン酸マグネシウムなど)、崩壊剤、滑沢剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤、保存剤、着色料、着色剤、溶解補助剤、光沢剤、コーティング剤などが含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。さらに香味剤(たとえば、ペパーミント、チェリーなど)、甘味剤(たとえば、ショ糖、乳糖、サッカリンなど)のほか、防腐剤、安定剤、膨化剤、潤滑剤なども必要に応じて配合される。

【0051】調剤単位の形態がカプセルの場合には、上記添加剤に加えて油脂のような液状担体をさらに含めることができる。注射用の無菌組成物は、注射用の水性溶液、たとえば生理食塩水、ぶどう糖、その他の補助薬を含有する等張液であるか、さらに天然産植物油などを溶解または懸濁させたものが処方される。さらに必要に応じて、適当な溶解補助剤(たとえば、アルコール、ポリアルコール、安息香酸ベンジル、界面活性剤など)、無痛化剤(たとえば、塩化プロカイン、塩化ベンザルコニウムなど)、安定剤(たとえば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、緩衝剤(たとえば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、保存剤

(たとえば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などを併用してもよい。

【0052】上記内用製剤には、また、相補的あるいは補助的作用のために、必要に応じて、コルチコステロイド類(たとえば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、デキサメサゾン、トリアムシロン、フルメタゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、フルオシノロン、吉草酸ベタメサゾン、フルオシノロン、ハルオシノニド、アムシノニド、クロベタゾール、リンデロンDPなど)、ホルモン剤(サイロキシ、トリヨードサイロニン、エストラジール、メチルテストステロンなど)、抗生物質(たとえば、ペニシリン、ストレプトマイシン、セファロスポリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フラジオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、フジジン酸ナトリウム、ミカマイシンなど)、サルファ剤(たとえば、サルファジアジン、サルファイソキサゾール、スルファイソミジン、スルファメトキシ、スルファメチゾールなど)、抗炎症剤(たとえば、インドメタシン、メフェナム酸、クロタミトン、プフェキサマック、リドカイン、キシロカインなど)、抗ヒスタミン剤(たとえば、クロルフェニラミン、トリプロリジン、ジフェニルピラリン、クレマスチン、ヒドロキシジン、シプロヘプタジン、ホモクロルシクリジン、プロメタジン、アリメマジンなど)、ビタミン剤(たとえば、ビタミンA、レチノイド、ビタミンE、ビタミンC、パントテン酸など)、抗悪性腫瘍剤(たとえば、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド、プスルファン、アクチノマイシンなど)などの他の薬効成分を配合してもよい。

【0053】上記化合物、リガンド類は、共存物質、添加物質とともに製剤実施に要求される単位用量の形態で混和することにより製剤することができる。これら製剤における有効成分量は、指定された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。このような内用製剤は、一般的には投与により全身作用を期待する全身性の障害または疾患の予防および/または治療剤として有効であるが、局所的な作用を求める場合でも適用できる。

【0054】このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるため、ヒトのほか、ヒト以外の哺乳動物、たとえばイヌ、ネコ、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ラットなどに投与することができる。錠剤、カプセル剤、顆粒剤といった本発明の医薬において、核タンパク質ap97、ap78などの発現量に影響を与えるか、あるいは核内におけるそのシグナル伝達機能を調節する化合物、生理活性物質(リガンド)などの化合物の配合量は、薬効を発揮するに充分な量であればよく、とくに制限されるものではない。通常、組成物総量に対し乾燥固形成分として、0.001~50重量%とすることが好ましく、より好ましくは、0.001~30重量%である。薬効成分の含量は、その含量が組成物総量に対して乾燥重量で

0.001重量%未満であると明確な効果が現れず、50重量%を超過すると含有量の増加による明確な効果の増加が現れない。

【0055】本発明に係る予防・治療剤のヒトへの至適投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与経路などを考慮して医師、薬剤師により決定されよう。経口投与の場合、患者の年齢、体重、症状、投与経路などによっても異なるが、一般的には、たとえば体重60kgの患者に対して、1日につき約0.01mg~500mg、好ましくは約0.01mg~200mg、より好ましくは1mg~50mgである。非経口

的に投与する場合、その1回の投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与経路などによっても異なるが、たとえば注射剤の投与の場合、通常体重60kgの患者に対して、1日において約0.01mg~100mg、好ましくは約0.01mg~50mg、より好ましくは0.1mg~10mgである。

【0056】なお、上記投与量が0.01mg未満では、十分な摂取効果が期待できないことがある。ヒト以外の哺乳動物に適用する場合には、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

・外用製剤

軟膏剤などの外用製剤は、経皮的吸収に限界があるものの、一般的に医薬活性成分の作用が持続的となり、経口投与にみられる副作用の発現もなく、肝臓代謝を受けることもない。万一、局所刺激等による副作用が発生した場合、即座に塗布を中止するか、塗布したものを拭き去ることもできるため、皮膚疾患の治療剤として好適である。一般的に外用製剤は皮膚外表面に適用されるため、患部などの経皮的局所治療薬としての適用が通常である。

【0057】本発明のタンパク質であるap97、ap78などの発現量に影響を与えるか、あるいは核内におけるそのシグナル伝達機能を調節する化合物、生理活性物質(リガンド)などは、本発明の外用製剤として、たとえば軟膏剤、硬膏剤、貼付剤、パスタ剤、クリーム剤、油剤などの半固形剤、リニメント剤、ローション剤、スプレー剤などの分散製剤、液状塗布剤の態様で用いることができる。これらの外用製剤のうち、水溶性軟膏剤、クリーム剤(乳剤性軟膏)、油剤(油性軟膏)などには、基剤(たとえば、ポリエチレングリコール、カルボキシビニルポリマー、ミツロウ、油脂、白色ワセリン、プラスチックベース、高級脂肪酸または高級アルコール、バニシングクリーム、親水ワセリン、精製ラノリン、オイセリン、ネオセリン、加水ラノリン、親水プラスチックベース、流動パラフィン、アイソパー、シリコン油、脂肪酸エステル、植物油、スクワレンなど)、増量剤、補形剤などを賦形剤として、さらに補助剤として分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤などを用いることができる。さらに所望により抗酸化剤、保存剤、保湿剤、着色剤、芳香剤、緩和剤などを併用してもよい。

【0058】テープ剤などの貼付剤およびパップ剤の薬剤含有層に用いられる基剤として、アクリル酸エステルまたはアクリルアミドを原料とする重合体、天然ゴム、合成イソブレンゴム、スチレン-ブタジエンゴム、スチレン-イソプレンゴム共重合体、ポリビニールエーテルおよびシリコンゴムなどを挙げることができる。これらの基剤は、単独で用いても適宜混合して用いてもよい。さらにロジン、ロジン誘導体、ポリテルペン樹脂、クロマン-インデン樹脂、石油系樹脂、テルペンフェノール樹脂などを必要に応じて添加して、薬剤含有層の粘性を増大させることができる。

【0059】テープ剤などの貼付剤およびパップ剤の支持体としては、一般にこれまでテープ剤などの貼付剤およびパップ剤の支持体として用いられてきたものでよい。この支持体の素材として、酢酸セルロース、エチルセルロース、ポリエチレンテレフタレート、酢酸ビニル-塩化ビニル共重合体、可逆性ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、ポリオレフィン、ポリ塩化ビニリデン、アルミニウムなどが例示される。あるいはこれらを使用した繊維で作られた織布、不織布または抄紙もそれぞれ使用することができる。アルミニウムではその箔が使用される。

【0060】パップ剤では、薬剤含有層にハッカ油、サリチル酸メチル、カラシ油などが添加される。硬膏剤においても薬剤含有層の基剤として上記に挙げた樹脂類、ゴム類、プラスチックなどを用いることができる。支持体も貼付剤およびパップ剤の場合に準じる。

【0061】リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤などの分散製剤においては、薬剤成分を水性媒体(たとえば、水、グリセリン、ポリエチレングリコール、ブチレングリコール、プロピレングリコールなど)、油性媒体(たとえば、オリーブ油などの植物油、動物油、シリコンなど)、あるいは揮発性溶媒(たとえば、変性アルコールなど)などに溶解または分散する。これらに加えて、上記の医薬品添加物を必要に応じて併用する。

【0062】また、相補的あるいは補助的作用のために、必要に応じて、コルチコステロイド類(たとえば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、デキサメサゾン、トリアムシノロン、フルメタゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、フルオシノロン、吉草酸ベタメサゾン、フルオシノロン、ハルオシノニド、アムシノニド、クロベタゾール、リンデロンDPなど)、ホルモン剤(サイロキシン、トリヨードサイロニン、エストラジオール、メチルテストステロンなど)、抗生物質(たとえば、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、フラジオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、フシジン酸ナトリウム、ミカマイシンなど)、サルファ剤(たとえば、サルファジアジン、サルファイソキサゾール、スルファイソミジンなど)、抗炎症剤(たとえば、インドメタシン、グリチルレチン酸誘導体、クロタミト

ン、プフェキサマック、リドカイン、キシロカインなど)、抗ヒスタミン剤(たとえば、クロルフェニラミン、トリプロリジン、ジフェンヒドラミン、ジフェニルピラリン、クレマスチン、ヒドロキシジン、シプロヘプタジン、ホモクロルシクリジン、プロメタジン、アリメマジンなど)、抗悪性腫瘍剤(たとえば、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド、ブスルファン、アクチノマイシンなど)、殺菌消毒剤(たとえば、ヨウ化ポリビニールピロリドン、塩化ベンザルコニウム、クロールヘキシジングルコネート、アクリノール、ハロゲン化フェノールなど)、角質軟化剤(たとえば、尿素、サリチル酸など)、ビタミン剤(たとえば、ビタミンA、レチノイド、ビタミンE、ビタミンC、パントテン酸など)、メラニン生成抑制剤(たとえば、ハイドロキノン、ビタミンCエステル類、パラヒドロキシシナメートなど)、紫外線抑制剤(たとえば、パラアミノベンゾエートエステルなど)、乾PUVA治療剤(たとえば、8-メトキシソラーレンなど)、抗真菌剤(たとえば、ナフチオメート、クロトリマゾールなど)などの他の薬効成分を配合してもよい。

【0063】経皮吸収を促進するため、経皮吸収促進剤を基剤に添加してもよい。この目的のために、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、メチルデシルスルホキシド、シネオール、モノテルペノイドアルコールなどが用いられる。あるいは、有効成分の持続性を延長するため、徐放性の基剤を使用して徐放性製剤として用いることもできる。

【0064】このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるため、ヒトのほか、ヒト以外の哺乳動物、たとえばイヌ、ネコ、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ラットなどに投与することができる。本発明の医薬において、本発明のタンパク質であるap97、ap78などの発現量に影響を与えるか、あるいは核内におけるそのシグナル伝達機能を調節する化合物、生理活性物質(リガンド)などの配合量は、薬効を発揮するに十分な量であればよく、とくに制限されるものではない。通常、組成物総量に対し乾燥固形成分として、0.001~50重量%とすることが好ましく、より好ましくは、0.01~30重量%である。薬効成分の含量は、その含量が組成物総量に対して乾燥重量で0.001重量%未満であると明確な効果が現れず、50重量%を超過すると含有量の増加による明確な効果の増加が現れない。

【0065】本発明に係る予防・治療剤のヒトへの至適適用量は、患者の年齢、体重、症状、適用部位などを考慮して医師、薬剤師により決定されよう。その1回の適用量は、患者の年齢、体重、症状、適用部位などによっても異なるが、たとえば軟膏剤などを適用する場合、一般的には、たとえば通常体重60kgの患者に対して、1日において約0.01mg~100mg、好ましくは約0.01mg~50mg、より好ましくは1mg~10mgである。塗布などの回数

は、通常は1日1~2回が適当である。

【0066】なお、上記適用量が0.01mg未満では、十分な適用効果が期待できないことがある。ヒト以外の哺乳動物に適用する場合には、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0067】

【実施例】以下、本発明を実施例を挙げてさらに具体的に説明する。これらの実施例は本発明を限定する意味ではない。なお、以下の実施例において、とくにことわらない限り、%は重量%を示す。

<実験方法>

・抗アセチル化リジン(AK)抗体
リジン残基のイプシロン()-アミノ基に特異的な抗AK抗体は、既報(Kawahara Kら, 1999)に従って作成した。概略は、キーホール・リンベット・ヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin)-結合AKをフロインド完全アジュバントと混合し、得られた懸濁液を10羽の和ウサギ(雌、白)に皮下投与した。等品位の抗原を1週間おきに1度、計5回投与した。プロテインAカラムを使用してIgG分画を得た。この抗体はアセチル化リジン(-AK)に特異的に結合するが、 -アセチル化リジン(-AK)および非アセチル化リジンには結合しない。

・細胞及び培養

H a C a T細胞は、Nobert E. Fusing博士(ドイツ癌研究センター、ハイデルベルグ、ドイツ)の許可を得て、L. Matrisian博士(バンダービルト大学、ナッシュビル、テネシー)より提供を受けた。H a C a T細胞は、正常皮膚由来の非腫瘍形成性の不死化ケラチノサイト細胞系であり、培養下でも基本的な分化能を保持している(Boukampら, 1988)。H a C a T細胞は、既報の方法(Boukampら, 1988)に僅かな変更を加えて培養した。細胞は、100,000units/lペニシリンG、100mg/lストレプトマイシン、各0.1mM非必須アミノ酸、292mg/lグルタミン、50mg/lアスコルビン酸および除カルシウムFCS(10%)を添加した、高グルコース含有ダルベッコ変法イーグル(カルシウム、マグネシウム不含)培地中で、5%(分圧比)炭酸ガスを含む加湿空气中、37℃で培養した(Henningsら, 1980)。培地中のカルシウム濃度は、280mM塩化カルシウム溶液を適量を加えることで特定の水準に調整した。

・DNA構築と一過性トランスフェクション

P/CAFおよびCBPへの変異導入は、位置指定突然変異導入法によった。具体的にはQuick-Change mutagenesis system(Stratagene, La Jolla, CA)用い、製造者が添付した説明書に従った。二本鎖オリゴヌクレオチドは、野生型P/CAF cDNAにおけるアミノ酸tyr⁵⁹⁷/phe⁵⁹⁸に相当する配列をアラニンで置換するように設計した。この変異導入で、P/CAFは、HAT活性を欠損する(pCMV-PCAF HAT-)。変異型CBP遺伝子も同様の手法で構築した。変

異型P/CAFおよび変異型CBPは細菌で発現させ、ヒストンを基質として溶液中でHAT活性を検定した(データ示さず)。ヘマグルチニン付加(HA)-PML遺伝子産物(Pml)発現プラスミドは、逆転写PCR法を用いてpcDNA3-HAベクターにクローニングすることで構築した(Miyagishiら, 2000)。

【0068】一過性トランスフェクションに際しては、まず2 μ gのDNAをOptiMEM (Life Technologies, Inc.) 100 μ lで希釈する。リポフェクタミン(Lipofectamine)試薬10 μ lとプラス試薬8 μ l(Life Technologies, Inc.)も同様にOptiMEM 100 μ lに希釈した。室温で5分間静置した後、両液を混合してさらに20分間静置して複合体を形成させた。次いで、カバーガラス上に2mlの抗生物質不含培地で播種した細胞に、この混合液を直接加えてトランスフェクションを行なった。その培地はトランスフェクション試薬を加えてから5時間後に、0.05mMカルシウムを含む培地に交換し、さらに24時間培養してから1.2mMカルシウム含有培地に交換した。トランスフェクション2日後に、異所性タンパク質の発現量を測定した。

・HAT活性測定

HAT活性の液相アッセイは、BrownellとAllisの方法(1995)に若干の変更を加えて行なった。既法(Schreiberら, 1989)を若干変更して核抽出液を調製した。単層細胞(5×10^6)をセルスクレーパーで回収してPBSで洗浄し、緩衝液A(10mM HEPES (pH7.8)、10mM KCl、2mM MgCl₂、1mM DTT、0.1mM EDTA、0.1mM PMSF)に懸濁して4、15分間静置した。ついでNP-40溶液を最終濃度0.6%になるように加え、細胞を15秒間激しく混合した後12000 \times gで30秒間遠心分離した。沈殿した核を緩衝液B(50mM HEPES (pH7.8)、50mM KCl、300mM NaCl、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.1mM PMSF、グリセロール10%)に懸濁し20分間混合した後12,000 \times gで5分間遠心した。核抽出液反応液(100mM Tris-HCl、2mM DTT、2mM PMSF、0.2mM EDTA、0.1M NaCl、0.02mM酪酸、20%グリセロール)は、基質として125nCi [¹⁴C]アセチルCoAと10mg/mlヒストン(Sigma-Aldrich社、ミルウォーキー、ウィンスコンシン)を加え、30 $^{\circ}$ Cで30分間保温した後、12%ドデシル硫酸ナトリウム/ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS PAGE)で分離した。分離後のゲルを乾燥して、コダックX-Omat ARフィルム(イーストマンコダック社、ロチェスター、ニューヨーク州)に、-80 $^{\circ}$ Cで4~7日間露出してオートラジオグラフを行なった。

・ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングは、既法(Nakajima, 1997a)に若干の変更を加えて行なった。HaCaT細胞の全細胞抽出液または核抽出液10 μ gを8%もしくは10%SDS-PAGEで分離し、次いでニトロセルロース膜に移した。該膜を、0.02%Tween 20を含む25mM トリス緩衝生理

食塩水(T-TBS)中に1%B SA (bovine serum albumin)および5%ローファットミルクを加えたブロッキング溶液中に1時間インキュベートし、次いで25 $^{\circ}$ Cで1時間、各実施例で指定する抗体と反応させた。25 $^{\circ}$ CのT-TBSで3回、各10分間洗浄後、膜をペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ、抗マウスまたは抗ラットIgG(1:3000希釈)とともに25 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした。抗体と反応したタンパク質は、アマシャム・ファルマシアバイオテック社製の高感度化学発光検出システム(ECL)を用いて可視化した。

・間接免疫蛍光法

各実施例で指定する抗体を用いた免疫染色は、4ウェルLab-Techチャンバースライド(Nalge Nunc International, ケンブリッジ、マサチューセッツ州)で培養したHaCaT細胞を用いて行なった。まず細胞を100%メタノールで-20 $^{\circ}$ C、30分間固定した。続いてスライドをブロッキング緩衝液(1%B SAを含むPBS)中に1時間処理した後、指定の一次抗体と1時間インキュベートし、次いでPBSで3回で洗浄した。一次抗体の検出は、AK検出の場合

にはFITC-結合ヤギ抗ウサギIgG、インヴォルクリン検出の場合にはTRIT-C(tetramethylrhodamine)結合ヤギ抗マウスIgG、そしてHA(Hemagglutinin)検出の場合にはTRITC-結合ヤギ抗ラットIgG(1:200希釈)をそれぞれ二次抗体として用い、30分間の処理を行なった。核はDAPI(6'-diamidino-2-phenylindole)で染色した

・免疫沈殿法(immunoprecipitation; IP)

免疫沈殿法は、既法(Nakajimaら, 1997a, 1997b)に従って行なった。約500 μ gの核抽出液をそれぞれ5 μ gの抗CBP抗体または抗P/CAF抗体とともにIP緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.6)、150mM NaCl、1% NP-40、1mM EDTA、5%グリセロール)中で1時間、インキュベートした。免疫複合体は25 μ gのプロテインA/Gアガロースビーズ(Santa Cruz Biotechnology Inc)にブロッキング震盪によって結合させた。次いでアガロースビーズをIP緩衝液で3回洗浄した。沈殿からのタンパク質の溶出は、タンパク質のHATアッセイを行なう場合は反応液を用い、ウェスタンブロットティングを行なう場合は、ローディング緩衝液中で煮沸して行なった。

【0069】

【実施例1】・HaCaT細胞でカルシウムにより誘導されるHAT活性

HaCaT細胞中のHAT酵素がカルシウム刺激で亢進するか否かを調べる目的で、培養HaCaT細胞の核抽出液中のHAT活性を測定した。HaCaT細胞を0.05mMカルシウムを含む培地中で培養し、カルシウム濃度を1.2mMに増加させた。カルシウムを増加した後のHAT活性の時間経過を図1に示す。低カルシウム(0.05mM)条件ではHAT活性はほとんど検出できなかったが、1.2mMカルシウムの添加で顕著に誘導され、添加後2時間で活性が最大になった。HAT活性は2時間目以降徐々に減弱したが、16時

間後にいたるまで微弱ながらも活性が検出された。この結果は、H a C a T細胞においてHAT活性がカルシウムシグナル伝達系に關与している可能性を示している。

【0070】HAT活性化と分化との関係は、これまでにいくつかの研究が示唆している。多種の癌細胞で、各種のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が分化を誘導すること(Marksら,2000)、キニジン(quinidine)が乳癌細胞の分化を、ヒストンH4高アセチル化と同調して誘導すること(Zhou Qら,2000)などである。これらの知見は、HAT活性がカルシウムによるケラチノサイトの分化誘導に、中心的役割を果たしているという本発明者らの仮説を支持するものである。

・HaCat細胞におけるカルシウムによる核内アセチル化の誘導

HAT活性は核内アセチル化(NA)と關連していることが知られているので(Kawaharaら,1999)、高カルシウム処理(1.2mM)によって起こるNAの時間経過を抗AK抗体を用いて調べた。図2Aに示すように、それぞれ約70kD、78kDおよび97kDである分子量の3種の核タンパク質のアセチル化がウェスタンブロッティングで觀察された。この3種のアセチル化核タンパク質をそれぞれap70、ap78、ap97と命名する。低カルシウム(0.05mM)条件下ではap70が検出されるが、カルシウム刺激後は徐々に減弱し、2時間後には消失した。ap97は、低カルシウム条件下でも検出されたが、その量はap70よりもわずかであった。ap97は高カルシウム刺激の後、2時間まで亢進し次いで減少したが、16時間後でも微弱ながら検出できた。ap97の時間経過は図1に示したHAT活性の時間経過とよく一致していた。ap70、ap97とは対照的にap78は低カルシウムでは検出できず、高カルシウム条件下では16時間以上にわたって、持続的に増加していた。以上から、カルシウムがNAの状態を変化させることが明確に示された。

【0071】

【実施例2】つぎに、カルシウム刺激後の形態変化を調べた。位相差コントラスト顕微鏡を用いた觀察によると、低カルシウム条件(0.05mM)で増殖した単層細胞は、高カルシウム条件(1.2mM)で16時間培養後には、相互に緊密に接着しており、角質化した重層性を示していた(図2B、左パネル)。カルシウムは上皮細胞の分化およびケラチノサイトの分化マーカーであるインヴォルクリン、フィラグリン、ロリクリン、トランスグルタミナーゼ等の発現を誘導する(Rice and Green,1979;Fuchs,1990;Dlugosz and Yuspa,1993)。H a C a T細胞も、高カルシウム条件下で、正常な角質化およびインヴォルクリンを含む分化マーカーの発現を示すことが知られている(Boukampら,1998)。インヴォルクリンは成熟した扁平上皮の構成成分であり、最終分化の直前の扁平上皮細胞を特徴づけるタンパク質性エンベロープ形成の一環として辺縁帯に取り込まれる(Murphyら,198

4)。抗AK抗体および抗インヴォルクリン抗体を用いて、カルシウムの効果を免疫細胞学的に検討した。図2B右パネルに示すように、低カルシウム条件および高カルシウム条件に移して4時間後のH a C a T細胞では検出できなかったが、高カルシウム条件下で16時間培養した細胞では、インヴォルクリン発現が誘導されておりH a C a T細胞の分化が示唆された。高カルシウム条件下で培養した細胞では4時間目および16時間目の双方において、低カルシウム条件の細胞より強いINAが觀察された。高カルシウム条件で4時間培養した細胞と比較して、16時間目の細胞ではより顕著なNAが觀察された。

【0072】分化およびNAレベルに対するカルシウム濃度の影響を検討するために、0.05mMカルシウムを含む培地中にサブコンフルント(subconfluent)なH a C a T細胞単層に0.1、0.5または1.2mMのカルシウムを添加して、48時間後のインヴォルクリン発現およびNA状態を調べた。インヴォルクリン発現量は、カルシウム濃度依存的に増加していた(図2C、上パネル)。ap78が1.2mMカルシウム条件で培養した細胞の核抽出液に見出されたのに対してap70およびap98は、0.05、0.1、0.5mMカルシウム条件で培養した細胞からの核抽出液に見られた。核内のアセチル化状態はカルシウムによるインヴォルクリン発現誘導と一致していた。これらの結果は、HAT活性化と引き続くNAがカルシウム依存的なケラチノサイトの分化と關連していることをより強く示唆するものである。

【0073】

【実施例3】・前骨髄性白血病ヌクレアーポディーと局在化が同じアセチル化核タンパク質

前骨髄性白血病(PML)ヌクレアーポディーは、細胞内の調節領域であり、ここでCBPまたはCBP結合タンパク質といったタンパク質が細胞外シグナルへの応答と協調して活性化または不活性化されると考えられている(Hodgesら,1998;Seeler and Dejean,1999)。CBPはPMLヌクレアーポディーに高度に濃縮されていることが知られている(LaMorteら,1998)。CBP自体が固有のHAT活性を有するため(Ogryzkoら,1996;Grunstein1997;Mizzen and Allis,1998;Struhl,1998)、NAとPMLヌクレアーポディーとの関係について検討した。PML遺伝子産物(Pml)は、PMLヌクレアーポディー中に見られるPMLヌクレアーポディー形成に必須のタンパク質であり(Ishovら,1999)、Pmlの過剰発現はPMLヌクレアーポディー中に内在性CBPの蓄積をもたらす(Boisvetら,2001)。PMLヌクレアーポディーは、ほとんどの細胞株で核内に存在しているが(Ascoli and Maul,1991;Stuurmanら1992)、H a C a T細胞では核抽出液にPmlはウェスタンブロッティングでは検出されなかった(データ示さず)。そこでH a C a T細胞にPml発現プラスミドを一過性にトランスフェクトし、次いで1.2mMカルシウムで刺激した。図3に示すように、PMLヌクレ

アーボディーは4時間後には点在する斑状に、16時間で単一の大きなフォーカスとして検出された。注目すべきことにPMLヌクレアーボディーのフォーカスは、抗AK抗体で蛍光染色されたAK部位と明らかに重なっていた。この事実は、カルシウムで誘導するNAは、PMLヌクレアーボディー中の活性化された動員因子と関係していることを示唆している。

【0074】

【実施例4】・プロテインキナーゼ(PKC)阻害剤によるHAT活性の阻害

カルシウムは、PKCシグナル伝達経路を介してケラチノサイト分化マーカー遺伝子の発現を誘導する(Dlugosz and Yuspa, 1994)。またカルシウム濃度と、HAT活性およびNAパターンとはそれぞれ関連している。これらの事実に基づき、PKCの特異的な阻害剤であるGo6983およびGF109203XがHAT活性とNAプロファイルとに及ぼす影響について検討した。カルシウム刺激に先立って、細胞をGo6983またはGF109203Xで1時間処理し、1.2mMカルシウムで刺激した後、指定する時間培養して核抽出液を調製された。カルシウム刺激後2時間目のHAT活性およびNAの時

間変化を測定した。【0075】HAT活性は、Go6983およびGF109203Xの双方によって濃度依存的に阻害された(図4A)。50nM GF109203Xが1.2mMカルシウム刺激によるNAに及ぼす影響は、図4Bに示す。ap70およびap78の発現パターンは、GF109203Xで処理しなかった場合(図2A)と同様であった。しかし、驚くべきことに、ap97は実験時間を通じて全く検出できなかった(図4B)。これらの結果は、PKCがカルシウム依存的なHAT活性化に関与していることと、ap97はこの過程の主要要素であることを示している。

【0076】CBPおよびP/CAFがカルシウム依存的HAT活性化に関与しているか否か、また関与しているとすればCBPおよびP/CAFのHAT活性がPKCの阻害により抑制されるか否かを確認するために免疫沈降(IP)アッセイを行なった。核抽出液からモノクローナルの抗CBP抗体および抗P/CAF抗体を用いてCBPおよびP/CAFを精製した。精製したタンパク質の品位をウェスタンブロットングにより確認した後(データ示さず)、各精製タンパク質について上記「実験方法」項に記載した通りHAT活性を測定した。カルシウム刺激は2時間の時点でCBPおよびP/CAFそれぞれのHAT活性を誘導し、GF109203Xはこれらの誘導を阻害した(図4C)。50nM GF109203Xの添加により、P/CAFのHAT活性は、CBPと比較してより顕著に阻害されていた。これらの結果は、ap97がカルシウム誘導HAT活性化に重要であるという見解をさらに支持するものである。

【0077】

【実施例5】・変異型P/CAFの導入によるインヴォルクリンおよびap97の発現の阻害

P/CAFがカルシウム誘導HAT活性化およびケラチノサイ

ト分化に重要であるか否かをより明確に決定する目的で、HaCat細胞にマウスの活性型HA-CBP(HAT活性あり)もしくは不活性型HA-CBP変異体もしくは活性型flag-tagged(flag)-P/CAFもしくは不活性型flag-P/CAFの変異体のいずれかを一過性に導入した。リンクした緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現から、導入効率は、85%と見積もられた(図5A,上パネル)。異所性タンパク質が充分発現していることは、導入細胞からの核抽出液のウェスタンブロットング分析で確認した(図5A,下パネル)。それぞれの遺伝子を導入した細胞で、1.2mMカルシウム刺激24時間後におけるインヴォルクリン発現誘導を、上記「実験方法」の項に記載した通り検討した。図5Bに示す通り、野生型CBPの導入はインヴォルクリン発現にほとんど影響を示さず、また変異型CBPの導入はインヴォルクリンを僅かに抑制したのみだった。対照的にP/CAF遺伝子導入はインヴォルクリン発現に顕著な変化をもたらした。野生型P/CAFは、インヴォルクリン発現を中程度に増加させたが、驚くべきことに変異型P/CAFを導入した細胞ではインヴォルクリン発現は顕著に消失した。さらに変異型P/CAFは、2時間の1.2mMカルシウム処理で誘導されるap97発現も阻害した(図5C)。いずれの遺伝子の導入もカルシウム刺激後のap70およびap78の発現に影響を与えなかった(データは示さず)。これらの結果は、P/CAFが、PKCシグナル伝達経路を介した97kD核タンパク質のアセチル化によって、カルシウム依存性ケラチノサイト分化に関与していることの証拠を提供するものである。

【0078】

【発明の効果】本発明は、ケラチノサイトの分化調節に関係するシグナル伝達因子の発現およびその生理的機能を通じて、ケラチノサイトの分化調節により角化を制御する方法を提供する。本発明によれば、カルシウム誘導性ケラチノサイト分化の調節に関与する核内シグナル伝達タンパク質、そのリガンド、シグナル伝達に機能する核内タンパク質の抗体、およびこれらを利用した検査・診断または治療・予防の医薬を提供することにより様々な、臨床診断的な応用を実現することができる。

【0079】本発明に係るタンパク質は、リガンドの決定、抗体または抗血清の入手、角化障害などの皮膚疾患の診断薬などに利用することができる。さらに、角化細胞の生理発現とその調節において、一員として関与する上記タンパク質の量およびその機能への調節を直接標的とする生理活性物質の探索し決定することにより、そうした生理活性物質を予防/治療薬として活用することができる。

【0080】本発明の説明において、これまでに引用した全文献の情報を一括して、以下の表に掲げる。

【0081】

【表1】

- Ait-Si-Ali, S., S. Ramirez, F.X. Barre, F. Dkhissi,²⁰ L. Magnaghi-Jaulin, J.A. Girault, P. Robin, M. Knibiehler, L.L. Pritchard, B. Ducommun, D. Trouche, and A. Harel-Bellan. 1998. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature*. 396: 184-186.
- Ascoli, C.A., and G.G. Maul. 1991. Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell. Biol.* 112: 785-795.
- Boisvert, F.M., M.J. Kruhlak, A.K. Box, M.J. Hendzel, and D.P. Bazett-Jones. 2001. The transcription coactivator cbp is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J. Cell. Biol.* 152: 1099-1106.
- Boynton, A.L., J.F. Whitfield, R.J. Isaacs, and H.J. Morton. 1974. Control of 3T3 cell proliferation by calcium. *In Vitro*. 10: 12-17.
- Boynton, A.L., J.F. Whitfield, R.J. Isaacs, and R. Tremblay. 1977. The control of human WI-38 cell proliferation by extracellular calcium and its elimination by SV-40 virus-induced proliferative transformation. *J. Cell. Physiol.* 92: 241-247.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Martham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* 106: 761-771.
- Brownell, J.E., and C.D. Allis. 1995. An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6364-6368.
- Brownell, J.E., and C.D. Allis. 1996. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 176-184.

- Cho, H., G. Orphanides, X. Sun, X.J. Yang, V. ³²Ogryzko, E. Lees, Y. Nakatani, and D. Reinberg. 1998. A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5355-5363.
- Dlugosz, A.A., and S.H. Yuspa. 1993. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell. Biol.* 120: 217-225.
- Dlugosz, A.A., and S.H. Yuspa. 1994. Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J. Invest. Dermatol.* 102: 409-414.
- Fuchs, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell. Biol.* 111: 2807-2814.
- Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389: 349-352.
- Gu, W., and R.G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* 90: 595-606.
- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO. J.* 7: 1395-1402.
- Hennings, H., D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S.H. Yuspa. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 19: 245-254.
- Hodges, M., C. Tissot, K. Howe, D. Grimwade, and Freemont P.S. 1998. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am.*

J. Hum. Genet. 63: 297-304.

- Imhof, A., X.J. Yang, V.V. Ogryzko, Y. Nakatani, A.P. Wolffe, and H. Ge. 1997. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* 7: 689-692.
- Ishov, A.M., A.G. Sotnikov, D. Negorev, O.V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E.T. Yeh, J.R.3rd. Strauss. And G.G. Maul. 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell. Biol.* 147: 221-234.
- Janknecht, R., and T. Hunter. 1996. Transcription. A growing coactivator network. *Nature.* 383: 22-23.
- Kawahara, K., S. Watanabe, T. Ohshima, Y. Soejima, T. Oishi, S. Aratani, M. Nakata, M. Shibata, K. Inoue, T. Amano, R. Fujii, K. Yanai, M. Hagiwara, A. Fukamizu, I. Maruyama, and T. Nakajima. 1999. Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 417-424.
- Kawasaki, H., R. Eckner, T.P. Yao, K. Taira, R. Chiu, D.M. Livingston, and K.K. Yokoyama. 1998. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature.* 393: 284-289.
- LaMorte, V.J., J.A. Dyck, R.L. Ochs, and R.M. Evans. 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 4991-4996.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell.* 72: 73-84.

- Lill N.L., S.R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio, and D.M. Livingston. 1997. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*. 387: 823-827.
- Marks, P.A., V.M. Richon, and R.A. Rifkind. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 92: 1210-1216.
- Murphy G.F., T.C. Flynn, R.H. Rice, and G.S. Pinkus. 1984. Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 82: 453-457
- McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson. 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 14400-14405.
- Miska, E.A., C. Karlsson, E. Langley, S.J. Nielsen, J. Pines, and T. Kouzarides. 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO. J.* 18: 5099-5107.
- Miyagishi, M., R. Fujii, M. Hatta, E. Yoshida, N. Araya, A. Nagafuchi, S. Ishihara, T. Nakajima, and A. Fukamizu. 2000. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275: 35170-37175.
- Mizzen, C.A., and C.D. Allis. 1998. Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell. Mo. Life. Sci.* 54: 6-20.
- Montminy, M. 1997. Transcriptional activation. Something new to hang your HAT on. *Nature*. 387: 654-655.

- Nakajima, T., C. Uchida, S.F. Anderson, C.G. Lee, J. Hurwitz, J.D. Parvin, and M. Montminy. 1997a. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*. 90: 1107-1112.
- Nakajima, T., C. Uchida, S.F. Anderson, J.D. Parvin, and M. Montminy. 1997b. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes. Dev.* 11: 738-747
- Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87: 953-959.
- Puri, P.L., V. Sartorelli, X.J. Yang, Y. Hamamori, V.V. Ogryzko, B.H. Howard, L. Kedes, J.Y. Wang, A. Graessmann, Y. Nakatani, and M. Levrero. 1997. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell*. 1: 35-45.
- Rice, R.H., and H.Green. 1979. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*. 18: 681-694
- Sartorelli, V., P.L. Puri, Y. Hamamori, V. Ogryzko, G. Chung, Y. Nakatani, J.Y. Wang, and L. Kedes. 1999. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell*. 4: 725-734.
- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic. Acids. Res.* 17: 6419.
- Seeler, J. S., and A. Dejean. 1999. The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 362-367.

- Shi, Y., and C. Mello. 1998. A CBP/p300 homolog specifies multiple differentiation pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Genes. Dev.* 12: 943-955.
- Stanley, J.R., and S.H. Yuspa. 1983. Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation. *J. Cell. Biol.* 96:1809-1814.
- Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes. Dev.* 12: 599-606.
- Stuurman, N., A. de Graaf, A. Floore, A. Josso, B. Humbel, L. de jong, and R. van Driel. 1992. A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J. Cell. Sci.* 101: 773-784.
- Thomas, T., A.K. Voss, K. Chowdhury, and P. Gruss. 2000. Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. *Development.* 127: 2537-2548.
- Waltzer, L., and M. Bienz. 1998. *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature.* 395: 521-525.
- Wolffe, A.P., and D. Pruss. 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell.* 84: 817-819.
- Youn, H.D., C.M. Grozinger, and J.O. Liu. 2000. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J. Biol. Chem.* 275: 22563-22567.
- Yuspa, S.H., A.E. Kilkenny, P.M. Steinert, and D.R. Roop. 1989. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J. Cell. Biol.* 109: 1207-1217.
- Zhou, Q., Z.K. Melkounian, A. Lucktong, M. Moniwa, J.R. Davie, and J.S. Strobl.

【0087】

【表7】

2000. Rapid Induction of Histone Hyperacetylation and Cellular Differentiation in Human Breast Tumor Cell Lines following Degradation of Histone Deacetylase-1. *J. Biol. Chem.* 275: 35256-35263.

【図面の簡単な説明】

【図1】 HaCaT細胞を1.2mMカルシウム処理した後のヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）活性の誘導を示す図である。指定された時間、1.2mMカルシウムで処理したHaCaT細胞から得た核抽出液10μgを、30℃で30分間、125nCi [¹⁴C]アセチルCoAと反応させた。反応混合物は12%SDS - PAGEで分離し、オートラジオグラフィで可視化した。

P;組替えP / CAFで置き換えた陽性コントロール

【図2】カルシウムは核内のアセチル化状態（NA）を変更し、それはカルシウム誘導セラチノサイト分化と関連していたことを示す図である。

10 A HaCaT細胞を1.2mMカルシウムで指定時間処理した。HaCaT細胞から得た核抽出液を10%SDS - PAGEで分離し、抗アセチル化リジン（AK）抗体を用いる免疫ブロッティングにより分析した。ウェスタンブロッティングから、約

70kD、78kD、97kDの3タイプの核タンパク質、すなわちap70、ap78、ap97と表記されるタンパク質のアセチル化が示された。

B 左パネル

1.2mMカルシウム刺激後に誘導された形態的变化を位相差顕微鏡 (Phase-contrast Microscope) により調べた。低カルシウム培地 (コントロール、ctrl) で培養したHaCaT細胞を、1.2mMカルシウムで4および16時間処理した。Phase-contrastは、位相差顕微鏡 (Phase-contrast Microscope) による画像を示す。

B) 右パネル

1.2mMカルシウムで刺激後、4時間および16時間でのNAおよびインヴォルクリン (INV.) の発現を示す。

核染色; DAPI、青、1番目のパネルの各列; TRITC、赤、2番目のパネルの各列; NA, FITC、緑、3番目のパネルの各列; 重ね合わせ (Overlay); INV.およびNAの2つのイメージを重ね合わせ (Overlay)、4番目のパネルの各列。

横線; 20 μ m

C NA状態およびINV.発現のカルシウム濃度依存性

HaCaT細胞をプレートして、カルシウム濃度0.05、0.1、0.5および1.2mMでそれぞれ48時間維持した。核抽出液には抗AK抗体を、細胞質画分には抗INV.抗体を使用して免疫プロットングを行なった。

【図3】非回旋 (deconvolution) 免疫蛍光顕微鏡により、HA (ヘマグルチニン、hemagglutinin) -PML遺伝子産物、Pmlを過剰発現しているHaCaT細胞において前骨髄性白血病 (PML) ヌクレアーポディーおよびNAの局在性が同じであることを示す図である。HaCaT細胞にPml遺伝子発現プラスミドを一過性的に導入し、次いで指定され

た時間、1.2mMカルシウムで処理した。核染色; DAPI、青、1番目のパネルの各列; PMLヌクレアーポディー、TRITC、赤、2番目のパネルの各列; NA, FITC、緑、3番目のパネルの各列; 重ね合わせ (Overlay); PMLヌクレアーポディーおよびNAの2つのイメージを重ね合わせ (Overlay)、4番目のパネルの各列。

横線; 10 μ m

【図4】特異的PKC阻害剤であるGo6983とGF109203Xにより、カルシウムが誘導したHAT活性化とap97発現に及ぼす影響を調べた図である。

A カルシウム刺激処理の1時間前に、HaCaT細胞に特異的PKC阻害剤であるGo6983またはGF109203Xを添加した。

GF109203X濃度は0、10、20、50nMでありGo6983濃度は0、1、5、20 μ Mであった。カルシウム刺激後2時間でのHAT活性を核抽出液について調べた。

B) HaCaT細胞を指定時間の1.2mMカルシウム刺激に先立ち1時間、50nM GF109203Xで処理した。核抽出液を10%SDS PAGEにより分離し、抗AK抗体を使用する免疫プロットングにより分析した。

C) 0、20、50nM GF109203Xによる前処理をし、次いでカルシウム処理 (1.2mM、2時間) したHaCaT細胞から得られた核抽出液を、抗CBP抗体もしくは抗P / CAF抗体とともに1時間インキュベートしたのち、プロテインA / Gアガロースと1時間インキュベーションした。結合した物質は、HATアッセイ反応混液中に溶出された。精製度を、CBPまたはP / CAFに特異的な抗体を使用する免疫プロットングにより確かめた (データは示さず)。0.05 mMカルシウムで培養した細胞から得た核抽出液をコントロール (ctrl) として使用した。

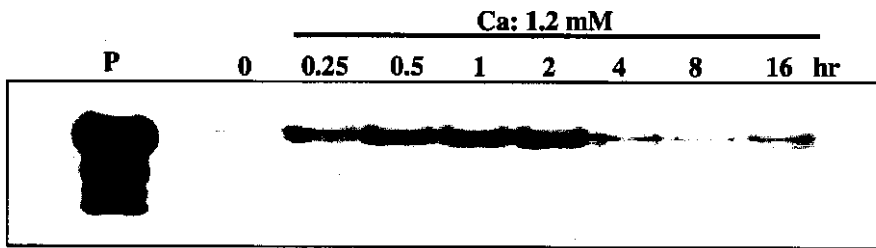
【図5】ケラチノサイト分化において、CBPでなくP / CAFが関与することを示す図である。

20 A リンクした緑色蛍光性タンパク質 (linked green fluorescent protein; GFP) の発現から、導入効率が充分であることが示された。細胞はトリプシン消化で回収し、PBSで2回洗浄して70%エタノールに固定した。蛍光はBecton-Dickinson社のFacsScan and Cell Questソフトウェアを使用して解析した (上パネル)。log fluorescenceは、蛍光の対数である。HA-tagged野生型 (wt) CBPまたはその触媒ドメインを欠く (HAT) 変異型 (mt) CBPの発現、ならびにflag-tagged wt P / CAFまたは HAT mt P / CAFの発現を、抗HA抗体 (HA) もしくは抗フラッグ抗体 (Flag) を用いて調べた (下パネル)。トランスフェクションしない細胞からの核抽出液をコントロール (ctrl) として用いた。

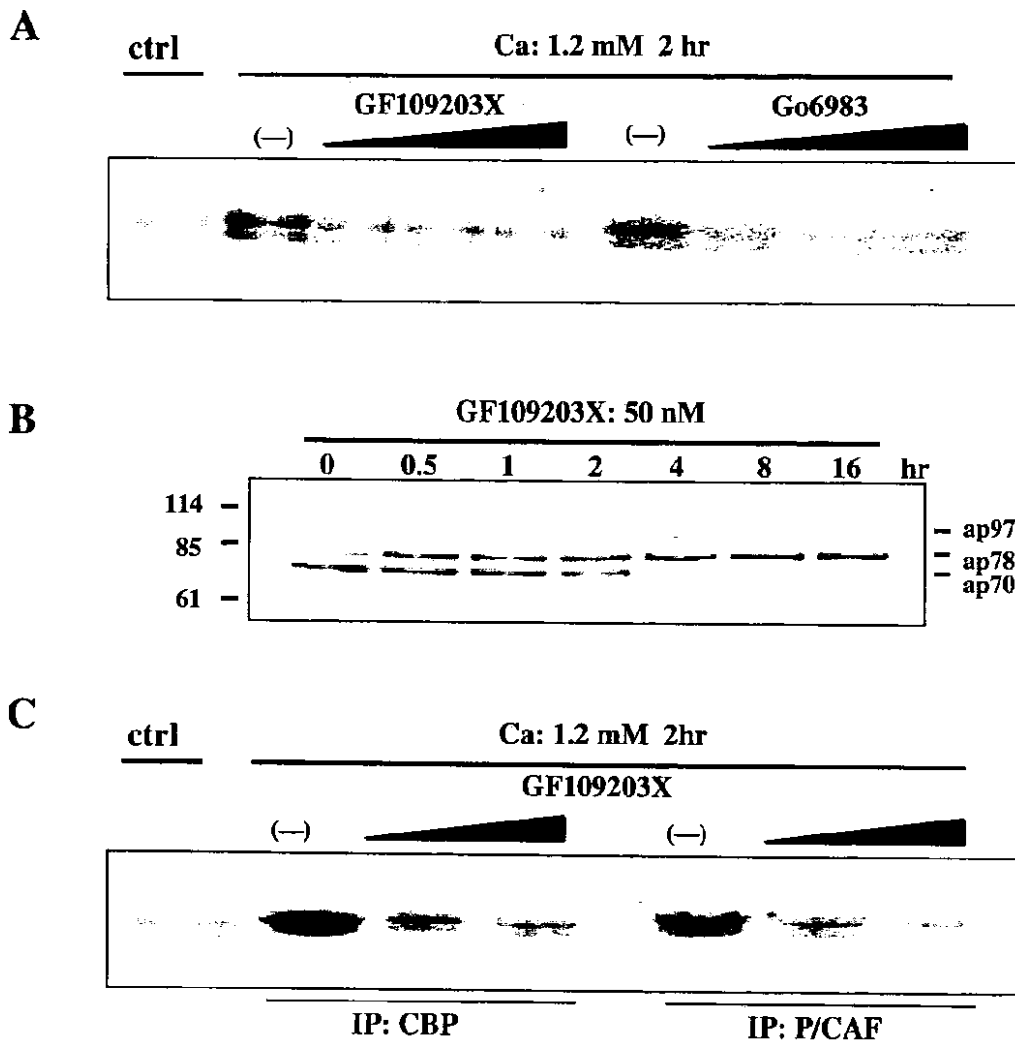
B 各異所性タンパク質を発現しているHaCaT細胞から得た細胞質画分を8%SDS PAGEにかけて分離し、抗インヴォルクリン抗体 (INV.) を用いる免疫プロットングによりインヴォルクリン発現を分析した。pCMVをコントロールとして使用した (BおよびCにおけるctrl)

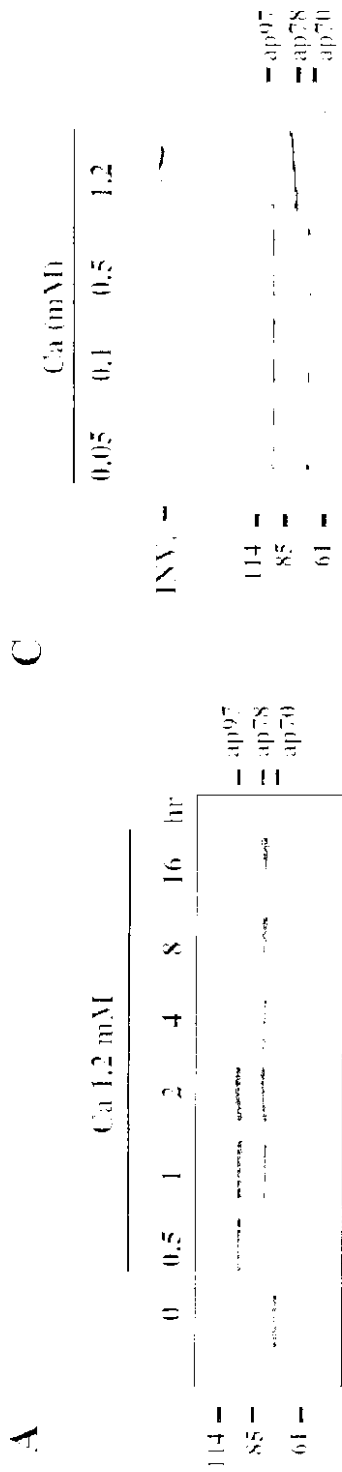
40 C 各異所性タンパク質を発現しているHaCaT細胞から得た核抽出液を、10%SDS PAGEにかけて分離し、抗AK抗体を用いる免疫プロットングによってカルシウム刺激後、2時間でのNA状態を分析した。

【図1】

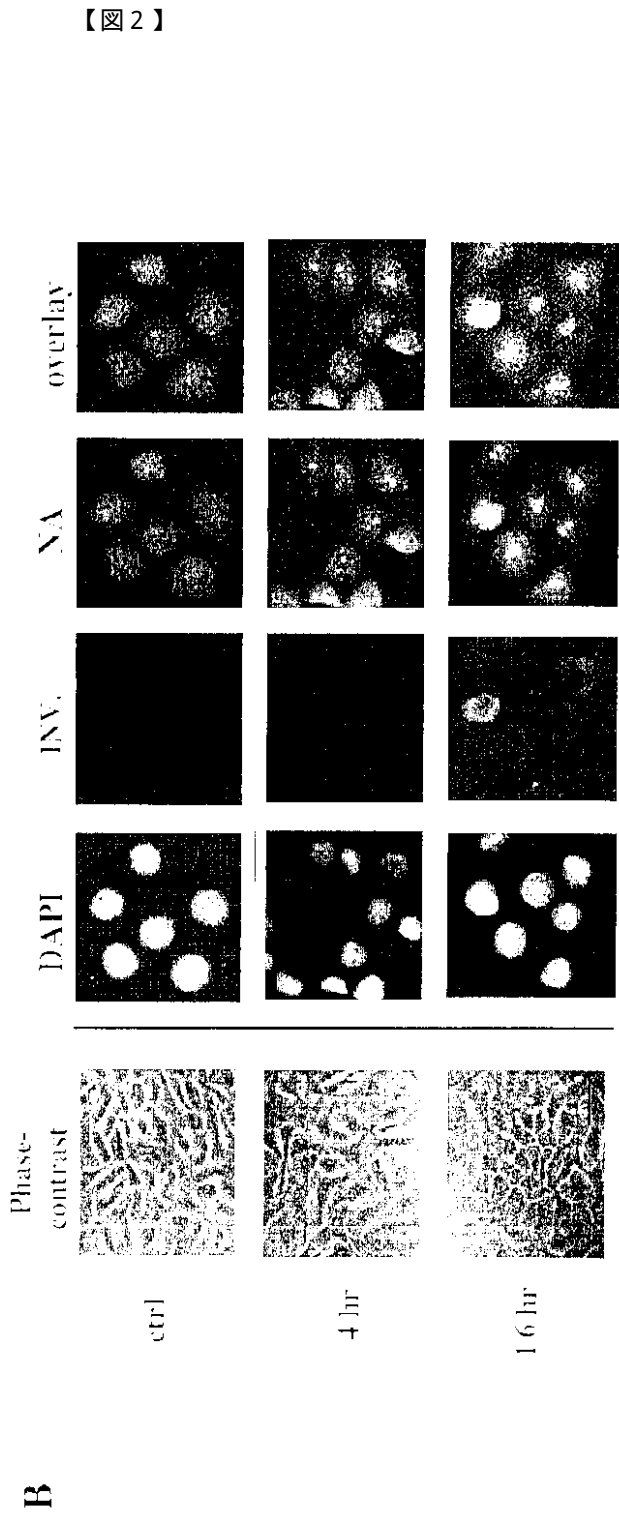
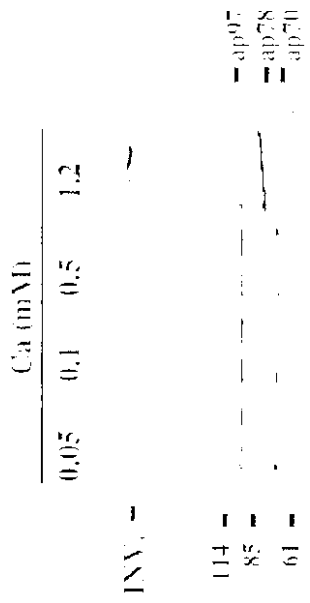


【図4】



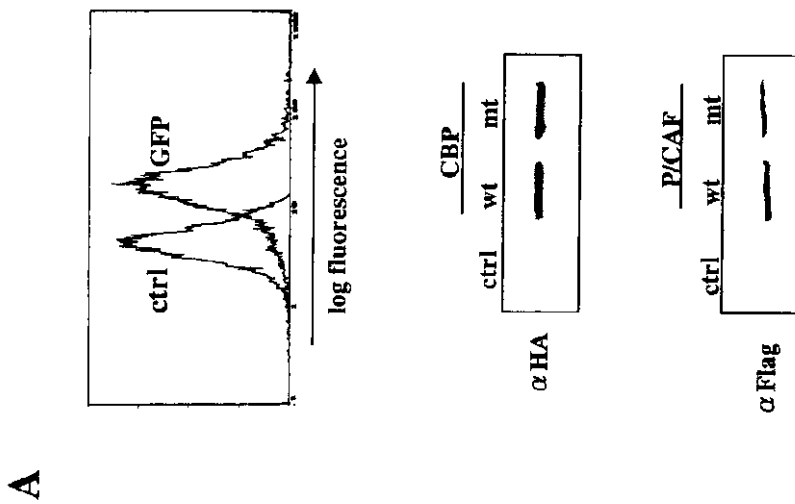
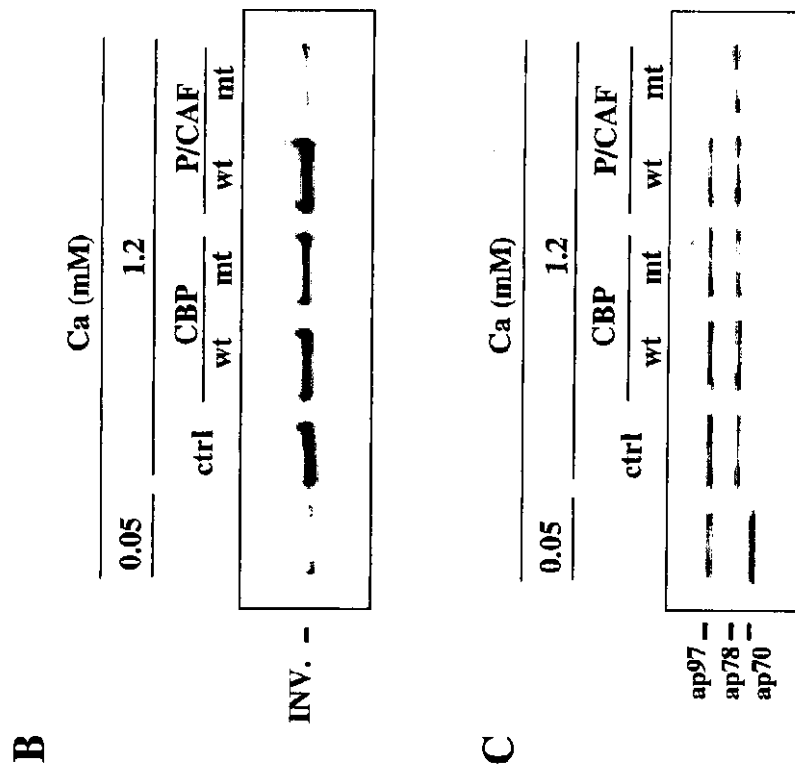


C



【図2】

【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

C 0 7 K 16/18

G 0 1 N 33/15

33/50

識別記号

F I

C 0 7 K 16/18

G 0 1 N 33/15

33/50

テ-マコード(参考)

Z

Z

(27)

特開2003-113200

33/53

33/53

D

M

33/566

33/566

(72)発明者 丸山 征郎
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘6丁目45番地10

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 FB02 FB03
4C084 AA17 NA14 ZA892
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA00 DA76 EA20 EA50 FA71
GA01 GA31 HA06

专利名称(译)	角质形成细胞的核信号转导蛋白及其临床应用		
公开(公告)号	JP2003113200A	公开(公告)日	2003-04-18
申请号	JP2001305690	申请日	2001-10-01
申请(专利权)人(译)	株式会社口コモジェン		
[标]发明人	中島利博 川畑久 丸山征郎		
发明人	中島利博 川畑久 丸山征郎		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C07K14/47 A61K45/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 C07K16/18 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/FB02 2G045/FB03 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA892 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA01 4H045/GA31 4H045/HA06		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过利用参与钙诱导的角质形成细胞分化调节的核信号转导蛋白的功能来实现各种临床应用。角质形成细胞分化调节信号转导因子及其生理功能可通过调节角质形成细胞增殖/分化来控制角质化。提供了用于信号转导的核蛋白，它们的抗体，配体，用于检查/诊断皮肤病的药物或使用它们的疾病，以及用于预防/治疗的药物。

