

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-536855
(P2010-536855A)

(43) 公表日 平成22年12月2日(2010.12.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	Z N A 4 B 0 2 4
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4 C 0 8 4
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4 H 0 4 5
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-521897 (P2010-521897)	(71) 出願人	592104782 ザ・トラスティーズ・オブ・コランビア・ ユニバーシティー・イン・ザ・シティー・ オブ・ニューヨーク THE TRUSTEES OF COL UMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YO RK アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100 27、ニューヨーク、ウエスト・ワンハン ドレッドシックスティーンス・ストリート ・アンド・ブロードウェイ (番地無し)
(86) (22) 出願日	平成20年8月22日 (2008.8.22)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月23日 (2010.4.23)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/010045		
(87) 國際公開番号	W02009/025867		
(87) 國際公開日	平成21年2月26日 (2009.2.26)		
(31) 優先権主張番号	60/966,052		
(32) 優先日	平成19年8月23日 (2007.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト化Notch融合タンパク質の組成物および治療方法

(57) 【要約】

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を含む融合タンパク質を提供する。この発明はまた、腫瘍を有する対象を治療する方法、対象における脈管形成を阻害する方法、卵巣癌を有する対象を治療する方法、代謝性疾患を有する対象を治療する方法であって、当該対象に対して当該対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を投与することを含む方法を提供する。本発明は更に、癌を有する対象を治療するための、対象における脈管形成を阻害するための、卵巣癌を有する対象を治療するための、代謝性疾患を有する対象を治療するための薬学的組成物の製造における上記融合タンパク質の使用を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を有する融合タンパク質。

【請求項 2】

当該Notch受容体タンパク質がNotch 1 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 3】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 2 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。 10

【請求項 4】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 3 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 5】

当該Notchレセプタータンパク質がNotch 4 レセプタータンパク質である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 6】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 7】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 2 の融合タンパク質。 20

【請求項 8】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 3 の融合タンパク質。

【請求項 9】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 4 の融合タンパク質。

【請求項 10】

当該抗体のFc部分がヒト抗体のFc部分である請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 11】

当該シグナルペプチドがNotch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4 またはIgG重鎖である請求項 1 の融合タンパク質。

【請求項 12】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。 30

【請求項 13】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 13を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 14】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 24を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 15】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 23を含む請求項 2 の融合タンパク質。 40

【請求項 16】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 17】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復13 - 24を含む請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 18】

当該Notch 1 レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復25 - 36を含む請求項 2 の融合タンパク質。 50

【請求項 19】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 20】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 13を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 21】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復1 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 22】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 23】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復9 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 24】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復13 - 23を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 25】

当該Notch4レセプタータンパク質の細胞ガイドメインが、EGF様反復21 - 29を含む請求項5の融合タンパク質。

【請求項 26】

配列番号54に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 27】

配列番号55に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 28】

配列番号56に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 29】

配列番号57に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 30】

配列番号58に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 31】

配列番号59に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 32】

配列番号60に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 33】

配列番号61に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 34】

配列番号62に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 35】

配列番号63に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 36】

配列番号64に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項2の融合タンパク質。

【請求項 37】

配列番号65に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項2の融合タンパク質。

【請求項 38】

配列番号66に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項2の融合タンパク質。

【請求項 39】

10

20

30

40

50

配列番号 6 7 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 0】

配列番号 6 8 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 1】

配列番号 6 9 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 2】

配列番号 7 0 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。 10

配列番号 7 1 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 3】

配列番号 7 2 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 4】

配列番号 7 3 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。 20

配列番号 7 4 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 5】

配列番号 7 5 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。

【請求項 4 6】

配列番号 7 6 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 2 の融合タンパク質。 30

配列番号 7 7 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 4 9】

配列番号 7 8 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 0】

配列番号 8 0 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 1】

配列番号 8 1 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 2】

配列番号 8 2 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 3】

配列番号 8 3 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 4】

配列番号 8 4 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。 40

【請求項 5 5】

配列番号 8 5 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 6】

配列番号 8 6 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 7】

配列番号 8 7 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 8】

配列番号 8 8 に記載の配列である連続したアミノ酸を含む請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 5 9】

配列番号 8 9 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の 50

融合タンパク質。

【請求項 6 0】

配列番号 9 0 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 1】

配列番号 9 1 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 2】

配列番号 9 2 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 3】

配列番号 9 3 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 4】

配列番号 9 4 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 5】

配列番号 9 5 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 6】

配列番号 9 6 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 7】

配列番号 9 7 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 8】

配列番号 9 8 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 6 9】

配列番号 9 9 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 0】

配列番号 1 0 0 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 1】

配列番号 1 0 1 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 2】

配列番号 1 0 2 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 3】

配列番号 1 0 3 に記載の配列である連続したヌクレオチドによりコードされる請求項 5 の融合タンパク質。

【請求項 7 4】

腫瘍を有する対象を治療するために有効な量の請求項 1 - 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより腫瘍を有する当該対象を治療することを含む腫瘍を有する対象を治療する方法。

【請求項 7 5】

対象における脈管形成を阻害するために有効な量の請求項 1 - 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより当該対象において脈管形成を阻害することを含む対象における

10

20

30

40

50

脈管形成を阻害する方法。

【請求項 7 6】

対象を治療するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む卵巣癌を有する対象を治療する方法。

【請求項 7 7】

対象を治療するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質を対象に投与し、それにより代謝性疾患を有する当該対象を治療することを含む代謝性疾患を有する対象を治療する方法。

【請求項 7 8】

当該代謝性疾患が、糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、または循環器病である請求項 7 7 の方法。

【請求項 7 9】

腫瘍を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質の使用。

【請求項 8 0】

対象における脈管形成を阻害するための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質の使用。

【請求項 8 1】

卵巣癌を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質の使用。

【請求項 8 2】

代謝性疾患を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための請求項 1 ~ 7 3 の融合タンパク質の使用。

【請求項 8 3】

当該代謝性疾患が、糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、または循環器病である請求項 8 2 の使用。

【請求項 8 4】

対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害する方法。

【請求項 8 5】

当該病理学的なリンパ管形成が腫瘍リンパ管形成またはリンパ節転移である請求項 8 4 の方法。

【請求項 8 6】

対象における腫瘍リンパ節転移を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍リンパ節転移を阻害する方法。

【請求項 8 7】

当該転移が血管、リンパ性脈管構造またはリンパ節を介して生じる請求項 8 6 の方法。

【請求項 8 8】

対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害する方法。

【請求項 8 9】

当該二次的腫瘍の増殖が、二次的腫瘍に関連する脈管形成の阻害により阻害される請求項 8 8 の方法。

【請求項 9 0】

対象における腫瘍による血管取り込みを阻害するために有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法。

【請求項 9 1】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と血管内皮成長因子 (VEGF) の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 2】

前記 VEGF の阻害剤が、 VEGF-A、 PGEF、 FEGF-B、 VEGF-C または VEGF-D の阻害剤である請求項 9 1 の方法。

【請求項 9 3】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と VEGF レセプター 阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 4】

当該 VEGF レセプター 阻害剤が、 VEGFR-1 阻害剤、 VEGFR-2 阻害剤または VEGFR-3 阻害剤である請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 5】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と血小板由来成長因子 (PDGF) の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 6】

血小板由来成長因子の阻害剤が、 PDGF-A の阻害剤または PDGF-B の阻害剤である請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 7】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と PDGF レセプター アンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 9 8】

当該 PDGF レセプター アンタゴニストが PDGF レセプター -B- アンタゴニストである請求項 9 7 の方法。

【請求項 9 9】

対象における癌を治療するために各々有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質と HER2/neu の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法。

【請求項 1 0 0】

血管性の増殖性網膜症の治療に有効な量の請求項 1 ~ 7 3 の何れか 1 項に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む血管性の増殖性網膜症の治療方法。

【請求項 1 0 1】

前記血管性の増殖性網膜症が、 糖尿病性網膜症、 黄斑変性 (macular degeneration) または未熟児網膜症である請求項 1 0 0 の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本出願は、 2 0 0 7 年 8 月 2 3 日に出願された米国仮出願番号 60/966,052 の優先権を主張するものであり、 その内容は引用によりここに組み込まれる。

【0 0 0 2】

ここに開示される本発明は、 米国保険研究所 (National Institutes of Health) からの助成番号 R01HL62454 号、 並びに国防総省からの助成番号 DAMRDCW81XWH-04-1-054 および助成番号 DAMD17-03-1-0218 号の米国政府の支援によりなされた。 従って、 合衆国政府は本発明において一定の権利を有する。

10

20

30

40

50

【0003】

この出願を通して、種々の出版物がカッコ内にアラビア数字により、またはカッコ内に著者および出版データにより引用される。これらの出版物についての全引用は、本明細書の最後に見出すことが可能である。これらの出版物の開示は、これによって引用により本出願に組み込まれ、本発明の属する技術分野をより十分に記載する。

【0004】

[発明の背景]

脈管の成長

胎芽発生の期間において、脈管系の形成は早期の必須の工程である。胎芽において、脈管の成長は近軸および垂直プレート中胚葉に由来する多能性の血管芽細胞で開始する。当該血管芽細胞(hemangioblast)は、血液前駆体(hematopoietic progenitor)または内皮細胞前駆体の何れにも分化する可能性を有し、血管芽細胞(angioblast)として知られる。

10

【0005】

血管の発達は、脈管形性として知られる工程で開始し、それにより血管芽細胞が内皮細胞に分化し、遊走し、それと共に初期の血管網状組織を形成する。この初期の血管ネットワークは、同種の大きさであり、且つ全て内皮細胞で作られている脈管からなる。血管網状組織が、次に、脈管形性を経て再構築される。

20

【0006】

脈管形性は新しい血管の発芽、これらの血管の無血管領域への遊走、および付属細胞、周細胞および平滑筋細胞の補充を含む(Gale and Yancopoulos, 1999)。分化し、収縮性のある血管壁を形成する平滑筋細胞は、神経稜細胞(neural crest cells)、間充織細胞(mesenchymal cells)および更に内皮細胞までも含む多数の前駆体から生じる(Owens, 1995)。成人においては、脈管形性は、濾胞性の発達、創傷治癒、並びに腫瘍脈管形性および心疾患などの病理学的過程を必要とする。

20

【0007】

NotchファミリーおよびNotchリガンド

ショウジョウバエ(*Drosophila*)、*C. Elegans*、ゼブラフィッシュ(zebrafish)および哺乳類の研究は、Notch経路が、多数の細胞運命の決定を調節するために機能する進化的に保存されたシグナリング機構であることを示している。Notchシグナリングは、3つの胚層全てから生ずる細胞の適切なパターニングのために必要とされる。細胞の状況に依存して、Notchシグナリングは、分化を阻害も誘導もし、増殖を誘導し、および細胞生存を促進することが可能である(Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Lewis, 1998; Weinmaster, 1997)。ショウジョウバエにおいて、単一のNotchタンパク質が2つのリガンド、セレイト(Serrate)とデルタにより活性化される。哺乳類において、これらのファミリーは4つのNotch遺伝子(Notch1、Notch2、Notch3およびNotch4)と5つのリガンド、2つのセレイト様(Jagged1-2)と3つのデルタ(DI1、3、4)にまで広がっている(Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Gallahan and Callahan, 1997; Lardelli et al., 1994; Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996a; Shutter et al., 2000a; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1992; Weinmaster et al., 1991)。胚発生の間中、Notchレセプターおよびリガンドは、動的な空間的且つ時間的パターンで発現される。しかしながら、全てのリガンドが全てのレセプターを活性化するのかどうかは不明である。

30

40

【0008】

Notchシグナリングと機能

Notchシグナリングは、多くの異なる種類の細胞運命の決定に、環境的な状況に依存する阻害性、誘導性または増殖性のシグナルを供給することによって影響している(以下に総説されている:Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Greenwald, 1998; Robey, 1997; Vervoort et al., 1997)。この多面的な機能は、Notchが空間時間的な方法において複数のシグナル経路を調節することを示唆する。

50

【0009】

Notchが調節する細胞運命の決定と一致して、当該レセプターとリガンドの両方が、単一の膜貫通ドメインを有する細胞表面タンパク質である（図1）。Notchタンパク質の調節性の細胞ガイドドメインは、大部分は、リガンド結合のために必要とされる直列に配列したEGF様反復からなる(Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Weinmaster, 1998)。EGF様反復までのC末端は、更なる3つのシステインリッチ反復であり、LIN12/Notch反復（LIN12/Notch repeats；LNR）と称される(Greenwald, 1994)。LNRの下流に、フーリン様転換酵素(furin-like convertase)により認識されるタンパク分解性の切断配列(RXRR)が位置する。Notch1については、この部位での切断により180キロダルトンの細胞外ペプチドと120キロダルトンの細胞内ペプチドが得られ、これらは共に保持されて細胞表面でヘテロダイマー・レセプターを生じる(Blaumueller et al., 1997; Kopan et al., 1996; Logeat et al., 1998)。

Notchの細胞内ドメイン(NotchICD、図1)は、この形態のNotchが構成的に信号を出すことを示す機能喪失のNotchの表現型を救う(Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1993; Lyman and Young, 1993; Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993)。

【0010】

Notchの細胞質ドメインは3つの同定可能なドメインを含む：RAMドメインおよびアンキリン反復ドメインおよびC末端PESTドメイン（図1）。リガンド活性化において、Notchは2つの更なるタンパク分解性の切断を受け、その結果、細胞質ドメインの放出が起こる(Weinmaster, 1998)。このNotchペプチドは核に転位置し、CSL(CBF, Su(H), Lag-2)として知られる転写性のリプレッサーと相互作用し、それを転写性のアクチベーターに変える。CSL/Notch相互作用は、NotchのRAMドメインの存在に依存し；一方では、転写性の活性は、アンキリン反復の存在を必要とする(Hsieh et al., 1996; Hsieh et al., 1997; Roehl et al., 1996; Tamura et al., 1995; Wettstein et al., 1997)。インビオおよびインピトロ研究の両方が、HESおよびHey遺伝子がNotch/CSL依存性シグナリングの直接のターゲットであることを示す(Bailey and Posakony, 1995; Eastman et al., 1997; Henderson et al., 2001; Jarriault et al., 1995; Nakagawa et al., 2000; Wettstein et al., 1997)。HESおよびHey遺伝子は、bHLH転写性リプレッサーであり、N-boxでDNAを結合する(Nakagawa et al., 2000; Sasai et al., 1992; Tietze et al., 1992)。Notchはまた、CSL非依存性の経路によりシグナリングすることも提唱されている。実際に、まさにアンキリン反復ドメインの発現はNotchシグナリングの幾つかの形態のために必要十分である(Lieber et al., 1993; Matsuno et al., 1997; Shawber et al., 1996b)。

【0011】

最終的に、PESTドメインは、SEI-10/ユビキチン依存性経路によるタンパク質ターンオーバーに関連している(Greenwald, 1994; Oberg et al., 2001; Rogers et al., 1986; Wu et al., 1998; Wu et al., 2001)。当該レセプターと同様に、Notchリガンドの細胞外ドメインもまた、直列に配列されるEGF様反復の大部分からなる（図1）。これらの反復の上流は、当該レセプターのリガンド結合と活性化のために必要とされるDSL(Delta, Serrate, Lag-2)として知られる異なるEGF様反復である(Artavanis-Tsakonas et al., 1995)。

【0012】

[Notchシグナリングおよび血管発生]

血管形成および脈管形成を誘導するために機能する多くの遺伝子が同定されているが、殆どが、血管発生の間にどのように細胞運命決定が特定化されるのかについては知られていない。多くの観察が、Notchシグナリング経路が細胞運命決定と血管系のパターンングにおいて役割を担い得ることを示唆する。

【0013】

Notch1、Notch4、Jagged1およびDI14は、全て発達中の血管において発現され、一方でNotch3は補助的の平滑筋細胞において発現される(Krebs et al., 2000; Shutter et al., 2000b; Uyttendaele et al., 1996; Villa et al., 2001; Xue et al., 1999)。Jagged1

10

20

30

40

50

欠損マウスは、胚芽致死性であり、幾つかの血管性の欠陥を有する(Xue et al., 1999)。Notch1のヌル接合体マウスは、胚芽致死性であり、幾つかの神経細胞の欠陥で死に至るが、脈管形成における欠陥をも有する(Krebs et al., 2000; Swiatek et al., 1994)。Notch4欠損マウスは出産され、正常であるように見えるが、Notch1およびNotch4の両方を欠損した胎芽は、幾つかの出血毒性および血管パターニング性の欠陥でE9.5で死に至り、これはNotch1およびNotch4が、血管発生の間において機能的に重複性であり得ることを示す(Krebs et al., 2000)。内皮におけるNotch4の活性型の外因性発現もまた、二重のNotch1/Notch4ヌル接合体マウスについて見られるのと同様な血管の欠陥を引き起こし、Notchシグナリングの適切なレベルが、胎芽血管構造の適切な発生のために重要な意味を有することを示唆している(Uyttendaele et al., 2001)。

10

【0014】

纏めると、Notch/Notchシグナル成分のためのマウス変異体からのデータは、血管リモデリング、動脈静脈特異化、血管平滑筋細胞補充および心臓/心流出血管発生を含むNotch依存性の幾つかの過程を明らかにする。

【0015】

最近の実験が、動脈/静脈の内皮細胞特異化にNotchシグナリングを結び付けている。E13.5胎芽(embryos)のインサイチュー分析は、Notch1、Notch3、Notch4、DI4、Jagged1およびJagged2発現が動脈に限定され、静脈では欠けていることを明らかにした(Villa et al., 2001)。発現データと一致して、ゼブラフィッシュにおけるNotchシグナリングの破損が、動脈性マーカーのエフリンB2(efrinB2)の減少と付随し、一方では、Notchの活性型の異所性の発現が背動脈範囲内の静脈性細胞マーカーEphB4の減少を導く(Lawson et al., 2001)。これらのデータは、Notchシグナリングが脈管形成の間の動脈性および静脈性の細胞運命の特定化することを助け得ることを示唆する。

20

【0016】

纏めると、Notch/Notchシグナル成分のためのマウス変異体からのデータが、血管リモデリング、動脈静脈特異化、血管平滑筋細胞補充および心臓/心流出血管発生を含むNotch依存性の幾つかの過程を明らかにする。

【0017】

NOTCHシグナリングはまた、成人血管系において機能することも示唆されている。ヒトにおいて、NOTCH3の細胞ガイドメインにおけるミスセンス突然変異は退行性の血管性疾患、CADASILの発生に関連する(CARONI ET AL., 1998; DESMOND ET AL., 1998; JOUTEL ET AL., 2000; JOUTEL ET AL., 1996)。創傷治癒モデルにおいて、Jagged1発現の増加が、再生化している内皮性の創傷縁で観察され、Notchシグナリングが成人の脈管形成の過程において機能している可能性が示唆されている(LINDNER ET AL., 2001)。纏めると、これらのデータは、血管発生；血管形成、血管パターニング/脈管形成、および動脈/静脈特定化の間の重要な意味を持つ多くの工程でのNotchシグナリング機能を支持する。しかしながら、Notchシグナリング経路がこれらの異なる工程に影響するための分子的な機序は更に明らかにされるべきである。

30

【0018】

[重要性]

シミズら(J. Biol. Chem. 274(46): 32961-32969 (1999))は、結合試験におけるNotch1ECD/Fc、Notch2ECD/FcおよびNotch3ECD/Fcの使用を記載する。しかしながら、シミズらは、脈管形成を阻害するためのそれらのタンパク質の使用には言及していない。

40

【0019】

キタジュースキーら(Kitajewski et al.)に対する2002年4月30日発行の米国特許第6,379,925号は、マウスのNotch4を記述する。しかしながら、それは、問題となる当該出願において明らかにされるNotchに基づく融合タンパク質を記載するものではない。

【0020】

Notchタンパク質は、脈管構造、造血系および神経系を含む発生上の決定において重要な役割を果たしている。そのために、それらの機能の理解は、細胞運命決定および傾倒が

50

発生期間および成人組織においてどのように制御されているのかを理解するための鍵である。今日までに、NotchまたはNotchリガンド遺伝子の破損についての幾つかの報告は、この経路が血管の発生を導く機構の基礎的な部分であることを強調する血管の表現系を記載している。異常なNotch活性は、癌および血管性疾患(CADASIL)の両方を含むヒトの病理に関連付けられてきた。腫瘍脈管形成におけるNotchの分析は最近になって始まったものであるが、我々のNotchの潜在的な下流のターゲットの発見は、脈管形成に関連する病理学的な過程における役割を示唆する。例えば、VEGFR-3は腫瘍脈管形成および腫瘍リンパ管形成の両方に関連している。幾つかの他の潜在的なNotchターゲットの発現または機能も腫瘍脈管形成に関連している：それらはエフリンB2(ephrinB2)、Id3、アンジオポイエチン1(Angiopoietin 1)およびPDGF-Bを含む。Notch遺伝子機能におけるこれらのターゲットの役割についての洞察は、ヒトの病理学の将来の分析を明らかに促進するであろう。

10

【発明の概要】

【0021】

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインおよびそれに対して結合する抗体のFc部分を有する融合タンパク質を提供する。

【0022】

本発明は、腫瘍を有する対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより腫瘍を有する当該対象を治療することを含む腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。

20

【0023】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより当該対象において脈管形成を阻害することを含む対象における脈管形成を阻害する方法を提供する。

【0024】

本発明は、対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む卵巣癌を有する対象を治療する方法を提供する。

【0025】

本発明は、対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与し、それにより代謝性疾患を有する当該対象を治療することを含む代謝性疾患を有する対象を治療する方法を提供する。

30

【0026】

本発明は、腫瘍を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0027】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

40

【0028】

本発明は、卵巣癌を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0029】

本発明は、代謝性疾患を有する対象の治療のための薬学的組成物を製造するための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【0030】

本発明は、対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害する方法を提供する。

【0031】

本発明は、対象における腫瘍転移を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対

50

象に投与することを含む、対象における腫瘍転移を阻害する方法を提供する。

【0032】

本発明は、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。

【0033】

本発明は、対象における腫瘍による血管取り込み (blood vessel cooption) を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法を提供する。

【0034】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と血管内皮成長因子 (VEGF) 、 VEGF-A 、 P1EF 、 FEGF-B 、 VEGF-C または VEGF-D の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0035】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と VEGF レセプターアンタゴニスト、 VEGFR-1 アンタゴニスト、 VEGFR-2 アンタゴニストまたは VEGFR-3 アンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0036】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と血小板由来成長因子 (PDGF) 、 PDGF-A または PDGF-B の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0037】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と PDGF レセプターアンタゴニストとを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0038】

本発明は、対象における癌を治療するために各々有効な量の上記融合タンパク質と HER2/neu の阻害剤とを対象に投与することを含む対象における癌を治療する方法を提供する。

【0039】

本発明は、血管性の増殖性網膜症の治療に有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む血管性の増殖性網膜症の治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】この図は、NotchおよびNotchリガンド：Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged-1、Jagged-2、Delta様1、Delta様3、Delta様4：の模式的な構造を示す。

【図2】この図は、Notchに基づく融合タンパク質 (NotchECD/Fc) の模式的な設計を示す。EGF反復を含むNotch1、Notch2、Notch3またはNotch4の細胞外ドメインは抗体のFc部分に対して融合されている。

【図3】この図は、Notchに基づく融合タンパク質の活性を試験するための共培養アッセイを示す。NotchおよびNotch応答性転写性レポーターは、「Notch応答性」細胞、HeLaにおいて発現される。Notchリガンド、Jagged-1、Delta様1またはDelta様4は、「リガンド提示」細胞、293において発現される。発現は個々の細胞集合体のトランスフェクションにより媒介され、細胞は共培養され、次にNotch依存性レポーター活性について試験される。

【図4】この図は、NotchとNotchリガンドとの間の相互作用によるNotchシグナリングの活性化に対するNotchに基づく融合タンパク質の阻害活性を示す。Notchシグナリングの誘導は、Notch1発現細胞および3種類のNotchリガンド発現細胞の両者の共培養により検出され、これらの誘導はNotchに基づく融合タンパク質発現ベクターのNotch1発現細胞への共トランスフェクションにより阻害された。そのため、Notchに基づく融合タンパク質は、N

10

20

30

40

50

otchとNotchリガンドとの間の相互作用の阻害に基づくNotch阻害剤として使用可能である。

【図5】この図は、293におけるNotch1に基づく融合タンパク質(Notch1ECD/Fc)の発現を示す。パネルA:細胞溶解物における発現(lys)または培地に分泌された発現(sup)。パネルB:293溶解物におけるNECD/Fcの発現の一覧。

【図6】この図は、アデノウイルスコーディングVEGF-165に感染させたHUVECにおけるNotchシグナリングの活性化を示す。Notchシグナリングの活性化は、CBF1プロモーター活性を使用して検出される。CBF1プロモーターの転写性活性は、Notch-ICのCBF1への結合により活性化される。我々は、異なるMOIでアデノウイルスコーディングVEGF-165に感染させたHUVECにおけるCBF1プロモーター活性を測定した。CBF1プロモーターの誘導は、MOI依存的な様式でのAd-LacZ感染細胞に比較して、Ad-VEGF感染HUVECにおいて明瞭に検出された。このデータは、VEGFの過剰発現がHUVECにおけるNotchシグナリングを活性化できることを示した。

【図7】この図は、NotchシグナリングのVEGF誘導性の活性化におけるNotchに基づく融合タンパク質の効果を示す。Ad-Notchに基づく融合タンパク質のAd-VEGFとの重感染は、Ad-VEGF感染単独により誘導されるCBF1プロモーター活性の活性化を明らかに減少した。パネルAにおいて、各アデノウイルスについて40MOIでの感染の場合、レポーター遺伝子のトランスフェクション後の24時間での60%の阻害と48時間での90%の阻害が検出された。このNotchトラップの阻害活性は、Ad-Notchに基づく融合タンパク質のMOIに依存した。

【図8】この図は、HUVECで過剰発現されたVEGF-165による発芽の誘導におけるNotchに基づく融合タンパク質の効果を我々が評価した実験を示す。Ad-VEGF感染HUVECをタイプコラーゲンゲル上で8日間培養した場合、発芽はコラーゲンゲルの中へ誘導された。過剰発現されたVEGFによる発芽のこの誘導は、アデノウイルスコーディングNotchに基づく融合タンパク質の重感染により明瞭に阻害された。Ad-Notchに基づく融合タンパク質それ自身は、形態学上の影響は少なかった。

【図9】この図は、顕微鏡下で視野当たりの芽をカウントした結果を示す。HUVECへのAd-VEGF感染は使用されたMOIに依存して芽の数を増加した。Notchに基づく融合タンパク質の半分のMOIが使用された場合でさえも、Ad-VEGFに比較して、Ad-VEGF誘導性の発芽は明瞭に阻害された。これらのデータは、VEGFがHUVECの発芽をNotchシグナリングの活性化を介して誘導し、Notchに基づく融合タンパク質がVEGF誘導性発芽を阻害できたことを示唆した。

【図10】この図は、ラットNotch1タンパク質の細胞外ドメイン(配列番号1)とリンカー配列(配列番号2)のアミノ酸配列を示す。

【図11】この図は、ラットNotch2タンパク質の細胞外ドメイン(配列番号3)とリンカー配列(配列番号2)のアミノ酸配列を示す。

【図12】この図は、マウスNotch3タンパク質の細胞外ドメイン(配列番号4)のアミノ酸配列を示す。

【図13】この図は、マウスNotch4タンパク質の細胞外ドメイン(配列番号5)とリンカー配列(配列番号2)のアミノ酸配列を示す。

【図14A】この図は、ラットNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号6)を示す。

【図14B】この図は、ラットNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号6)を示す。

【図15A】この図は、ラットNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号7)を示す。

【図15B】この図は、ラットNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号7)を示す。

【図16A】この図は、マウスNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号8)を示す。

【図16B】この図は、マウスNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列(配列番号8)を示す。

10
20
30
40
50

を示す。

【図17A】この図は、マウスNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号9）、並びにリンカー配列の核酸配列（配列番号10）およびアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図17B】この図は、マウスNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号9）、並びにリンカー配列の核酸配列（配列番号10）およびアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図18A】この図は、ヒトNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号11）を示す。

【図18B】この図は、ヒトNotch1遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号11）を示す。 10

【図19A】この図は、ヒトNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号12）を示す。

【図19B】この図は、ヒトNotch2遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号12）を示す。

【図20A】この図は、ヒトNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号13）を示す。

【図20B】この図は、ヒトNotch3遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号13）を示す。 20

【図21A】この図は、ヒトNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号14）を示す。

【図21B】この図は、ヒトNotch4遺伝子の細胞外ドメインの核酸配列（配列番号14）を示す。 20

【図22a】図22A - 22I これらは、VEGFがNotchシグナリングを活性化してHUVECの発芽を誘導することを示す。HUVECは、40MOI（図22A、22H、22I）または20MOIでAd-VEGFを形質導入された。Ad-LacZをHUVECに対して同時形質導入して、同様の総量のアデノウイルス60MOI（図22G）、80MOI（図22A）および100MOI（図22H、22I）とした。図22AはNotchおよびNotchリガンド発現のRT-PCR分析を示す。番号はPCRサイクルを示す。図22Bは、CSLレポーター活性における形質導入VEGFの効果を示す。図22Cは、Ad-VEGFを形質導入されたCSLレポーター活性におけるSU5416の効果を示す。図22DはNotchデコイ（N1ECDFc）の構成物を示す。図22EはAd-N1ECDFcを形質導入されたHUVECからのN1ECDFcの分泌を示す。図22Fは共培養アッセイでのリガンド誘導性CSLレポーター活性に対するN1ECDFcの効果を示す（白四角：（-）；黒四角：0.33 ng pHyTC-N1ECDFc；黒四角：0.67 ng pHyTC-N1ECDFc）。図22G - Iは、Ad-VEGF形質導入HUVECに対するN1ECDFcの効果を示す。Notchシグナリングは、表示された用量でのAd-N1ECDFcの共伝達の存在または不在におけるHUVECへのAd-VEGFの形質導入により活性化された。図22Gは、Ad-VEGFによりトランス活性化されたCSLレポーター活性におけるN1ECDFcの効果を示す。図22Hは、40MOIのAd-N1ECDFcの同時形質導入によるAd-VEGF形質導入HUVECの発芽の阻害を示す。図22IはAd-VEGF形質導入HUVECの発芽におけるN1ECDFcの効果の定量化を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。 30

【図22b】記載なし。 40
【図22c】記載なし。
【図23a】図23A - 23J これらは、NotchシグナリングがFlt1発現を上方制御してHUVECの発芽を誘導することを示す。HUVECは、40MOIでのAd-LacZまたはAd-N1ICの何れかを形質導入された。図23A - 23CはNotch誘導性HUVEC発芽におけるレセプターチロシンキナーゼの阻害剤の効果を示す。図23Aは、PD166866、ZD1893の1 μMおよびSU5416の0.5 μMで処理されたAd-N1IC形質導入HUVECの発芽の写真である。図23Bは、1 μMの阻害剤の効果の定量化を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。図23CはSU5416の効果の用量依存性を示す（白四角：芽；黒四角：細胞数）。図23D - EはAd-N1IC形質導入HUVECにおけるFlt-1発現の誘導を示す。図23DはRlt-1mRNA発現のRT-PCR分析を示す。図23

【図23e】記載なし。 50

EはFlt-1タンパク質発現のW.B.分析を示す。図23F-GはNotch誘導性HUVEC発芽のPIGF刺激による促進を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、完全培地の代わりに、50 ng/ml PIGFの不在または存在においてSFMと共にコラーゲンゲル上で培養された。図23Fは、Ad-N1IC形質導入HUVECのPLGF誘導性の発芽を示す(矢印(arrow head)：単一の糸状仮足を伴う芽；矢(arrow)：複数の糸状仮足を伴う芽)。図23GはAd-N1IC形質導入HUVECの発芽におけるPIGFの効果の定量化を示す(白四角：複数の；黒四角：全体の)。図23H-IはFlt1発現におけるFlt-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、コントロール(CT)またはFlt-1 siRNAの何れかの200pmolでトランスフェクションされた。図23Hは、Flt-1 mRNA発現の減少を示す。図23IはFlt-1タンパク質発現の減少を示す。図23JはNotch誘導性HUVECの発芽におけるflt-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す。Ad-N1IC形質導入HUVECは、100または200pmolの何れかのsiRNAをトランスフェクションされ、コラーゲンゲル上で2日間培養された。

10

20

30

40

【図23b】記載なし。

【図23c】記載なし。

【図24】これらの図は、VEGFがNotchシグナリングを介したMMP-9およびMT1-MMPの両方の上方制御によるゼラチナーゼ活性を制御することを示す。図24A-Bは、HUVECにおいてVEGFにより刺激されたMMP-9およびMMP-2活性のゼラチン酵素電気泳動分析を示す。図24Aは、MMP-9活性におけるN1ECDFcの効果を示す。形質導入HUVECを記載された日数で(即ち、D2、D4、D6、D8)フィブリンゲル上で培養した。同様な結果が、コラーゲンゲルを用いることにより得られたが、MMP-9の誘導は、コラーゲンゲルよりもフィブリンゲルにおいてより強いものであった(データには示さず)。図24Bは、MMP-2活性におけるN1ECDFcの効果を示す。HUVECを記載された用量でAd-N1ECDFcを形質導入し、コラーゲンゲル上で培養したHUVECから4日目に培養上清を採取した。図24C-Dは、NotchシグナリングでのMMP-9およびMT1-MMPの上方制御を示す。HUVECをAd-LacZまたはAd-N1ICの何れかで形質導入した。番号はPCRサイクルを示す。図24Cは、MMP-9およびMMP-2の発現におけるNotchシグナリングの効果のRT-PCR分析を示す。図24DはNotchシグナリングを伴う転写物およびタンパク質の両方のNT1-MMP発現の誘導を示す。図24Eは、Ad-N1ECDFcの同時形質導入を伴うAd-VEGF-HUVECにおけるMMP-9およびMT1-MMP発現のRT-PCR分析を示す。HUVECは、各々40MOIで、Ad-N1ECDFcの同時形質導入の不在または存在においてAd-VEGFで形質導入された。Ad-LacZが同時形質導入されて、80MOIの同様な総量のアデノウイルスとした。

【図25a】図25A-25D これらの図は、VEGF依存性インビオ脈管形成におけるNotchシグナリングの役割を示す。図25A-25DはマウスDASアッセイにおけるVEGF誘導性脈管形成のN1ECDFcによる阻害を示す。代表的な写真を示す。図25Aは、293/VEGFトランスフェクションでの、対Notchデコイ(Notchに基づく融合タンパク質)N1ECDFcも発現している293/VEGFでの皮下の誘導性脈管形成を示す。図25Bはコントロールにおける293/VEGF、対Notchデコイ(Notchに基づく融合タンパク質)-N1ECDFc発現293における293/VEGFにより誘導される血管新生の程度の定量化を示す。図25CはAD-LacZ感染MDA-MB-231細胞、対Ad-N1ECDFc(Notchに基づく融合タンパク質)感染MDA-MB-231細胞での皮下誘導性脈管形成を示す。MDA-MB-231乳癌細胞はVEGFを産生する(データに示さず)。図25Dは、Ad-LacZ感染MDA-MB-231細胞、対Ad-N1ECDFc(Notchに基づく融合タンパク質)感染MDA-MB-231細胞により誘導される血管新生の程度の定量化を示す。

50

【図25b】記載なし。

【図26】これらの図は、Ad-VEGF165形質導入HUVECの増殖を示す。HUVECは記載された用量のAd-VEGF165で形質導入された。Ad-LacZも同時形質導入されて、細胞当たり40PFUのMOIで同様の総量のアデノウイルスとした。HUVECを1%FBSを補充したSFM中に懸濁し、次に、0.4mlの培地と共に1ウェル当たり 1×10^4 細胞で24ウェルマルチウェルプレートに播種した。4日後、細胞数をCCK-8キットを用いて測定し、その結果を、細胞当たり40PFUのMOIでAd-GFPを形質導入したコントロール細胞の数に対して決定した細胞数の比で示した。図26は、増殖における形質導入されたVEGFの効果を示す。図26Bは、SU5416の阻害効果

50

を示す。Ad-VEGF形質導入HUVECを記載された用量のSU5416で処理した。

【図27】これらの図は、I型コラーゲンゲル上でのHUVECの発芽の誘導を示す。HUVECは、記載された用量でのAd-VEGF165またはAD-N1ICの何れかで形質導入された。Ad-LacZも同時形質導入されて、アデノウイルスの同様な総量を細胞当たり40pfuのMOIとした。形質導入HUVECは完全培地を用いてコラーゲンゲル上で培養された。発芽の量は、7日目に顕微鏡下で評価された。

【図28】これらの図は、細胞増殖におけるNotchシグナリングの変化の影響を示す。細胞を記載されたアデノウイルスで形質導入した。Ad-GFPも同時形質導入して、アデノウイルスの同様な総量を細胞当たり60pfuのMOIとした。4日後、細胞数をCCK-8キットを使用して決定し、結果を、細胞当たり60pfuのMOIでのAd-GFPで形質導入されたコントロール細胞の数に対して決定された細胞数の比として示す。図28Aは、HUVECの増殖における形質導入されたN1ICおよびNotch融合タンパク質の影響を示す。形質導入HUVECを完全培地に懸濁し、次に1ウェル当たり 1×10^4 細胞で24ウェルマルチウェルプレートに0.4mlの記載された培地と共に播種した(白四角:Ad-N1IC;黒四角:Ad-N1ECDFc)。図28Bは、HP1/VEGF形質移入体の増殖におけるNotch誘導タンパク質の効果を示す。形質導入されたKP1/VEGF形質移入体をRPMI1640に懸濁し、次に24ウェルマルチウェルプレートに1ウェル当たり 2×10^4 細胞で0.5mlの培地と共に播種した。

【図29】この図は、AD-N1IC-形質導入HUVECにおけるPIGF発現の誘導のRT-PCR分析を示す。HUVECは、細胞当たり40pfuのMOIでのAd-LacZまたはAd-N1ICの何れかで感染させた。全RNAを、コラーゲンゲル上で5日間に亘り完全培地で培養された形質導入HUVECから単離した。

【図30】これらの図は、Ad-N1IC-またはAd-VEGF-形質導入HUVECの何れかの発芽のFlk-1 siRNAトランスフェクションによる阻害を示す。図30Aは、Ad-VEGF-HUVECにおけるFlk-1mRNAおよびタンパク質の発現の200pmolのFlk-1 siRNAのトランスフェクションによる減少を示す。細胞当たり40pfuのMOIでのAd-VEGF-HUVECをコントロール(CT)またはFlk-1 siRNAの何れかの200pmolでトランスフェクトした。総RNAをトランスフェクションの48時間後に単離した。トランスフェクションの48時間に亘りSFMで血清を枯渇された細胞から収集した。図30Bおよび30Cは、VEGFまたはNotchの何れかの誘導性HUVEC発芽におけるFlk-1 siRNAトランスフェクションの阻害効果を示す。細胞当たり40 pfuのMOIでのVEGFまたはNotchの何れかの誘導性HUVECを記載された通りの200pmolのsiRNAでトランスフェクトし、5日間コラーゲンゲル上で培養した。図30BはHUVEC発芽におけるFlk-1 siRNAトランスフェクションの効果を示す(白四角:Ad-VEGF;黒四角:Ad-N1IC)。図30CはFlk-1 siRNAトランスフェクションの阻害効果の定量化を示す。

【図31】これらの図は、Ad-N1IC-形質導入HUVECの発芽のマトリックスメタロプロテイン阻害剤GM6001の処理での阻害を示す。細胞当たり40pfuでのAd-LacZまたはAd-N1IC-HUVECの何れも、50 μmでのGM6001の不在または存在において5日間コラーゲンゲル上で培養した。図31Aは、Notch誘導性HUVEC発芽におけるGM6001の効果を示す。図31BはGM6001の阻害効果の定量化を示す。

【図32】図32A - 32D これらの図は、NotchデコイがNotchリガンドにより刺激されたNotchシグナリングの活性化を阻害することを示す。図32Aは、Notchデコイ(N1ECDFc)の概要と、培養上清中に分泌されたNotch1デコイを検出するためのウェスタンプロットを示す。Notch1デコイをコードするアデノウイルス(Ad-N1ECDFc)を記載された通りのm.o.i.で形質導入されたHUVEC。図32Bは、Notch1デコイが共培養シグナリングアッセイにおいてリガンド誘導性CSLレポーター活性を阻害することを示す。Notchシグナリングの活性化は、Notchリガンドを発現する293細胞と共に培養されたNotch1を発現するHeLa細胞において測定した。データは、平均値±SDとして示す。図32Cは、Notch4の異所性発現がフィブリンゲル上で培養されたHUVECの形態形成を誘導することを示す。HUVECは、30m.o.i.でNotch4をコードするアデノウイルス(Ad-Notch4)と、感染細胞を標識するための10m.o.i.のAd-GFPで形質導入した。2日後、HUVECを安定なHUVECトランスフェクタントとフィブリンゲル上で共培養し、形態学的变化を蛍光顕微鏡を使用して記録した。Notch4は細胞

10

20

30

40

50

伸展 (cell extensions) を誘導し (上段左、白色矢印) 、200nMの化合物Eの処理はNotch4誘導性進展を阻害した (上段右)。Notch1デコイ発現はNotch4誘導性細胞伸展を阻害した。アデノウイルス形質導入HUVECを、Fc (下段左) またはNotch1デコイ (下段右) の何れかを発現している安定したHUVECトランスフェクタントとフィブリングル上で共培養し、2日後に写真を撮った。線 (Bar) = 200 μm。図32DはNotch4誘導性伸展におけるNotchシグナル阻害の効果の定量化を示す。発芽の減少は、化合物Eでの処理およびN1ECDFcの形質導入後に統計学的に有意であった(共にp<0.0001; データは平均値±SDで示す)。

【図33】図33A - 33D これらの図は、FGF4がマウス乳癌Mm5MT細胞におけるNotchリガンドの発現を誘導することを示す。レトロウイルスの遺伝子移入により產生された安定したMm5MTトランスフェクタント。図33Aは、偽トランスフェクタント (Mm5MT-X) と比較しての、FGF4を発現するMm5MTトランスフェクタント (Mm5MT-FGF4) におけるJagged1およびDI11の誘導を示すNotchリガンドの発現のRT-PCR分析の定量化を示す。図33Bは、Japped1タンパク質は、対Mm5MT-XでのMm5MT-FGF4において、ウェスタンプロットにより測定することにより評価された。図33Cは、FGFレセプター-キナーゼの阻害剤であるPD166866による、Mm5MT-FGF4細胞におけるNotchリガンド発現の減少を示す。図33Dは、Mm5MTトランスフェクタントにおけるJapped1染色の免疫組織化学的分析を示す。線 = 50 μm。

【図34】図34A - 34C これらの図は、Notch1デコイが、マウスにおけるMm5MT-FGF4腫瘍の脈管形成および皮下腫瘍増殖を阻害することを示す。図34Aは、マウスにおいて、Mm5MT-FGF4-XとMm5MT-FGF4-Fcの腫瘍体積が、Mm5MT-FGF4-N1ECDFcトランスフェクタントとは有意に異なることを示す(21日目、P=0.037およびP=0.008, Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fc、それぞれ対Mm5MT-FGF4-N1ECDFc; データは平均値±SDで示す)。図34Bは、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントの腫瘍内のCD31染色を用いた新生血管の免疫組織化学的分析を示す。上段パネル、線=100 μm、下段パネル、線 = 50 μm。図34Cは、定量分析が、Fcまたは偽トランフクト腫瘍と比較したときの、Mm5MT-FGF4-N1ECDFcトランスフェクタントにおけるCD31(+)新生血管の減少を示すことを示す(Mm5MT-FGF4-N1ECDFcに対して、Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fcについて共にP<0.001; データは平均値±SDで示す)。異種移植はインキュベーション (inoculation) の22日後に採取し、抗CD31抗体で染色した。

【図35】図35A - 35D これらの図は、Notch1デコイ発現がヒトNGP異種移植における脈管形成を崩壊し、腫瘍生存度を障害することを示す。我々は以前、これらのヒト神経芽細胞種の異種移植が、成熟した階層的な脈管構造を有し、これはVEGF阻害に対して相対的に抵抗性であることを報告している(16)。Notchレセプター活性が、NGP脈管形成に寄与するのか否かを決定するために、我々は、NGP細胞を、Notch1デコイ構成物でトランスフェクトしたが、これは培養におけるそれらの増殖能には影響しなかった(データには示さず)。しかしながら、インビボでの腫瘍生存度における顕著な減少があり(図35A)(TUNEL=赤色蛍光、赤血球=緑色蛍光、線=100 μm)、腫瘍細胞アポトーシスの有意な増加(図35B、P=0.0002、NGP-LacZ腫瘍に対するNGP-N1ECDFcにおけるTUNEL-陽性細胞)と、腫瘍内出血(図35C、p<0.0001、実質性赤血球シグナルの定量化)を伴った。加えて、NGP-N1ECDFc異種移植における腫瘍血管ネットワークは、NGP-LacZコントロールに比べて、物理的に崩壊しているように見え、(抗CD31およびSMA抗体をそれぞれ使用する)ECおよびVMCのための免疫染色がこれらの血管細胞層の連続性の欠如を示していた(図35D、線 = 50 μm)。個々の血管性細胞は、互いに剥離しているように見えた。纏めると、これらの結果は、Notch1デコイ発現が、ECおよびVMCの安定した脈管性導管(vascular conduits)を形成する能力を崩壊し、それにより血管崩壊、出血および腫瘍組織の虚血を引き起こすことを示唆する。

【図36】この図は、Notch1デコイを発現するようにプログラムされたSKOV3腫瘍細胞が卵巣癌異種移植の増殖を阻害することを示す。

【図37】この図は、FoxoおよびNotchによる筋芽細胞分化の調節を示す。C2C12細胞を抗ミオシン抗体(緑色)およびDAPI(青色)で免疫染色した。パネルの記載についてのテキストを参照されたい。各実験は6回または6回以上繰り返した。

10

20

30

40

50

【図38】図38A-38C これらの図は、C2C12分化の定量的な分析を示す。図38AはC2C12細胞におけるミオシン発現のウェスタンプロット分析を示す。図38Bはミオシン陽性細胞の形態計測分析を示す。分化実験からの結果は、全てのDAPI陽性細胞に対するパーセンテージとしてミオシン免疫染色細胞の数をスコアリングすることにより分析した。図38Cは、DBD-Foxo1ADAレポーター遺伝子アッセイを示す。我々は、Foxo1-ADAまたはDBD-Foxo1ADAを共トランスクレクトされた細胞における正準のFoxo1応答Igfbp1プロモーター（左のパネル）とHes1プロモーター（右のパネル）を使用する遺伝子アッセイを行った。ウェスタンプロット（挿入）は、2つのタンパク質の発現レベルが同様であることを示す。星印はANOVAによるP<0.01を示す。

【図39】これらの図は、Foxo1がCsIと共に免疫沈降することを示す。a) LacZ-（符号「-」で示す）またはJagged1-発現HEK293細胞（符号「+」で示す）と共に培養されたC2C12細胞における内在性Foxo1およびCsIの共免疫沈降。b-c) FLAG-CsIおよびHA-Foxo1で共トランスクレクトされたC2C12細胞における共免疫沈降実験。d-e) FLAG-CsIおよび切断型ミュータントMyc-またはHA-タグ付256Foxo1と共にトランスクレクトされたC2C12細胞における共免疫沈降実験。

【図40】図40A-40D これらの図は、Foxo1がCsIに対して直接に結合することを示す。A) HEK293細胞からの免疫沈降されたCsIとのGST-Foxo1融合タンパク質のGSTプルダウンアッセイ。b-c) 無細胞系におけるGST-Foxo1およびGST-FLAG-CsIの結合、並びにCsI相互作用ドメインのマッピング。全長および切断型フラグメントのGST-Foxo1およびGST-FLAG/CsIを、細菌から精製して共インキュベートした。その後、CsIを抗FLAG抗体を使用して単離し、免疫沈降物を抗Foxo1または抗FLAG抗体でイムノプロットにより分析した。d) 筋芽細胞分化中の内在性Foxo1、CsIおよびNotch1（Endog）、または統合Foxo1-ADA（Foxo1-ADA）での形質導入を検出するためのC2C12細胞におけるHes1プロモーターChIPスパンニングCsI結合部位。インプットは、免疫沈降前にクロマチンから抽出されたDNAを表す。各時点に対応するHes1（準定量的なRT-PCR）およびミオシン（ウェスタンプロット）発現が示される。0日目は、筋芽細胞融合を誘導するために、細胞を血清欠乏とした時点と定義した。略語：IP：免疫沈降； IB：イムノプロット； TCL：全細胞溶解物。

【図41】図41A - 41B これらの図は、Foxo1がNotch誘導性Hes1、Hes5およびHey1発現を制御することを示す。a) Foxo1-ADAまたはNotch1-ICで形質導入され、続いて記載された通りのGfp、Foxo1またはCsI siRNAでトランスクレクトされたC2C12における準定量的なRT-PCRにより測定されたHes1、Hes5およびHey1発現。b) Foxo1-ADA、Notch1-IC、Foxo1 siRNA、GFP siRNAまたはコントロールプラスミドで形質導入されたHEK293細胞におけるHes1レポーター遺伝子アッセイ。我々はフシフェラーゼ活性を測定し、それを-ガラクトシダーゼ活性により正規化した。データは、コントロールベクターに対して相対的な任意のユニットで表す。

【図42】図42A - 42F これらの図は、Foxo1が、Hes1プロモーターに対するNotchの結合と、Hes1ターゲット遺伝子の活性化のために必要とされることを示す。a) CsI siRNAの不在（レーン1-2）および存在（レーン3-4）においてLacZ-（符号「-」で示す）またはJagged1-（符号「+」で示す）発現HEK293細胞と共に培養されたC2C12細胞における内在性Foxo1とNotch1 ChIPアッセイ。b) Foxo1 siRNAの不在（レーン1-2）と存在（レーン3-4）での共培養系での内在性Notch1のChIPアッセイ。c) Notch1またはGfp siRNAの不在および存在における共培養に統合Hes1プロモーターアッセイ。d) Foxo1 siRNAの不在（レーン1-2）および存在（レーン3-4）での共培養系でのHes1に対して結合するNcorおよびSmrtおよびMaml1 ChIPアッセイ。e) 準定量的なRT-PCRによるC2C12細胞におけるMyoD、Myf5および-アクチンの発現。f) Hes1プロモーターのFoxo1およびNotch調節のモデル。

【図43】図43A - 43D これらの図は、骨格筋におけるFoxo1の条件的な消失（conditional ablation）を示す。

【0041】

A) 各種の種類の筋におけるFoxo1およびFoxo4発現レベルのウェスタンプロット。b) MyoG-Foxo1マウスおよびコントロール（lox/lox）同腹仔からのヒラメ筋および足底筋の異染

10

20

30

40

50

性および免疫組織化学的分析。c) Myog-Foxo1(黒棒 (solid bars))とコントロールマウス(白棒 (empty bars))の遺伝子発現分析; TropC: トロポニン-C; TropT: トロポニン-T; Mlc: ミオシン軽鎖; Myog: ミオゲニン(Myogenin); Mck: 筋型クレアチニナーゼ。データは3つの独立した測定値の平均値±SEMである(n=6、各遺伝子型について)。星印はANOVAによるP<0.05を示す。d) 8週齢Myog-Foxo1マウスおよびlox/lox同腹仔におけるトレッドミルパフォーマンス試験(Treadmill performance test)(n=6、各遺伝子型について)。星印はANOVAによるP<0.05を示す。

【図44】この図は、C2C12細胞におけるアデノウイルス形質導入の効果を示す。我々は、細胞にHA-Foxo1-ADAまたはHA-Notch1-ICアデノウイルスを形質導入し、抗HA抗体(赤色)およびDAPI(青色)で免疫組織化学法を行った。
10

【図45】この図は、トランスフェクトされたFoxo1発現の阻害を示す。我々は、アデノウイルスの形質導入に続き、内在性(左のパネル)およびトランスフェクトされた(右のパネル)Foxo1の発現を阻害するFoxo1 siRNAの能力を試験した。

【図46】この図は、Foxo1 siRNAの特異性を示す。Foxo1 siRNAでトランスフェクトされたC2C12細胞におけるFoxo1、Foxo3およびFoxo4発現のウェスタンプロット分析。

【図47】この図は、Foxo1-ADAおよびNotch1-ICが細胞増殖に影響しないことを示す。我々はC2C12細胞にLacZ、Foxo1-ADAまたはNotch1-ICアデノウイルスを形質導入し、抗Ki67抗体およびDAPIで、免疫組織化学法を行い、少なくとも1000細胞をカウントすることにより、Ki67陽性細胞に対するパーセンテージとして、Ki67標識インデックスを定量化した。

【図48】この図は、siRNA抵抗性Foxo1-ADAを示す。Foxo1 siRNAでトランスフェクトされた細胞におけるFoxo1-ADAとsiRNA抵抗性Foxo1-ADAのウェスタンプロット。
20

【図49】この図は、Foxo1-CSl共免疫沈降の特異性を示す。Foxo3またはFoxo4発現ベクターの共トランスフェクションに続いて、我々はCsIとの共免疫沈降実験を行った。

【図50】この図は、Hes1プロモーターアッセイを示す。我々は、4タンデム型反復のCsI結合部位を含む合成Hes1レポーター遺伝子をC2C12細胞中のFoxo1およびNotch1-ICでのプロモーターアッセイにおいて使用した。

【図51】この図は、siRNAによるCsI発現の阻害を示す。我々は、異なる濃度のCsI siRNAでのC2C12細胞のトランスフェクションに続くウェスタンプロットによりCsIレベルを測定した。

【図52】この図は、図式化されたヒトNotch1デコイの11の構築物を示す。
30

【図53】この図は、Notch1シグナルペプチド末端を決定するためのNotch1のシグナル配列分析を示す。デンマーク工業大学(the Technical University of Denmark)によりオンラインで提供されるSignalI 3.0 Server(the SignalI 3.0 Server)を使用する分析の予測結果を示す。結果は、アラニン18(A19)とA19の間に位置する切断のメジャー部位とA19とアルギニン20(R20)との間のマイナー部位を予測する。これらの2つの切断部位はヒトNotch1のアミノ酸配列1-20において「/」により示した: MPPLLAPLLCLALLPALA/A/R(配列番号15)。ヒトNotch1のアミノ酸1-23をコードするヌクレオチド配列はatgccgccc tccctggcgcc cctgctctgc ctggcgctgc tgcccgcgct cgccgcacga ggcccgcgca(配列番号16)である。

【図54】この図は、ヒトHcシグナルペプチド末端を決定するためのヒトHcのシグナル配列分析を示す。MWG WKCLLFWAVLVTATLCTA/R(配列番号17)。デンマーク工業大学によるオンライン提供されるSignalIP 3.0 Serverを使用する分析の予測結果を上に示す。これらの結果は、アラニン21(A21)とアルギニン22(R22)の間に位置する切断のメジャー部位を予測する。この切断部位は、上で提供されたヒトHc(配列番号17)のアミノ酸配列1-22において「/」により示す。ヒトHcのアミノ酸1-22をコードするヌクレオチド配列はatgtggggct ggaagtgcct cctcttctgg gcttgctgg tcacagccac tctctgcact gccagg(配列番号18)である。
40

【図55】この図は、ヒトNotch1のEGF反復36の後で終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図56】この図は、ヒトNotch1のEGF反復13の後で終止する全ての構成物についてのヒ
50

トNotch1/Fc融合配列を示す。

【図57】この図は、ヒトNotch1のEGF反復23の後で終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図58】この図は、ヒトNotch1のEGF反復24の後を終止する全ての構成物についてのヒトNotch1/Fc融合配列を示す。

【図59A】図59Aおよび59B この図は、ヒトNotch1の完全長アミノ酸(aa)配列を示し、aa残基1(M=メチオニン)からaa残基2555(K=リジン)からなる(配列番号52)。シグナルペプチドおよび最初の36EGF様反復ドメインがこの配列のaa1-1433に存在する。アミノ酸1-1433、またはこれらのaaの部分集合は、次のセクションにおいて記載されるヒトNotch1デコイタンパク質の設計のために利用される。EGF反復1-36を含むアミノ酸に下線を付す。
10

【図59B】記載なし。

【図60】この図は、Notch1デコイタンパク質におけるFcタグを産生するために利用できるヒトFcアミノ酸配列を示す(配列番号53)。ヒトFcの237アミノ酸は、Notch1のEGF様反復のまさに下流の、全てのNotch1デコイ構成物のC末端で融合される。ヒトFcのこの領域が検出およびNotchデコイの精製を可能にし、分泌されるヒトNotch1-ヒトFc融合タンパク質の安定化に役立つ。

【図61】この図は、h-Notch⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号54)を示す。h-Notch⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1433からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸1434-1670。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1670アミノ酸を含む。
20

【図62】この図は、h-Notch⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号55)を示す。h-Notch⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-531からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸532-768。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。
30

【図63】この図は、h-Notch⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号56)を示す。h-Notch⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-948からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸949-1185。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。

【図64】この図は、h-Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号57)を示す。h-Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-594からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸595-831。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。
40

【図65】この図は、h-sp^{HC}Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号58)を示す。h-sp^{HC}Notch⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-593からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸594-830。予測されるシグナルペプチド配列に
50

下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。

【図66】この図は、 $h-sp^N Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号59）を示す。略語 sp^N は、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^N Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1118からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸1119-1355。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1355アミノ酸を含む。

【図67】この図は、 $h-sp^{HC} Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号60）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^{HC} Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-1117からなる配列；これに続く（3）ヒトHCタグを含むアミノ酸1118-1354。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1354アミノ酸を含む。

【図68】この図は、 $h-sp^N Notch1^{(13-24)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号61）を示す。略語 sp^N は、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^N Notch1^{(13-24)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-478からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸479-715。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は715アミノ酸を含む。

【図69】この図は、 $h-sp^{HC} Notch1^{(13-24)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号62）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^{HC} Notch1^{(13-24)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-477からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸478-714。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は714アミノ酸を含む。

【図70】この図は、 $h-sp^N Notch1^{(25-36)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号63）を示す。略語 sp^N は、ヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^N Notch1^{(25-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-508からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸509-745。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は745アミノ酸を含む。

【図71】この図は、 $h-sp^{HC} Notch1^{(25-36)}$ デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号64）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。 $h-sp^{HC} Notch1^{(25-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-507からなる配列；これに続く（3）ヒトHCタグを含むアミノ酸508-744。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は744アミノ酸を含む。

【図 7 2 A】この図は、図 6 1において示されるh-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 6 5）。

【図 7 2 B】記載なし。

【図 7 3】この図は、図 6 2において示されるh-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 6 6）。

【図 7 4 A】この図は、図 6 3において示されるh-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 6 7）。

【図 7 4 B】記載なし。

【図 7 5】この図は、図 6 4において示されるh-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 6 8）。

10

【図 7 6】この図は、図 6 5において示されるh-sp^{Hc}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 6 9）。

【図 7 7 A】この図は、図 6 6において示されるh-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 0）。

【図 7 7 B】記載なし。

【図 7 8 A】この図は、図 6 7において示されるh-sp^{Hc}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 1）。

【図 7 8 B】記載なし。

【図 7 9】この図は、図 6 8において示されるh-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 2）。

20

【図 8 0】この図は、図 6 9において示されるh-sp^{Hc}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 3）。

【図 8 1】この図は、図 7 0において示されるh-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 4）。

【図 8 2】この図は、図 7 1において示されるh-sp^{Hc}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列を示す（配列番号 7 5）。

【図 8 3】この図は、ヒトNotch4の全長アミノ酸(aa)配列を示し、aa 1 (M =メシオニン)からaa 2003 (K =リシン)からなる（配列番号 7 6）。シグナルペプチドおよび第1の29E GF-様反復ドメインはこの配列のaa 1-1174に存在する。アミノ酸1-1174またはこれらaaの部分集合はヒトNotch4デコイタンパク質の設計に利用され、次のセクションで説明される。EGF-反復を取り囲むアミノ酸は下線を付す。

30

【図 8 4】この図は、Notch4デコイタンパク質におけるFcタグを产生するために利用できるヒトFc配列を示す（配列番号 7 7）。ここで示されるヒトFcの237アミノ酸はNotch4のEGF様反復のまさに下流の、全てのNotch4デコイ構成物のC末端で融合される。ヒトFcのこの領域が検出およびNotchデコイの精製を可能にし、分泌されるヒトNotch4-ヒトFc融合タンパク質の安定化に役立つ。

【図 8 5】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 7 8）を示す。h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復1-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-1173からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸1174-1410。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1410アミノ酸を含む。

40

【図 8 6】この図は、h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 7 9）を示す。h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-554からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸555-791。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は791アミノ酸を含む。

50

【図 8 7】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 0）を示す。h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 1-23 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-933 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 934-1170。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 1170 アミノ酸を含む。

【図 8 8】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 1）を示す。略語 sp^N は、ヒト Notch4 シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 9-23 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-602 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 603-839。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 839 アミノ酸を含む。

【図 8 9】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 2）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒト HC シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト HC シグナル配列であり、ヒト HC のアミノ酸 1-22 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 9-23 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 23-597 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 598-834。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 834 アミノ酸を含む。

【図 9 0】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 3）を示す。略語 sp^N は、ヒト Notch4 シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 9-29 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-843 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 844-1080。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 1080 アミノ酸を含む。

【図 9 1】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 4）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒト HC シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト HC シグナル配列であり、ヒト HC のアミノ酸 1-22 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 9-29 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 23-838 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 839-1075。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 1075 アミノ酸を含む。

【図 9 2】この図は、h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 5）を示す。略語 sp^N は、ヒト Notch4 シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト Notch4 シグナル配列であり、ヒト Notch4 のアミノ酸 1-27 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 13-23 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 28-444 からなる配列；これに続く（3）ヒト Fc タグを含むアミノ酸 445-681。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒト Fc タグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は 681 アミノ酸を含む。

【図 9 3】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8 6）を示す。略語 sp^{HC} は、ヒト HC シグナルペプチドがこの形成物で用いられることを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の 3 つの成分からなる：（1）ヒト HC シグナル配列であり、ヒト HC のアミノ酸 1-22 からなる配列；これに続く（2）ヒト Notch4 の EGF- 様反復 13-23 をコードするアミノ酸であり、アミノ酸 23-439 からなる配列；こ

10

20

30

40

50

れに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸440-676。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は676アミノ酸を含む。

【図94】この図は、h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号87)を示す。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物で用いられるこ¹⁰とを意味する。h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる:(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-392からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸393-629。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は629アミノ酸を含む。

【図95】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質のアミノ酸配列(配列番号86)を示す。略語sp^{HC}は、ヒトHCシグナルペプチドがこの形成物で用いられるこ²⁰とを意味する。h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる:(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-387からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸388-624。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は624アミノ酸を含む。

【図96A】この図は、ヒトNotch4の核酸配列(配列番号89)を示す。

【図96B】記載なし。

【図97】この図は、ヒトNotch4シグナルペプチド配列(配列番号90)を示す。下線を付した配列がシグナルペプチドをコードする。

【図98】この図は、ヒトHCシグナルペプチド(nt 1-66)の核酸配列(配列番号91)を示す。

【図99】この図は、ヒトFCタグの核酸配列(配列番号92)を示す。

【図100A】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号93)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-29)[nt 1-3522]。

【図100B】記載なし。

【図101】この図は、h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号94)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-13)[nt 1-1662]。

【図102A】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号95)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-23)[nt 1-2799]。

【図102B】この図は、h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号95)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復1-23)[nt 1-2799]。

【図103】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号96)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-29)[nt 1-81, 1075-3522]。

【図104】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号97)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-29)[nt 1075-3522]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図105】この図は、h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号98)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-23)[nt 1-81, 1075-2799]。

【図106】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号99)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復9-23)[nt 1075-2799]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図107】この図は、h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号100)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復13-23)[nt 1-81, 1549-2799]。

【図108】この図は、h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列(配列番号101)を示す。ヒトNotch4デコイ(EGF様反復13-23)[nt 1549-2799]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図109】この図は、h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列（配列番号102）を示す。ヒトNotch4デコイ（EGF様反復21-29）[nt 1-81, 2428-3522]。

【図110】この図は、h-sp^HCNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質をコードする核酸配列（配列番号103）を示す。ヒトNotch4デコイ（EGF様反復21-29）[nt 2428-3522]およびHCシグナルペプチド[nt 1-66]。

【図111】図は、ヒトNotch4デコイの11形成物の組織的配列を示す。

【図112】図は、Notch4シグナルペプチドが末端であることを決定するためのNotch4のシグナル配列分析を示す。

【図113】図は、ヒトNotch4のEGF反復29後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。
10

【図114】図は、ヒトNotch4のEGF反復13後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。

【図115】図は、ヒトNotch4のEGF反復23後の末端である全ての構造に対するヒトNotch4/Fc融合配列を示す。

【図116】図は、循環グルコースおよびインスリンレベルを下げるNotch4不足を示す。我々は、Notch4（N4）突然変異マウスの血液グルコースおよびインスリンレベルを最近分析している。離乳（P21）で、N4+/-交尾から発生される複数の同腹子は通常餌または脂肪の45%カロリからなる高脂肪食のいずれかが供される。5ヶ月の歳のときに、血液を引き出し、かつグルコースおよびインシュリンレベルが無作為に肥育されたマウスまたは6時間の空腹後のマウスから測定される。雌において、N4アレルの低下は食に依存する循環グルコースレベルの十分な減少に関連する。これに対し、N4不足は通常食で肥育された雄のみにグルコースレベルの減少と付随した。すべての雌のインシュリンレベルは影響さらなかつた（データなし）。これは、雌マウスがインシュリン耐性に対して遺伝的に保護され、かつ従って代謝性異常が精巧に穏やかであることによるかもしれない。通常食において、雌マウスのインシュリンレベルに相違がなかつた。しかしながら、N4のアバレーション（ablation）は高脂肪食で飼育される雄マウスのインシュリンレベルに無作為に与える十分な減少に関連する。同様な傾向は、6時間絶食したN4ノックアウト雌に観察される。したがつて、N4損失は通常食で飼育される両方の雄および雌の血液グルコースレベルの十分な減少に関連する。雌において、グルコースレベル、しかしインシュリンレベルではなく、のこの減少は高脂肪食で飼育されるN4マウス雌に観察された。これに対し、グルコースレベルはN4ノックアウト雄で変化せず、一方インシュリンレベルが減少した。これらの結果は、混乱したインシュリンシグナルによる高血糖の遺伝的かつ環境形態に対して保護するNotch4不足と矛盾しない。
20

【図117】図は、高脂肪食を供したマウスの重量利得を抑えたNotch4発現損失を示す。

【図118】図は、マウス血清に存在するラットNotch1デコイを示す。哺乳類血流中のラットNotch1デコイ系生物の安定性を試験した。ウエスタンプロット分析は全長たんぱく質がマウスで発現でき、かつ変質の僅かな形跡で検出可能なレベルにて存在されることを証明する。
30

【図119】図は、ヒトNotch1デコイ（n-Notch(1-36)デコイ）およびラットNotch1デコイブロックマウス乳房腫瘍増殖を示す。ここで表される増殖曲線はラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイのいずれかがヌードマウスの腫瘍異種移植の増殖を低減することを証明する。
40

【図120】図は、肺組織へのSKNEP1転移を抑制するラットNotch1デコイを示す。SKNEP1ユーリング肉腫細胞は、制御Fcタンパク質またはラットNotch1デコイs1（sort 2）またはラットNotch1デコイs4（sort 4）を発現するためプログラムされた。これらのSKNEP1細胞ラインはヌードマウスの肝臓に同所性で移植される。腫瘍増殖の6週間後に、肺への転移は組織学的に評価した。僅かな肺に示されるラットNotch1デコイに発現するSKNEP1細胞は転移に対して陽性である。我々は、ヌードマウスのラットNotch1デコイの発現が肺に転移するためにSKNEP1細胞の容量を減少すると結論付ける。

【図121】図は、マウス皮膚のリンパでVEGFR-3およびLYVE-1を共発現するNotch1およ
50

びNotch4を示す。Notch1およびNotch4のこれらの発現は、マウスP4背部皮膚の脈管構造で分析した。この時点で、経皮リンパ管は表面近くのリンパキャビラリーに活発に再造形し、かつ低経皮層の管に集まる。皮膚の5 μm断面はNotch1またはNotch4(赤)およびPECA M、VEGFR-3またはLYVE-1(緑)に対する抗体で共染色された。Notch1およびNotch4は、血液およびリンパ管内皮細胞マーカー、PECAM(上部パネル)での重複するパターンの発現を共有する。Notch1およびNotch4は、両方のVEGFR-3(中間パネル)および経皮脈管構造のLYVE-1(下部パネル)で共発現された。この発現パターンはNotch1およびNotch4が発現され、かつ新生児新皮のリンパ管で機能するかもしれないことを証明する。

【図122】図は、Notch4同型接合性ノックアウトマウスで変化する経皮リンパキャビラリーを示す。我々は、P4マウスの経皮リンパを試験した。野生型セクションおよびNotch4ヌル接合体はPECAMおよびLYVE-1(緑)に対する抗体で免疫染色される。PECAM染色の分析は変異体と野生型皮膚(上部パネル)の間に同様に見られた。これに対し、Notch4変異体の新皮のLYVE-1-陽性管はしばしば拡張され、かつLYVE-1染色は不連続であった(下部パネル)。これらの結果は、Notch4シグナルがリンパ血管網状組織の再造形に関与してもよいことを提案する。

【図123】この図は、マウス経皮リンパの減少LYVE1発現に関連するNotch4の損失を示す。Notch4異型接合性(N4+/-)マウスは交尾され、結果として得られた子の背部皮膚は取り除かれ、かつ出生後14日に包理される。皮膚の断面は、内皮細胞マーカー、PECAM(データなし)、またはリンパ内皮細胞マーカー、LYVE1(A)に免疫染色される。それぞれに對して5つの領域は顕微鏡によって捕捉され、かつPECAMおよびLYVE1染色は画像ソフトウェア(B, C)を用いて定量される。PECAM発現は野生型(WT)新皮(B)に比べてN4+/-新皮で約25%に減少する。LYVE-1染色は、WTマウス(C)に比べてN4+/-で約50%減少されるLYVE1染色でPECAMより影響を受けた。WT(A)に比べてN4+/-リンパでLYVE1染色の強度での減少であった。

【図124】図は、ヒト乳がんリンパ管を発現されるNotch1およびNotch4を示す。我々は、ヒト乳がんのVEGFR-3またはLYVE-1(緑)およびNotch1またはNotch4(赤)に対する抗体で二重免疫組織化学をなした。Notch1およびNotch4は腫瘍外血液およびヒト微小乳頭乳がんのリンパ内皮で表される。測定するために、もしNotch1情報伝達が腫瘍リンパ内皮で活性化されるならば、我々はポドプレニン(podoplanin)(緑)およびN1Val(赤；細胞シグナル)に対する抗体で二重染色し、抗体は活性化Notch1ペプチドを特別に検出する。活性化Notch1ペプチドの発現は、殆ど(白矢印)観測されるが、リンパ内皮核(下部パネル)の全て(黄色矢印)ではない。これらの結果は、Notch1が病理学的なリンパ管で活発に情報伝達する。

【発明の詳細な説明】

【0042】

[用語]

本出願において使用されるとき、ここに明確な他の記載がある場合を除き、次の各用語は以下に示す意味を有する。

【0043】

「投与すること」は当業者に公知の何れかの方法を使用して達成または実行されればよい。当該方法は、例えば、病巣内、筋肉内、皮下、静脈内、腹腔内、リポソーム媒介、経粘膜、経腸、局所的、経鼻、経口、経肛門、経眼、経耳の送達手段を含む。

【0044】

「付着された」は、何れかの手段により接続されることを意味するべきである。1つの態様において、付着されたことは、共有結合により接続されたことを意味する。もう1つの態様において、付着されたことは、非共有結合性に接着されたことを意味する。

【0045】

「アミノ酸」、「アミノ酸残基」および「残基」は、ここでは交換可能にタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに組み込まれたアミノ酸を指す。アミノ酸は、例えば、天然に発生しているアミノ酸または天然に発生しているアミノ酸と同様の様式で作動できる天

10

20

30

40

50

然のアミノ酸の類似体であってよい。

【0046】

「抗体」は、これに制限するものではないが、(a) 2つの重鎖と2つの軽鎖を含み、抗原を認識するイムノグロブリン分子；(b) ポリクローナルまたはモノクローナルイムノグロブリン分子；および(c) その一価または2価のフラグメント；を含むであろう。イムノグロブリン分子は何れかの一般的に知られる種類に由来してよく、これらに限定するものではないが、IgA、分泌性のIgA、IgG、IgEおよびIgMを含む。IgGのサブクラスは当業者に周知であり、これらに限定するものではないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む。抗体は、天然に発生しているものと非天然に発生しているものの両方であってよい。更に、抗体は、キメラ抗体、完全な合成抗体、単一鎖抗体およびそのフラグメントを含む。抗体は、ヒトまたは非ヒトであってよい。非ヒト抗体は、組み換え法によりヒト化されて、ヒトにおけるそれらの免疫原性を減少してもよい。抗体フラグメントは、これらに限定するものではないが、FabおよびFcフラグメントを含む。1つの態様において、「抗体のFc部分」は、ジスルフィド結合により連結された2つの重鎖のC末端の半分からなるイムノグロブリンのパバイン消化により得られる結晶性フラグメントであり、イムノグロブリンの「エフェクター領域」として知られている。もう1つの態様において、「抗体のFc部分」は重鎖の1つのC末端の半分の全て、実質的に全てを意味する。

10

【0047】

抗体に関しての「ヒト化」は、CDR領域の外側の幾つか、殆どまたは全てのアミノ酸がヒトイムノグロブリン分子に由来する対応するアミノ酸で置換された抗体を意味する。アミノ酸の少量の付加、欠失、挿入、置換または修飾は、それらが問題とする抗原への抗体の結合能を抑制しない限りにおいて差支えない。適切なヒトイムノグロブリン分子は、これらに限定されるものではないが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgM分子を含む。種々の刊行物が、抗体のヒト化をどのように作成するのかを記載しており、例えば、米国特許第4,816,567号、5,225,539、5,585,089および5,693,761、並びにPCT国際公開番号WO 90/07861に記載される。

20

【0048】

ここにおいて使用されるとき、薬学的組成物における場合の用語「組成物」は、(単数または複数の)活性成分および担体を形成する(単数または複数の)不活性成分を含む生産物、並びに当該成分の何れかの2若しくは2以上の組み合わせ、複合若しくは集合により、または当該成分の1若しくは1以上の分離により、または当該成分の1若しくは1以上の他の種類の反応若しくは相互作用により、直接的または間接的に結果として生じる何れかの生産物を包含することを意図する。

30

【0049】

ここにおいて使用されるとき「有効な量」は、腫瘍、疾患または障害を有する対象を治療することが可能な量をいう。従って、有効な量は、治療しようとする患者および治療されるべき状態によって変わるだろう。当業者は、そのような十分な量を決定するために慣例的な滴定実験を行うことが可能である。化合物の有効な量は、対象および使用される特定の投与経路に依存して変化するだろう。化合物に基づいて、当該量が、連続したポンプなどによって連続して、または断続的な間隔で(例えば、1または1以上の独立した時に)送達される。所望の時間間隔での特定の化合物の複数の量が、当業者による過度の実験もなく決定される。1つの態様において、有効な量は約1μg/kg～10mg/kgである。もう1つの態様において、有効な量は、10μg/kg～1mg/kgである。更なる態様において、有効な量は100μg/kgである。

40

【0050】

Notchレセプタータンパク質に関連して使用されるとき、「細胞外ドメイン」は、全てのまたは一部分のNotchであり、これは(i)細胞外に存在する(即ち、膜貫通部分または細胞内部分のどちらとしても存在しない)、および(ii)インタクトのNotchレセプタータンパク質が結合する細胞外リガンドに対して結合していることを意味する。Notchの細胞外ドメインは任意にシグナルペプチドを含んでよい。「細胞外ドメイン」、「ECD」

50

および「外部ドメイン」は同義である。

【0051】

「半減期を増大する成分 (Half-life-increasing moiety)」は、第2の成分に対して稼働可能に付着されたとき、当該第2の成分のインビポの半減期を増大する成分を意味する。半減期を増大する成分は、例えば、抗体のFc部分、グリコシリ化タグ（即ち、グリコシリ化されたポリペプチド）、ポリエチレングリコール（PEG）、それに対して付着されたPEGを有するポリペプチドおよび脂質修飾化ポリペプチドなどを含む。

【0052】

疾患または望ましくない生物学的な過程の開始を「阻害する」は、疾患または過程の開始の可能性を減少すること、または完全に疾患または過程の開始を抑制することのどちらも意味するべきである。好ましい態様において、疾患または過程の開始を阻害することは、完全にその開始を抑制することを意味する。

10

【0053】

「Notch」、「Notchタンパク質」および「Notchレセプタータンパク質」は同義である。加えて、用語「Notchに基づく融合タンパク質」および「Notchデコイ」は同義である。以下のNotchアミノ酸配列が公知であり、引用することによりここに組み込まれる；Notch1 (Genbank accession no. S18188 (ラット)); Notch2 (Genbank accession no. NP_077334 (ラット)); Notch3 (Genbank accession no. Q61982 (マウス)); およびNotch4 (Genbank accession no. T09059 (マウス))。以下のNotch核酸配列が公知であり、引用することによりここに組み込まれる；Notch1 (Genbank accession no. XM_342392 (ラット)およびNM_017617 (ヒト)); Notch2 (Genbank accession no. NM_024358 (ラット), M99437 (human and AF308601 (ヒト)); Notch3 (Genbank accession no. NM_008716 (マウス)およびXM_009303 (ヒト)); およびNotch4 (Genbank accession no. NM_010929 (マウス)およびNM_004557 (ヒト))。

20

【0054】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「核酸配列」は、ここにおいて交換可能に使用され、各々デオキシリボヌクレオチドおよび/またはリボヌクレオチドをいう。デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、天然に発生している、またはその合成的な類似体であってよい。「核酸」は何れかの核酸を意味し、これらに限定するものではないが、DNA、RNAおよびそのハイブリッドを含む。核酸分子を形成する核酸塩基は、塩基A、C、G、TおよびU、並びにその誘導体であってよい。これらの塩基の誘導体は当該技術分野において周知であり、PCR系、試薬および消耗品において例示される(PCR Systems, Reagents and Consumables, Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA)。核酸は、これらに限定するものではないが、アンチセンス分子および触媒的な核酸分子、例えば、リボザイムおよびDNAzymeなどを含む。核酸はまた、ペプチド類似体、フラグメントまたは誘導体をコードする核酸を含み、それらは1または1以上のアミノ酸残基の同一性の観点から天然に発生している形態とは異なり（特定された残基の全体よりも少ない残基を含む欠失類似体；1または1以上の残基が1または1以上の残基により置換されている置換類似体；および1または1以上の残基が当該ペプチドの末端または内側の部分に対して加えられている付加類似体）、当該天然に発生している形態の性質の一部分または全部を共有するものである。

30

【0055】

第2の成分に対して付着している第1の成分に関しての「稼働可能に付着している」は、それがそのように付着されていない場合に、第1の成分を（例えば、結合特性などの）機能可能にする様式において付着されることをいう。

40

【0056】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」はここにおいて交換可能に使用され、各々アミノ残基のポリマーを意味する。アミノ酸残基は、天然に発生しているものであっても、その化学的類似体であってもよい。ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質はまた、グリコシリ化、脂質付着、硫酸化、ヒドロキシリ化およびADPリボース化

50

などの修飾を含んでもよい。

【0057】

ここで使用されるとき、「薬学的に許容される担体」は、担体が製剤の他の成分と適合性であり、且つその受給者に対して有害ではないことを意味し、標準的な薬学的に許容される何れの担体をも包含する。そのような担体は、例えば、0.01～0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸バッファーまたは0.8%の生理食塩水を含む。或いは、そのような薬学的に許容される担体は、水性または非水性溶液、懸濁液および乳濁液を含む。非水溶性溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油および注射用有機性エステル、例えば、オレイン酸エチルなどである。水性担体は、水、アルコール性／水性溶液、乳濁液および懸濁液を含み、これらは塩水および緩衝化媒体を含む。非経口ベヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リングルおよび固定油を含む。静脈内用ベヒクルは、流体および栄養分補充液、電解質補充液、例えば、リングルデキストロースなどに基づく液などを含む。保存剤および他の添加物、例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどが存在してもよい。

10

【0058】

「対象」は何れかの有機体を意味し、これらに限定するものではないが、哺乳類、例えば、マウス、ラット、イヌ、モルモット、フェレット、ウサギおよび靈長類などを含む。好ましい態様において、対象はヒトである。

20

【0059】

「治療すること」は、疾患または障害の進行を遅くする、止めるまたは後退することの何れかを意味する。ここにおいて使用されるとき、「治療する」はまた、疾患または障害に関連する症状の寛解をも意味する。疾患は、これらに限定するものではないが、腫瘍脈管形性、アテローム性動脈硬化、創傷治癒、黄斑性変性、未熟児網膜症、子癇前症、子癇前症、糖尿病性網膜症、虚血、脳卒中、循環器病、乾癬、リンパ浮腫、腫瘍形成および腫瘍リンパ管形成を含む。

30

【0060】

脈管形性は、創傷治癒過程、雌性月経周期および子宮内膜リモデリングの間、並びに胚芽発生および臓器発達の間に遭遇される。病理学的な設定において、脈管形性は、関節リウマチ、黄斑性変性、糖尿病性網膜症および腫瘍増殖などの異なる疾患において重要な役割を演じている。

30

【0061】

臨床的な知見を含むインビボにおいては相当なエビデンスが証拠が存在し、異常な脈管形成が多くの疾患状態に関連し、それらは関節リウマチ、炎症、癌、乾癬、退行性の眼科的状態などを含む。

【0062】

Notch融合タンパク質を使用するための他の疾患は、代謝性疾患、これらに限定するものではないが、例えば、糖尿病、肥満、前糖尿病状態、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中、循環器病、インスリンの発現の調節およびインスリン機能の調節である。

40

【0063】

Notch融合タンパク質の使用はまた、ヒトに対して循環器病および糖尿病の危険性を増加する医学上の障害の組み合わせを指す代謝性症候群に適応する。そのような症候群を指す他に知られた名称は、症候群X、インスリン抵抗性症候群、リーベン症候群(Reaven's syndrome)である。当該症候群の幾つかの特徴は以下を含む：空腹時高血糖、高血圧、中心性肥満(内臓肥満としても知られる)、高密度リポタンパク質(LDL)の減少、トリグリセリドの上昇、尿酸値の上昇。上記で列記された空腹時高血糖は、二型糖尿病または障害性空腹時グルコースおよび障害性グルコース耐性またはインスリン抵抗性を含む。代謝性症候群に加えて、Notchデコイは前糖尿病状態のための効能を有する。

【0064】

ユニット、プレフィックスおよびシンボルは、それらのS I公認の形態において表示さ

50

れてよい。他の記載がない限り、核酸配列は、左から右に 5' から 3' の配向で記載され、アミノ酸配列は左から右に、アミノ末端からカルボキシ末端の配向で記載される。アミノ酸は、それらの一般的に知られる 3 文字記号か、1 文字記号の何れかによりここにおいて示されてよく、これらは IUPAC-IUB 生化学命名法委員会により推奨される。ヌクレオチドは同様に、それらの一般的に受容される単一文字コードにより示されてよい。

【0065】

以下の略語がここにおいて使用される：ECD：細胞外ドメイン；IC：細胞内ドメイン；N ECD/Fc：Notch-に基づく融合タンパク質；N1：Notch1；N2：Notch2；N3：Notch3；N4：Notch4；DII：Delta-様；EC：内皮細胞；FGF：纖維芽細胞成長因子；FGFR：纖維芽細胞成長因子レセプター；HUVEC：ヒト臍帯静脈内皮細胞；m.o.i.：感染の多重度；VMC：血管壁細胞；VEGF：血管内皮細胞成長因子；VEGFR：血管内皮細胞成長因子レセプター；sp：シグナルペプチド；PDGF：血小板由来成長因子；PDGFR：血小板由来成長因子レセプター；P1 GF：胎盤性成長因子。

10

【0066】

[発明の態様]

本発明は、シグナルペプチド、ヒトNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメイン、およびそれに対して結合する抗体のFc部分を含む融合タンパク質を提供する。

【0067】

当該融合タンパク質の第1の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-36を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-13を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-24を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復9-23を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復9-36を含む。もう1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復13-24を含む。更なる態様において、Notch1レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復25-36を含む。

20

【0068】

融合タンパク質の第2の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。

30

【0069】

融合タンパク質の第3の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。

【0070】

融合タンパク質の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインは、EGF-様反復1-29を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復1-13を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復1-23を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復9-23を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復9-29を含む。もう1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復13-23を含む。更なる態様において、Notch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインはEGF-様反復21-29を含む。

40

【0071】

融合タンパク質の1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。

【0072】

融合タンパク質の1つの態様において、シグナルペプチドは the signal peptide of Notch1、Notch2、Notch3、Notch4 のシグナルペプチドまたは抗体のHc(HC；重鎖)部分である

50

配列番号 8 4 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 8 5 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 8 6 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 8 7 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したアミノ酸（継続性のアミノ酸）を含み、その配列は配列番号 8 8 で示される。

【 0 0 7 6 】

1 つの態様において、融合タンパク質連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 8 9 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 0 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 1 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 2 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 3 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 4 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 5 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 6 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 7 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 8 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 9 9 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 1 0 0 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 1 0 1 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 1 0 2 で示される。もう 1 つの態様において、融合タンパク質は連続したヌクレオチド（継続性のヌクレオチド）によりコードされ、その配列は配列番号 1 0 3 で示される。

【 0 0 7 7 】

本発明は、上記の融合タンパク質の対象を治療するために有効な量を前記対象に対して投与し、それにより腫瘍を有する前記対象を治療することを含む、腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。

【 0 0 7 8 】

本発明は、対象において脈管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより当該対象における脈管形成を阻害することを含む、対象において脈管形成を阻害する方法を提供する。

【 0 0 7 9 】

本発明は、当該患者の治療ために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより卵巣癌を有する当該対象を治療することを含む、卵巣癌を有する対象を治療する方法を提供する

本発明は、当該対象を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与し、それにより代謝性疾患有する当該対象を治療することを含む、代謝性疾患有する対象を治療する方法を提供する。1 つの態様において、代謝性疾患は糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中または循環器病である。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

本発明は、腫瘍を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 1 】

本発明は、対象における脈管形成を阻害するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 2 】

本発明は、卵巣癌を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。

【 0 0 8 3 】

本発明は、代謝性疾患を有する対象を治療するための医薬阻害剤の製造のための上記融合タンパク質の使用を提供する。1つの態様において、代謝性疾患は糖尿病、肥満、アテローム性動脈硬化、虚血、脳卒中または循環器病である。

【 0 0 8 4 】

本発明は、対象において生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む、当該対象における生理的なリンパ管形成または病理学的なリンパ管形成を阻害するための方法を提供する。

【 0 0 8 5 】

本発明は、対象において腫瘍転移を阻害するために有効な量の上記融合物を当該対象に投与することを含む、当該対象における腫瘍転移を阻害する方法を提供する。態様において、当該転移は、血管、リンパ性脈管構造またはリンパ節を介して生じる。腫瘍転移とは、1つの臓器から他の非隣接的な臓器に癌が広がることである。

【 0 0 8 6 】

本発明は、対象における二次的腫瘍の増殖を阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む、当該対象において二次的腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。阻害はまた、二次的または転移性腫瘍に関連する腫瘍脈管形成についてのものでもあってよい。1つの態様において、当該二次的腫瘍増殖は、二次的腫瘍に関連する脈管形成の阻害により阻害される。

【 0 0 8 7 】

本発明は、対象における腫瘍による血管取り込みを阻害するために有効な量の上記融合タンパク質を前記対象に投与することを含む当該対象における腫瘍による血管取り込みを阻害する方法を提供する。血管取り込みの過程は、腫瘍細胞は既存の血管と、吸収される血管の補助による増殖とに関連する過程である。吸収された血管における腫瘍のこの増殖は、腫瘍脈管形成の不在において存在しても、腫瘍脈管形成に先行して存在しても、または腫瘍脈管形成との組み合わせで存在してもよい。

【 0 0 8 8 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質と血管内皮成長因子(VEGF)の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、VEGFの阻害剤は、VEGF-Aの阻害剤、P1GFの阻害剤、VEGF-Bの阻害剤、VEGF-Cの阻害剤、VEGF-Dの阻害剤である。VEGF阻害剤の例は、これらに制限するものではないが、ベバシズマブ(bevacizumab)、PTK787、Bay43-9006、SU11248、AG013676、ZD6474、VEGF-trapおよび抗VEGFR2を含む。そのような阻害剤の例は更に以下に十分に記載される；Ferrara et al., (2004) Nature Reviews Drug Discovery, Vol.3:391-400 and Ellis et al. (2008) Nature Reviews Cancer Vol8:579-591；これらのそれぞれの内容は引用によりここに組み込まれる。

【 0 0 8 9 】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とVEGFR-1、VEGFR-2またはVEGFR-3の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、当該阻害剤は1以上のVEGFRを標的

10

20

30

40

50

とする。

【0090】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質と血小板由来増殖因子(PDGF)の阻害剤とを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、血小板由来増殖因子の阻害剤は、PDGF-Aの阻害剤またはPDGF-Bの阻害剤である。

【0091】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とPDGFレセプターアンタゴニストとを対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。1つの態様において、PDGFレセプターアンタゴニストは、PDGFレセプター-Bアンタゴニストである。

10

【0092】

本発明は、それぞれ対象において癌を治療するために有効な量の上記融合タンパク質とHER2/neuの阻害剤を対象に投与することを含む前記対象において癌を治療する方法を提供する。

【0093】

本発明は、血管性増殖性網膜症を治療するために有効な量の上記融合タンパク質を対象に投与することを含む血管増殖性網膜症を治療する方法を提供する

101. 前記血管性の増殖性網膜症が、糖尿病性網膜症、黄斑変性(macular degeneration)または未熟児網膜症である請求項100の方法。

20

【0094】

本発明はまた、半減期を増大する成分(half-life-increasing moiety)に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物の有効量を当該対象に投与し、それにより当該対象を治療することを含む、腫瘍を有する対象を治療するための第1の方法も提供する。

【0095】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物の有効量を当該対象に投与し、それにより当該対象における脈管形成を阻害することを含む、対象において脈管形成を阻害する第2の方法も提供する。

30

【0096】

上記方法の第1の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質はヒトNotch1レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

【0097】

上記の方法の第2の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch2レセプタータンパク質はヒトNotch2レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

40

【0098】

上記方法の第3の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch3レセプタータンパク質はヒトNotch3レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にあり

50

る。

【0099】

上記方法の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質はヒトNotch4レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は、同じポリペプチド鎖の範囲内にある。

【0100】

上記方法の第5の態様において、対象は哺乳類である。1つの態様において、哺乳類はヒトである。 10

【0101】

上記方法の第6の態様において、脈管形性は腫瘍脈管形性である。

【0102】

当該第2の方法の更なる態様において、対象は腫瘍を有する。もう1つの態様において、対象は病態的な血管過形成に罹患している。1つの態様において、病態的な血管過形成は、良性のヘマジオーマ(benign hemangioma)である。更なる態様において、対象はリンパ管増殖性疾患に罹患する。

【0103】

本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の第1の組成物を提供する。1つの態様において、細胞外ドメインは、半減期を増大する成分に対して共有結合されている。もう1つの態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖の範囲内にある。 20

【0104】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインと薬学的に許容された担体とを含む物質の第2の組成物も提供する。

【0105】

本発明は更に、(i)半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含む物質の組成物をその中に有するパッキング物質、および(ii)当該組成物が、腫瘍または当該対象における脈管形成を阻害することにより治療可能な他の疾患を有する対象の治療において使用することに向けられることを指示する表示を含む製品を提供する。 30

【0106】

上記の製品の第1の態様において、Notchレセプタータンパク質は、Notch1レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch1レセプタータンパク質は、ヒトNotch1レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。 40

【0107】

上記製品の第2の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch2レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch2レセプタータンパク質はヒトNotch2レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0108】

上記製品の第3の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch3レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch3レセプタータンパク質はヒトNotch3レセプタ 50

ータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0109】

上記製品の第4の態様において、Notchレセプタータンパク質はNotch4レセプタータンパク質である。1つの態様において、Notch4レセプタータンパク質はヒトNotch4レセプタータンパク質である。もう1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、抗体のFc部分はヒト抗体のFc部分である。更なる態様において、細胞外ドメインおよび半減期を増大する成分は同じポリペプチド鎖に含まれる。

【0110】

上記製品のもう1つの態様において、当該組成物は、薬学的担体と混合される。最後の態様において、対象はヒトである。

【0111】

本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotch4レセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターを提供する。

【0112】

1つの態様において、半減期を増大する成分は抗体のFc部分である。もう1つの態様において、ベクターは、これらに限定するものではないが、プラスミド、コスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、ラムダファージまたはYACを含む。

【0113】

本発明はまた、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターおよび適切なホスト細胞を含む宿主ベクター系を提供する。1つの態様において、ホスト細胞は、真核細胞である。もう1つの態様において、真核細胞はCHO細胞である。もう1つの態様において、真核細胞はHeLa細胞である。更なる態様において、ホスト細胞は細菌性細胞である。

【0114】

最後に、本発明は、半減期を増大する成分に対して稼働可能に付着されたNotchレセプタータンパク質の細胞外ドメインを含むポリペプチドをコードする複製可能なベクターと、適切なホスト細胞とを具備するホストベクター系を、当該ポリペプチドの産生を可能にする条件下で増殖させること、並びにそのように産生されたポリペプチドを回収することとを具備する当該ポリペプチドを産生する第3の方法を提供する。

【0115】

本発明を、続く実験の詳細のセクションにおいて説明する。このセクションは、本発明を理解するのを助けるために記載されるものであるが、その後に続く特許請求の範囲に記載される本発明を何れの方向にも制限することを目的とするものではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0116】

[実験の詳細]

[第1のシリーズの実験]

ヒトNotch1融合タンパク質(Notchデコイ)

Notch1デコイはシグナルペプチド、全て含むNotch1細胞外ドメイン部分またはEGF-様反復ドメインのサブセット、およびヒトFcタンパク質(アミノ酸1-237)部分をコードする配列を用いて組み立てる。ヒトNotch1の完全な全長配列を図59に供する。

【0117】

利用されるシグナルペプチドは天然Notch1シグナルペプチドか、またはヒトHcシグナルペプチドかいずれかであり、それぞれNotch1領域で融合される。シグナルペプチドはNotchデコイタンパク質の分泌をなす。

使用されるNotch1細胞外ドメインは、Notch配位子を結合するために設計され、かつヒ

10

20

30

40

50

トNotch1タンパク質の36 EGF-様反復ドメインの全てまたはサブセットからなる。

【0118】

Fcタグは所望のヒトNotch1の所望EGF-様反復のC-終端で融合し、かつNotch1デコイタンパク質の精製、検出および安定化をなすために貢献する。

【0119】

ヒトNotch1デコイの全てに亘る設計、11形成物、は(1)Notch1デコイタンパク質の分泌をタンパク質を生成するために用いられる真核細胞の細胞外媒体に対してなすためのシグナルペプチド、(2)Notch配位子と関連させるための全ての細胞外ドメイン部分またはヒトNotch1のEGF-様反復部分、および(3)検出させるためのヒトFcタンパク質部分に対してコード化するためである。

10

【0120】

ヒトNotch1デコイの次の11の形成物は説明され、かつ図52に図示される。

【0121】

- 1) h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-1)
- 2) h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイ(図52のN1-2)
- 3) h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-3)
- 4) h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイ(図52のN1-4)
- 5) h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾ デコイ(図52のN1-5)
- 6) h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-6)
- 7) h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-7)
- 8) h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-8)
- 9) h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾ デコイ(図52のN1-9)
- 10) h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-10)
- 11) h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾ デコイ(図52のN1-11)

20

ヒトNotch1配列

aa残基2555(K=リシン)に対してaa残基1(M=メチオニン)からなるヒトNotch1全長アミノ酸配列は図59に示す。シグナルペプチドおよび第1の36EGF-様反復ドメインはこの配列のaa1-1433に表す。アミノ酸1-1433、またはこれらのaaサブセットはヒトNotch1デコイタンパク質の設計に利用し、次のセクションで説明する。

30

【0122】

Notch1デコイタンパク質上のFcタグを生成するために利用されるヒトFc配列

図60に示される、ヒトFcの237アミノ酸はまさにNotch1EGF-様反復の下流で、全てのNotch1デコイのC-終端で融合した。ヒトFcのこの領域はNotchデコイの検出および精製をなし、かつ分泌ヒトNotch1-ヒトFc融合タンパク質を安定化するために貢献する。

【0123】

Notch1デコイタンパク質に利用されるシグナルペプチド

2つの特異なシグナルペプチド配列はヒトNotch1デコイタンパク質の設計に組み込まれる。第1はヒトNotch1のアミノ酸1-20を含むために予測するシグナルペプチドである。この測定は、デンマークのTechnical Universityによって提供されるシグナルIP 3.0サーバプログラムを用いてなされた。第2はヒトIgG重鎖(HC)シグナルペプチドのアミノ酸1-22を含むために予測されるヒトHcシグナルペプチドである。

40

【0124】

1. ヒトNotch1シグナルペプチド(aa1-20)

MPPLLAPLLCLALLPALA/A/R(配列番号16)

予測されるヒトNotch1シグナルペプチドのアミノ酸配列は図53に図示される。デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する分析の予測結果は図53に示される。これらの結果は、アラニン18(A18)およびアラニン19(A19)の間に位置される開裂の多数サイトとA19およびアルギニン20(R20)の間に位置される開裂の少数サイトとを予測する。これら2つの開裂サイトは上に供される、ヒトNotch1のアミノ酸配列1-20に“/”によって示す。

50

【0125】

2. このシグナル配列に利用されるNotch1デコイに利用されるヒトNotch1シグナルペプチド融合ペプチド(aa 1-23)

Notch1シグナルペプチドが十分に利用されることを確かめるために、開裂の予測少数サイトを越える3つの付加アミノ酸がヒトNotch1デコイに提供される。したがって、Notch1シグナルペプチドを組み込むヒトNotch1デコイ形成物で利用されるアミノ酸配列は以下に示すように予測シグナルペプチド開裂のサイトとNotch1 EGF-様反復の間のグリシン-プロリン-アルギニン(GPR-太字/下線引き)を含む。

【0126】

MPPLLAPLLCLALLPALAARGPR (配列番号130)

10

3. ヒト HC シグナルペプチド (aa 1-22)

予測ヒトHcシグナルペプチドのアミノ酸配列は、

MWGWKCLLFWAVLVTATLCTA/R (配列番号18)

である。

【0127】

デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する予測結果は、以下に示す。これらの結果は、アラニン21 (A21)およびアルギニン22 (22)間に位置する開裂の多数サイトを予測する。この開裂サイトは、以下に供されるヒトHcのアミノ酸配列1-22に“/”によって示される。

20

【0128】

h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイ

h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイはNotch1 (図52のN1-1)のEGF-様反復1-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【0129】

図61に示すh-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1433からなる配列；これに続く(3)ヒトHCタグを含むアミノ酸1434-1670。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1670アミノ酸を含む。

30

【0130】

h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイ

h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイはNotch1 (図52のN1-2)のEGF-様反復 1-13を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【0131】

図62に示すh-Notch1⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-531からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸532-768。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は768アミノ酸を含む。

40

【0132】

h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイ

h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイはNotch1 (図52のN1-3)のEGF-様反復 1-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。

【0133】

図63で示されるh-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch1のEGF-様反復 1-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-948からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸949-1185。予測されるシグナルペ

50

プチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1185アミノ酸を含む。

【 0 1 3 4 】

$h-sp^N Notch1^{(9-23)}$ デコイ

$h-sp^N Notch1^{(9-23)}$ デコイはNotch1（図52のN1-4）のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^N はヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【 0 1 3 5 】

図64に示される $h-sp^N Notch1^{(9-23)}$ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：
 (1) ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-593からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸595-830。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は830アミノ酸を含む。

$h-sp^{HC} Notch1^{(9-23)}$ デコイ

$h-sp^{HC} Notch1^{(9-23)}$ デコイはNotch1（図52のN1-5）のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^{HC} はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

図65に示される $h-sp^{HC} Notch1^{(9-23)}$ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：
 (1) ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-592からなる配列；これに続く(3) ヒトHcタグを含むアミノ酸593-829。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は829アミノ酸を含む。

【 0 1 3 6 】

$h-sp^N Notch1^{(9-36)}$ デコイ

$h-sp^N Notch1^{(9-36)}$ デコイはNotch1（図52のN1-6）のEGF-様反復9-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^N はヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【 0 1 3 7 】

図66に示される $h-sp^N Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：
 (1) ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-1118からなる配列；これに続く(3) ヒトFcタグを含むアミノ酸1119-1355。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1355アミノ酸を含む。

【 0 1 3 8 】

$h-sp^{HC} Notch1^{(9-36)}$ デコイ

$h-sp^{HC} Notch1^{(9-36)}$ デコイはNotch1（図52のN1-7）のEGF-様反復9-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^{HC} はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【 0 1 3 9 】

図67に示される $h-sp^{HC} Notch1^{(9-36)}$ デコイタンパク質は、以下の3つの成分からなる：
 (1) ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2) ヒトNotch1のEGF-様反復9-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-1117からなる配列；これに続く(3) ヒトHcタグを含むアミノ酸1118-1354。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1354アミノ酸を含む。

【 0 1 4 0 】

$h-sp^N Notch1^{(13-24)}$ デコイ

10

20

30

40

50

$h\text{-}sp^N\text{Notch1}^{(13-24)}$ デコイはNotch1（図52のN1-8）のEGF-様反復13-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^N はヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられるこ¹⁰とを意味する。

【0141】

図68に示される $h\text{-}sp^N\text{Notch1}^{(13-24)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-478からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸479-715。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は715アミノ酸を含む。

【0142】

$h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(13-24)}$ デコイ

$h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(13-24)}$ デコイはNotch1（図52のN1-9）のEGF-様反復13-24を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^{HC} はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0143】

図69に示される $h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(13-24)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復13-24をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-477からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸478-714。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は714アミノ酸を含む。

【0144】

$h\text{-}sp^N\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイ

$h\text{-}sp^N\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイはNotch1（図52のN1-10）のEGF-様反復25-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^N はヒトNotch1シグナルペプチドがこの形成物に用いられるこ²⁰とを意味する。

【0145】

図70で示される $h\text{-}sp^N\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch1シグナル配列であり、ヒトNotch1のアミノ酸1-23からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸24-508からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸509-745。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は745アミノ酸を含む。

【0146】

$h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイ

$h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイはNotch1（図52のN1-11）のEGF-様反復25-36を含むヒトNotch1デコイを意味する。略語 sp^{HC} はヒトHcシグナルペプチドがこの形成物に用いられることを意味する。

【0147】

図71に示される $h\text{-}sp^{HC}\text{Notch1}^{(25-36)}$ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch1のEGF-様反復25-36をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-507からなる配列；これに続く（3）ヒトHcタグを含むアミノ酸508-744。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は744アミノ酸を含む。

【0148】

方法

ヒトNotch1デコイ構造

臍静脈内皮細胞(HUVEC)からの総RNAは、ヒトNotch1デコイ変異体を生成するために用い

10

20

30

40

50

た。総RNAはM-MLV逆転写酵素および無作為六量体プライマーまたはNotch1デコイ特異的プライマーのいずれかで逆転写した。合成されたCdnalはそれからNotch1デコイ特異的上流(センス)および下流(アンチセンス)を使って増幅した。

【0149】

下流プライマーはフレームヒトNotch1/Fcキメラを生成するためにFC配列のBgIIIサイトで結合するであろう⁵、終端でBamHIまたはBgIII選択サイトのいずれかをコード化する。

【0150】

ヌクレチド配列がEGF-様反復36をコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BgIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch1、図4)に供するであろう。これは、形成物；h-Notch1⁽¹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽²⁵⁻³⁶⁾デコイに適用する。
10

【0151】

ヌクレチドがEGF-様反復13にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BamHIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch1、図5)に供するであろう。これは形成物h-Notch1⁽¹⁻¹³⁾デコイに適用する。

【0152】

ヌクレチドがEGF-様反復23にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BgIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch1、図6)に供するであろう。これは形成物h-sp^NNotch1⁽⁹⁻²³⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽⁹⁻²³⁾デコイに適用する。
20

【0153】

ヌクレチドがEGF-様反復24にコード化した後に融合を発生するNotch1デコイの場合において、BgIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch1、図7)に供するであろう。これは形成物h-Notch1⁽¹⁻²⁴⁾デコイ、h-sp^NNotch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイ、h-sp^{HC}Notch1⁽¹³⁻²⁴⁾デコイに適用する。

【0154】

増幅されたPCR生成物は異なるヒトNotch1/Fcキメラを生成するためにpBluescript SK+Fcにサブルコーン(subcloned)する。Notch1/Fcデコイ配列はそれから発現およびヒトNotch1デコイタンパク質の精製のために哺乳類発現ベクター(pAd-lox, pCCL, pcDNA3)を往復する。
30

【0155】

ヒトNotch4Fusionタンパク質(Notchデコイ)

Notch4デコイはシグナルペプチド、全て含むNotch4細胞外ドメイン部分またはEGF-様反復ドメインのサブセット、およびヒトFcタンパク質(アミノ酸1-237)部分をコードする配列を用いて組み立てる。ヒトNotch4の完全な全長配列を図8-3に供する。

【0156】

利用されるシグナルペプチドは天然Notch4シグナルペプチドか、またはヒトHcシグナルペプチドかいずれかであり、それぞれNotch4領域で融合される。シグナルペプチドはNotchデコイタンパク質の分泌をなす。
40

【0157】

使用されるNotch4細胞外ドメインはNotch配位子を結合するために設計され、かつヒトNotch4タンパク質の29EGF-様反復ドメインの全てまたはサブセットからなる。

【0158】

Fcタグは所望のヒトNotch4の所望EGF-様反復のC-終端で融合し、かつNotch4デコイタンパク質の精製、検出および安定化をなすために貢献する。

【0159】

ヒトNotch4デコイの全てに亘る設計、11の形成物、は(1)Notch4デコイタンパク質の分泌をタンパク質を生産するために用いられる真核細胞の細胞外媒体に対してなすためのシグナルペプチド、(2)Notch配位子と関連させるための全ての細胞外ドメイン部分
50

またはヒトNotch4のEGF-様反復部分、および(3)検出させるためのヒトFcタンパク質部分に対してコード化するためである。

【0160】

ヒトNotch4デコイの次の11の形成物は説明され、かつ図111に図示される。

【0161】

- 1) h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイ (図111のN4-1)
- 2) h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイ (図111のN4-2)
- 3) h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイ (図111のN4-3)
- 4) h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイ (図111のN4-4)
- 5) h-sp^HCNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイ (図111のN4-5)
- 6) h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ (図111のN4-6)
- 7) h-sp^HCNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾ デコイ (図111のN4-7)
- 8) h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイ (図111のN4-8)
- 9) h-sp^HCNotch4⁽¹³⁻²³⁾ デコイ (図111のN4-9)
- 10) h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイ (図111のN4-10)
- 11) h-sp^HCNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾ デコイ (図111のN4-11)

10

20

20

30

40

50

ヒトNotch4配列

aa残基2003(K=リシン)に対してaa残基1(M=メチオニン)からなるヒトNotch4全長アミノ酸配列は図83に示す。シグナルペプチドおよび第1の29EGF-様反復ドメインはこの配列のaa 1-1174に表す。アミノ酸1-1174、またはこれらのaaサブセットはヒトNotch4デコイタンパク質の設計に利用し、次のセクションで説明する。EGF-反復1-29を含むアミノ酸は下線を引く。

【0162】

Notch4デコイタンパク質上のFcタグを生成するために利用されるヒトFc配列

図84に示される、ヒトFcの237アミノ酸はまさにNotch4EGF-様反復の下流で、全てのNotch4デコイのC-終端で融合した。ヒトFcのこの領域はNotchデコイの検出および精製をなし、かつ分泌ヒトNotch4-ヒトFc融合タンパク質を安定化するために貢献する。

【0163】

Notch4デコイタンパク質に利用されるシグナルペプチド

2つの特異なシグナルペプチド配列はヒトNotch4デコイタンパク質の設計に組み込まれる。第1はヒトNotch4のアミノ酸1-24を含むために予測するシグナルペプチドである。この測定は、デンマークのTechnical Universityによって提供されるシグナルIP 3.0サーバプログラムを用いてなされた。第2はヒトHCシグナルペプチドのアミノ酸1-22を含むために予測されるヒトHCシグナルペプチドである。

【0164】

1. ヒトNotch4シグナルペプチド (aa 1-24)

MQPPSLLLLLLLLLLCVSVVRP/R (配列番号104)

予測されるヒトNotch4シグナルペプチドのアミノ酸配列は図112に図示される。デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する分析の予測結果は図112に示される。これらの結果は、プロリン23(A23)およびアルギニン24(R24)の間に位置される開裂の多数サイトを予測する。開裂サイトは上に供される、ヒトNotch4のアミノ酸配列1-24に“/”によって示す。

【0165】

2. このシグナル配列に利用されるNotch4デコイに利用されるヒトNotch4シグナルペプチド融合ペプチド(aa 1-27)

Notch4シグナルペプチドが十分に利用されることを確かめるために、開裂の予測される少数サイトを越える3つの付加アミノ酸がヒトNotch4デコイに提供される。したがって、Notch4シグナルペプチドを組み込むヒトNotch4デコイ形成物で利用されるアミノ酸配列は以下に示すように予測シグナルペプチド開裂のサイトとNotch4 EGF-様反復の間のグリシン-プロリン-アルギニン(GPR-太字/下線引き)を含む。

【 0 1 6 6 】

MQPPSLLLLL^LCVSVVRPRGLL (配列番号131)

3. ヒト HC シグナルペプチド (aa 1-22)

予測ヒトHcシグナルペプチドのアミノ酸配列は、

MWGWKCLLF^WAVLV^TT^LC^AT/R (配列番号17)

である。

【 0 1 6 7 】

デンマークのTechnical Universityによってオンラインで提供されるシグナルIP 3.0サーバを利用する予測結果は、以下に示す。これらの結果は、アラニン21 (A21)およびアルギニン22 (22)間に位置する開裂の多数サイトを予測する。この開裂サイトは、以下に供されるヒトHcのアミノ酸配列1-22に“ / ”によって示される。
10

【 0 1 6 8 】

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-1)のEGF-様反復1-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 6 9 】

h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復1-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-1173からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸1174-1410。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1410アミノ酸を含む。
20

【 0 1 7 0 】

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-2)のEGF-様反復1-13を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 7 1 】

h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復1-13をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-554からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸555-791。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は791アミノ酸を含む。
30

【 0 1 7 2 】

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイ

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-3)のEGF-様反復1-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。

【 0 1 7 3 】

h-Notch4⁽¹⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復1-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-933からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸934-1170。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1170アミノ酸を含む。
40

【 0 1 7 4 】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイ

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイはNotch1 (図111のN4-4)のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 7 5 】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾ デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNo
50

tch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-602からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸603-839。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は839アミノ酸を含む。

【0176】

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイはNotch1(図111のN4-5)のEGF-様反復9-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{Hc}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【0177】

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復9-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-597からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸598-834。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は834アミノ酸を含む。

10

【0178】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイはNotch1(図111のN4-6)のEGF-様反復9-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

20

【0179】

h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-843からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸844-1080。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1080アミノ酸を含む。

【0180】

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイはNotch1(図111のN4-7)のEGF-様反復9-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{Hc}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

30

【0181】

h-sp^{Hc}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：(1)ヒトHCシグナル配列であり、ヒトHCのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復9-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-838からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸839-1075。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は1075アミノ酸を含む。

【0182】

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイはNotch1(図111のN4-8)のEGF-様反復13-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

40

【0183】

h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：

(1)ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く(2)ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-444からなる配列；これに続く(3)ヒトFcタグを含むアミノ酸445-681。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は681アミノ酸を含む。

50

【 0 1 8 4 】

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイはNotch1（図111のN4-9）のEGF-様反復13-23を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 5 】

h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復13-23をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-439からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸440-676。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は676アミノ酸を含む。

10

【 0 1 8 6 】

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイ

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイはNotch1（図111のN4-10）のEGF-様反復21-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^Nは、ヒトNotch4シグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 7 】

h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトNotch4シグナル配列であり、ヒトNotch4のアミノ酸1-27からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸28-392からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸393-629。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は629アミノ酸を含む。

20

【 0 1 8 8 】

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイ

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイはNotch1（図111のN4-11）のEGF-様反復21-29を含むヒトNotch4デコイを意味する。略語sp^{HC}は、ヒトHcシグナルペプチドがこの形成物を用いることを意味する。

【 0 1 8 9 】

h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイタンパク質は以下の3つの成分からなる：（1）ヒトHcシグナル配列であり、ヒトHcのアミノ酸1-22からなる配列；これに続く（2）ヒトNotch4のEGF-様反復21-29をコードするアミノ酸であり、アミノ酸23-387からなる配列；これに続く（3）ヒトFcタグを含むアミノ酸388-624。予測されるシグナルペプチド配列に下線を付し、ヒトFcタグに下線を付してイタリックで示す。この形成物は624アミノ酸を含む。

30

【 0 1 9 0 】

方法

ヒト Notch4デコイ構造

臍静脈内皮細胞(HUVEC)からの総RNAは、ヒトNotch4デコイ変異体を生成するために用いた。総RNAはM-MLV逆転写酵素および無作為六量体プライマーまたはNotch4デコイ特異的プライマーのいずれかで逆転写した。合成されたcDNAはそれからNotch4デコイ特異的上流(センス)および下流(アンチセンス)を使って増幅した。

40

【 0 1 9 1 】

下流プライマーはフレームヒトNotch4/Fcキメラを生成するためにFC配列のBgIIIサイトで結合するであろう5'終端でBamHIまたはBgIII選択サイトのいずれかをコード化する。

【 0 1 9 2 】

ヌクレチド配列がEGF-様反復29をコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BgIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図113)に供するであろう。これは、形成物；h-Notch4⁽¹⁻²⁹⁾デコイ, h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ, h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²⁹⁾デコイ, h-sp^NNotch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイ, h-sp^{HC}Notch4⁽²¹⁻²⁹⁾デコイに適用する。

50

【0193】

ヌクレチドがEGF-様反復13にコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BamHIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図114)に供するであろう。これは形成物h-Notch4⁽¹⁻¹³⁾デコイに適用する。

【0194】

ヌクレチドがEGF-様反復23にコード化した後に融合を発生するNotch4デコイの場合において、BgIIIサイトは融合サイトを創るために生成され、かつこの融合配列を(Notch4、図115)に供するであろう。これは形成物h-Notch4⁽¹⁻²³⁾デコイ, h-sp^NNotch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ, h-sp^{HC}Notch4⁽⁹⁻²³⁾デコイ, h-sp^NNotch4⁽¹³⁻²³⁾デコイ, h-sp^{HC}Notch4⁽¹³⁻²³⁾デコイに適用する。

10

【0195】

増幅されたPCR生成物は異なるヒトNotch4/Fcキメラを生成するためにpBluescript SK I Fcにサブクローン(subcloned)する。Notch4/Fcデコイ配列はそれから発現およびヒトNotch4デコイタンパク質の精製のために哺乳類発現ベクター(pAd-lox, pCCL, pcDNA3)を往復する。

【0196】

[第2のシリーズの実験]

材料および方法

プラスミド構成物

LacZ、完全長Notch4、または活性型Notch4/int3をコードするアデノウイルス構成物は以前に記載されている(Shawber et al., 2003)。6mycタグ(Kopan et al., 1994)を有するフレームに融合された活性型Notch1 cDNAをアデノウイルス発現ベクターであるpAd-loxにクローニングした。VEGF165およびN1ECDFcの両方もまた、当該pAd-loxにクローニングした。アデノウイルスストックを作成し、以前の記載の通り力価を求め(Hardy et al., 1997)。LacZ、活性型Notch4/int3、J1、DII1およびDII4の何れかをコードするレトロウイルス発現ベクターpHyTcは以前に記載されている(Uyttendaele et al., 2000, Shawber et al., 2003, Das et al., 2004 in print)。Myc/Hisタグを有するフレームに融合されたNotch1 (bp 5479-7833, Genbank accession# X57405) の細胞内ドメインおよびDII4の細胞外ドメイン (bp 1-1545, Genbank accession# AF253468, provided by Chiron) をコードするプラスミドをpHyTcに操作した。

20

【0197】

Clin. Exp. Immunol. (1992) 87(1):105-110に記載される方法を使用して、Notch1ECD、Notch2ECD、Notch3ECDおよびNotch4ECDを、プラスミドpCMX-sFR1-IgGに含まれるFc配列を使用して操作して、Notchに基づく融合タンパク質、即ち、Notch1ECD/Fc、Notch2ECD/Fc、Notch3ECD/FcおよびNotch4ECD/Fcを作成する。

30

【0198】

アデノウイルス遺伝子導入

アデノウイルス感染の前日に、3代目の 7.5×10^5 細胞のHUVECをI型コラーゲンコーティング6ウェルプレートに播種した。Ad-LacZ、Ad-VEGF165またはAd-N1ECDFcでのアデノウイルス感染を記載されるm.o.i.で行い、37℃で1時間、時々プレートを回旋しながらインキュベートした。

40

【0199】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

リガンド誘導性Notchシグナリングを決定するために、HeLaおよび293由来Bosc細胞を使用する共培養アッセイを行った。一過性のトランスフェクションをリン酸カルシウム沈殿により行った。1日前に10cmプレートに 1.5×10^6 で播種されたHeLa細胞を、333ngのpBOSNotch1、333ngのpGA981-6、および83ngのpLNC-lacZを用いて、666ngのpCMV-FcまたはpHyTC-N1ECDFcの何れかと共にトランスフェクトした(x1には333ng、x2には666ng)。1日前に10cmプレートに 4×10^6 で播種されたBosc細胞を、680ngのpHyTc-Jagged1、pHyTc-DII1、pHyTc-CII4またはpHyTc-x(空ベクター)の何れかでトランスフェクトした。トランスフェク

50

ションの1日目に、細胞を、12ウェルプレートで24時間に亘りトリプリケートで共培養した(HeLa:Bosc, 1:2)。細胞を採取し、トランスフェクション後2日目をエンハンスドルシフェラーゼアッセイキット(the Enhanced Luciferase assay kit (BD PharMingen))を使用してルシフェラーゼ活性を測定し、-ガラクトシダーゼ活性をガラクトライトライスキット(the Galacto-Light Plus kit (PE Biosystems))を用いて測定した。全てのアッセイは、バースオールド・デュアル-インジェクション・ルミノメーター(Berthold dual-injection luminometer)において行った。

【0200】

VEGF誘導性Notchシグナリングの決定のために、アデノウイルスで感染させたHUVECを使用した。1日前に6ウェルプレートに 8.0×10^5 で播種されたHUVECを、記載されるとおりのm.o.i.でコントロールとしてのAd-LacZまたはAd-VEGFの何れかで、Ad-N1ECD/Fcの存在または不在において感染させた。感染後2日目、感染させたHUVECを24ウェルプレートにトリプリケートで 1.5×10^5 細胞で再播種し、24時間に亘り培養し、次に12.5ngのpRL-SV40(Promega)および137.5ngのpGA981-6をエフェクテン・トランスフェクション・試薬(Effectene transfection reagent (Qiagen))を用いてトランスフェクトした。細胞をトランスフェクションの1日後または2日後の何れかで採取し、ルシフェラーゼ活性を、デュアル-ルシフェラーゼ(登録商標)レポーターアッセイシステム(Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega))を使用して測定した。

10

【0201】

発芽アッセイ

20

コラーゲンゲルを作るために、ブタI型コラーゲン(Nitta gelatin, Tokyo, Japan)の氷冷溶液を10xTPMI1640培地および中和バッファーと、8:1:1で混合した。400 μLアリコートのコラーゲンゲルを次に24ウェルプレートに加え、少なくとも1時間に亘り37℃でゲル化した。(上記の)アデノウイルス感染に続いて、HUVECを採取し、1ウェル当たり 1.3×10^5 細胞で、0.8mLのEGM2培地中で24ウェルプレート中のコラーゲンゲルの上から播種した。HUVECは、播種後48時間で殆どコンフルエントになった。播種後、培地を1週間に亘り2日毎に交換した。発芽を観察し、顕微鏡に搭載されたオリエンパスデジタルカメラで8日後に写真を撮影した。発芽の数を定量化するために、各ウェル当たり5視野を無作為に選択し、二人の研究者により盲検法で顕微鏡下で発芽をカウントした。

30

【0202】

結果および考察

NOTCHECD/FC融合タンパク質

Notchのアンタゴニストとしての機能

Notchアンタゴニスト-NotchECD/Fc融合タンパク質

我々は、幾つかのNotchアンタゴニストを作成した(図2)。我々の戦略は、ヒトまたはマウスFcドメインに対して細胞外ドメイン(ECD)中のNotchEGF反復をコードする配列を融合するためのものである。この設計は、シグナリング機能は伴わないが、リガンド結合ドメインを保持し、従って、リガンドに結合してリガンド機能を阻害する分泌タンパク質を作る。我々は、これらのタンパク質を「NotchECD/Fc」と呼び、4つ全てのNotch-4ECDFcを作成している。Fcドメインは、イムノプロットまたは免疫組織化学によるアフィニティ精製とタンパク質検出を容易にする。

40

【0203】

Notchアンタゴニストの試験

1つの細胞において発現されたリガンドともう1つの細胞において得られたNotchレセプター活性化とを有するインビトロ共培養系(図3)を使用して、Notch経路の転写性活性化を測定した。我々は、この共培養アッセイを使用して、NotchECD/Fc機能がリガンド依存性Notchシグナリングを阻害することを示した(図4)。N1ECD/Fc発現ベクターを、HeLa細胞中で異なる比率で完全長Notch1とCSL-ルシフェラーゼレポーターと共にトランスフェクトし、次にリガンド発現293細胞と共に培養した。我々は、NotchリガンドによるNotch1シグナリングの活性化がN1ECD/Fc発現により減少したことを観察した。この効果は、濃度

50

依存性を示した；N1ECD/FcのNotch1に対して2:1の比率は、1:1の比率よりもシグナリングの阻害においてより効果的であった。Notch1ECD/Fcは、Jagged1、Delta1様1またはDelta様4により媒介されるシグナリングを阻害できた。

【0204】

Notchアンタゴニストの発現および精製

我々は、タンパク質精製の目的のためにレトロウイルスベクターを使用してNotchECD/Fcを発現するCHOおよびHeLa細胞株を作成した。HeLa-NotchECD/Fc株から回収された上清において示される通り、N1ECD/Fcタンパク質が分泌され（図5）、タンパク質A(pA)アガロースで精製される。pA精製サンプル(Sup)および全細胞溶解物(Lys)を-Fc抗体とイムノプロットし（図5、パネルA）、N1ECD/Fcが培地に分泌されることを示した。NotchECD/Fcのためのアデノウイルスベクターを使用してHeLa細胞を感染し、これらの細胞からの溶解物を-Fc抗体とイムノプロッティングし、それらがNotchECD/Fc(1, 2, 3, 4)タンパク質を発現していることを示した（図5、パネルB）。我々は、現在、pAアフィニティクロマトグラフィを使用してCHO細胞培養上清からN1ECD/Fcを精製している。10

【0205】

Notch融合タンパク質を使用した脈管形成の阻害の定義

Notchシグナリングの活性化はCBF1プロモーター活性を用いることにより検出できる。Notchシグナリング機能を、CBF1プロモーターの転写性活性を測定することにより測定でき、これはNotch-ICのCBF1への結合により活性化される。我々は、異なるMOIでVEGF-165をコードするアデノウイルスで感染されたHUVECにおけるCBF1プロモーター活性を測定した（図6）。CBF1プロモーターの導入は、MOIに依存する様式で、Ad-LacZ感染細胞に比較して、Ad-VEGF感染HUVECにおいてはっきりと検出された。このデータはVEGFの過剰発現がHUVECにおけるNotchシグナリングを活性化できたことを示した。従って、VEGFはNotchシグナリング活性を誘導した。20

【0206】

我々は、Notch融合タンパク質がNotchシグナリングのVEGF誘導性の活性化を阻害できるか否かを求めた。Ad-Notch融合タンパク質とAd-VEGFとの重感染は、Ad-VEGF感染単独により誘導されるCBF1プロモーター活性の活性化を明らかに低下した（図7）。図7において各アデノウイルスについて40MOIでの感染の場合において、レポーター遺伝子のトランسفエクション後24時間では60%阻害、48時間では90%の阻害が検出され、また、Notchデコイの阻害活性はAd-Notch融合タンパク質のMOIに依存した。30

【0207】

Notch融合タンパク質はVEGFにより誘導された血管形成性の発芽の開始を阻害する。この実験において、我々は、HUVECにおいて過剰発現したVEGFによる発芽の誘導（発芽の開始）におけるNotchデコイの効果を評価した。Ad-VEGF感染HUVECを型コラーゲンゲルにおいて8日間培養した場合、発芽がコラーゲンゲル中に誘導された。過剰発現されたVEGFによるこの発芽の誘導は、Notch融合タンパク質をコードするアデノウイルスの重感染により明らかに阻害された（図8）。Ad-Notch融合タンパク質自身は形態学上の小さな影響を有していた。40

【0208】

図9において、我々は顕微鏡を使用して視野当たりの芽をカウントした。HUVECへのAd-VEGF感染は、使用したMOIに依存して芽の数を増加した。Ad-VEGF誘導性発芽は明らかに阻害された。これらのデータは、VEGFがNotchシグナリングの活性化によりHUVECの発芽を誘導したこと、およびNotch融合タンパク質がVEGF誘導性の発芽を阻害できたことを示唆する。

【0209】

第2のシリーズの実験において引用された参考文献

1. Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science* 268:225-232.
2. Bailey, A.M., and J.W. Posakony. 1995. Suppressor of hairless directly

10

20

30

40

50

activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Development* 9:2609-22.

3. Bettenhausen, B., M. Hrabe de Angelis, D. Simon, J.L. Guenet, and A. Gossler. 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of DII, a murine gene closely related to *Drosophila Delta*. *Development* 121:2407-18.

4. Blaumueller, C.M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90:281-91.

5. Caronti, B., L. Calandriello, A. Francia, L. Scorretti, M. Manfredi, T. Sansolini, E.M. Pennisi, C. Calderaro, and G. Palladini. 1998. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy (CADASIL). Neuropathological and in vitro studies of abnormal elastogenesis. *Acta Neurol Scand.* 98:259-67.

6. Desmond, D.W., J.T. Moroney, T. Lynch, S. Chan, S.S. Chin, D.C. Shungu, A.B. Naini, and J.P. Mohr. 1998. CADASIL in a North American family: clinical, pathologic, and radiologic findings [see comments]. *Neurology* 51:844-9.

7. Dunwoodie, S.L., D. Henrique, S.M. Harrison, and R.S. Beddington. 1997. Mouse DII3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124:3065-76.

8. Eastman, D.S., R. Slee, E. Skoufos, L. Bangalore, S. Bray, and C. Delidakis. 1997. Synergy between suppressor of Hairless and Notch in regulation of enhancer of split m gamma and m delta expression. *Mol Cell Biol.* 17:5620-5634.

9. Fortini, M.E., and S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell* 75:1245-7.

10. Gale, N.W., and G.D. Yancopoulos. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes and Development* 13:1055-1066.

11. Gallahan, D., and R. Callahan. 1997. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14:1883-90.

12. Greenwald, I. 1994. Structure/function studies of Lin-12/Notch proteins. *Current Opinion in Genetics & Development* 4:556-62.

13. Greenwald, I. 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12:1751-62.

14. Henderson, A.M., S.J. Wang, A.C. Taylor, M. Aitkenhead, and C.C.W. Hughes. 2001. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem.* 276:6169-6176.

15. Hicks, C., S.H. Johnston, G. diSibio, A. Collazo, T.F. Vogt, and G. Weinmaster. 2000. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nature Cell Biology* 2:515-520.

16. Hsieh, J.J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M.G. Peterson, and S.D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJK-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular & Cellular Biology* 16:952-9.

17. Hsieh, J.J., D.E. Nofziger, G. Weinmaster, and S.D. Hayward. 1997. Epstein-Barr virus immortalization: Notch2 interacts with CBF1 and blocks differentiation. *J Virol.* 71:1938-45.

18. Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377:355-3

10

20

30

40

50

58.

19. Joutel, A., F. Andreux, S. Gaulis, V. Domenga, M. Cecillon, N. Battai I, N. Piga, F. Chapon, C. Godfrain, and E. Tournier-Lasserve. 2000. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients [see comments]. *J Clin Invest.* 105:597-605.
20. Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E.A. Cabanis, M.M. Ruchoux, J. Weissenbach, J.F. Bach, M.G. Bousser, and E. Tournier-Lasserve. 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-10. 10
21. Kopan, R., E.H. Schroeter, H. Weintraub, and J.S. Nye. 1996. Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1683-8.
22. Krebs, L.T., Y. Xue, C.R. Norton, J.R. Shutter, M. Maguire, J.P. Sundberg, D. Gallahan, V. Closson, J. Kitajewski, R. Callahan, G.H. Smith, K.L. Stark, and T. Gridley. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development* 14:1343-1352.
23. Lardelli, M., J. Dahlstrand, and U. Lendahl. 1994. The novel Notch homologue mouse Notch3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mechanism of Development* 46:123-136. 20
24. Lawson, N.D., N. Scheer, V.N. Pham, C. Kim, A.B. Chitnis, J.A. Campos-Ortega, and B.M. Weinstein. 2001. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128:3675-3683.
25. Lewis, J. 1998. Notch signaling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol.* 9:583-589.
26. Lieber, T., S. Kidd, E. Alcomo, V. Corbin, and M.W. Young. 1993. Anti neurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7:1949-1965. 30
27. Lindner, V., C. Booth, I. Prudovsky, D. Small, T. Maciag, and L. Liaw. 2001. Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alteration in cell matrix and cell-cell interactions. *Pathology* 159:875-883.
28. Lindsell, C.E., C.J. Shawber, J. Boulter, and G. Weinmaster. 1995. Jagged: A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909-917.
29. Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N.G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8108-12.
30. Lyman, D., and M.W. Young. 1993. Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10395-10399. 40
31. Matsuno, K., M.J. Go, X. Sun, D.S. Eastman, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development* 124:4265-4273.
32. Nakagawa, O., D.G. McFadden, M. Nakagawa, H. Yanagisawa, T. Hu, D. Srivastava, and E.N. Olson. 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13655-13660.
33. Oberg, C., J. Li, A. Pauley, E. Wolf, M. Gurney, and U. Lendahl. 2001 50

- . The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem.* 276:35847-35853.
34. Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 75:487-527.
35. Rebay, I., R.G. Fehon, and S. Artavanis-Tsakonas. 1993. Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74:319-29.
36. Robey, E. 1997. Notch in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 7:551-7.
37. Roehl, H., M. Bosenberg, R. Blelloch, and J. Kimble. 1996. Roles of the RAM and ANK domains in signaling by the *C. elegans* GLP-1 receptor. *Embo J.* 15:7002-7012. 10
38. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degrade proteins: The PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
39. Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes & Dev.* 6:2620-2634.
40. Shawber, C., J. Boulter, C.E. Lindsell, and G. Weinmaster. 1996a. Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol.* 180:370-6.
41. Shawber, C., D. Nofziger, J.J. Hsieh, C. Lindsell, O. Bogler, D. Hayward, and G. Weinmaster. 1996b. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122:3765-73. 20
42. Shimizu, K., S. Chiba, T. Saito, T. Takahashi, K. Kumano, H. Hamada, and H. Hirai. 2002. Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for the release of the Notch2 intracellular domain. *Embo J.* 21:294-302.
43. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. Deblanc, C.R. Kintner, and K.L. Stark. 2000a. DLL4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14:1313-1318.
44. Shutter, J.R., S. Scully, W. Fan, W.G. Richards, J. Kitajewski, G.A. Deblanc, C.R. Kintner, and K.L. Stark. 2000b. DLL4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes and Development* 14:1313-1318. 30
45. Struhl, G., K. Fitzgerald, and I. Greenwald. 1993. Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* 74:331-45.
46. Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F. Franco del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1994. Notch 1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & Development* 8:707-719.
47. Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, and T. Honjo. 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol.* 5:1416-1423. 40
48. Tietze, K., N. Oellers, and E. Knust. 1992. Enhancer of splitD, a dominant mutation of Drosophila, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6152-6156.
49. Uyttendaele, H., J. Ho, J. Rossant, and J. Kitajewski. 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *PNAS.* 98:5643-5648.
50. Uyttendaele, H., G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon, and J. Kitajewski. 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122:2251-9.
51. Vervoort, M., C. Dambly-Chaudiere, and A. Ghysen. 1997. Cell fate det 50

ermination in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol.* 7:21-28.

52. Villa, N., L. Walker, C.E. Lindsell, J. Gasson, M.L. Iruela-Arispe, and G. Weinmaster. 2001. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of Development* 108:161-164.

53. Weinmaster, G. 1997. The Ins and Outs of Notch Signaling. *Mol Cel Neurosci.* 9:91-102.

54. Weinmaster, G. 1998. Notch signaling: direct or what? *Curr Opin Genet Dev.* 8:436-42.

55. Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G. Lemke. 1992. Notch 2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931-941.

56. Weinmaster, G., V.J. Roberts, and G.A. Lemke. 1991. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113:199-205.

57. Wettstein, D.A., D.L. Turner, and C. Kintner. 1997. The Xenopus homolog of Drosophila Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 124:693-702.

58. Wu, G., E.J. Hubbard, J.K. Kitajewski, and I. Greenwald. 1998. Evidence for functional and physical association between *Caenorhabditis elegans* SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15787-91.

59. Wu, G., S.A. Lyapina, I. Das, J. Li, M. Gurney, A. Pauley, I. Chui, R.J. Deshaies, and J. Kitajewski. 2001. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 21:7403-7015.

60. Xue, Y., X. Gao, C.E. Lindsell, C.R. Norton, B. Chang, C. Hicks, M. Gendron-Maguire, E.B. Rand, G. Weinmaster, and T. Gridley. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* 8:723-30.

【0210】

[第3のシリーズの実験]

VEGFは、Notchシグナリングを介して脈管形性を阻害する

VEGFとNotchシグナリング経路の両方が血管の発生のために重要である。ここで、我々はVEGFがNotchシグナリングを活性化して脈管形成を開始することを示す。VEGFは、Delta4およびNotch4の発現を増大し、Notchシグナリング活性化を生じ、培養された初代内皮細胞における糸状仮足を誘導する。VEGFレセプター阻害剤を使用する研究は、Notchシグナリング活性が、VEGF-1 (Flt-1) 発現を誘導することにより次々にVEGFの作用を増強することを示す。VEGF作用の他の成分は、MMP-9およびMT1-MMPの誘導を含み、Notchにより媒介される。VEGF誘導性皮膚新生血管新生のモデルのためのインビオアッセイを用いて、我々は分泌されたNotch阻害剤 (Notchに基づく融合タンパク質) がVEGF誘導性新血管新生とVEGFR-1発現の誘導を阻害することを発見した。このように、Notchシグナリングは、恐らく開始の段階で、VEGFにより調節される脈管形成のためになくてはならない。

【0211】

VEGFは、ECMの分解、発芽（糸状仮足の形成）、増殖、生存および内皮細胞の遊走などの複数の過程からなる脈管形成発達の重要な制御因子である。殆どの段階は、VEGFシグナリングの下流の分子と協同しているのだろうが、これらの段階が、どのような経緯で調節されて、血管原性の発芽などにより複雑な形態形成の現象を起こすのかは知られていない。Notchシグナリングは、進化的に保存された細胞運命決定を制御するために機能するシグナリング機構である（1）。Jagged1およびDelta様などのリガンドによる結合において、Notch (Notch1C) の細胞質内のドメインはプレセニリン/-セクレターゼにより放出され、核に転位置し、転写性のリプレッサーCSL (CBF1/Su(H)/Jag2) と相互作用し、それを転写性のアクチベーターに変換する（1）。Notchシグナリングの血管発生における役割

10

20

30

40

50

は、標的変異を有するマウスの研究により示唆された(2)。内皮におけるNotch活性化はまた血管リモデリングを崩壊することから、適切なNotchシグナリングは血管発生のために必須である(3)。NotchのVEGFシグナリングに対する関連性は示唆されているが(4-6)、NotchシグナリングがVEGF調節性の脈管形成においてどのような役割を有しているのか、Notchシグナリングが成人の脈管構造における生理的および病理学的な脈管形に関係しているのか否かは、成未だにはっきりしない。

【0212】

HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)の増殖は、VEGF(図26Aおよび26B)および発芽などの分化関連性の生物応答に依存しており、初期の段階で評価できる(7)。最初に、我々は、報告(5)通り、アデノウイルスで形質導入されたVEGFが、bFGFを含む完全培地で培養されたHUVECにおいてNotchおよびNotchリガンド発現の両方を誘導するのか否かを試験した(図2)。RT-PCR分析は、DI4およびNotch4 mRNAの両々が、アデノウイルスで形質導入されたVEGF HUVEC(Ad-VEGF-HUVEC)において、アデノウイルスで形質導入されたLac Z HUVECに比べて上方制御されたことを示した(図22A)。形質導入されたVEGFは、Jagged1およびNotch1を誘導しているように見えなかった。CSLルシフェラーゼレポーター活性で、形質導入されたVEGFはまた、Notchシグナリングを用量依存性に活性化し(図22B)、これはNotchシグナリングでトランス活性化された(8)。Notchシグナリングは、増殖に比べて、より高い用量のAd-VEGFで活性化された(図26A)。VEGFRキナーゼの阻害剤であるSU5416がVEGF誘導性CSLルシフェラーゼレセプター活性を低減したことから(図22C)、VEGFはNotchシグナリングをレセプターキナーゼの活性化により誘導した。膜貫通および細胞質内ドメインの両方を欠失しているNotch変異体が、Notchシグナリングに対するドメイン陰性阻害剤として機能したことから(9)、我々はNotchシグナリングを阻害するためのNotchに基づく融合タンパク質またはデコイ(N1ECDFc)を作成した(図22D)。Ad-N1ECDFc形質導入性HUVECの培養上清のウェスタンプロット分析は、N1ECDFcが発現されてウェルに分泌されたことを示した(図22E)。そこにおいてNotchリガンド(J1、DI1またはDI4の何れか)を発現しているBosc細胞が、Notch1を発現しているHeLa細胞において、コントロールBosc細胞と比較してNotchシグナリングを活性化している共培養アッセイ使用することにより、我々は、N1ECDFc発現プラスミドのトランスフェクションでのNotchシグナリングの阻害を測定した(図22F)。次に、我々は、N1ECDFcが、HUVECに形質導入されたVEGFによるNotchシグナリングの活性化を阻害するか否かを試験した(図22G)。HUVECへのAd-VEGFとのAd-N1ECDFcの同時形質導入は、VEGFにより誘導されるCSLルシフェラーゼ活性を明らかに減少した。Gerhardtら(Gerhardt et al.)は、VEGFが、血管性発芽の先端での糸状仮足伸展を導くことによって初期の出生後網膜における脈管形成を制御したことを報告した(10)。血管原性の発芽の間に、静止状態の内皮細胞の間に糸状仮足の突出を起こす分化した内皮細胞の形成が、1つの初期の現象であるかもしれない。ここで、我々は、糸状仮足突出を起こしている単一の内皮細胞の形成を発芽という。初代内皮細胞の発芽は、それらをフィブリンまたはコラーゲンゲル上で3次元で培養することにより誘導される(11)。Ad-VEGF-HUVECが完全培地と共にコラーゲンゲル上で培養される場合に、形質導入性HUVECは5日間でコラーゲンゲルに糸状仮足の伸展を起こし(図22H)、芽の数は用量依存性に増加した(図27A)。活性型Notch4をコードするアデノウイルス(Ad-Notch4/int3)によるNotchシグナリングの活性化は、HUVECの発芽を誘導し(12)、またNotch1のそれは(Ad-N1IC)もまた、HUVECの発芽を誘導した(図23Aおよび27B)。VEGFおよびNotchシグナリングの両方がHUVECの発芽を誘導することから、我々は、N1ECDFcがVEGF誘導性HUVECの発芽を阻害したのか否かを試験した(図22H-I)。Ad-VEGF-HUVECの発芽は、Ad-N1ECDFcの同時形質導入により明らかに阻害された。Ad-LacZまたはAd-N1ECDFc形質導入性HUVECは、何れも芽を形成しなかった(図22H)。N1ECDFcは、細胞数に影響することなくVEGF誘導性HUVECの発芽を阻害した(図22I)。形質導入されたN1ECDFcは、HUVECの増殖を明らかには変化させない一方で、Ad-N1IC形質導入性HUVECのそれは用量依存性に阻害され(図28A)、内皮増殖に対するNotchシグナリングの阻害効果と一致する(13)。

10

20

30

40

50

【0213】

NotchシグナリングがVEGFの下流であるのか否かを試験するために、我々は、N1IC誘導性HUVECの発芽においてVEGFRを含むチロシンキナーゼレセプターのための3つの異なる阻害剤を評価したが、これは3つの成長因子が完全培地に存在するからである（図23A-C）。1 μMの濃度で、各化合物は、各キナーゼに対する選択的阻害を示した（データに示さず）。PD166866またはZD1893の何れもAd-N1IC-HUVECの発芽には影響を示さなかつたが、SU5416は明らかにそれを阻害した（図23A-B）。SU5416は、より低い濃度で生存度をより減少すると共にAd-N1IC-HUVECの発芽を選択的に阻害した（図23C）。Taylorら（Taylor et al.）が、NotchはFlk1/KDR/VEGFR2発現を下方制御することを報告していることから（14）、NotchはFlk1と協同して発芽を促進することはなさそうである。従って、我々は、Notchシグナリングの活性化が、HUVECにおけるFlt1/VEGFR1発現に影響するのか否かを試験したが、これはSU5416がFlt1およびFlk1キナーゼ活性を阻害するからである（15）。RT-PCR分析は、Flt1 mRNAの発現がAd-N1IC-HUVECにおいて下方制御されたことを示したが、一方で、内皮細胞メーカー（endothelial cell marker）であるCD31 mRNAの発現は、Ad-LacZ-HUVECにおけるそれには匹敵しなかつた（図23D）。ウェスタンプロット分析も、Flt1タンパク質の発現がAd-N1IC-HUVECにおいて上方制御されたことを示した（図23E）。従って、我々は、Flt1のための選択的リガンドであるPIGFが、Notchシグナリングの活性化を介してFlt1の上方制御されているHUVECの発芽を促進するか否かを試験した（図23F-G）。PIGFは、Ad-N1IC-HUVECの芽の数を、PIGFの不在する場合に比較して150%に増大した（図23F）。更に、PIGFは複数の糸状仮足を含むHUVECの芽を250%に増加した（図23G）。Flt1のための小型干渉RNA（siRNA）を用いたFlt1発現の減少がAd-N1IC-HUVECの発芽を阻害する一方で（図23J）、そのトランスフェクションは選択的にFlt1 mRNAの発現とFlt1タンパク質の発現を減少した（図23I）。Flk1 siRNAでのFlk1発現の減少もAd-N1IC-HUVECの発芽を抑制したが（図30B）、Flk1 siRNAの阻害効果はFlt1 siRNAのそれよりも小さかつた（図23J）。Flk1 siRNAの効果は、Ad-N1IC-HUVECのそれよりもAd-VEGF-HUVECの発芽においてより効果的であった（図30B-C）。Flt1 siRNAでのトランスフェクションは、Ad-N1IC-およびAd-VEGF-HUVECの両方の発芽を同じ程度まで阻害した（データには示さず）。幾つかの研究は、VEGFが、内皮細胞におけるゼラチナーゼ活性を調節し、MMP-2およびMMP-9のような有意なゼラチナーゼ活性がしっかりと確立されて血管原性の発芽を誘導したことを示した（16）。我々はVEGFがHUVECにおいてNotchシグナリングを介するゼラチナーゼ活性を制御するか否かを試験した。

【0214】

ゼラチン酵素電気泳動法において、Ad-VEGF-HUVECの培養上清は、MMP9の誘導および活性化の両方を示し、これは6日目で検出され始め（図24A）、MMP2の活性は4日目で検出され（図24B）、これらをAd-LacZ-HUVECの結果と比較した。Ad-N1ECDFcとAd-VEGFの同時形質導入は、MM9の誘導および活性の両方について阻害を示し（図24A）、並びにMM P2の活性についても阻害した（図24B）。RT-PCR分析は、MMP9 mRNAの発現がAd-N1IC-HUVECにおいて上方制御されたが、MM2 mRNAはAd-N1IC-HUVECにおいて減少したことを示した（図24C）。MMP2活性の誘導は、ゼラチン酵素電気泳動法で検出されなかつたので（図24B）、この結果はおそらく結論であろう。一方で、細胞表面でMMP2を活性化できる（17）MT1-MMPの発現は、Ad-N1IC-HUVECにおける転写性およびタンパク質レベルの両方を上方制御された（図24D）。VEGFはゼラチナーゼおよびMT1-MMP発現の両方を調節できることから（16）、RT-PCR分析は、MMP9およびMT1-MMPの両方がAd-VEGF-HUVECにおいて、Ad-LacZ-HUVECと比較して上方制御され、この誘導はAd-N1ECDFcの同時形質導入で阻害されたことを示した（図24E）。Ad-N1ECDFc感染単独は、Ad-LacZ感染性HUVECにおけるMMP9またはMT1-MMPの何れの発現にも影響しなかつた（データには示さず）。脈管原性の発芽のためのMMPの要求性は合成MMP阻害剤によって確立された（16）。GM6001は、MMP2、MMP9およびMT1-MMPを含むMMPに対する1つの広い阻害剤である。GM6001は、明白にコラーゲン（図31A-B）およびフィブリングル（データには示さず）の両方においてAd-N1IC-HUVECの出芽を減少させた。

10

20

30

40

50

【0215】

マウス背部気嚢(Dorsa Air Sac ; DAS)アッセイにおいて(19)、VEGF121(293/VEGF)を過剰発現する293細胞の安定したトランスフェクタントは、インビボの脈管形成を有意に誘導した(図25A、左側パネル)。このVEGF誘導性脈管形成は、293/VEGF単独に(図25A)比較して、N1ECDFcの同時発現によって明らかに阻害された。血管密度を測定し、図25Bの中で示された脈管形成のインデックスは、293/VEGF誘導性脈管形成を、293/N1ECDFcの共発現により阻害することを示す(図25B)。

【0216】

また、マウス背部気嚢(Dorsa Air Sac ; DAS)アッセイにおいて(19)、ヒト乳癌細胞株、MDA-MB-231は、恐らくVEGFの分泌によって有意にインビボの脈管形成を誘導した(図25C、左側パネル)。このVEGF誘導性脈管形成は、LacZを発現するアデノウイルスと比較して、N1ECDFcのアデノウイルスを媒介とした発現によって明らかに阻害された(図25C)。血管密度が測定され、図25Dの中で示された脈管形成のインデックスは、MDA-MB-231誘導性脈管形成がN1ECDFcの発現によって阻害することを示す。

10

【0217】

F1k1は、胎芽におけるその強いチロシンキナーゼ活動による脈管形成のための主な陽性シグナルトランスデューサーであり、その一方で、F1t1は、脈管形成の陰性シグナルトランスデューサーであると考えられている。しかしながら、PIGF2を過剰発現するLLCのインビボの成長が、細胞質のF1t-1キナーゼドメインを欠失するマウスにおける厳しく損なわれたので、F1t-1についての陽性の役割は成体マウスにおいて示された(20)。PIGF/F1t-1シグナリングがF1k-1のリン酸化部位を変更し、虚血の心筋の脈管形成を強めたので(21)、Notchは、糸状仮足の伸張を誘導するか、または脈管原性の発芽を強めるかの何れかのためにF1t-1シグナリングを誘導すること、およびF1k-1シグナリングを和らげるにより、VEGFシグナリングを変えるために機能するのかもしれない。興味深いことに、Notchシグナリングは、PIGF発現を上方制御した(図29)。しかしながら、以前に(22)を報告された通り、Notchシグナリングの連続的な活性化は、脈管原性の発芽を含む多細胞ルーメンの形成を阻害する。Notchシグナリングは、出芽/糸状仮足形成の後に切られるべきであり、Notch経路の一時的な活性化が要求される。

20

【0218】

腫瘍脈管形成がVEGF依存性である臍臓の細胞発癌(Rip1Tag2マウス)のトランスジェニックマウスマodelにおいて、VEGF発現のレベルは増加しないが、VEGFレセプターへのマトリックスに蓄えられた細胞外VEGFの動員が生じる。MMP-9はこの動員の原因であり、腫瘍発生はRip1Tag2/MMP-9-ヌルダブル-トランスジェニックマウスにおいて阻害された(23)。NotchはMMP-9発現を上方制御し、血管原性の発芽のための部位での局所的なVEGFレベルを増加するかもしれない。NotchはさらにMT1-MMP発現を上方制御しているが、細胞外MMP-2はNotch活性化ないHeLa細胞の細胞膜に対するターゲットとされている可能性がある。Notchは、ゼラチナーゼ活動およびVEGF濃度の調節による脈管原性の発芽のための部位を決定するかもしれない。内皮のMMP-9が肺特異的転移(20)においてF1t-1によって調節されたので、F1t-1は、MMP-9の誘導に間接的に関与するかもしれない。

30

【0219】

[第3のシリーズの実験において引用された参考文献]

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 1999;284(5415):770-776.
2. Shawber CJ, J. K. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays*. 2004;26(3):225-34.
3. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, J. K. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5643-8.
4. Lawson ND, Vogel AM, BM. W. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differ

40

50

entiation. *Dev Cell* 2002;3(1):127-36.

5. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. Regulation of Notch1 and DLL4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):14-25.

6. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(45):5949-54.

7. Montesano R, L. O. Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1987;130(2):284-91. 10

8. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, A. I. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995;377(6547):355-8.

9. Small D, Kovalenko D, Kacer D, Liaw L, Landriscina M, Di Serio C, et al. Soluble Jagged 1 represses the function of its transmembrane form to induce the formation of the Src-dependent chord-like phenotype. *J Biol Chem* 2001;276(34):32022-30.

10. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161(6):1163-77. 20

11. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaie R, et al. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 1996;132(6):1177-88.

12. Das I, Craig C, Funahashi Y, Jung KM, Kim TW, Byers R, et al. Notch oncproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 2004;279(29):30771-80.

13. Noseda M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):8813-22. 30

14. Taylor KL, Henderson AM, CC. H. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 2002;64(3):372-83.

15. Itokawa T, Nokihara H, Nishioka Y, Sone S, Iwamoto Y, Yamada Y, et al. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol Cancer Ther* 2002;1(5):295-302.

16. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(7):104-17.

17. Seiki M, Koshikawa N, I. Y. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(2-3):129-43. 40

18. Yamamoto M, Tsujishita H, Hori N, Ohishi Y, Inoue S, Ikeda S, et al. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase by hydroxamate inhibitors: an examination of the subsite pocket. *J Med Chem* 1998;41(8):1209-17.

19. Funahashi Y, Wakabayashi T, Semba T, Sonoda J, Kitoh K, K. Y. Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. *Oncol Res*. 1999;11(7):319-29.

20. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in 50

lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002;2(4):289-300.

21. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9(7):936-43.

22. Leong KG, Hu X LL, Noseda M, Larrivee B, Hull C, Hood L, et al. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2830-41.

23. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2(10):737-44.

10

【0220】

[第4のシリーズの実験]

Notch1外部ドメイン由来の新規構成物はNotchシグナリング、内皮形態形成および腫瘍脈管形成を阻害する

Notchシグナリングは血管発生のために必要であり、腫瘍脈管形成においても機能する。血管内皮成長因子(VEGF)の抑制は、有効になった抗脈管形成治療法であり、VEGFは、内皮細胞(EC)におけるNotchおよびNotchリガンドDelta様4(DII4)発現の両方を誘導できる。DII4の阻害は、腫瘍増殖を制限し、新生血管を崩壊することができるが、腫瘍脈管形成におけるNotchレセプター機能を阻害する効果はまだ明らかにされていない。この研究において、我々は、この経路を阻害するためにNotch1レセプターの可溶性融合タンパク質(N1ECDFcまたはNotch1デコイ)を生成し、インビトロおよびインビボでの脈管形成におけるその効果を評価した。Notch1デコイ発現は、3つの異なるNotchリガンドのNotch1に対する結合により刺激されたシグナリングを減少し、更にNotch4を過剰発現するECの形態形成を阻害した。我々は、2つのモデル：纖維芽細胞増殖因子4(Mm5MTFGF4)を過剰発現するマウスの乳腫瘍Mm5MT細胞およびNGPヒト神経芽細胞腫細胞：を使用して、腫瘍脈管形成におけるNotch1デコイ発現の影響を試験した。外因的に発現されたFGF4は、Mm5MT-FGF4細胞においてNotchリガンドJagged1およびDelta様1(DII1)の発現を誘導し、Jagged1はMm5MT-FGF4異種移植片において発現された。Notch1デコイの過剰発現は、Mm5MT-FGF4細胞の腫瘍形態形成性にインビトロで影響しなかったが、マウスにおけるMm5MT-FGF4異種移植片の増殖を制限したが、一方で、著しく新脈管形性を損なった。同様に、Notch1デコイ発現はインビトロのNGP細胞に影響せず、しかし血管を崩壊し、NGP異種移植片における腫瘍生存能力を減少した。これらの結果は、Notchレセプターシグナリングが腫瘍新脈管形成のために必要であること、腫瘍治療のための新しい標的を提供することを強く示唆する。

20

30

40

【0221】

脈管形成は、VEGF、纖維芽細胞増殖因子(FGF)および肝細胞成長因子(HGF)を含む多数のシグナル経路によって精巧に調節される。これらの中で、VEGFは、内皮増殖、生存およびチューブ形成を含む脈管形成の段階ほとんどすべてに臨界的に影響を及ぼす(1)。この変化し続ける役割と一致して、VEGF阻害剤は、前臨床のモデルにおける脈管形成を低減し、癌治療として臨床的に有効になった(2)。この確立された効能にもかかわらず、異なる腫瘍タイプは、VEGF遮断に広い感受性の変化を示す(2)。この可変性の根本的な理由は明らかではない。1つの可能性は、代替のシグナルがVEGF阻害にもかかわらず灌流を可能にして、腫瘍血管を救済するということである。従って、そのような経路の検証が明らかに治療上の重要性である。

40

【0222】

高度に保存されたNotch遺伝子ファミリーは膜内外のレセプター(Notch1、-2、-3、-4)およびリガンド(Jagged1、-2; Delta様またはDII1、-3、-4)、および膜貫通型タンパク質をコードする。リガンド結合に際して、Notchの細胞質ドメイン(NotchIC)はプレセニリン/セクレターゼによって放出される(3)。Notchシグナリングは、致命傷を引き起こすDII4のハプロ不全と共に、胎芽の重篤な血管の欠陥を生ずる(4)。腫瘍脈管形成におけるNotchシグナリングの潜在的な役割はこのように多くの新しい興味を起こさせる。DII4リポー

50

ター構成物のためのトランスジェニックマウスは、腫瘍内皮細胞(EC)において発現を示し(5)、増加したDII4発現は、ヒト癌において検出されている(6、7)。DII4遮断が実験的腫瘍における増殖と灌流を抑制する(8と9)ことを示していることによりこの役割が批判されることを最近の2つの報告は確証する。興味をそそるのは、これらの研究において、DII4阻害は、単に血管増殖を防ぐだけではなく、腫瘍血管を混乱させ、DII4が機能的な血管アッセンブリのために必要であることを示唆する。

【0223】

最近のデータは、Notchレセプターが腫瘍血管においても機能することを示す。例えば、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)において、最近、HGFが内皮ではなく腫瘍細胞上のJagged1の発現を上方制御すると示された。増加したJagged1発現は、マウスにおける近隣のECにおけるNotchシグナリングを活性化し、腫瘍脈管形成と増殖を刺激する(10)。従って、これらのデータは、腫瘍ECにおけるNotchシグナリングの活性化のための少なくとも2つの異なる機序があることを示唆する。

10

【0224】

これらの研究において、我々は、Notch1の細胞外ドメイン(N1ECDFc、またはNotch1デコイ)に基づいた新しい可溶性構成物を使用して、脈管形成におけるNotchレセプター活性化の役割を評価した。インビトロで、Notch1デコイは、Notchシグナリングのリガンド誘導性活性化と、アデノウイルスによりNotch4を過剰発現するECの形態形成との両方を阻害した。インビボで、Notch1デコイ発現は、Jagged1発現がFGF4の形質導入によって上方制御されたマウスMm5MT異種移植片の増殖を遅らせ、NGP神経芽細胞腫瘍における血管と腫瘍生存能力を崩壊した。これらのデータは、腫瘍新脈管形成中のNotchレセプター機能の必要性を支持し、この経路の阻害が有効な新しい抗腫瘍戦略を提供するかもしれないことを示唆する。

20

【0225】

[材料と方法]

試薬と発現ベクター

化合物EはCalbiochem(San Diego, CA)から、PD166866はエーザイ(東京(日本))から購入した。Notch1デコイ(N1ECDFc)は、ヒトIgG Fcへのフレーム中で融合されたラットNotch1エクトドメイン(bp 241-4229、Genbank accession # X57405)をコードする。レトロウイルスのpHyTC-Jagged1、-DII1、-DII4およびpBos-Notch1は記述されている(11)。Notch1デコイおよびFcを、レトロウイルスベクターpHyTCXへ操作し、マウスFGF4はpQNCXへ操作した。LacZおよびマウスNotch4をコードするアデノウイルスの構成物およびpAdlox-GFPは記述されている(12)(13)。

30

【0226】

HUVEC、アデノウイルスおよびレトロウイルス感染

HUVECは記述された通りに単離し(14)、マウス乳癌Mm5MTを入手した(ATCC, Manassas, VA)。我々は、示された多重度の感染(m.o.i.)でアデノウイルスと、感染のためGP2-293細胞(BD Biosciences, Bedford, MA)からのレトロウイルス上清を使用した。HUVECは300g/mlのhygromycinB(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して選択し、Mm5MT-FGF4は、ダブルのトランスフェクタントを伴い、1mg/ml G418 (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY)において選択した。

40

【0227】

ウェスタンプロット

Ad-N1ECDFc-形質導入HUVECは、内皮無血清培地(GIBCO-Invitrogen)で48h、およびDMEMでMm5MT-FGF4トランスフェクタントを培養した。ウェスタンプロットは抗ヒトFc(Pierce, Rockford, IL)を使用して行なった。

【0228】

定量的なRT-PCR

Mm5MTトランスフェクタントを、ベヒクルまたは1μMのPD166866(FGFレセプターキナーゼの阻害剤)と共に7日培養し、総RNAを単離し(RNeasy mini-kit, Qiagen, Valencia, CA)

50

、第1の鎖のcDNAを合成した(SuperScriptTM First-Strand Synthesis System, Invitrogen)。

【0229】

アクチン、FGF4、Jagged1、DII1およびDII4のための定量的なRT-PCR(SYBER Green PCR Master Mix, 7300 Real Time PCR; Applied Biosystems, Foster City, CA)をトリプリケートで行い、値を -アクチンについて標準化した。値はコントロールに比較した倍数で示す(プライマー配列は要求により入手可能)。

【0230】

共存培養シグナリング分析

リガンド誘導性シグナリングのNotch1デコイ阻害は記述された通りに行った(11)。HeLa細胞は、666ngのpCMV-FcまたはpHyTC-N1ECDFc(x1のために333ng、x2のために666ng)の何れかと、333ngのpBOS-Notch1、333ngのpGA981-6および83ngのpLNC-LacZでトランスフェクトした。293細胞を、680ngのpHyTc-Jagged1、pHyTc-DII1、pHyTc-DII4またはpHyTc-X(空のベクター)でトランスフェクトした。細胞を採取し、トランスフェクションの48h後にルシフェラーゼ活性(Enhanced Luciferase assay kit, BD PharMingen, San Diego, CA)と、-ガラクトシダーゼ活性(Galacto-Light Plus kit, Applied Biosystems)を測定した。アッセイはトリプリケートで行なった。

【0231】

内皮共存培養形態形成アッセイ

HUVEC形態形成は、Ad-Notch4形質導入HUVECとNotch1デコイHUVECまたはFc-HUVECトランスフェクタントとの共培養をすることを加えたことにより変更して、既述された通りに(11)評価した。10m.o.iのAd--GFPを30m.o.iのAd-LacZまたはAd-Notch4と共にHUVECに重形質導入し、48時間後、フィブリンゲル(24ウェルプレート、 1.5×10^4 cells/well)に播種した。安定したHUVEC-偽(HUVEC-X)、HUVEC-Fc、またはHUVEC-N1ECDFcトランスフェクタントを 1.35×10^5 cells/wellで播種し、ベヒクルまたは200nMのcompound Eを3時間後に添加した。7日後に、HUVEC形態形成を、視野当たりの総GFP陽性細胞と比較する方法で、GFP陽性細胞の数として計算した。

【0232】

Mm5MT腫瘍モデル

6-8週齢の雌性C3Hマウス(Taconic, Hudson, NY)を、 10^6 Mm5MTトランスフェクタント(各N=10)で皮下移植した。腫瘍直径は、ノギスで測定し、体積を算出した(長さ(mm)×幅(mm)²/2)。腫瘍は22日目に採取して分析した。実験は3度行った。

【0233】

免疫組織化学

5 μmの新鮮な凍ったMm5MT組織セクションを免疫染色した(15)(抗体リストの補足のデータを参照)。CD31定量化は、Eclipse E800顕微鏡およびImagePro Plus v.4.01 (Silver Spring, MD)を使用して行った。20の異なる視野をスライド毎に測定し、密度比を(特異的染色の領域)/(全領域、各視野)として計算した。データは、Mm5MT偽トランスフェクタントに対する各Mm5MTトランスフェクタントの平均密度比の平均の比として示す。

【0234】

NGP腫瘍モデル

NGP腫瘍モデルは以前に詳細に記述されました(16)。NGP細胞を、上記の通りにLacZまたはN1ECDFcでトランスフェクトし、4-6週齢のNCRのヌードマウス(Taconic、ジャーマンタウン、NY; NGP-LacZ n=11、NGP-N1ECDFc n=13)に腎臓内に 10^6 NGP-LacZまたはNGP-N1ECDFc細胞を移植した。6週で、腫瘍を分析のために採取した。5uMのパラフィン抱埋切片をCD-31/PECAMと平滑筋アクチン(SMA)で免疫染色した。アポトーシスを検出するために(TUNEL分析)、我々はキット(Apoptag Red in situ kit(Chemicon))を使用した。シグナルを、正常な腎領域を除いた各組織の任意に選択された20~23視野を写真に写すことにより定量化した。各フレームは、それぞれ赤色(TUNELシグナル)および緑色チャンネルの両方で撮影した。アドビ・フォトショップを使用して、赤血球自己蛍光を除去する

10

20

30

40

50

ために緑色チャンネルシグナルを減じた。一定の赤色チャンネル閾値を任意に選択し、総シグナル領域を4 NGP-N1ECDFcおよび3NGP-LacZ腫瘍において測定した。赤血球定量化を同様に行つた。

【0235】

統計解析

定量分析における有意性は、Tukey-クレイマーテスト(Tukey-Kramer tests、CD31定量化)およびクラスカル-ヴァリス解析(Kruskal-Wallis analysis、他の全て)を使用して評価した。

【0236】

結果

Notchデコイは、Notch1を発現している細胞においてリガンド誘導性Notchシグナリングを阻害する

Notch1デコイは、ヒトIgG Fcに対して融合されたNotch1のエクトドメインに基づいており、プロッティングにより特定された通りにアデノウイルスNotch1デコイ(Ad-N1ECDFc)感染HUVECによる培養上清に分泌された(図32A)。我々は、共存培養シグナリングアッセイを使用してNotch1デコイ活性を評価した(11)。Notchリガンド(Jagged1、DII1、DII4)を発現する293細胞はNotch1を発現するHeLa細胞と培養したときに、Notchシグナリングを活性化し、これはCSLルシフェラーゼリポーター活性により測定された(図32B)。HeLa(図32B)または293細胞(データには示さず)の何れかにおけるNotch1デコイの発現は、共存培養アッセイにおけるNotch1シグナリングを阻害し、これはNotch1デコイがJagged1、DII1またはDII4による活性化を阻害したことを示す。

【0237】

Notch1デコイはNotch4により誘導されたHUVECの形態形成を阻害する

Notch4発現は、フィブリングルにおいて培養されたHUVECからの細胞伸展を誘導し(図32c)、これはVEGF and FGF2により誘導される形態学的な変化に似ている(17と18)。フィブリンは、EC(19)におけるJagged1を誘導する。我々は、そのような伸展が、HUVECに形質導入されたNotch4の内因性Notchリガンド活性化を反映するという仮設について、化合物E(CE)、セクレターゼ阻害剤(GSI)またはNotch1デコイの何れかを用いて試験した。ベヒクルと比較して、200nM CEでの処理は、明らかにNotch4HUVECにおける伸展を阻害した(図32Cの上パネル、32D)。発芽の減少は有意であった(図32D、 $p < 0.0001$ 、化合物E処理とN1ECDFc形質導入の両方について；データは平均値 \pm SDで示す)。HUVECにおけるNotch4+Notch1デコイ共同発現は、同様にNotch4+Fcコントロールに比べて内皮の伸展を阻害した(図32C、下パネル；32D)。まとめると、これらのデータは、Notchレセプター活性化が、このアッセイにおけるHUVEC伸張を誘導するのに必要十分であり、Notch1デコイは同様にGSIに対して機能し、更に、Notchレセプター阻害剤としてその活性が妥当であることを示す。

【0238】

FGF4は、マウス乳腫瘍Mm5MT細胞において、Notchリガンド、Jagged1およびDII1の発現を誘導した

FGF4のMm5MT細胞におけるか蒸発は、クローン原性および異種移植アッセイにおいて腫瘍形成能を促進した(データには示さず)。HGF/MAPKシグナリングがHNSCCにおけるJagged1発現を誘導したので(10)、我々はFGF4がMm5MT細胞のNotchリガンドの発現を刺激するかどうかを検討した。我々は、定量的PCRを使用して、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントのJagged1とDII1のアップ調節を検出した(DII4発現は不变だった)(図33A)。FGFRキナーゼ阻害剤PD166866は、Mm5MT-FGF4トランスフェクタントにおけるJagged1およびDII1の両方を誘導を抑制し(図33C)、これはFGF4誘導性Jagged1およびDII1発現がFGFRシグナリングを必要とすることを示す。イムノプロッティングにより、Mm5MT-FGF4細胞におけるJagged1タンパク質の上方制御が確認され(図33B)、免疫染色により、Mm5MT-FGF4腫瘍におけるJagged1の著しい増加が示された(図33D)。更に、Notch4がMm5MT-FGF4腫瘍内皮で検出された(データには示さず)。

【0239】

10

20

30

40

50

Notch1デコイ発現はマウスにおけるMm5MT-FGF4腫瘍の脈管形成および増殖を阻害した。我々は、内皮のNotchレセプターによるシグナリングにより、Jagged1発現Mm5MT-FGF4腫瘍が脈管形成を促進すると仮定した。従って、我々は、マウスにおけるMm5MT-FGF4異種移植片増殖に対するNotch1デコイ発現の効果を評価した。安定してFcまたはNotch1デコイの何れかを過剰発現するMm5MT-FGF4の腫瘍形成能は、クローン原性アッセイによって不变であった（データには示さず）。しかしながら、両方のMm5MT-FGF4偽トランスフェクタントおよびFcトランスフェクタントと比較して、Mm5MT-FGF4-N1ECDFc異種移植片増殖は有意に遅延し、これはNotch阻害が腫瘍形成において重大な成分を失ったことを示唆する（図34A）。内皮マーカーCD31/PECAMについての免疫染色は、Mm5MTFGF4-N1ECDFc腫瘍における脈管形成を顕著に阻害した（図34B）。血管アッセンブリにおけるNotchの必要性と一致して、ECは、剥離した孤立した細胞と小さなクラスタとして見え、それと共にわずかな組織された血管が検出された。抗CD31染色の定量分析は、Notch1のデコイ発現腫瘍において微細血管密度の58%の減少を示した（P<0.001、Mm5MT-FGF4-XおよびMm5MT-FGF4-Fcの両方について、対Mm5MT-FGF4-N1ECDFc；データは平均値±SDで示す；図34C）。

10

【0240】

Notch1デコイ発現はヒトNGP神経芽細胞腫異種移植において脈管形成を崩壊した。マウスにおける、NGP異種移植は、VEGF阻害に対して比較的に抵抗性である成熟した階層的血管を形成した（16）。Notchレセプター活性化がNGP脈管形成に寄与したかどうか判断するために、我々は、上記のように、N1ECDFcでNGP細胞をトランスフェクトした。Mm5MTFGF4-N1ECDFc細胞で観察された結果と同様に、培養中のNGP-N1ECDFc細胞の増殖はトランسفエクションに影響されなかった（データには示さず）。しかしながら、異種移植片生存能は、有意に増加した腫瘍細胞アポトーシスを伴って著しく損なわれた（P=0.0002、TUNEL-陽性細胞についてNGP-N1ECDFc対NGP-LacZ腫瘍、図35A）。腫瘍内の出血は、血管が物理的に崩壊したことを示唆し、NGP-N1ECDFc腫瘍において有意に増加した（P<0.0001、図36C）。滑らかでインタクトに見えるコラーゲンスリーブが残ったが、血管基底膜の構成成分コラーゲンIVの免疫染色により、小さくなつた分岐と共に、血管の全面的な減少が示された（データには示さず）。しかしながら、

20

ECおよび血管壁細胞（VMC）の免疫染色（それぞれ抗CD31および抗-SMA抗体を使用）は、これらの正常に隣接する細胞層の障害を示した。個々の血管の細胞は不規則に見えて、血管連続性が損失されると共に、互いに不安定に引き離された（図35D）。纏めると、Notch1デコイ発現が腫瘍血管中の内皮とVMC相互作用を崩壊し、これらの結果は、腫瘍組織の不安定、出血および不完全な灌流を導いたことを示唆する。

30

【0241】

考察

最近の報告書は、脈管形成におけるNotchリガンドDII4の重大な役割を確認し、血管を崩壊することにより、DII4阻害が有效地に腫瘍増殖を抑制することができる（8、9）。本研究では、我々は、血管に対するその影響は異なるが、Notch1エクトドメインに由来する新規構成物を使用するNotchレセプター機能の阻害もまた、有效地に腫瘍灌流を低減することを示す。Notch1デコイは、Notch1へのリガンドJagged1、DII1およびDII4の結合により誘導されたシグナリングを阻害した。血管新生におけるNotchレセプター活性化の役割と一致し、Notch4の過剰発現は内皮細胞伸展を誘導し、これはNotch1デコイまたはGSIの何れかによるNotchシグナリングの阻害によって防ぐことができた。Notch1デコイは腫瘍細胞増殖をインビトロで阻害しなかつたが、Notch1デコイの発現はMm5MT-FGF4異種移植片の増殖および脈管形成を阻害し、そこにおいてJagged1発現は上方制御された。同様に、Notch1デコイ発現は、NGP腫瘍細胞増殖における効果はインビトロではなかつたが、腫瘍血管および生存能をインビオでは崩壊した。

40

【0242】

HUVECにおけるNotch4過剰発現は、Notchリガンドの外因性の発現のないフィブリングルにおける内皮伸展を誘導するのに十分であった。フィブリンがECにおけるJagged1発現を誘導することが知られており、従って、このアッセイにおけるJagged1のHUVEC発現を促進

50

するために機能したのかもしけず、我々は、これがNotch4の活性化を引き起こしたと推測しする。HeLa共存培養シグナリングアッセイにおいて、Notch1デコイはリガンド-Notch1レセプター相互作用によってシグナリングを阻害した。Notch4がHeLa細胞において不十分に処理されて示された通り、我々はNotch4活動を同様に評価することができなかった(データには示さず)。しかしながら、処理されたNotch4は、アデノウイルスのNotch4形質導入後にHUVECにおいて見られ(示さず)、これはNotch1デコイがリガンド誘導性Notch4活性化を阻害することができることを示す。

【0243】

腫瘍形成におけるNotchシグナリングのために最近示された多数の役割は、癌治療の潜在的な目標としてのこの経路の魅力を増加させるものである。Notch活性化はヒト癌における悪性変化において直接に機能している可能性もあるが(20、21)、それはまた脈管形成のために必要とされ得る(8と9)。興味深いことには、Notchリガンド誘導は成長因子シグナルによって調節される。例えば、Jagged1は、HGFによって腫瘍細胞において誘導され(10)、DII4はVEGFによってECにおいて誘導される(22)。ここで、我々は、FGF4がマウスMm5MT細胞のJagged1およびDII1発現を同様に刺激することができることを示す。Notch1デコイはインビオでMm5MT-FGF4腫瘍増殖および脈管形成を低減したが、腫瘍形成性に対してインピトロでは影響しなかった。従って、これらの結果は、腫瘍細胞ではなくMm5MT血管中のNotchレセプター活性化がこのシステムにおける新生物の増殖のために必要であることを示唆する。

【0244】

Mm5MTFGF4およびNGP異種移植片の両方はNotch1デコイ発現の後に腫瘍血管の著しい障害を示したが、これらのモデルにおいて観察された血管の表現型の違いは、Notch機能の腫瘍特異的なパターンが血管アッセンブリを微調節する可能性を示唆する。Mm5MT-FGF4腫瘍は急速に増殖し、補充されるVMCの比較的欠けた密集した不規則な内皮ネットワークを発達する。これらの未熟な血管床はDII4を発現し(データには示さず)、Notch1デコイ発現によって広範囲に除去され、腫瘍実質組織において小さなクラスタまたは単離された個々のECを分離する。血管ネットワークを形成するこの初期の障害と一致し、デコイ発現腫瘍の残りは壊死性でなく、コントロールよりも有意に小さい。対照的に、NGP腫瘍はVMCによる内皮の一様に近い被覆と共に、成熟した脈管叢を発生する。NGP血管はNotch1を発現し、DII4を相対的にほとんど表現しない(示さず)。NGP腫瘍におけるNotch1デコイ発現は血管連続性の損失と共に、腫瘍内の出血および壊死を引き起こし、ある程度の腫瘍増殖が生じた後で、灌流された血管が不安定になることを示唆する。

【0245】

纏めると、これらのデータは、Notchシグナリングが腫瘍脈管形成の多数の側面を制御するモデルについての支持を提供する。Notch活性化は血管新生のために広く必要とされる一方で、個々のNotchタンパク質は差次的に血管リモデリングを調節する可能性がある。我々の結果は、腫瘍血管におけるNotchリガンドレセプター相互作用の重要性を確認し、Notchレセプター機能を乱すことが、腫瘍脈管形成を崩壊する新しい有効な手段を提供するかもしれないことを示唆する。

【0246】

[第4のシリーズの実験のための参考文献]

1. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.*, 25: 581-611, 2004.
2. Jain, R., Duda, D., Clark, J., and Loeffler, J. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 Jan;3(1):24-40., 3: 24-40, 2006.
3. Kopan, R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.*, 115: 1095-1097, 2002.
4. Shawber, C. and Kitajewski, J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays.*, 26: 225-234, 2004.

10

20

30

40

50

5. Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Adams, N. C., Lin, H. C., Holash, J., Thurston, G., and Yancopoulos, G. D. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci* 101: 15949-15954, 2004.
6. Patel, N. S., Li, J.-L., Generali, D., Poulsom, R., Cranston, D. W., and Harris, A. L. Up-regulation of Delta-like 4 Ligand in Human Tumor Vasculature and the Role of Basal Expression in Endothelial Cell Function. *Cancer Res.*, 65: 8690-8697, 2005.
7. Patel, N. S., Dobbie, M. S., Rochester, M., Steers, G., Poulsom, R., Le Monnier, K., Cranston, D. W., Li, J.-L., and Harris, A. L. Up-Regulation of Endothelial Delta-like 4 Expression Correlates with Vessel Maturation in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*, 12: 4836-4844, 2006. 10
8. Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chantrey, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J. A., de Sauvage, F., Plowman, G., and Yan, M. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444: 1083-1087, 2006.
9. Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetze, S., Boland, P., Gale, N. W., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., and Thurston, G. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 444: 1032-1037, 2006. 20
10. Zeng, Q., Li, S., Chepeha, D. B., Giordano, T. J., Li, J., Zhang, H., Polverini, P. J., Nor, J., Kitajewski, J., and Wang, C.-Y. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell*, 8: 13-23, 2005.
11. Das, I., Craig, C., Funahashi, Y., Jung, K.-M., Kim, T.-W., Byers, R., Weng, A. P., Kutok, J. L., Aster, J. C., and Kitajewski, J. Notch Oncoproteins Depend on {gamma}-Secretase/Presenilin Activity for Processing and Function. *J Biol Chem.*, 279: 30771-30780, 2004. 30
12. Shawber, C. J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J. A. N. Notch Signaling in Primary Endothelial Cells. *Ann NY Acad Sci*, 995: 162-170, 2003.
13. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., and Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol.*, 71: 1842-1849, 1997.
14. Jaffe, E., Nachman, R., Becker, C., and Minick, C. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.*, 52: 2745-2756, 1973.
15. Vorontchikhina, M. A., Zimmermann, R. C., Shawber, C. J., Tang, H., and Kitajewski, J. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expression Patterns*, 5: 701-709, 2005. 40
16. Kim, E. S., Serur, A., Huang, J., Manley, C. A., McCrudden, K. W., Frischer, J. S., Soffer, S. Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Kandel, J. J., and Yamashiro, D. J. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11399-11404, 2002.
17. Montesano R and L., O. Phorbol esters induce angiogenesis in vitro from large-vessel endothelial cells. *J Cell Physiol.*, 130: 284-291., 1987.
18. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaije 50

r R, and VW., v. H. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol*, 132: 1177-1188, 1996.

19. Zimrin, A. B., Pepper, M. S., McMahon, G. A., Nguyen, F., Montesano, R., and Maciag, T. An Antisense Oligonucleotide to the Notch Ligand Jagged Enhances Fibroblast Growth Factor-induced angiogenesis in Vitro. *J Biol Chem*, 271: 32 499-32502, 1996.

20. Nickoloff, B., Osborne, B., and L., M. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*, 22: 6598-6608, 2003.

10

21. Radtke, F. and Raj, K. THE ROLE OF NOTCH IN TUMORIGENESIS: ONCOGENE OR TUMOUR SUPPRESSOR? *Nature Reviews Cancer*, 3: 756-767, 2003.

22. Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., and Herlyn, M. Regulation of Notch1 and DLL4 by Vascular Endothelial Growth Factor in Arterial Endothelial Cells: Implications for Modulating Arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 14-25, 2003.

【0247】

[第5のシリーズの実験]

卵巣癌における治療学的ターゲットとしてのNotch

上皮の卵巣癌は、米国の患者における婦人科医学的癌による死亡の主な原因である。初期段階でこの疾患を診断することができないこと、およびこの腫瘍に向けられた新しい治療法の不足に患者は苦しんでいる。血管内皮成長因子(VEGF)は悪性上皮卵巣癌細胞によって生産され、それは次に、腫瘍を育て、腫瘍脈管形成を促進する[1]。最近の臨床試験は、幾つかのケースにおいて治療学的な処置のためのVEGFターゲティングが結果を改善することを示している[2]。従って、抗脈管形成の治療法が、卵巣癌を治療するためのアプローチとして確認されているが、これらの利益を確立するためのはより多くの研究が必要である。我々は、Notchシグナリング経路が生理学および病理学の両方における脈管形成における新しい脈管形成の経路であることを確認した[3, 4]。Notchは、細胞運命決定、細胞生存および増殖を促進する細胞表面レセプタ(図1-Notch1)である。我々の研究室は、Notchデコイ(図1に図式化する)と呼ばれるNotch阻害剤を開発し、それは、リガンド依存性Notchシグナリングを阻害することができ(データには示さず)、Fcタグに対して融合したNotch1細胞外ドメインを含む融合タンパク質である(N1ECDFc)。我々は、Notchデコイがウイルムス腫瘍マウスモデルにおいてVEGFに誘導された脈管形成および腫瘍脈管形成を阻害できることを示している(データには示さず)。我々はヒト卵巣癌細胞SKOV3を生成したが、これはNotchデコイ、SKOV3-N1ECDFcを過剰発現する。我々は、マウスに異種移植された場合、SKOV3細胞のNotchデコイの発現が腫瘍の増殖を有意に阻害することを明らかにした(図36)。従って、Notchデコイは卵巣癌増殖を阻害する。我々は、この阻害が腫瘍脈管形成をターゲットとしていると仮定した。更に、我々はヒト卵巣癌サンプルを調査し、幾つかのNotchリガンドおよびNotchレセプターが卵巣癌に関連した腫瘍血管において高度に発現されることを明らかにし、それにより、1つはヒト卵巣腫瘍血管においてNotchをターゲットにできること、その結果、それらの増殖が阻害できるという仮説を立証する。

20

【0248】

この研究は、Notchシグナリングが卵巣癌中の腫瘍脈管形成を促進するという仮説を検討する。さらに、我々は「Notchデコイ」を利用するNotchの阻害が腫瘍増殖を阻害するだろうと仮定している。我々は、Notchデコイ作用が、腫瘍血管または腫瘍細胞の増殖、またはその両方に対するものであるかどうかを判断する。全面的な目的はNotchデコイを確立し、卵巣癌の治療のための治療薬としてNotchデコイを確立することである。

30

【0249】

特異的な目的:

特異的な目標1:

40

50

Notchデコイ発現がSKOV3またはOVCAR3の細胞の腫瘍異種移植片増殖を阻害するかどうか判断して、Notchデコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうかを明白にすること。

【0250】

特異的な目標2:

効能/安定性の増加したバージョンを作るためにNotchデコイ設計を修正すること。

【0251】

特異的な目標3:

マウスにおける卵巣癌腫瘍異種移植片を阻害するために、更に標準的な化学療法剤と組み合わせにおいて精製されたNotchデコイを使用すること。

10

【0252】

研究戦略:

特異的な目標1:

NotchデコイがSKOV3またはOVCAR3の細胞の腫瘍異種移植片増殖を阻害するかどうか判断して、Notchデコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうか明白にすること。

【0253】

我々は、予備的な結果は、Notch1デコイを発現してプログラムされたSKOV3腫瘍細胞が卵巣癌異種移植片(図36)の増殖を阻害することを示す。この発見は別の卵巣癌細胞株OVCA R3においても再現されるだろう。Notchデコイは、腫瘍細胞、腫瘍血管または両方の増殖を阻害し得る。Notchデコイが腫瘍細胞をターゲットしているか否かを決定するために、我々はNotchデコイを発現する卵巣癌株が柔軟な寒天アッセイにおいてより不十分な増殖であるかどうか測定する。デコイが腫瘍脈管形成をターゲットとしているかどうか判断するために、我々は、そのような阻害の証拠となる異種移植された腫瘍の評価を行う。コントロール異種移植片の腫瘍脈管形成の手段は、微細血管密度評価、腫瘍内皮細胞の増殖のインデックスおよびレクチン灌流による腫瘍血管イメージングを含む。Notchデコイを発現する異種移植片について腫瘍脈管形成の阻害の測定は、アポトーシス性内皮細胞の評価、腫瘍微小血管系の減少および腹水蓄積の蓄積を含む。

20

【0254】

特異的な目標2:

効能/安定性の増加したバージョンを作るためにNotchデコイ設計を修正すること

30

現在のNotchデコイは、Notch阻害剤としての効果はあるが、それが比較的大きなタンパク質であるので、容易に適用可能な精製はされていない。我々は、細胞外ドメインのより小さな部分を含むNotch1デコイの変異体を開発することを目的とする。これらの変異体は細胞培養に基づいたアッセイにおいてNotchシグナリングの阻害剤としてスクリーニングされる。阻害性の変異体は次についてスクリーニングされる:産生される細胞からの分泌効率、分泌後の安定性、それらの溶解性、およびFcアフィニティータグによる精製の容易さ。精製された変異体は、潜在的な毒性について評価するためにマウスに注射される。

【0255】

特異的な目標3:

マウスにおける卵巣癌腫瘍異種移植片を阻害するために、更に標準的な化学療法剤と組み合わせにおいて精製されたNotchデコイを使用すること

40

特異的な目標2から精製されたデコイは、卵巣癌異種移植片(SKOV3/OVCAR3)に対する効能を評価するために単一の薬剤として、または化学療法と組み合わせて使用される。単一の薬剤として精製されたNotchデコイを使用して、我々は、特異的な目標1の実験内に見られた腫瘍異種移植片増殖への阻害を再現し、阻害のために最適な濃度を決定することを目的とした。この目的を達成するために、我々は、マウスにおけるSKOV3/OVCAR3異種移植片増殖を阻害するために必要とされる治療上の最適な服用量、服薬スケジュールおよび期間を決定する。次に、我々はパクリタキソールと組み合わせてNotchデコイを使用する。異種移植片増殖を阻害する際の効能を決定するために、Notchデコイの最適な服用量を、パクリタキソールと共に、またはパクリタキソールなしで使用する。

50

【0256】

インパクト：

この研究は直接的な卵巣癌の治療を進歩させることを目指す。臨床研究は、VEGF阻害剤により卵巣癌を成功裏に治療することを最近確立した。化学療法による治療を補足するために開発されている新しい治療薬はほとんどない。この成功にもかかわらず、VEGFを腫瘍成長を阻害するためのターゲットとすることは、単に腫瘍増殖をある程度に抑制するだけかもしれない。それはまた、VEGF阻害に耐性のある新しい腫瘍血管増殖を導くかもしれない。我々は、卵巣癌における代替的な脈管形成の経路、Notchシグナル経路をターゲットとすることを目的とする。この研究は、新しい治療の実体であるNotchデコイの開発により治療を前進させるであろう。我々の予備的研究は、Notchデコイがマウスモデルにおいて卵巣癌成長を阻害することができると既に立証している。従って、治療の実体としてのNotchデコイの開発のインパクトは高度に重要であり得る。

10

【0257】

革新：

Notchデコイの我々の最近の開発は、卵巣癌を治療するために新しい以前に試験されていないパラダイムを示す。他の公表された研究は、卵巣癌の治療にまだこの経路を密接に結び付けてはいない。しかし、我々の予備証拠はこれを調査の重要な分野として定義付ける。卵巣癌の治療のための新しい治療のアプローチとしてのVEGF阻害の最近の成功にもかかわらず、我々は、Notchなどの他の脈管形成の経路を阻害することによりこのアプローチが補われる必要があると考える。

20

【0258】

[第5のシリーズの実験のための参考文献]

1. Abu-Jawdeh, G.M., et al., Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest*, 1996. 74(6): p. 1105-15.
2. Monk, B.J., et al., Activity of bevacizumab (rhuMAB VEGF) in advanced refractory epithelial ovarian cancer.. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(3): p. 902-5.
3. Shawber, C., J.J. Kandel, and J. Kitajewski, Notch: cell fate determination from vascular development to human vasculopathy. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2004. 1(3): p. 351-8.
4. Zeng, Q., et al., Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell*, 2005. 8(1): p. 13-23.

30

【0259】

[第6のシリーズの実験]

Foxo/Notch経路は筋原性を制御する

分化および纖維タイプ特異化

Foxo転写調節因子は新陳代謝および細胞の分化を調節する。Foxo依存性の代謝経路および目標遺伝子と異なり、これらのタンパク質が分化を調節する機序は調査されていない。Notchシグナリングの活性化は、細胞の分化に機能獲得型のFoxoの影響を模倣する。モデル系として筋肉分化を使用して、我々は、Notch目標遺伝子の活性化に関連し、NotchエフェクターCslからのコリプレッサークリアランスの促進により、Foxoが物理的に機能的にNotchと相互に作用することを示す。構成的に活性型のFoxo1による筋芽細胞分化の阻害は、Notchシグナリングの阻害によって部分的に救済され、一方で、Foxo1機能欠損は、筋形成のNotch阻害を妨げ、MyoD発現を増加する。従って、骨格筋における条件的なFoxo1アブレーションは、ミオゲニン含有(緩慢単収縮)ファイバーを犠牲にして、MyoD含有(迅速単収縮)筋纖維および変更された纖維型分布を増加することに帰着する。前駆体細胞の維持および分化を調節するために、Notch/Foxo1の協調は、Notchによって環境上の合図にFoxo1による代謝性の合図を統合するのかもしれない。

40

【0260】

50

再生医療における主要な問題は、特定化する細胞の種類が未分化幹または前駆体細胞からどれくらい高度に発生するかを理解することである(1)。この問題に密接な関係し、微環境により生じる生化学的なシグナルがどうのようなものであるか、内分泌腺/栄養上の合図はどのように細胞の分化プロセスを活性化するために転写的調節されるのかが問題となる。フォックスヘッド(Fox)タンパク質の0サブファミリーは、細胞生存および代謝を促進するホルモン、栄養素およびストレス応答を調節する。Foxo転写を微調節する能力は、これらの細胞の機能をコントロールするのに不可欠であり、リン酸化およびアセチル化を含む転写後修飾に大部分は依存性である(2)。最終分化細胞のそれらの役割に加えて、Foxoタンパク質も、筋芽細胞(3)、前脂肪細胞(4)および内皮細胞分化(5)に関連する。更に、Foxo4はミオカルジン(Myocardin)との相互作用によって血管平滑筋細胞分化を調節する(6)。Foxo3ノックアウトマウスは未成熟卵巣不全を示し、これは卵胞成熟におけるこの遺伝子の役割と一致する(7)。Foxoタンパク質が細胞の分化をコントロールするメカニズムは不明瞭ままであり、また、最近の条件付きのアブレーション研究は、造血性系において3つのFoxoアイソフォーム中の著しい程度の機能的なオーバーラップと一致する(8、9)。

10

【 0 2 6 1 】

Notch経路は胚形成の間ににおいて、神経、血管、筋肉および内分泌腺の分化に重要な役割を果たしている(10)。リガンド誘導性の分裂において、Notchレセプターの細胞内ドメインが核に移動し、サプレッサーから転写性のアクチベーターにまでその転写特性を変更し、それがDNA結合蛋白質CsIと相互に作用する(11)。CsIターゲットはHairy and Enhancer of Split(Hes, Hey)遺伝子を含む。Hes1は腸内胚葉(gut endoderm、12)、前脂肪細胞(13)および神経性の分化(14)を調節する。活性型Notchシグナリング、またはNotch1レセプター機能の獲得は、MyoD転写を抑制することによりC2C12および10T/2の筋芽細胞の分化を阻害する(15-21)。

20

【 0 2 6 2 】

全ての細胞の分化コンテキストにおいて、Foxo1の機能獲得型(3-5)はNotch1活性化を表現模写すること(13、17、22、23)は注目すべきことである。さらにマウスにおいてもFoxo1アブレーション(24)はNotch1アブレーションを表現模写する(25)。興味をそそる類似性にも拘らず、FoxoおよびNotchシグナルは2つの表面上別個のメカニズムにより、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ経路(Foxo)、そしてその、Hes/Hey経路(Notch)を経る。この研究には、我々は、CsIからのコリプレッサークリアランスの促進により、Foxoが物理的に機能的にNotchと相互に作用することを示し、それにより、筋形成のプログラムをコントロールことを示す。筋原性の先駆体は中胚葉の幹細胞(26)から発生し、MRFファミリー(MyoD、Myogenin、MRF4およびMyf5)(27)の筋原性の転写調節因子の発現内でピークに達する多段階過程によって筋管に変わる。筋原性の転写調節因子はEタンパク質でヘテロ二量体化し、ミオサイトに特有のMEF2エンハンサー因子(28)を備えた綿密な調節に作用して、筋肉に特有の遺伝子の発現を促進する。

30

【 0 2 6 3 】

成人の筋肉はその筋繊維コンテンツ(29)によって主に定義される異種混合の組織である。異なるミオシン重鎖(MyHC)サブタイプは異なる筋繊維を特徴付ける。I型ファイバーは主として緩慢な単収縮でMyHCを発現し、II型ファイバーは迅速な単一収縮でMyHC(29)を発現する。繊維型特異的なプロセスは多数のステップでコントロールされる。最初に、筋原性の前駆細胞には異種である見え、鳥類の胎芽クロス移植実験からの証拠は、初期の先駆体が主として遅筋ファイバーおよび後の先駆体が速筋ファイバー(29)寄与することを示す。誕生後、繊維型特異性も細胞によって影響され、神経および内分泌腺/栄養上の合図(28)を含む自律の要因に支配される。Foxo共活性剤Pgc1^{-/-}は遅筋線維(30)の形成を促進する際に重大な役割を果たす。また、最近のデータはこのプロセス(31)にさらにFoxo deacetylase Sirt1を密接に結び付けた。マウスにおいて条件付きの突然変異生成を使用して、我々は、Foxo1不全の骨格筋(筋芽細胞系に得意な重要な機能と一致する)のMyoD含んでいる筋繊維の増加により、Foxo1のC2C12細胞のMyoD依存の筋形成を抑制することにおける役

40

50

割が反映されることを示す。

【0264】

結果

C2C12分化におけるFoxo1およびNotchシグナリングの相互作用

NotchとFoxoが筋肉発生をコントロールするために協同していることを理解するために、我々は細胞分化モデルを使用した。C2C12細胞は、成長因子撤回、Foxo1の核転置に関連したプロセスにおける筋原性の転換および筋管融合を生じる(3)。それにより、筋芽細胞融合の抑制によって反映されるよう(図37a-c)に、構成的に活性型のFoxo1突然変異体(Foxo1ADA)(4)をコード化するアデノウイルスの形質導入はC2C12分化を誘導するために血清撤回の影響を阻害した。反対に、siRNAによるFoxo1抑制はこれらのプロセスに影響しなかった(図37d)。同様に、構成的に活性型Notch(Notch1-IC)は筋芽細胞分化を阻害する際にFoxo1ADAを表現型模写した(図37e)。事実上、細胞はすべて、アデノウイルスで形質導入されるようになった(図44)。Foxo1 siRNAは、制御蛋白質または他のFoxoアイソフォーム(図46)に影響せずに、用量依存的な様式で内在性のFoxo1およびトランスフェクトされたFLAG-Foxo1(図45)の両方の発現を有効に抑えた。Foxo1-ADAもNotch1-ICもC2C12増殖(図47)に影響しなかった。

10

【0265】

我々は、内在性のNotchシグナリングの抑制によりFoxo1ADAの影響を阻害することができるかどうかを試験した。この目的のために、我々は、膜内外のアンカーおよび細胞内ドメインを欠失するトランケイティットなNotch1レセプターを使用した。それは、結合力のあるNotchリガンドによってデコイレセプターとして働く(32、33)(Y.F.およびJ.K.(出版されていない観察))。デコイは、成長因子撤回(図37f)に応じて分化を被るC2C12の能力ではなく筋芽細胞分化(図37g)の部分的に救済されたFoxo1ADA抑制に影響した。Notchシグナリングを阻害する代替プローブとして、プレセニリン阻害剤(PSI)化合物E(34)は、さらに筋芽細胞分化のFoxo1ADA抑制を救済した(図37h)。

20

【0266】

Notchシグナリングに対するFoxo1の影響を検討するために、我々はFoxo1 siRNAおよびNotch-ICを共同トランスフェクトした。Foxo1 siRNAは、Notch1-IC(図37i)によって筋芽細胞分化およびミオシン発現の抑制を救済した。一方、コントロールsiRNAは効果がなかった(データには示さず)。筋芽細胞文化に対するFoxo1 siRNAの非特異性の影響を除外するために、我々は耐siRNA性のFoxo1ADAを生成した(図48)。Foxo1 siRNAは、Foxo1ADAの影響を逆にしたが(図37j)、耐siRNA性のFoxo1ADAによって引き起こされたC2C12分化の抑制を救済しなかった(図37k)。我々は、Foxo1およびNotch1-ICがミオシンレベルを>80%減少させ、その一方でNotchデコイおよびFoxo1 siRNAが完全に分化された細胞の~70%にこれらを戻したことを示し、図38aにおいてこれらのデータの定量分析を示す。我々は、ミオシン陽性細胞の形態測定の分析を行なうことにより、同様のデータを得た(図38b)。これらのデータは、Foxo1が筋芽細胞分化に対するNotchの影響のために必要であることを示す。

30

【0267】

我々は、次にFoxo1がその転写の機能によって分化に影響するかどうかテストした。この目的のために、我々は、N208AおよびH212R(DBD-Foxo1ADA)の置換によって、ADA突然変異体のバックボーンにおいて不十分な突然変異体を結合するDNAを生成した(6、35)。我々は、Igfbp1プロモーター活性(標準的なFoxo1目標)の測定により、この突然変異体がDNAを結合することができないことを確認した。Foxo1-ADAはIgfbp1プロモーター活性を10倍増加した。しかし、DBD-Foxo1ADAはそのような増加はなかった(図38c、左パネル)。驚いたことに、この突然変異体は、分化を阻害することについて、DNA結合成分Foxo1ADAと同じくらい有効であった(図37l)。これらのデータは、配列特異的な様式でDNAに結合する能力と無関係に、Foxo1が分化をコントロールすることを示す。

40

【0268】

Foxo1はCsIに結合し、Hes1プロモーターに補充される

50

Notch1-ICはCsIに結合して共活性化し、Hesをプロモートし、Heyを発現する(11)。DBD-Foxo1ADA突然変異体を使用した結果に基づいて、我々は、NotchリガンドJagged1(符号「+」によって表示された)を発現するHEK293細胞とNotch1レセプターを発現するC2C12細胞の共存培養を使用して、Notch依存性様式でFoxo1がCsI、またはネガティブコントロール(符号「-」で示す)としてのLacZと相互に作用するかどうかを試験した。我々は、Foxo1とCsIが培養細胞において相互作用するという証拠のいくつかの系を提供する。我々は、内在性のCsI免疫沈殿において内在性のFoxo1を発見した。また、共免疫沈殿は、Notchシグナリングの活性化によって有意に増強された(図39a)。相互作用の特異性を確認するために、我々は、C2C12細胞のHAタグを付与したFoxo1およびFLAGタグを付したCsIを発現した。抗HA(Foxo1)抗血清での免疫沈殿により、我々は、免疫プロットにFLAG-CsIを発見した(図39b)。反対に、抗FLAG(CsI)抗血清での免疫沈殿により、我々は、免疫プロットにHA-Foxo1を発見した(図39c)。我々はCsI免疫沈殿の他のFoxoアイソフォームを発見しなかった(図42)ので、CsIによる共免疫沈殿への能力はFoxo1に特有であるように見える。トランケイテットなFoxo1突然変異体(256、アミノ酸1-256をコード化する)(36)は、CsIと相互に作用する能力を保持した。我々は、Myc-256免疫沈殿(図39d)にFLAG-CsIを、FLAG-CsI免疫沈殿(図39e)にHA-256を検出し、これによりCsIがFoxo1のN-ターミナルドメインと相互に作用することが示される。これが直接のタンパク質間の相互作用であるかどうかを判断し、相互作用ドメインをマッピングするために、我々は、バクテリア内で產生されたGST-Foxo1と、HEK293細胞において発現されたFLAG-CsIをアフィニティ精製し、プルダウンアッセイを行った。我々は、C-末端のFoxo1(aa.290-655)またはGST(図40a)を持たず、N-末端Foxo1(アミノ酸1-300)と完全長で結合しているCsIを検出した。次に我々は菌培養精製したGSTフラグ/CsIおよびGST-Foxo1を含む無細胞系を使用して、Foxo1と相互に作用するCsIDメインをマッピングしました。再度、我々は、CsI免疫沈殿中に、C-ターミナル(290-655)Foxo1を除く完全長(1-655)とN末端(1-300)を回収した。逆に、N-末端のFoxo1はN-末端CsI(図40b)と相互に作用する。我々は、CsIの中のFoxo1を結合するドメインをマッピングするためにCsI欠損変異株を使用した。これらの研究は、アミノ酸172-279(図40c)を含むドメインに対してFoxo1が結合することを示し、これはCsI NTDドメイン内に含まれる(37)(図40c、図形)。興味深いことには、このドメインはDNAおよびコレプレッサー結合のために必要であるが、Notch結合には寄与しない(38と39)。

【0269】

10

20

30

30

40

50

CsIはHes1プロモーター(40)の中の共通配列に結合し、それは、このようにFoxo/CsI相互作用の有用な読み出し分析を提供する。もし後者がC2C12分化を調節するために要求されるのであれば、3つの予測が得られる:(a) Foxo1は、Hes1プロモーターの中のCsIを測る染色質免疫沈殿分析(ChIP)で検出される。(b)相互作用は分化依存である。(c)Foxo1ADAによる分化の抑制はHes1プロモーターにおけるCsI成分への構成的な結合に付随する。図40dは、予測がすべて満たされたことを示す。最初に、我々は、C2C12細胞を分化する際にHes1のCsI結合部位を測るプライマーを使用してChIPsを行った。我々は、未分化細胞からの免疫沈殿の内在性のFoxo1、Notch1およびCsIを発見した(図40d Endogレーン(0日))。PCRで増幅された配列がフォックスヘッド結合部位を含んでいなかったので、我々はFoxo1がCsIによってこのDNA断片に結合するとの結論を下した。さらに、細胞が分化すると共に、Foxo1とNotch1の両方の結合は減少した(1日目および2日目)。我々は、構成的に核Foxo1ADAを備えた細胞を形質導入した再に分化は阻害された(図37c)。また、CsIおよびNotch1と同様に、突然変異体Foxo1はHes1プロモーターに持続して結合した。

【0270】

私たちは次にHes1発現を分析した。予測は、Hes1レベルがFoxo1とNotch1によってHes1プロモーターの占有と関連するということである。実際は、Foxo1と称されるHes1 mRNA発現とCsIに結合するNotch1は減少した。その一方でミオシンタンパク質レベルは増加した(図40d)。CsI転写でFoxo1の直接効果を除外するために、我々はCsIプロモーターとレポーター遺伝子分析を実行した。CsIプロモーターにおけるフォークヘッド結合部位に10反復が存在するにも拘らず、Foxo1はCsIレポーター遺伝子の発現を活性化しなかった(41)(デ

ータには示さず)。さらに、CsI発現はFoxo1ADAを発現するC2C12細胞において影響されなかつた(示されない)。これらのデータは、Foxo1がCsIとのタンパク質/タンパク質相互作用によってNotch依存性分化を調節することを示す。

【0271】

CsIによるHesおよびHey遺伝子のNotch誘導のためにFoxo1が必要である

我々は、Foxo1ADAがC2C12細胞の内在性のHes1、Hes5およびHey1の発現を促進する能力を検討した。Foxo1-ADAおよびNotch1-ICの両方は、3つの遺伝子の発現を増加させた。その一方でFoxo1 siRNAは、Notch1-ICによって誘導されたHes1、Hes5およびHey1発現を阻害した(図41a)。Foxo1 siRNAは成長因子欠乏細胞においてHes1、Hes5およびHey1発現に効果がなかつた(図41a)。

10

【0272】

我々は、プロトタイプのNotchターゲット遺伝子として、Hes1における実験に注目した。我々は、Hes1発現の測定と同様にHes1プロモーターとリポーター分析を使用して、Hes1転写を調節するFoxo1の能力を分析した。Foxo1-ADAおよびNotch1-ICは、1.8-および2.5-倍にHes1プロモーター活性をそれぞれ誘導した。Notch1-ICとFoxo1ADAの同時トランスフェクションは2.5倍の増加(図41b)を引き起こした。Foxo1 siRNAの同時トランスフェクションは用量依存的な様式でNotchに誘導されたHes1活性を抑制した。一方で、コントロールsiRNAは効果(図41b)がなかつた。CsI結合モチーフである4つのタンデム反復を含む合成のHes1リポーターについても同様の結果を得た(図50)。さらに、DBD-Foxo1ADAは、Hes1のFoxo1活性化のために直接のDNA結合が必要ではないことを確認し、Foxo1ADAよりさらに大きな程度までHes1レポーター遺伝子活性を誘導した(図38c、右パネル)。

20

【0273】

Notch1-ICがFoxo1 siRNAを発現する細胞においてHes1発現の誘導しないということは、CsI/Notch相互作用のためにFoxo1が必要であることを示唆する。したがって、我々は、共存培養システムにおけるHes1プロモーターへのFoxo1およびNotch1の結合を試験した。我々は、内在性のNotchシグナリングの活性化を誘導するためにNotchリガンドJagged1を発現するHEK293細胞とNotch1を発現するC2C12細胞を共同培養した。Jagged1を表現する細胞がある状態での共存培養は、ChIP分析においてHes1プロモーターに結合する内在性のFoxo1(図42a(レーン1-2))およびNotch1を増加した(図42a、b、レーン1-2)(42)。これらのデータは、CsIを備えたFoxo1共同免疫沈殿が共存培養で増加したという観察と一致する(図39a)。Hes1プロモーターに結合するFoxo1がCsI依存かどうかテストするために、我々はsiRNA(図51)でCsI発現を阻害した。CsI siRNAのトランスフェクションは、それらがCsI依存であることを示し、Hes1プロモーターに結合するFoxo1とNotch1の両方を阻害した(図42a(レーン3-4))。さらに、Foxo1-ADAは、CsI siRNAがある状態においてHes1発現を誘導しなかつた(図41a(レーン5))。ChIP実験の結果はHes1プロモーター分析によって確認された。Jagged1またはNotch1だけの発現はHes1活動に効果がなかつた。しかし、共同培養することにより、Hes1レポーター遺伝子活動の3.7倍の増加を産出した(図42c)。ChIP分析において、Foxo1 siRNAは、NotchのHes1プロモーターへの結合(図42b(レーン3-4))と、Hes1プロモーター活性の誘導を阻害した(図42c)。これらの結果は、Hes1プロモーターにNotch1を結合するために、Foxo1が必要であることを示唆し、それによってFoxo1発現の抑制がNotch1-ICを発現する筋芽細胞の分化を回復するメカニズムを提供する。Foxo1 siRNAが共存培養システムにおけるHes1のNotch誘導を阻害する能力は、Notch1-ICの分化実験において観察された効果がトランケイティッドな細胞内のNotch1突然変異体(15)によるNotchシグナリングの非生理学的活性化による可能性を排除する。

30

【0274】

Foxo1は、コリプレッサークリアランスとMam11のCsIへの結合する促進するHes1発現のFoxo1依存の活性化の分子のメカニズムを明確にするために、我々はHes1プロモーターでコリプレッサー/コアクチベーター交換を調査した。Notchの活性化はコリプレッサーNcorおよびSmrt(43)を取り除き、Hes1プロモーターへのコアクチベーターMam11(42)を補充した。Foxo1 siRNAはNotchに誘導されたコリプレッサー交換(図42d)を抑制した

40

50

。これらのデータは、Foxo1がCsI(図40c)の領域172-279に結び付けるという観察と一致する。それはNcor/Smrt結合部位(38と39)を含むことを示した。転写の複合体の観察された変化がHes1活動の変化に帰着することを示すために、我々は、筋形成に含まれるHes1標的遺伝子の発現を調査した。Hes1はMyf5(16、17)に影響せずに、bHLH転写調節因子MyoDを阻害することにより筋芽細胞分化を抑えた。発現分析は、Myf5が影響されなかった間、Notch1-ICまたはFoxo1-ADAがMyoDを抑えることを明らかにした。NotchデコイまたはFoxo1 siRNAは部分的にMyoD発現をリストアした(図42e)。

【0275】

Foxo1を欠損した骨格筋における変更された纖維型の組成物

細胞のデータに基づいて、インビオ、条件付きの遺伝子不活性化の使用して、我々は筋肉分化中のFoxo1機能を調査することを試みた。この実験の予測された結果は、Myf5含有筋芽細胞ではなくMyoD含有細胞の加速された分化である。ミオゲニンが緩徐纖維(44)の優勢な要因である一方で、MyoDは速いファイバーの優勢な筋原性の要因であり、MyoD発現中のFoxo/Notch抑制の除去は緩徐纖維を犠牲にして速いファイバーの増加した形成に潜在的に帰着する。マウスには3つのFoxoアイソフォームがある:Foxo1、3および4(8、9)。Foxo1が最も豊富な(図43a)ものである場合、後者はひらめ筋以外のほとんどの筋肉種類(45)において優勢である。偶然の一一致で、ひらめ筋も、生理学上遅筋線維の中で豊かになり、私たちが容易に私たちの仮説を分析することを可能にした。我々は、ミオゲニン-cre遺伝子組み換えを備えたflaxedされたFoxo1対立遺伝子には同型接合体のマウスとの交差により、骨格筋中のFoxo1発現を不活性化した。mRNA分析は、計画通りノックアウトを生じることを示した(データには示さず)。

10

20

30

40

50

【0276】

II型種類のファイバーが豊富な筋肉が影響されなかったのに対して(図43b)、組織学の分析はMyog-Foxo1マウスのひらめ筋のI型(遅延単一収縮)ファイバーの減縮を明らかにした。組織学の発見と一致して、I型の発現、ファイバーマーカーは減少した。その一方でI型ファイバーマーカーはMyog-Foxo1マウス(図43c)の中で増加した。その後、我々は筋原性の転写調節因子MyoD、Myf5およびミオゲニンの発現を分析した。MyoDは、速いファイバーの優勢な要因および緩徐纖維(44)の中のミオゲニンである。組織病理学と一致して、Myf5発現が不变だったのに対して(図43c)、我々はミオゲニンにMyoD発現および~80%減少の2倍の増加が見られた。さらに、I型ファイバーを調節する発現、Foxo1コアクチベータ-Pgc1^{-/-}は不变であり、これは減少したFoxo1依存のPgc1^{-/-}転写(図43c)(46)によってMyog-Foxo1マウスの表現型を説明することができないことを示す。観察された纖維状スイッチの機能的な相関として、トレッドミルにおけるランニング性能を検討した。実際は、I型(耐久性)ファイバーの減縮から予言されるように、Myog-Foxo1マウスは低減されたランニング性能を表示した(図43d)。

【0277】

最後に、適応性があるか、細胞非自律の要因に対立するものとして、これらの変更が纖維状特異性の発展的な変更を反映したかどうか判断するために、我々はE9.5によりFoxo1(24)およびNotch1ノックアウト(25)胎芽の中のMyoD発現を測定した。Foxo1-/-胎芽、MyoDレベルは 3.1 ± 1.1 倍、Notch1-/-胎芽 7.3 ± 2.9 倍、コントロール(P、両方の突然変異体対野生体、n=4中の<0.05)と比較して増加した。インビオで観察されたMyoD発現の増加はFoxo1の間の物理的、機能的な相互作用と一致して、またNotchは、筋芽細胞分化において重要なシグナリングネクサスである。したがって、我々は、Myog-Foxo1マウスにおける纖維タイプのスイッチが胚発生の間のMyoDを含んでいる筋芽細胞の加速された分化の結果であることを提唱する。

【0278】

議論

この研究は、FoxoとNotchの経路が筋肉分化の調節に協力するという生化学、細胞、遺伝証拠を提供する。データは、CsI NTD領域(図42f)へ直接の結合によってHes1プロモーターでコリプレッサー交換を促進するためのFoxo1作用の新しい方法を明らかにする。我々は

、このドメインへ結合するFoxo1がNotch/CsI複合体を安定させてコリプレッサークリアランスおよびMaml1リクルーターを促進することを提案し、これは構造の研究(37)からのNTDの提案された役割と一致する。発見はさらにメカニズムを提供し、どれによって、2つの主な生化学プロセス、ホスホイノシトール-3-キナーゼ/Akt経路およびNotch/Hes経路、細胞の分化を生体内でコントロールする相乗効果の様式に注目する。Foxo1のための提案された役割は、その転写の機能に依存せず、CsIで直接の相互作用を含んでいる。我々は研究はNotch1シグナリングの原型のエフェクターとしてHes-1に注目するが、我々はデータはHes-1がNotch/Foxo相互作用のただ1つの媒介物であることを示すと介されるべきではない。例えば、我々は、Foxoが多数の細胞コンテキストにつけたNotchとの相互に作用することを示唆し、前脂肪細胞、PC-12およびHUVECの分化中の同様のFoxo/Notch停止を観察した(示されないデータ)。

10

【0279】

我々は、前駆細胞の維持および分化を調節するために、Foxo1によってNotchによって同化作用の合図にNotch/Foxo協力が環境上の合図を統合することを提案する。この2層をなしたメカニズムは、Foxo1が活性なときに、発展的な合図(Notch)に応じて分化を回避する様々な組織中の、つまり成長因子の欠如中で傾倒した前駆細胞を可能にする。その後、これらの細胞は、成人の組織中の休止状態を続ける。ここでそれらは、Foxo1抑制に結びつくNotchリガンドおよびホルモン/栄養上の合図のコンビネーションに応じて定期に分化することが可能になる。この解釈は、Foxo1欠損の筋肉において観察された纖維タイプスイッチ、筋原性のプログラムの誘導者に対立するものとして、筋原性の血統内の運命決定物としてFoxo1の位置を決めるように見える観察と一致する。他のFoxoとNotchのアイソフォームも相互作用するかどうか、それらがどのようにこのプロセスに寄与するかは今のところ不明である。

20

【0280】

Foxo1が遺伝子発現の共同調整装置であるという実証は、この転写調節因子の変化し続ける機能の潜在的な説明を提供する。私たちの研究から出現する興味ある質問は、1つの機能から別の機能までのスイッチがどのように達成されるか、また、成長因子、ホルモンおよび栄養素に応じたFoxo1の複雑な翻訳後修飾が、どのようにこのプロセスに影響を与えるかである。発見はFoxo1シグナリングを含んでいる疾病プロセスの病態生理学にとって広い意味合いを持つ。我々の観察の潜在的な含意は、過度のFoxo関数(48)によって特徴づけられた代謝異常の治療としてNotchシグナリング(47)を阻害する薬剤の使用を調査する能力である。

30

【0281】

材料と方法

動物産生および分析

ミオゲニン-cre(49)およびFoxo1fl/flマウスは記述される(9)。野生型、ヌルおよびFoxo1fl/fl対立遺伝子が、5'-GCT TAG AGC AGA GAT GTT CTC ACA TT-3'，5'-CCA GAG TCT TG TAT CAG GCA AAT AA-3' and 5'-CAA GTC CAT TAA TTC AGC ACA TTG A-3'のプライマーを用いたPCRで検知された。トレッドミルパフォーマンステストに先立って、マウス(Columbus Instruments)を2日間訓練した。そのテストは、消耗まで10minの間隔で1m/minの増加を後に続けて、第1 30minの15m/minで行なった。骨格筋サンプルは、オクタ・マトリックス中で急速に凍結した。また、7つのμm連続切片が得られた。筋纖維は、メタクロマジーのATPアーゼ(50)を使用し、反骨格の遅いミオシン(シグマ)で免疫染色して分類した。胚の研究については、我々は、E9.5でヘテロ接合のFoxo1(24)またはNotch1(25)マウスおよび回復された胎芽の時間が計られた交配をセットアップした。mRNAは全体の胎芽から分離した。また、下記に述べられるように、リアルタイムRT-PCRを行った。

40

【0282】

ウイルスの発現研究

記述される(3と4)ように、C2C12細胞を分化した。Foxo1-ADA、Notch1-IC、Jagged1、アデノウイルスのCsIおよびNotchデコイ、および哺乳類の発現ベクターは記述されている(3

50

6、51)。我々は、pQCXIHベクトルを使用するFoxo1ADAおよびNotch1-ICを発現するレトロウイルスを生成した。Notchデコイ(pAdllox Notch1ECD-Fc)を生成するために、Notch1(bp 241-4229、GenBank accession# X57405)の細胞外ドメインはヒトIgG Fcタグを備えた構造において融合され、pAdlloxへクローニングした。レトロウイルスの上清をpVSV-Gベクトルで一時的に共同トランスフェクトされた細胞から生産され、GP2-293細胞(BDバイオサイエンス)へpQCXIHベクトルを指定した。DNAの結合する不十分なFoxo1を生成するために、私たちは、QuikChange突然変異生成キット(Stratagene)を使用して、N208とH212をアラニンとアルギニンにそれぞれ置換した。その後、変異体をFoxo1ADA突然変異体のバックボーンにおいてクローニングを作成した。

【0283】

10

ルシフェラーゼ分析および共存培養アッセイ

我々は、HEK293をHes1ルシフェラーゼ(転写スタート部位からの-194~160)(Hes1/pGL2基礎)、合成のHes1-ルシフェラーゼ(4x CsI結合部位、4 x CsI/pGL2基礎)、またはCsIルシフェラーゼ(-1536~22および基礎的なCsI/pGL2)レポーター遺伝子をpCMV5、pCMV5-Foxo1-ADA、pQNC-Notch1-IC、pHyTc NotchデコイまたはFoxo1 siRNAと共にトランスフェクトした。私たちはプラスミドpRSV-β-ガラクトシダーゼをトランスフェクション効率のコントロールとして用いた(51)。共存培養分析について、我々は、トランスフェクションによってC2C12細胞においてNotch1を発現し、HEK293細胞においてJagged1またはLacZを発現した。その後、我々はHEK293細胞を回収し、C2C12細胞にそれらに播した。1時間のインキュベーション後、我々は共同培養細胞を実験に使用した。

20

【0284】

ウェスタンプロットと免疫沈殿

我々は、抗ミオシン(MF-20)、抗HA(12CA5、Boehringer Mannheim)、抗FLAG(M2、シグマ)、抗Foxo1(H128およびN20、Santa-Cruz)、抗Notch1(C-20、Santa-Cruz)、抗CsI(Chemicon and Santa-Cruz)、抗NcoR(Santa-Cruz)、抗SMRT(サンタクルーズ)または抗MAML1(Chemicon)抗体を使用して、標準技術によってこれらの分析を行った。Foxo/CsI共同免疫沈殿については、我々は精製した核フラクションを使用した(52)。SDS-PAGEにおいてCsIがIgG重鎖に接近して移動するため、私たちはプロテインAビーズに対する架橋抗体に対してジメチルピリミデート(dimethylpyrimidilate、DMP from Pierce))を使用し、溶出されたタンパク質複合体のIgG汚染を回避した(52)。

30

【0285】

染色質免疫沈殿アッセイ

私たちは、以前に記述されるようなC2C12細胞のChIP分析とFryerによって記述される(42)のような共同培養細胞におけるChIP分析を行なった(4)。Hes1プロモーターのCsI結合部位を増幅するために使用されたプライマー・ペアは次の通りである：

5'-GCAAAGCCCCAGAGGAAAGAGTTAG-3' および 5'-AGGAGAGAGGTAGACAGGGGATTG-3'。

【0286】

40

siRNAトランスフェクションおよびsiRNA耐性Foxo1

Foxo1に特有のsiRNAシーケンスは5'-ACGGAGGATTGAACCAGTATA-3'である。CsIの特異的なsiRNAシーケンスは5'-TAGGGAAGCTATGCGAAATTA-3'である。

【0287】

siRNAはフィボデクタミン-プラス試薬(Invitrogen)を使用してトランスフェクトした。我々は、シーケンス5'-ACGGCGGTCTGAACCAGTATA-3'に3つの残留物(強調)をトランスフェクトすることにより、siRNA耐性のFoxo1を生成した。リアルタイムRT-PCR研究のために使用されたプライマーは要求に応じて入手可能である。

【0288】

組換え型タンパク質と相互作用アッセイ

私たちはpGEX6P-1へのクローニングによりアミノ酸1-527、1-279、1-172および279-527断片を含むGST-FLAG-CsIを生成した。GST-Foxo1構成物は記述された通りである(53)。細菌培養およびIPTG誘導に従って、私たちはGST融合タンパク質を精製し、それらを共にイ

50

ンキュベートした。その後、我々は抗FLAG抗体での免疫沈殿によりGST-FLAG/CsIを単離し、免疫の小球を広範囲に洗浄し、抗Foxo1抗血清で免疫プロットを行った。

【0289】

[第6のシリーズの実験のための参考文献]

1. Singec, I., Jandial, R., Crain, A., Nikkhah, G., and Snyder, E.Y. 2007. The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med* 58:313-328.
2. Accili, D., and Arden, K.C. 2004. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *Cell* 117:421-426.
3. Hribal, M.L., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J.R., and Accili, D. 2003. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 162:535-541.
4. Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., Arden, K.C., and Accili, D. 2003. The forkhead transcription factor foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4:119-129.
5. Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K.I., Hofmann, W.K., Heeschen, C., Achter, A., Kollipara, R., Depinho, R.A., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2005. Involvement of Foxo transcription factors in 脈管形性 and postnatal neo血管新生. *J Clin Invest* 115:2382-2392.
6. Liu, Z.P., Wang, Z., Yanagisawa, H., and Olson, E.N. 2005. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* 9:261-270.
7. Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., and DePinho, R.A. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301:215-218.
8. Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. 2007. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128:325-339.
9. Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., et al. 2007. FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* 128:309-323.
10. Shawber, C.J., and Kitajewski, J. 2004. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays* 26:225-234.
11. Lai, E.C. 2002. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep* 3:840-845.
12. Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24:36-44.
13. Ross, D.A., Rao, P.K., and Kadesch, T. 2004. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol* 24:3505-3513.
14. Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18:2196-2207.
15. Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J.J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D., and Weinmaster, G. 1996. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122:3765-3773.
16. Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila

10

20

30

40

50

hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6:2620-2634.

17. Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. 1999. Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 274:7238-7244.

18. Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K.M., and Weinmaster, G. 1999. Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* 126:1689-1702.

19. Wilson-Rawls, J., Molkentin, J.D., Black, B.L., and Olson, E.N. 1999. Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol Cell Biol* 19:2853-2862.

20. Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. 2001. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* 128:107-116.

21. Conboy, I.M., and Rando, T.A. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3:397-409.

22. Shawber, C.J., Das, I., Francisco, E., and Kitajewski, J. 2003. Notch signaling in primary endothelial cells. *Ann NY Acad Sci* 995:162-170.

23. Limbourg, F.P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R.T., Chin, M.T., and Liao, J.K. 2005. Essential role of endothelial Notch1 in 脈管形性. *Circulation* 111:1826-1832.

24. Hosaka, T., Biggs, W.H., 3rd, Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N.M., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. 2004. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2975-2980.

25. Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., et al. 2000. Notch signaling is essential for vascular 形態形成 in mice. *Genes Dev* 14:1343-1352.

26. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11:497-504.

27. Rudnicki, M.A., and Jaenisch, R. 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* 17:203-209.

28. Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. 2006. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19-37.

29. Schiaffino, S., and Reggiani, C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76:371-423.

30. Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418:797-801.

31. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122.

32. Nickoloff, B.J., Osborne, B.A., and Miele, L. 2003. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22:6598-6608.

10

20

30

40

50

33. Nickoloff, B.J., Qin, J.Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bonish, B., and Miele, L. 2002. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ* 9:842-855.
34. Pan, Y., Lin, M.H., Tian, X., Cheng, H.T., Gridley, T., Shen, J., and Kopan, R. 2004. gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial 形態形成. *Dev Cell* 7:731-743.
35. Dowell, P., Otto, T.C., Adi, S., and Lane, M.D. 2003. Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways. *J Biol Chem* 278:45485-45491. 10
36. Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., and Accili, D. 2001. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108:1359-1367.
37. Kovall, R.A., and Hendrickson, W.A. 2004. Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *Embo J* 23:3441-3451.
38. Hsieh, J.J., and Hayward, S.D. 1995. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268:560-563.
39. Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12:2269-2277. 20
40. Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22:965-971.
41. Kawaichi, M., Oka, C., Shibayama, S., Koromilas, A.E., Matsunami, N., Hamaguchi, Y., and Honjo, T. 1992. Genomic organization of mouse J kappa recombination signal binding protein (RBP-J kappa) gene. *J Biol Chem* 267:4016-4022.
42. Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. 2004. Mastermind recruits C ycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16:509-520. 30
43. Liang, Y., Chang, J., Lynch, S.J., Lukac, D.M., and Ganem, D. 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16:1977-1989.
44. Hughes, S.M., Taylor, J.M., Tapscott, S.J., Gurley, C.M., Carter, W.J., and Peterson, C.A. 1993. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118:1137-1147.
45. Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H., 3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., and Accili, D. 2002. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110:1839-1847. 40
46. Daitoku, H., Yamagata, K., Matsuzaki, H., Hatta, M., and Fukamizu, A. 2003. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. 糖尿病 52:642-649.
47. Miele, L., Miao, H., and Nickoloff, B.J. 2006. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 6:313-323.
48. Accili, D. 2004. Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insu 50

lin action: from triumvirate to republic. 糖尿病 53:1633-1642.

49. Knapp, J.R., Davie, J.K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E.N., and Klein, W.H. 2006. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. Development 133:601-610.

50. Ogilvie, R.W., and Feeback, D.L. 1990. A metachromatic dye-ATPase method for the simultaneous identification of skeletal muscle fiber types I, IIA, IIB and IIC. Stain Technol 65:231-241.

51. Das, I., Craig, C., Funahashi, Y., Jung, K.M., Kim, T.W., Byers, R., Weng, A.P., Kutok, J.L., Aster, J.C., and Kitajewski, J. 2004. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. J Biol Chem 279:30771-30780. 10

52. Chi, T., Yan, Z., Xue, Y., and Wang, W. 2004. Purification and functional analysis of the mammalian SWI/SNF-family of chromatin-remodeling complexes. Methods Enzymol 377:299-316.

53. Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. Nature 423:550-555.

第7のシリーズの実験

糖尿病患者はしばしば肥満および血管の病理を開発する。糖尿病の合併症に寄与する分子のメカニズムはこれから解明する。過去2年内に、私は出生後の欠陥に対するNotch4ノックアウトマウスを評価した。これらの分析は、Notch4突然変異体マウスが糖尿病の特徴を開発することを明らかにした:1)皮下脂肪の劇的な増加に見られるような初期の開始肥満および2)糖尿病性網膜症の網膜脈間構造暗示における減少周細胞含有量。我々は、NotchおよびFoxo1(インシュリンシグナリングの転写調整、が脂肪生成と脈管形成を調節するように協力することを見出した。Notch1、Notch1/Notch4またはFoxo1に対するマウス欠乏は、脈管原性の欠陥にて子宮内で死亡する。これらのデータは、調節異常のNotchシグナルが糖尿病の肥満および血管病理学に寄与すると我々に仮定させる。提案目的は、この仮説について考察し、かつ脂肪生成と脈管形成におけるNotchとインシュリンシグナル相互作用の役割を定義する。マウスモデルは遺伝子操作を経由してNotch、Foxo1およびインシュリン受容体活性を変更するために使用されるであろう。脂肪生成および代謝性機能障害は、これらのマウスに由来したNotch4とインシュリン受容体ノックアウトマウスおよび胚の纖維芽細胞において評価されるであろう。胚・網膜の脈管形成は、Notch1、Notch4および/またはFoxo1のためのマウスハプロ不全において評価されるであろう。最後に、増殖性網膜症におけるNotchおよびFoxo1シグナルの機能は低酸素症誘導網膜脈管形成マウスモデル中で評価されるであろう。私の経験ゴールは、糖尿病研究の分野で独立した科学研究者になることである。

【0290】

新陳代謝におけるNotch機能の評価

我々は、細胞運命決定を調節するためにNotchおよびFoxo1、インシュリンシグナル転写調整、がCSLを備えた転写の複合体を形成することを見出した。Foxo1の1つの対立遺伝子の損失は、インシュリン受容体ハプロ不全マウスにおける高血糖および高インスリン血症を救う。同様に、野生型同腹仔と比較して、マウスのNotch4の損害はより低い血糖レベルと関連した。Foxo1とNotch4は、成人ネズミ臍臓の -細胞におけるオーバーラップ発現パターンを共有し、Notch1が両方の -または -細胞で発現される。この目標において、我々がさらにNotch突然変異体マウスの新陳代謝を特徴づけるであろう。さらに、我々は欠陥がNotchおよびNotch/Foxo1の突然変異体マウスの臍臓の中にあるかどうか判断するであろう。

【0291】

脂肪生成におけるNotch4機能の評価

10

20

30

40

50

我々は、Notch4ノックアウトマウスがより大きな脂肪組織貯蔵物を持っていることを見出した。皮膚において、Notch4が脂肪細胞と血管の両方で発現される。Notch4は細胞自律神経または細胞非自律神経機構のいずれかによって脂肪生成を調節するかもしれない。細胞自律神経モデルにおいて、脂肪細胞中のNotch機能は基質無血管画分における関連付ける前脂肪細胞からの分化を調節する。択一的に、Notch、脂肪組織内の脈管形成を調節することができる。その後、それは脂肪生成に影響する。我々はそのNotchとFoxo1が培養された纖維芽細胞のホルモン誘導脂肪生成を阻害するように協力することを確立した。インシュリン受容体突然変異体マウスにおいて、脂肪生成が乱され、かつ分化はFoxo1を阻害することにより部分的に救在された。しかしながら、Notch機能の異常がインシュリン依存の脂肪細胞分化および機能に生体内で影響する場合があるかどうかは未知である。この質問に取り組み始めるために、我々はさらに皮下・内臓の脂肪の部への焦点を備えたNotch突然変異体マウス中の脂肪の表現型を特徴づけるであろう。我々はそれから、もしNotch4不足がInsr突然変異体マウス中の皮下の脂肪の表現型を救うならば決定する。最後に、我々はNotch4とInsrの欠陥のあるマウスに由来した胚の纖維芽細胞の脂肪細胞分化におけるNotch機能を評価するであろう。我々のゴールは、脂肪細胞分化におけるNotchとインシュリン相互作用の役割を決定することである。

10

【0292】

糖尿病と肥満

肥満は、インスリン抵抗性、高血糖および種類2糖尿病{Eckel、2005年の#769}の発生のための主要な危険因子である。それは心血管の機能障害にもまた関係する。脂肪組織は、エネルギー超過のうちにトリアシルグリセロールを蓄えて、エネルギー剥奪のうちに遊離脂肪酸およびグリセリンを放出する際に重要な代謝機能を有する。さらに、脂肪細胞は脂肪動態と名付けられて、多くの生物活性の物質を生むことにより同化作用のホメオスタシスを調節する。脂肪動態はホルモン細胞分裂、増殖因子および他の生物活性の合成物からなる。命題はレプチン、腫瘍壞死因子アルファ、アンギオテンシンII、インターロイキン6、インターロイキン1、adiponectin、resistinおよびプロスタグランジンを含む。分泌された要因は、同化作用管の生物学を調節する際に主な役割を果たし、インスリン抵抗性と心疾患の間の接続であるためにそういうものとして提案された。肥満の発生は、インシュリンシグナルによって調節され、かつ脈管形成に依存性のように見える。脂肪細胞において、インシュリンシグナルが血管内皮増殖因子(VEGF){ミック(2002年の#767)}を誘導する。VEGFは、血管壁漏れやすさ{Yancopoulos(2000年の#65)}と同様に内皮細胞増殖、移植および分化も促進することができる脈管形成の有力な誘導物質である。肥満のマウスモデルにおいて、VEGFのアンタゴニストが脈管形性だけでなく脂肪生成{Rupnick、2002年#766を防ぐ; Fukumura(2003年の#768)}も崩壊する。したがって、脂肪組織において脂肪細胞分化および脈管形成の相互のパラクリン調節がある。

20

30

【0293】

脂肪生成の中のNotch機能

脂肪細胞分化につけたNotchの役割はちょうど解明され始める。インビトロの分析を使用して、Notchシグナルは纖維芽細胞のホルモンに誘導された脂肪生成を促進し阻害することに示した。ストロマの細胞株には、Notchがその後、脂肪細胞分化{Sciaudone、2003年の#772}の増加に結びついた骨芽細胞分化を乱した。これに対し、両方のリガンド媒介Notchシグナル、または本質的に活発なNotch1の異所的発現は、3T3-L1纖維芽細胞{ガルセス(1997年#177)の脂肪生成を阻害した; ロス(2004年の#773)}。同様に、Notch目標遺伝子の過剰発現、HES1は、纖維芽細胞{ロス(2004年の#773)}の脂肪細胞分化を阻害した。siRNAを備えたHES1発現を崩壊することはさらに纖維芽細胞脂肪細胞分化を阻害した。したがって、Notchの抑制および活性化の両方は、脂肪生成がNotchシグナルに敏感な投薬であることを示唆する脂肪生成を乱す。

40

【0294】

脂肪細胞に特有の遺伝子C/EBP およびPPAR の損失で関連纖維芽細胞脂肪生成のNotchを媒介とした抑制した。Notchシグナルが活性化された纖維芽細胞の脂肪細胞分化も発現

50

によって救在した。C/EBP またはPPAR 、そのNotchの示唆は、これらの2つの遺伝子の発現を抑えることにより脂肪生成を阻害する。纖維芽細胞データと一致しているので、レチノイン酸に誘導された脂肪生成は、Notch1ノックアウト胎様体身体{ニコルズ(2004年の#770)}の中でわずかに増強された。最後に、Notch1発現は、糖尿病につけたNotchの役割が脂肪細胞分化{ヤン(2003年の#777)}を関連づけたことを示唆するインシュリン微妙な対象に関する耐インシュリン性の患者から分離された脂肪組織中で低減されると分かった。

【0295】

糖尿病における管の合併症

糖尿病患者は、主要な高血圧症、卒中、乏血、網膜症、アテローム性動脈硬化症および心臓発作を含む多数の管の合併症を表示する。しかしながら、糖尿病の管の合併症に寄与する分子のメカニズムに関してほとんど知られていない。盲目はそのような合併症のうちの1つで、それは管の起源を持っているが、よく理解されていない。20年間の診断内で、糖尿病患者の4分の1は盲目に結びつく増殖の網膜症になる。糖尿病性網膜症は、管の浸透性、基底膜の厚化、および新血管新生{の増殖期が後続する網膜の微小血管系のpericytes}の損害の増加でCukiernik(2004年の#749)を始める。管の成長因子(VEGF)は糖尿病の増殖の網膜症の進行に巻き込まれる。VEGFシグナリングは内皮細胞増殖、移住、分化および血管壁漏れやすさ{Yancopoulos(2000年の#65)}を促進することができる。種類Iおよび種類II糖尿病のマウスモデルには、転写調節因子を感じる低酸素症、HIF1 およびVEGFが目{近藤(低酸素症が糖尿病性網膜症の進行における開始の事象であることを示唆する2004年の#744)}内に増加させられることができた。VEGFがHIF1 {Yancopoulos、2000年の#65}の直接の転写の目標であるので、VEGFの誘導は恐らくHIF1 によって調停する。糖尿病性網膜症内にVEGFのための役割を支援して、靈長動物目の中のVEGFの異所的発現は、増殖の網膜症および黄斑の浮腫{Lebherz(2005年の#748)}の急速現像に結びつく。糖尿病のネズミモデルには、VEGFレセプタシグナル阻害剤SU5416の皮下注射がVEGFを抑え、網膜の微小血管の浸透性および血管収縮{Cukiernik(2004年の#749)}を誘導した。最後に、3つのすべてのVEGFRの阻害剤の内因性注入、PTK/ZKは低酸素症のマウスモデル{マイエル(2005年の#750)}の中の網膜新生血管を低減する。したがって、VEGF信号の調節異常は増殖の網膜症の進行に重大な役割を果たし、さらに他の糖尿病の管の合併症に寄与することができる。

【0296】

新陳代謝におけるNotch機能の評価

我々は、NotchおよびFoxo1、インシュリンシグナルの転写調整がCSLを持つ転写複合体を形成し、細胞運命決定を調節することを見出した。Foxo1の1つの対立遺伝子の損失は、インシュリンシグナル欠陥のあるマウス(Nakae 2002年ng)において高血糖および高インスリン血症を救出する。マウスにおいて、血糖レベルの著しい減少に関連するN4の損失は、野生体同腹児に匹敵する。Foxo1のようにNotch4は新陳代謝を調節する際にインシュリンシグナルに反対するかもしれない。グルコースとインシュリンのレベルを循環させることは、肝臓のように組織を生産するグルコース、および島状 細胞を生産するインシュリンの両方によって調節される。膵臓の細胞 細胞およびFoxo1遺伝子組換えにおける増加したFoxo1シグナルは、 細胞失敗および糖尿病(Nakae 2002年ng)導く。Foxo1とNotch4は、Notch1が両方の および 細胞を発現しながら、成人マウス膵臓の 細胞におけるオーバーラップする発現パターンを共有する。したがって、Notch4および / またはNotch1は膵臓島の内分泌腺の細胞に機能を持っているかもしれない。この目標には、我々がさらにNotch突然変異体マウスの新陳代謝および膵臓を特徴づける。Notch突然変異体マウスは交差されるL2、Ttr-Insr-/-マウス(図21)、かつN4および(または)N1不足がこのInsrの不十分な背景の中で観察された糖尿病・膵臓の欠陥を抑えるかどうか判断するために使用される。

【0297】

脂肪生成におけるNotch機能の評価

我々は、N4ノックアウトマウスが皮膚の脂肪異常発達を持っていることを見出した。N4突然変異体マウス中のこの脂肪組織表現型は、脂肪細胞の細胞の自律の欠陥、または非細胞の自律の脈管原性の欠陥から発生するかもしれない。N4のハプロ不全マウスとは対照的

10

20

30

40

50

に Insr 欠陥のあるマウスは脂肪組織発育不全になる{Cinti、1998年#774を表示します；北村、2004年の#745}(岡本JCI 2004)。支配的な陰性のFoxo1の異所的発現は脂肪生成を回復する Insr-/- 胚の纖維芽細胞{Nakae(2003年の#765)}。我々は、NotchとFoxo1が纖維芽細胞のホルモンに誘導された脂肪生成を阻害するように協力することを見出した。インシクリンシグナル(図3)を備えた停止中のFoxo1機能以来、Notchはさらに脂肪生成にインシクリンシグナルに対して反対する機能を持っているかもしれない。脂肪細胞と一致している、Notch4のための自律の機能はNotch4は皮下の脂肪細胞内に発現される。したがって、我々はNotchとNotchに由来した胚の纖維芽細胞のNotch機能脂肪生成を Insr 欠陥のあるマウスに対して評価する。我々はさらに皮下脂肪欠陥を特徴づけて、Notch突然変異体マウス中の内臓の脂肪組織を評価する。最後に、我々はNotch4不足が Insr 突然変異体マウスの皮膚の脂肪組織欠陥を救う場合、測定する。

10

【0298】

肥満のマウス・モデルにおいて、VEGFのアンタゴニストが脈管形成および脂肪生成{Ruppnick(2002年#766)の両方を阻害し;Fukumura、2003年の#768}、脈管形成と脂肪生成の相互の調節があることを示す。N4のハプロ不全マウスがさらに網膜の脈管形成の欠陥を表示するので、皮下脂肪の観察された増加は内皮細胞機能障害から発生するかもしれない。したがって、我々は、さらに違いがNotch突然変異体マウスの脂肪組織血管にあるかどうか判断するであろう。

20

【0299】

[第8のシリーズの実験]

[マウス血漿に存在するラットNotch1デコイ]

マウス血清に存在されるラットNotch1デコイ

哺乳類血流におけるラットNotch1デコイ系生物の安定性を試験した。図118に示すようにNotchデコイは哺乳類循環システムで安定である。

30

【0300】

ヌードマウスは、制御アデノウイルスまたはラットNotch1デコイ(rN1デコイ)を発現するアデノウイルスで注入された。注入後2週間において、リンパ液は収集され、かつ4マイクロリットルがウェスタンプロット分析で評価された。この分析は、全長ラットNotch1デコイタンパク質(図118の矢印参照)がマウスにおいて発現でき、かつ分解の僅かな証拠で検出レベルにて現れることを証明する。

30

[第9のシリーズの実験]

ヒトNotch1デコイ(h-Notch(1-36)デコイ)およびラットNotch1デコイプロックマウス乳房腫瘍増殖

ヒトNotch1デコイおよびラットNotch1デコイの活性は、乳房腫瘍細胞株、Mm5MT-FGF4、の増殖に対して比較される。図119に示すように両方のhNotch1デコイおよびrNaotch1デコイはMm5MT-FGF4の増殖速度を減少する。

40

【0301】

我々は、ヌードマウスでMm5MT-FGF4細胞増殖に利用する腫瘍モードを開発した。この実験で、 2×10^5 Mm5MT-FGF4細胞はヌードマウスに移植し、かつ4日間後のアデノウイルスをFC制御にコードし、ラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイは眼球静脈に注入した。Notchデコイはマウス肝臓に感染され、かつ血流に分泌されるアデノウイルスによって生産される(図118の例)。図119に表される増殖曲線は、ラットNotch1デコイまたはヒトNotch1デコイがヌードマウスの腫瘍異種移植の増殖を減少することを証明する。

40

【0302】

ラットNotch1デコイが肺組織へのSKNEP1転移を阻害する

Notch1デコイはマウスマードで転移をブロックできる。我々は、腫瘍増殖およびユーリング肉腫細胞株、SKNEP、の転移に対するラットNotch1デコイの活性を試験した。この腫瘍モデルにおいて、SKNEP腫瘍細胞は腫瘍が増殖し、それから肺に転移された子に同所性に移植する。SKNEP腫瘍細胞のラットNotch1デコイの発現は、図120に示すように腫瘍増殖および肺への纖維を減少する。

50

【0303】

SKNEP1ユーワイント肉腫細胞は、制御FCタンパク質またはラットNotch1デコイs1 (sort 2)またはラットNotch1デコイs4 (sort 4)を発現するためにプログラムされる。6週間の腫瘍増殖後に、肺への転移は組織学的に評価した。ラットNotch1デコイを発現するSKNEP1細胞は、転移に対して陽性であった僅かな肺を示した。我々は、ヌードマウスのラットNotch1デコイの発現がSKNEP1細胞の容量を減少し、肺に転移することを結論する。

【0304】

[第10のシリーズの実験]

Notch1およびNotch4はマウス皮膚のリンパ管中でVEGFR-3およびLYVE-1で共発現する
Notch1およびNotch4はマウス皮膚のリンパ管で発現する

10

我々は、マウスP4背部皮膚の脈管構造でのNotch1およびNotch4の発現を分析した。この時点で、経皮リンパ管は表面近くのリンパキャピラリーに活発に再造形し、かつ低経皮層の管に集まる。皮膚の5μm断面はNotch1またはNotch4(赤)およびPECAM, VEGFR-3またはLYVE-1(緑)に対する抗体で共染色された。Notch1およびNotch4は、血液およびリンパ管内皮細胞マーカー、PECAM(上部パネル、図121)での重複するパターンの発現を共有する。Notch1およびNotch4は、両方のVEGFR-3(中間パネル、図121)および経皮脈管構造のLYVE-1(下部パネル、図121)で共発現された。この発現パターンはNotch1およびNotch4が発現され、かつ新生児新皮のリンパ管で機能するかもしれないことを証明する。

【0305】

真皮リンパキャピラリーはNotch4変異体マウスで変化する

20

我々は、P4マウスの経皮リンパを試験した。野生型セクションおよびNotch4ヌル接合体はPECAMおよびLYVE-1(緑)に対する抗体で免疫染色される。PECAM染色の分析は変異体と野生型皮膚(上部パネル、図122)の間に同様に見られた。これに対し、Notch4マウスの皮膚のLYVE-1-陽性管は野生型のそれより異なる形態学を有する(中間パネル、図122)。Notch4マウスLYVE-1管はしばしば拡張され、かつLYVE-1染色は不連続であった(下部パネル、図122)。これらの結果は、Notch4シグナルがリンパ血管網状組織の再造形に関与してもよいことを提案する。

【0306】

Notch4損失は減少されたLYVE-1陽性管を結果として生じる

30

Notch4異型接合性(N4+/-)マウスは交尾され、結果として得られた子の背部皮膚は取り除かれ、かつ出生後14日に包埋される。結果は図123に示す。皮膚の断面は、内皮細胞マーカー、PECAM(データ示さず)、またはリンパ内皮細胞マーカー、LYVE1(A)に免疫染色される。それぞれに対して5つの領域は顕微鏡によって捕捉され、かつPECAMおよびLYVE1染色は画像ソフトウェア(B, C)を用いて定量される。PECAM発現は野生型(WT)新皮(B)に比べてN4+/-新皮で約25%に減少する。LYVE-1染色は、WTマウス(C)に比べてN4+/-で約50%減少されるLYVE1染色でPECAMより影響を受けた。WT(A)に比べてN4+/-リンパでLYVE1染色の強度での減少であった。

【0307】

マウスのNotch4機能の損失はリンパ管形成における役割を示唆する皮膚リンパの発達を崩壊する。

40

【0308】

Notch1およびNotch4はヒト乳がんで発現する

我々は、ヒト乳がんのVEGFR-3またはLYVE-1(緑)およびNotch1またはNotch4(赤)に対する抗体で二重免疫組織化学をなした。結果は図124に示す。Notch1およびNotch4は腫瘍外血液およびヒト微小乳頭乳がんのリンパ内皮で発現される。測定するために、もしNotch1情報伝達が腫瘍リンパ内皮内で活性化されるならば、我々はポドプレニン(podoplanin)(緑)およびN1Val(赤；細胞シグナル)に対する抗体で二重染色し、抗体は活性化Notch1ペプチドを特別に検出する。活性化Notch1ペプチドの発現は、殆ど(白矢印)観測されるが、リンパ内皮核(下部パネル)の全て(黄色矢印)ではない。これらの結果は、Notch1が病理学的なリンパ管で活発に情報伝達することを証明する。これらの結果は、またNo

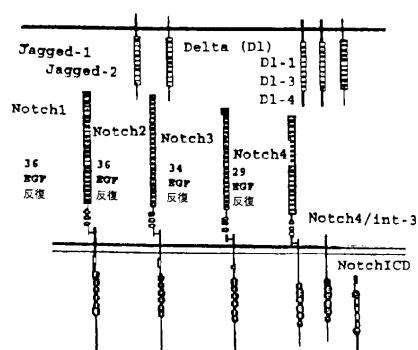
50

tch1およびNotch4が腫瘍リンパ管形成に機能するかもしれないことを証明する。

【図1】

図1

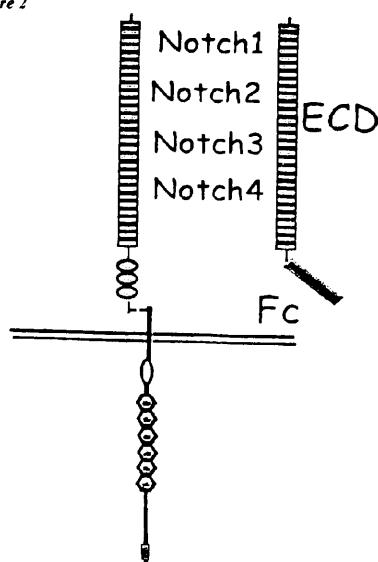
Figure 1



【図2】

図2

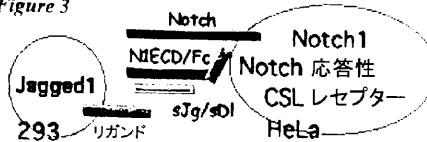
Figure 2



【図3】

図3

Figure 3

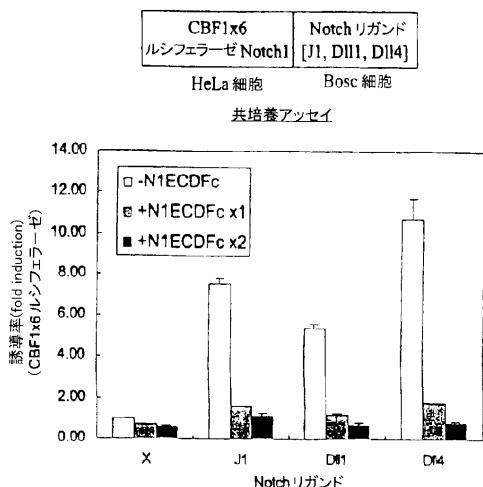


【図4】

図4

Figure 4

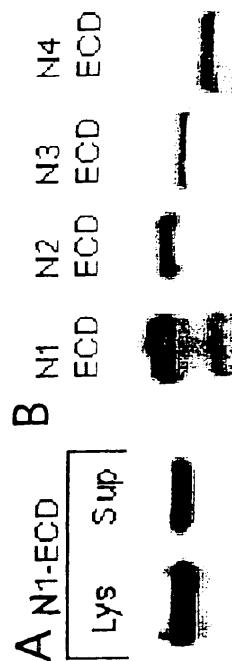
Notch外部ドメイン(Notchトラップ)は
Notchシグナル伝達の
リガンド誘導性の活性化を阻害する



【図5】

図5

Figure 5

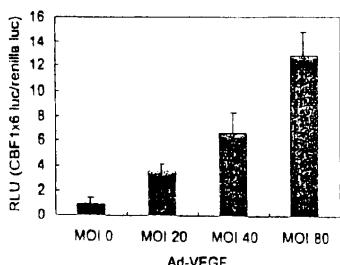


【図6】

図6

Figure 6

VEGF-165をコードするアデノウイルスに感染した
HUVECsにおけるNotchシグナル伝達の活性化

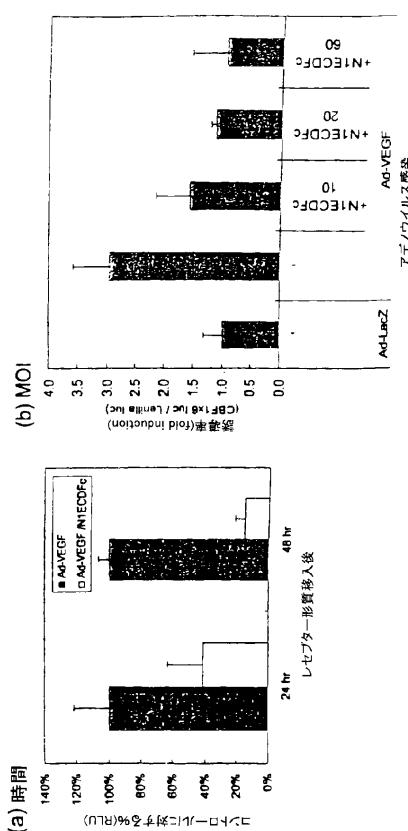


【図7】

図7

Figure 7

Notch外部ドメイン(Notchデコイ)はアデノウイルス感染する
VEGF刺激により誘導されるNotchシグナル伝達の活性化を阻害する

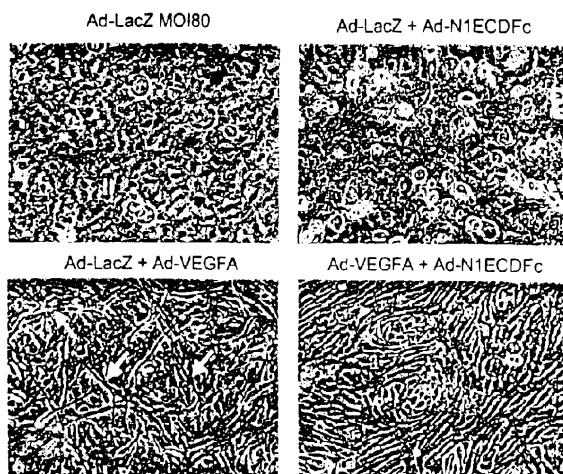


【図 8】

図 8

Figure 8

NotchデコイはI型コラーゲンゲル上のVEGFの過剰発現により誘導されるHUVECの発芽を阻害する

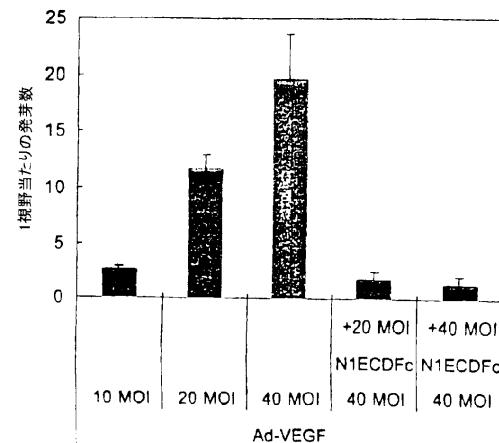


【図 9】

図 9

Figure 9

NotchトラップはI型コラーゲンゲル上のVEGFの過剰発現により誘導されるHUVECの発芽を阻害する



【図 10】

図 10

1 mprlaplic ltlppalaa gllrcsqpsgt clnggrceva ngeacvsgs afvgqrcqdp
61 spclstpcnn agtcyyvdhg givdyacscp lgfsgplcplt planaclanp crnggtdll
121 titexkcrp pgwsgksccq adpcasnpca nqgqclptes avicgccccpgf haptcrqdn
181 ecsgnpglcr hggthneig ayrcacraht cspheclpyv pcspspcncq gtrcrtgdt
241 hecasclpgf# gqngcevndd cpngnckng acvdgvntyn cpcppewtqg yctedvdecq
301 lmpnacqncg tchnshgym cvcvngwtge dcdnniddcn saacfgqatc hrvsafyce
361 cphprtgcilc hlnadclanp cnesanctdm pvngekcctc prgvtgpcas qdvdecalga
421 npcchagklc ntlgafecfc loggytprce ldvneciunp qndatclqg qfclqcmcp
481 gyegvyceln tecasapcl hnrgcvdkm efflcqcpcgf sghlccvwdv ecstpcnkg
541 akldcpntry twctvemry thcvedidee pdpchnigk dgwvftcl cpqygtghac
601 etnnechsqg pcrhagfcqd rdnyylclic kgttgpncl niddcaasnpc degtclakid
661 gycacepcgy tgsmenvnid ecsgapchng gctedglaqt tccrpegyhd ptclsev
721 nencpihgc rdglngykd apwgwgtg dinnneasea pcvngtckd mtsgyvotcr
781 esfsgpnqct nincsanep lnggldw agykcnpcpl ytgtatcevvl apcatespcn
841 svvckessedy eafscvcpcg wgnccidi neevkpcpkd ga*cqntngs ytclicqayt
901 grmcasiddd crppnchanc aedgvnmaad edcpnpgcav fceendlnca tmcpcnganc
961 tdcvdaytot cptgfnqgln enntpdetee scfngtgcavd gneftclcp pgftgmycqv
1021 dncdscrpt lbohtcaday stkyketcavg ytcgqngnq rccasapkn ggkwcqntq
1081 yhcercsgwt gnndclvse cevssaqkncr vllcldesq lcvdeddkhy chcqaygt
1141 ycedevdcesq pmpcqngatc tdyllg*ck evayhngc reeknqpcg pcngngtcl
1201 lntykykcp rgtgnvqni myvdhddpld pasrpkfhn ngcndqvg yctctppgv
1261 gercegdcpq tcnvcrvnd flcceragt grrceaving crgkpcrmng
1321 vcavaantar gflrcrcpaf egatcder tcsalrlcng stcspcspars tclcgatq
1381 pccqfpassp cyganpcyng gtcpcspewp fyrcpcpkf nglchldy aft 1433

リンクー配列
DLOPQ

Figure 10

【図 12】

図 12

1 mgllargxxrr rrrimallppp ppmrmlpl1 lllaglgasa ppcldgspca ngrcrthqqp
61 aleasclclp gwgvercqlp dpcshspca rgvcqssava starfsacrl rfgqpdcsq
121 pdpcwrcpvp hgepcavpdp grfcaespcpg yqgqeqsqqdi decragttcr hgtclntpq
181 sfrcpcplg tyglcempv pcspspcncg gtrcqsadvd ydcscipgfa gqnevvvd
241 cphrclngg tcvdgvtym cpcppewtqg fotedvdecq lqpmachng tcfmlighs
301 cvcngvwtg ec*gnldcln tavevhgatc hrvsafyce cmppktglic hiddavcnp
361 chedalcldn pvgarlaite ppgftgqacd qdveclsaia npcchlgcv ntqgsflcq
421 gytspfcdqpl iddedpcnl pgsqppqgqg dvedeqgasp cphgtctal pgnfricir
481 gytspfcdqpl iddedpcnl pgsqppqgqg dvedeqgasp cphgtctal pgnfricir
901 tcdtbwafse cscppqyggf dscldpderc vdcgqgqg vdcgqgqg vdcgqgqg
961 spcadpcfsr phlgqpcip thpgfekcr egftrgqg vdcgqgqg vdcgqgqg
541 tlcernvddp spdpchhgrz vdglassfaca cspgytgirc esqydecrsq pcrqyggkld
601 lvdkylcrcc pgtgvnclc niddcaasnpc tfgverdgiin rydcvccpgf tgpvcnvein
661 cscaspcgcs gavdngiin helpppgalp plicjpanhpc ahpkpcshgv hdpqyfrcv
721 cscaspcgcs gavdngiin helpppgalp plicjpanhpc ahpkpcshgv hdpqyfrcv
781 cehchgessd pdslitvscp pgwqppqgqg dvedeqgasp cphgtctal pgnfricir
841 gytspfcdqpl iddedpcnl pgsqppqgqg dvedeqgasp cphgtctal pgnfricir
901 tcdtbwafse cscppqyggf dscldpderc vdcgqgqg vdcgqgqg vdcgqgqg
961 spcadpcfsr phlgqpcip thpgfekcr egftrgqg vdcgqgqg vdcgqgqg
1021 ayccpgwv grldclqplp ctteasqmgv rleclqeqg kcdkqeqb vdcgqgqg
1081 hechvdpstl spqpcgqtc rymgypvca cpgaygqdc ednidecasq pcqngqg
1141 lvsylycscp ptglyvclcp lddclqplp lddclqplp lddclqplp lddclqplp
1201 hceadinecd spqpcgqtc rdcldqpgpl frcvchpgfpt gprcqlais cpgqpcqhg
1261 qcrhllrgg gltffchcp pfwglrcerv arscrelcp vpcqpcqzaz spreacpcpl
1321 spqpcrvera spqgatnasc aspcplchgg clpvqevpff zcvvapgwgg prctpcppel 1379

リンクー配列
リンクー配列なし

【図 11】

1 1 mprlapml allwlwlcgs gphalqlcrg gqepcvnegr ctvtyhngtgy crcpeglfe
61 ycqhredpcet nrcqngtgcv tqamglkate rcpagftged cqysatshpcv vrcpcqngt
121 chmlsrdpcet ctcyqgfdqf qcgqngtgcv hpcengtca evnqsfacrc pagitqkcd
181 adinecdipg rcpghgtcln lpgsryccp qritgqchdcv pyvpcspcpc vnggtcrqtd
241 dtfcshclp gfegegkln gngctctnrg gyccvngvng egddcsenidc dcafcasctpg atcidrvesf
301 ecilgpnqacq nincsanep lndvceqngtgcv gnefcdnec dcafcasctpg atcidrvesf
361 scilpekgag lndvceqngtgcv gnefcdnec dcafcasctpg atcidrvesf
421 manapcena gkevntdgal heeklkgayg prcndinecd hdpccndat cldkiggftc
481 cfpkqfkgvh deleyneccg npcvngqcv okvnrqfclc ppgftgpcvq idldccsnp
541 cingpkcdh pncqngtgcg gftgulclden idnacdppch hqccqngdilc tycicnpqym
601 gaiecdida cysapcndid rciidvngyq nmcqpgtqgk nceinfddca npcchlgcv
661 dglnrycvc pcpftgqrcn iddclcdqnp erkdatcindl vngfrcmcpc gphhpccyq
721 vnecliespcp hngcttggag ykcldegaw gincevdne clempcngg tcmlyngyr
781 ctckxhkgky gncvndica cncplngtgcg lddvvegthc cmlptgknc qvlapcspn
841 pcenavcke amfnsftcl capwgqgqc tvdvcdevk pcmmngicha tqgaymcecp
901 pgfagmdcees dindclanp qnggacdkv sfcslclpg vfdgkctdm neclscpcn
961 ggtcsdyvns ytcpcpavb gvhnnnele etescicngg tcvdgjnhfa clcpvgtfp
1021 fcldhinecs npcncngetc vdgtlyrct cplgytghmc qlvnlcpcpckmkgkqtcq
1081 ekarprrclp pgwdsgaydv lnwckesaq kqgypvchne qhagcinag nthhccqplg
1141 ytgayceqdl dcscapnqch gatcddifgq yrcvccpvgq gvnceyevd
1201 tcidivnkhk cspcpqrgl nincdida gephcnqngg cvdrigiyac rclpgfager kpcnqngca
1261 cedginecs npcncngetc ciklnhgnqdc sfcslcavtfrgk ctdlvdpcq
1321 vashvpdgil trcpqftrgq rcqscqgqk crqscqcvtht sepgfcpcn hkdcesgca
1381 npcqhggtcy pqrqppyycc rcpqpfugsh cseyatpa 1419

リンクー配列
DLOPQ

Figure 11

【図 13】

図 13

1 mppqll11111 lplnlpvilt relccggepe pcanggtclr lsrqgqicq apfqlqetcq
61 fpdpcerdtq cknggqclq lptpqaersp tspltpfhsc tpcpofgtqdr cqthkclcp
121 pfcanghdc yqsgsgrpgc scsepgrwseq qclridfcns pcanggvclc typqjcrpc
181 lqgtcglvp eghthfhlcl cppgftgldc empddcvrh qcngqatcll gldtqclcp
301 ktwgwdcees didecarpg prcngtgcu ntagefchvc vsgwggsece qnlldcasat
361 capgatcldr vgsfclcp gtrglchc mleqgpcvq naqscqplmt gtlcicpc
421 yngatcldq decqmgqg spchqgscil ntppgfcncl lppytgcrce adhncelcsp
481 tgarcltdm ecstapcang grcndqpgaf yccelpfeg pchcekevdec lsdpcvqgss
541 cldjpcifc lcpqftggl ceplctpmn cpgqgqccgg chrapclcpd gpgpcpaaed
601 ncpchhghg ralcvcdqg tpcetctlg scistpcahg gthcpqgsgy nctpcsgyng
721 nctpcsgyng hepcplngg csirpegyac tclphtgzh rctqavdhcm scingqtcv
781 nctpcsgyng hepcplngg csirpegyac tclphtgzh rctqavdhcm scingqtcv
841 lidclarcpc phdclqpcp qkqpcp qkqpcp qkqpcp qkqpcp qkqpcp
901 glcdtqsgy frcpcpdcg klcndpcp rppchqatc vpcpgeyvc qcapqyeggn
961 cakvlqdcqg qpcnqngtgc tpcnqngtgc tpcnqngtgc tpcnqngtgc tpcnqngtgc
1021 vlnafyqcp lpghtqarct vndlqpcp cngqatctt yppgpfchc opkqfegptc
1081 shkalsqgih hchngolcp spkpgpcpl scisqfppd clppappcg gpppcppl
1141 tottppqjg pgfctpcppd spgpcrqrpp 1170

リンクー配列
DLOPQ

【図 1-4-A】

図 14A

Figure 14A

【図14B】

図 14B

Figure 14B

【図15A】

図 15A

Figure 15A

【 図 1 5 B 】

图 15B

Figure 15B

【図 1 6 A】

16A

Figure 16A

60
61 tggggctggg ggccccgggc cgcgcgcgc tcgtcgccct gatggccttg ccacccggca
121 cacccggcat gggggcgtgc cccctgtgc tcgtcgatgc ggggtgggg tgatcgac
181 cccctgtgc gtggatggaa ccatgtggcc atggggatgc tgccacccac cagccggcc
241 ctggggggc tgctgtgcg tcgtcgccag gttgggggg tgatgggggg tgatgggggg
301 acccttgcgc ctcaggccat tcgtcgccg gatgggggg tgatgggggg tgatgggggg
361 gggccggcc ttcattgtcg tcgtcgccca gtaggtggcc agggccggac tggtgggggg
421 cagggccatcg cgtcagccgg ccctgtgttc atggggcccg cttcgatgtg gggccggatgg
481 gggatggcc tcgtcgccgc cccatgtgtt accggggatca aaggtggccas atggatgtgg
541 atggatgtgg atcttgtgtaca Acttggccgc atgggtgtac tcgtcgccat accatgtgg
601 cttccgtcggt ccgtgtgtcc ctgggtggcc accgggtgtc tggtggaggg ccggatgtgg
661 ctggggccc ttccgggggt ctgtatgtgg gccatgtggc tgatgggggg tgatgtgg
721 atggatgtgc ttggccgtcc ggtttgggggg cggatgtggc tgatgggggg tgatgtgg
781 ctggggggc tccgggttcata atgggggggg cttggatgtggc cggatgtggc atttacgggg
841 gggatgtggcc tcggccgggg acggccggatgt tcgtcgatgtgg acggatgtgg gatgtggcc
901 tcggccggcc tcgtcgccac atggggggta cttggatgtggc tcgtcgccat cttatgggggg
961 tggtatgtgg cttatgggggg acggggggatgg gatgtggcc
1021 cccggccgtgt ttccatgtgg gcacccgtgc atggatgtggc tcgtcgccat cttatgggggg
1081 gecctatggg ggaaaggccg ctgttgggtc atttatgggggg tgatgtgg
1141 cccatggatc tgatgtatgtt gaccaaaaaac ctgtatgtgg cccggggcc
1201 cccctgtgtt cactgtgtgg gatgtggcc atggatgtggc tgatgtgg
1261 acccttgcgtt acatgggggt cttggatgtgg atacacgggg cttatgggggg
1322 ggcgtgggtt taatgtggatc tcgtcgatgtgg cttatgggggg
1383 gggccggcc tcggatgtgg ctggatgggggg
1441 gttccatgggg gggatgtggc tggtggggaaa
1501 atttatgggggt ctggatgggggg
1561 ttggggccat tggtgtggatc tggtggatgg
1621 ccaatgtgtt gggatgtggcc
1681 ctttgtgtgg gggatgtggcc
1743 toggtggatc tgatgtggc tcgtatgtgg
1801 agggccggatgt ggatgtgggg
1861 tggggccatggggccatccggc tcgttgggtt
1921 acatgtgtgc ctgtcgatgtgg cttatgggggg
1981 tggtatgtgg tcgtcgatgtgg cttatgggggg
2041 atgtgtggatc cggccggccatgggggggg
2101 acgttcgtcc tcaccatgggg
2161 cccatggccat cttatgggggg
2221 tgatgtggatc tgatgtggcc
2281 cccatggccatggggccatccggc
2341 tggtggccatggggccatccggc
2401 tgatgtggatc
2461 cttatgggggg
2521 ggccggccca
2581 gatatactgg
2641 atggatgtgg
2701 tcgtggccatggggccatccggc
2761 ctgtatgtgg
2821 atgtgtggatc
2881 tggtggatgtgg
2941 aatacgatgg
3001 cccatggccat
3061 cttatgggggg
3121 ctgtatgtgg
3181 gccatgggggg
3241 atggatgtggat
3301 acgtatgtgg
a

【図16B】

図 16B

Figure 16B

【図 17A】

図 17A

Figure 17A

【図17B】

図 17B

Figure 17B

リンク一配列

【 図 1 8 A 】

18A

Figure 18A

1 atgcggccgc tcctggcgcg ctgttgtcgc tgccggcgct gcggccgacga
61 ggccggccgc gtcccttccagg ctttgaaatgc tktccgtatgg gggggaaatgg tgaaaggcc
121 aatggccgcg aggttgtcgat ttgttggccg gcttcgttgcg ccggccatgc ccaggacc
181 aaccggcgcc tcacggccccc tcgtcaatgg gccggccatgc ggcacccatgg ggccggcc
241 ggccggccgc actatgtcgat cttgttgtcc tcggggcttc ctggccggcc ctgtccgtac
301 ccccttgcggc atgttgtcgat caccatggcc tcggccggcc gggggccatgg ccgttcgtcc
361 acgtcgccgg agtactatgg ctgttcggcc cccggccatgg cggggatggc ggccgtcc
421 gttccggccgt gggccgttccca cccctggccgc accatggccg agtgtcgatcc ctggccggcc
481 tccttacatcc gcacatggcc accggatggcc catggggcccc tcgtccggccg cccatggcc
541 gagttggggcc agggggccgg gttttggccg ccggggatgg ccgtccggcc tcgtccggcc
601 tccttacggct ggttgtcgcc gggccacccatgc atggccggcc atggccatgc ggccatccatgg
661 cccctggccg ctccgtccgg ccggggatggcc gggccatggcc gcccggccgg ggccatccatgg
721 caccgttgcg ctgttgtcgat ggtttccatgc ccggccatgg gggggatggcc tttccatgg
781 tgccggccgg aaccatggcc gaaatgggggt ctgttgtggcc agggccatgg gggggatggcc
841 tcgtccggcc cccggatggc gaggttgtccg tactttatggcc aggtttatggcc
901 tcgtatggccgg atgttgtcgcc gggccggccgg accttggccatgc acggccatgg
961 tcgttgttgcg tcacggccgc gactttgtggcc gatgttgtccg catggccatgg
1021 aacggccatgc gttttttccagg gggccatggcc tcgttgtccg tcgttgtcc
1081 tgccggccatgg cggccggccgg ttttttgtccg caccatggcc
1141 tgtaatggggcc gttttttccatgg gggccacccatgc tcgttgtccg
1201 cccctggggatcc acggccggcc gggccggccgg cggggatggcc
1261 aacccttgcggc agatgttgtgg ccgtatggcc tcaccatggcc
1321 ctggcagggtt acacggggccgg ctggatggcc atccatggcc
1381 tgccggccggcc acggccatggcc ctggggatggcc
1441 ggccatgggggg gtgttgtcgatc gggggatggcc
1501 cccatggccgg gttttttccatgg
1561 actggccatcc tcgttgtccgg
1621 gggccatggggcc tggttgtccgg
1681 acggatccggc aggttgtccatgc
1741 aaccggccatgg tcacggccatgg
1801 gagggccatcc tcacggccatgg
1861 cccggccatcc tcacggccatgg
1921 aaccatggcc tcacggccatgg
1981 ggccatggccgtt gggggatggcc
2041 gggccatggcc gggccatggcc
2101 aaccggccatcc tcacggccatgg
2161 aaccggccatcc tcacggccatgg
2221 tggttgtccgg tggttgtccatgc
2281 ctggccatggcc acggccatggcc
2341 gggggccatcc tcacggccatgg
2401 ctggccatggcc tcacggccatgg
2461 tacatggccatcc tcacggccatgg
2521 tggttgtccgg
2581 tgccggccatcc
2641 cacggccatcc tcacggccatgg
2701 agtggggccatcc actggccatgg
2767 tgccggccatcc
2821 aaccttttgtg aggaggatgg
2881 tgccggccatcc
2941 tggttgtccgg
3001 aaccggccatcc
3061 caccatggcc
3121 tgccggccatcc
3181 tggttgtccgg
3241 aaccatggccatcc
3301 tccctgtgggg
3361 tggttgtccgg
3421 aaccatggccatcc
3481 tggttgtccgg
3541 aaccatggccatcc
3601 aaccatggccatcc
3661 aaccatggccatcc
3721 tggttgtccgg
3781 tgccggccatcc
3841 tggttgtccgg
3901 tgccggccatcc
3961 tggttgtccgg
4021 aaccatggccatcc
4081 tgccggccatcc
4141 tggttgtccgg
4201 cccatggccatcc
4261 aaccatggccatcc
4321 tggttgtccgg
4381 tgccggccatcc
4441 tggttgtccgg
4501 cccatggccatcc
4561 aaccatggccatcc
4621 tggttgtccgg
4681 aaccatggccatcc
4741 tggttgtccgg
4801 tgccggccatcc
4861 aaccatggccatcc
4921 tggttgtccgg
4981 tgccggccatcc
5041 aaccatggccatcc
5101 tggttgtccgg
5161 aaccatggccatcc
5221 tggttgtccgg
5281 tgccggccatcc
5341 aaccatggccatcc
5401 tggttgtccgg
5461 aaccatggccatcc
5521 tggttgtccgg
5581 tgccggccatcc
5641 aaccatggccatcc
5701 tggttgtccgg
5767 tgccggccatcc
5821 aaccttttgtg
5881 tgccggccatcc
5941 tggttgtccgg
6001 aaccggccatcc
6061 caccatggcc
6121 tgccggccatcc
6181 tggttgtccgg
6241 aaccatggccatcc
6301 tggttgtccgg
6361 tggttgtccgg
6421 aaccatggccatcc
6481 tggttgtccgg
6541 aaccatggccatcc
6601 tggttgtccgg
6661 aaccatggccatcc
6721 tggttgtccgg
6781 tgccggccatcc
6841 tggttgtccgg
6901 aaccatggccatcc
6961 tggttgtccgg
7021 aaccatggccatcc
7081 tggttgtccgg
7141 tggttgtccgg
7201 tgccggccatcc
7267 tgccggccatcc
7321 tggttgtccgg
7381 tgccggccatcc
7441 tggttgtccgg
7501 aaccatggccatcc
7561 tggttgtccgg
7621 tgccggccatcc
7681 tggttgtccgg
7741 tgccggccatcc
7801 tggttgtccgg
7861 tgccggccatcc
7921 tggttgtccgg
7981 tgccggccatcc
8041 tggttgtccgg
8101 aaccatggccatcc
8161 tggttgtccgg
8221 tgccggccatcc
8281 tggttgtccgg
8341 tggttgtccgg
8401 aaccatggccatcc
8461 tggttgtccgg
8521 tgccggccatcc
8581 tggttgtccgg
8641 aaccatggccatcc
8701 tggttgtccgg
8767 tgccggccatcc
8821 aaccttttgtg
8881 tgccggccatcc
8941 tggttgtccgg
9001 aaccggccatcc
9061 caccatggcc
9121 tgccggccatcc
9181 tggttgtccgg
9241 aaccatggccatcc
9301 tggttgtccgg
9361 tgccggccatcc
9421 tggttgtccgg
9481 aaccatggccatcc
9541 tggttgtccgg
9601 tgccggccatcc
9661 aaccatggccatcc
9721 tggttgtccgg
9781 tgccggccatcc
9841 tggttgtccgg
9901 tgccggccatcc
9961 aaccatggccatcc

【 図 18B 】

☒ 18B

Figure 18E

【 义 1 9 A 】

図 19A

Figure 19.4

【 図 1 9 B 】

図 19B

Figure 19B

【 义 20A 】

20A

Figure 20A

【 2 0 B 】

图 20B

Figure 20B

3361 tgggggggaccc tgcgggtggc tatagggggg ctacatgtgt gaggtgttcc ctggctacaa
3421 tggatcaatc tggtgggggg acgtgggggg ggggggggg cggccgtggc agcgacgggggg
3481 ttatccatgg gacccgtggg ccggccatcc ctggcttcgtt ccccccgggggggggggggggggg
3541 gcttcgggggg attaaatgggg atggatgg
3601 gtggctacaaat aatggggaccc tggtggggccctt gggtgggggggggggggggggggggggggggg
3661 aggatcaact ggtttggccgtt ggccgg
3721 ggccggccatcc accggggggat gcttgg
3771 tgggtgggttc tcaggggggcc tgggtgg
3841 ccgg
3901 ctatgtgtcc cggccgtttt ggg
3961 gtggccgg
4021 cccccccgg
4071 tggggggggcc tccatggggcc tgg

【 図 21A 】

図 21A

Figure 21A

【 図 2 1 B 】

21B

Figure 21B

3361 tgccggctcc atcaactgcga ccacggaggc ctgtgtctgc ctcctccatg gcccagggttc
3421 ccacccacgt gtgcgtccgt cagtgggtttt ggggggttttttcc acgttgtatc cccacccatgt
3481 cttttaaatgt ggccggcttcc ttccccatgtc ctataatcgatc gggatgtttt agacaccagg
3541 ggcttggggg ggccgggttt tggatgtcttc tgcccttcaca gtcctccagg gccccgggtgt
3601 caaaaaaccgg qa

【図 2 2 a】

図 22a

Figure 22A

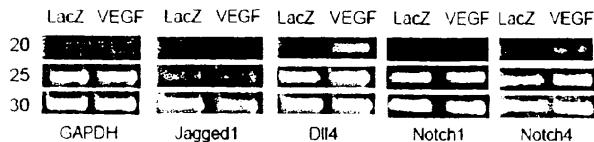


Figure 22B

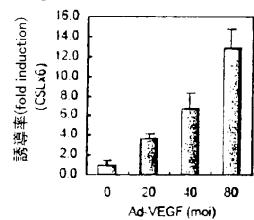


Figure 22C

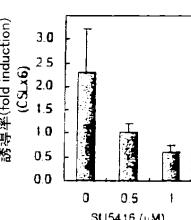
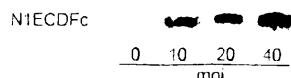


Figure 22D



Figure 22E



【図 2 2 c】

図 22c

Figure 22I

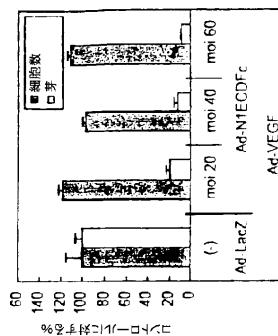
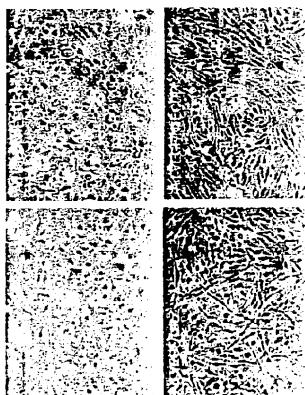


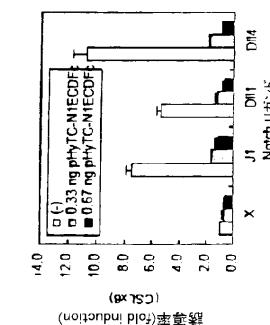
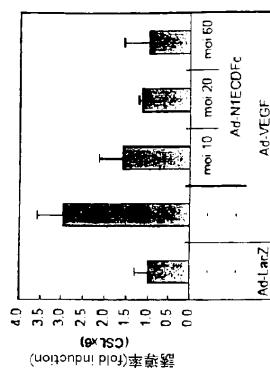
Figure 22H



【図 2 2 b】

図 22b

Figure 22G



【図 2 3 a】

図 23a

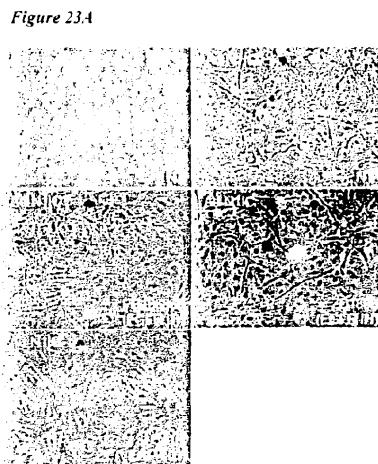


Figure 23.4

Figure 23B

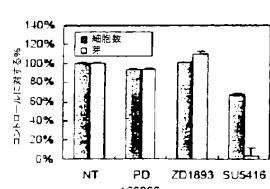
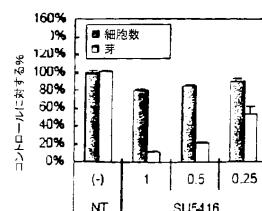


Figure 23C



【図 2 3 b】

図 23b

Figure 23D

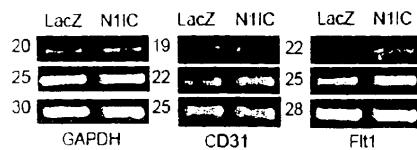


Figure 23E

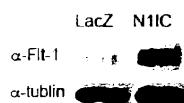
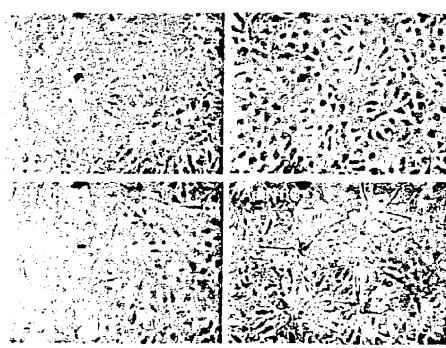


Figure 23F



【図 2 4】

図 24

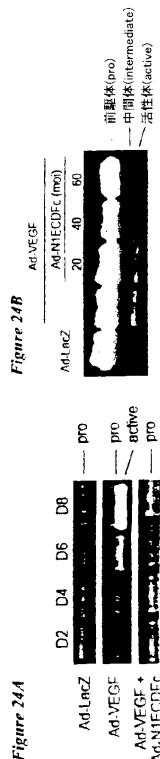


Figure 24C

Figure 24D

Figure 24E

Figure 24F

Figure 24G

Figure 24H

Figure 24I

Figure 24J

Figure 24K

Figure 24L

Figure 24M

Figure 24N

Figure 24O

Figure 24P

Figure 24Q

Figure 24R

Figure 24S

Figure 24T

Figure 24U

Figure 24V

Figure 24W

Figure 24X

Figure 24Y

Figure 24Z

Figure 24AA

Figure 24BB

Figure 24CC

Figure 24DD

Figure 24EE

Figure 24FF

Figure 24GG

Figure 24HH

Figure 24II

Figure 24JJ

Figure 24KK

Figure 24LL

Figure 24MM

Figure 24NN

Figure 24OO

Figure 24PP

Figure 24QQ

【図 2 5 a】

図 25a

Figure 25A

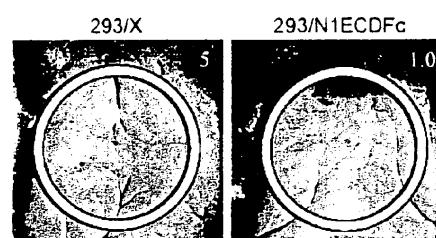


Figure 25B

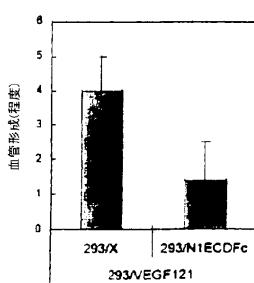


Figure 25A

Figure 25B

【図 25 b】

図 25b

Figure 25C

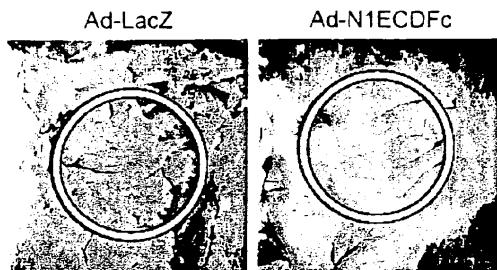
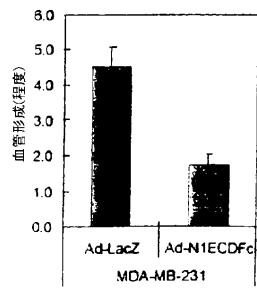


Figure 25D



【図 28】

図 28

Figure 28A

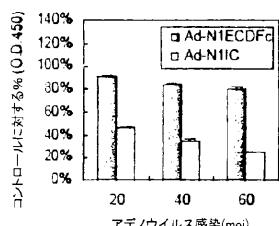
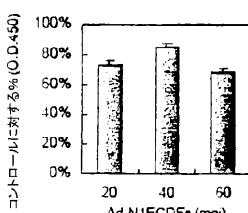


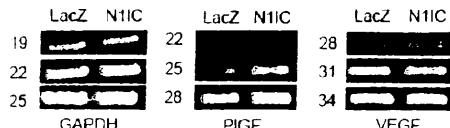
Figure 28B



【図 29】

図 29

Figure 29



【図 26】

図 26

Figure 26A

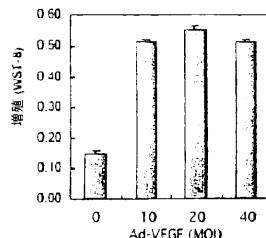
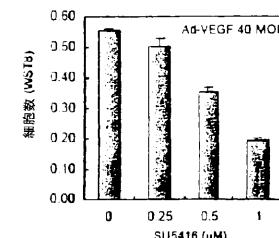


Figure 26B



【図 27】

図 27

Figure 27A

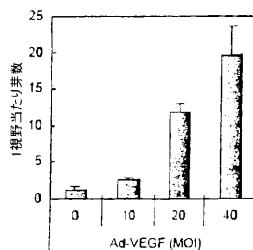
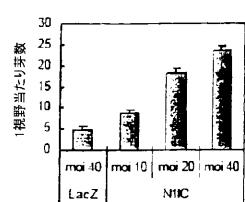


Figure 27B



【図 30】

図 30

Figure 30A

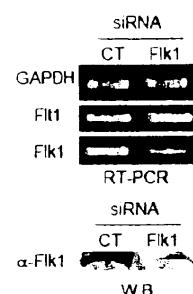


Figure 30B

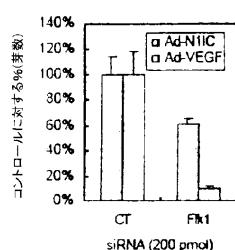
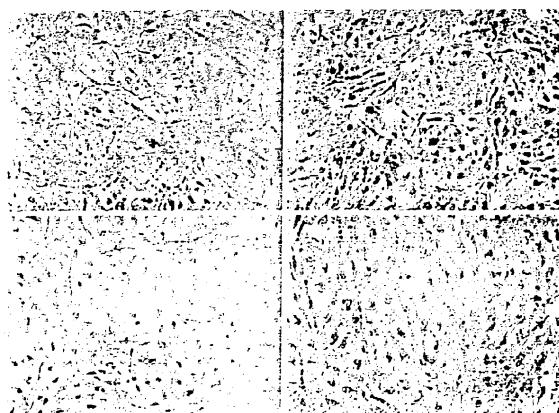


Figure 30C



【図 3 1】

図 31

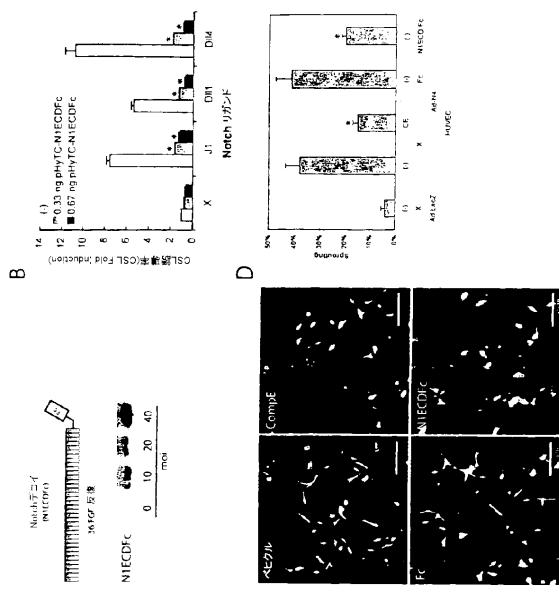


Figure 31A

【図 3 2】

図 32

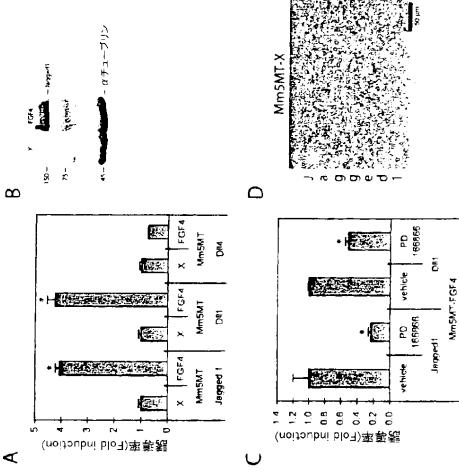
Figure 32



【図 3 3】

図 33

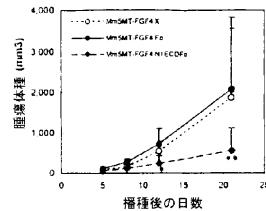
Figure 33



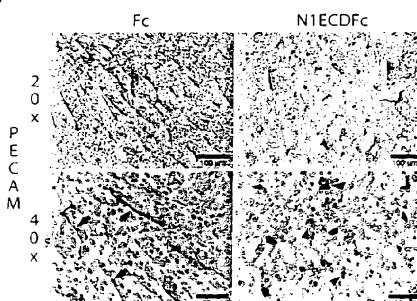
【図 3 4】

図 34

A



B



C

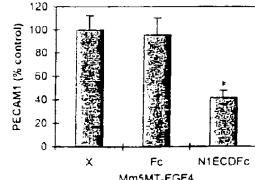
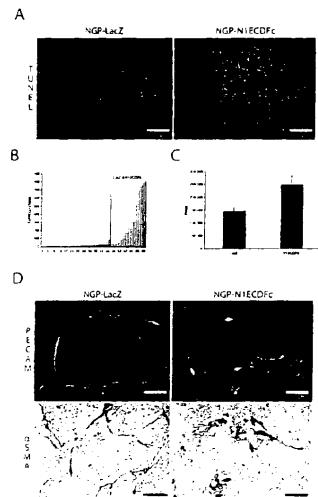


Figure 34

【図35】

図35

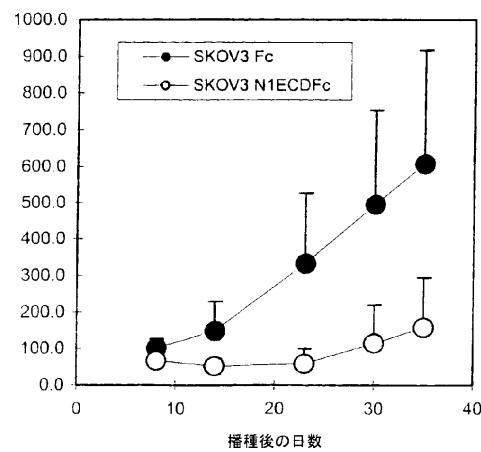
Figure 35



【図36】

図36

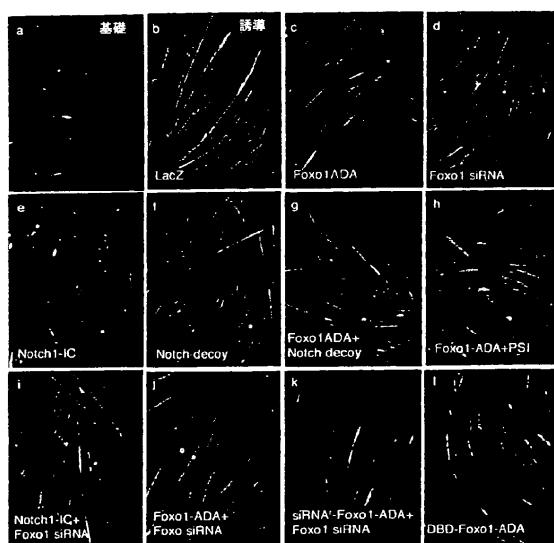
Figure 36



【図37】

図37

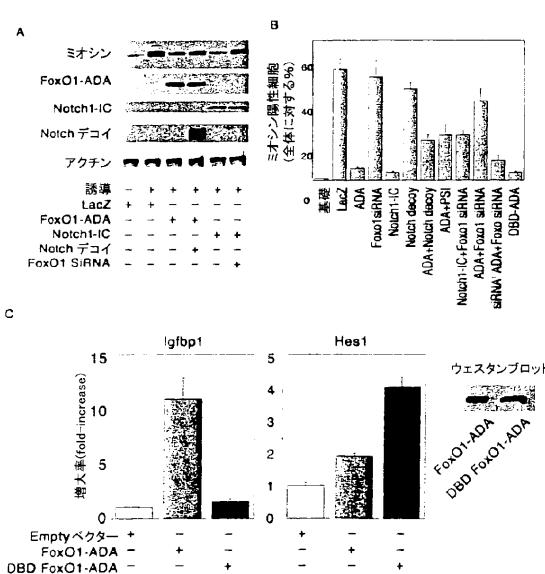
Figure 37



【図38】

図38

Figure 38



(四 3 9)

图 39

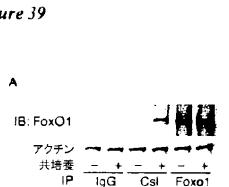
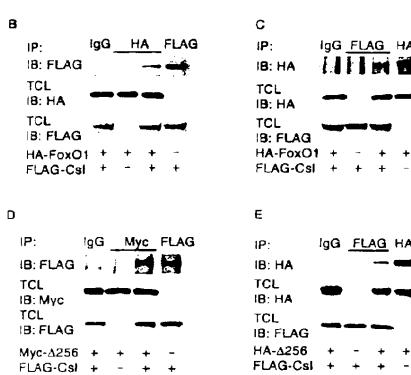


Figure 39



【 四 0 】

図 40

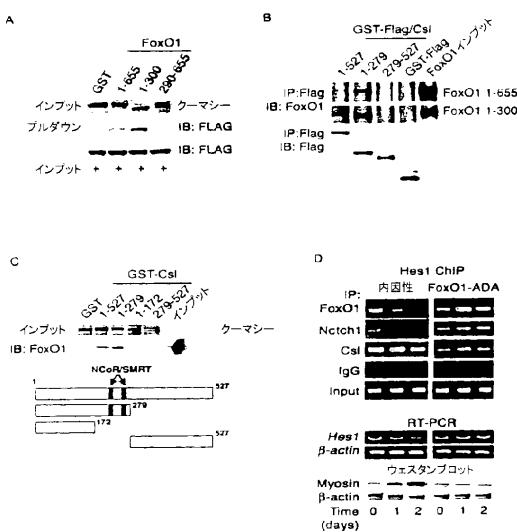


Figure 40

(四 4 1)

四 41

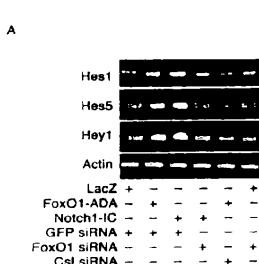
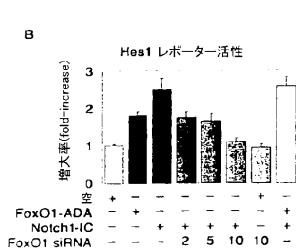


Figure 1D



Cell Type	Fold-increase	Activity
FoxO1-ADA	1	~1.5
	2	~2.5
	5	~2.8
Notch1-IC	1	~1.5
	2	~2.0
	5	~1.8
FoxO1 siRNA	1	~1.5
	2	~1.8
	5	~1.5
	1	~1.5
	2	~1.8
	5	~1.5

【 図 4 2 】

42

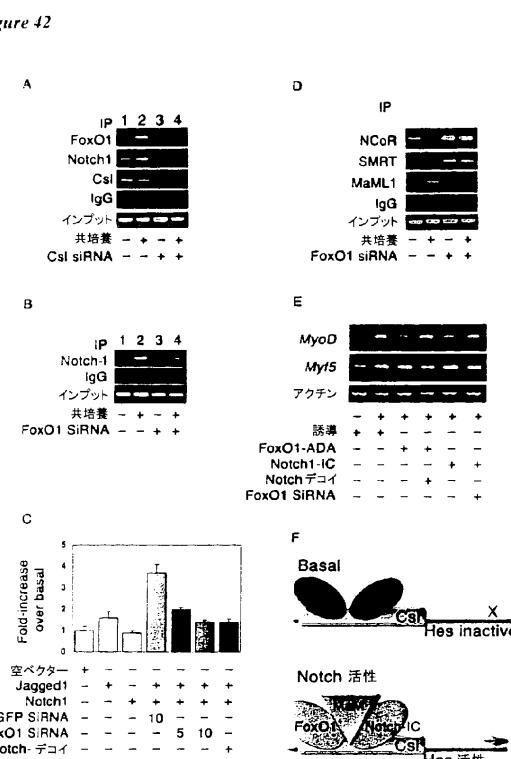
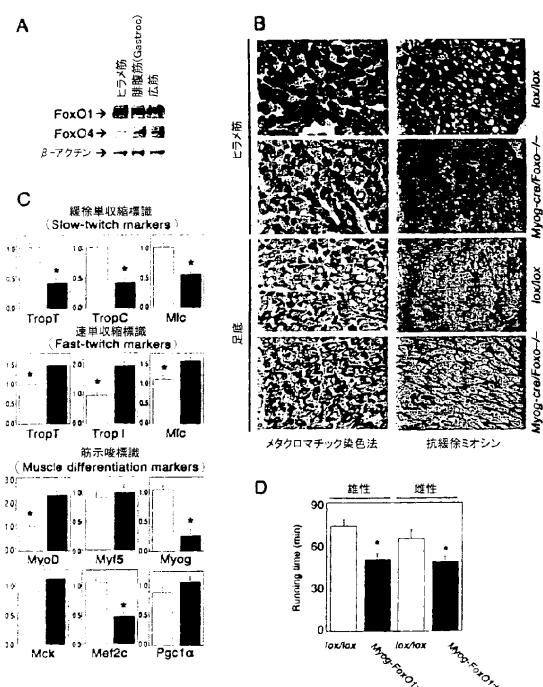


Figure 12

【図43】

図43

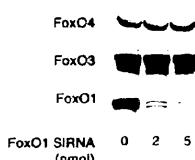
Figure 43



【図46】

図46

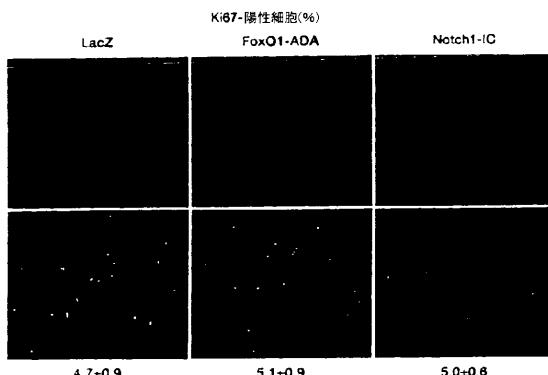
Figure 46



【図47】

図47

Figure 47

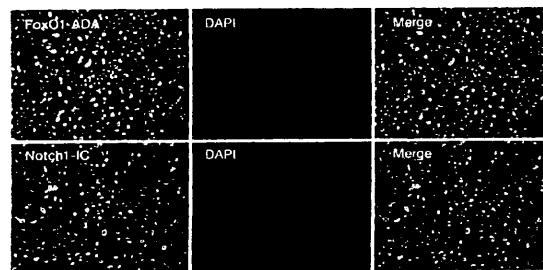


【図44】

図44

Figure 44

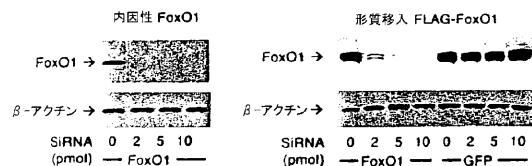
アデノウイルス形質導入効率



【図45】

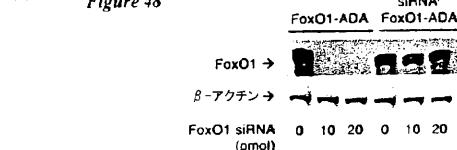
図45

Figure 45



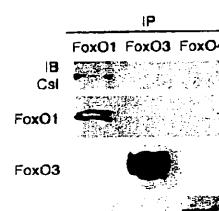
【図48】

Figure 48



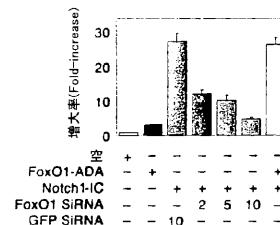
【図49】

Figure 49



【図50】

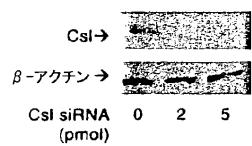
Figure 50



【図51】

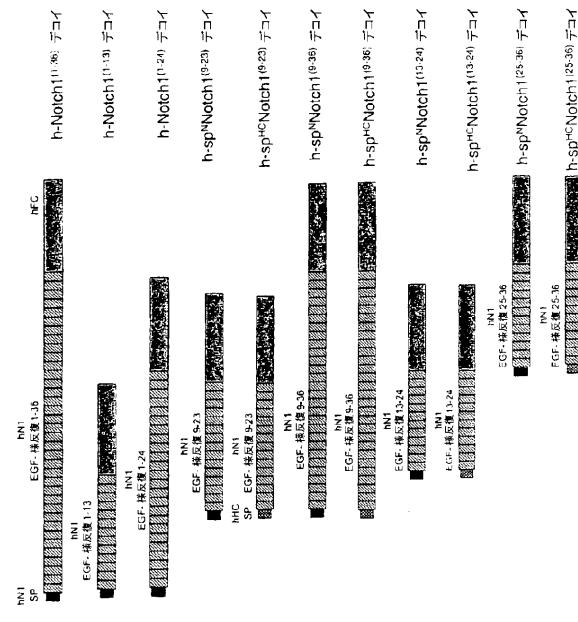
51

Figure 51



【 図 5 2 】

図 52



【図53】

図 53

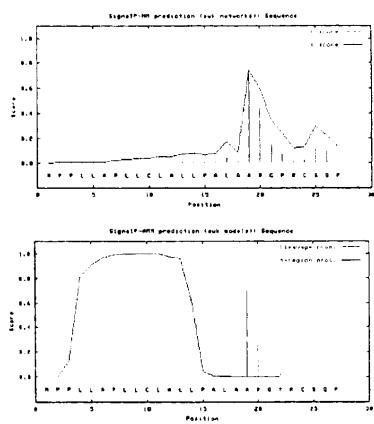
Fig. 53

【 図 5 4 】

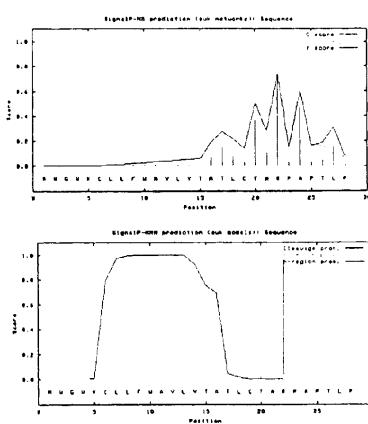
图 54

Fig. 54

ヒトNotch1シグナルペプチド



ヒトIgG重鎖(HC)シグナルペプチド



【図 5 5】

図 55

Fig. 55

ヒトNotchデコイ(EGF-LR 1-36)
 ヒトNotchデコイ(EGF-LR 9-36)
 ヒトNotchデコイ(EGF-LR 25-36)

ヒトN1

tac agc ttc ggg (SEQ ID NO: 19)
 atg tcg aag ccc (SEQ ID NO: 20)
 Y S F G (SEQ ID NO: 21)

最後のヌクレオチドに換えてBgIII部分を付加

tac agc ttc gga ~~GAT-CG~~ (SEQ ID NO: 22)
 atg tcg aag cct ~~CTA-GA~~ (SEQ ID NO: 23)
 Y S F G (SEQ ID NO: 21)

N1/EC 融合

tac agc ttc gga GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 24)
 atg tcg aag cct CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 25)
 Y S F G D L G P (SEQ ID NO: 26)

【図 5 6】

図 56

Fig. 56

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 1-13)

ヒトN1

gat gtg gac gag (SEQ ID NO: 27)
 cta ctc ctg ctc (SEQ ID NO: 28)
 D V D E (SEQ ID NO: 29)

BamHI部位の付加

gat gtg gac gag ~~GAT-CG~~ (SEQ ID NO: 30)
 cta ctc ctg ctc ~~CTA-GG~~ (SEQ ID NO: 31)
 D V D E (SEQ ID NO: 29)

N1/EC 融合

gat gtg gac gag GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 32)
 cta ctc ctg ctc CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 33)
 D V D E D L G P (SEQ ID NO: 34)

【図 5 7】

図 57

Fig. 57

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 9-23)

ヒトN1

gag acc gac atc ~~gac gag~~ (SEQ ID NO: 35)
 ctc tgg ctg tag ~~ctg ctc~~ (SEQ ID NO: 36)
 E T D I D D (SEQ ID NO: 37)

BgIII部位の付加

gag acc gac atA ~~GAT-CG~~ (SEQ ID NO: 38)
 ctc tgg ctg taT ~~CTA-GA~~ (SEQ ID NO: 39)
 E T D I (SEQ ID NO: 40)

N1/EC 融合

gag acc gac atA GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 41)
 ctc tgg ctg taT CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 42)
 E T D I D L G P (SEQ ID NO: 43)

【図 5 8】

図 58

Fig. 58

ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 1-24)
 ヒトNotch1デコイ(EGF-LR 13-24)

ヒトN1

gac atc aac gag (SEQ ID NO: 44)
 ctg tag ttg ctc (SEQ ID NO: 45)
 D I N E (SEQ ID NO: 46)

BamHI部分の付加

gac atc aac gag ~~GAT-CG~~ (SEQ ID NO: 47)
 ctg tag ttg ctc ~~CTA-GG~~ (SEQ ID NO: 48)
 D I N E (SEQ ID NO: 46)

N1/EC 融合

gac atc aac gag GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO: 49)
 ctg tag ttg ctc CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO: 50)
 D I N E D L G P (SEQ ID NO: 51)

【図 59A】

図 59A

Figure 59A

MPPLAPLLCIALLPALAAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDPNPLS
 TPCKNAGTCHVDRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCCRNGTCOLLTLTEYKCRCP
 PGWSGKSCQQADPCASNPANCNGQCCLPFEASYIHCPCPSFHGPTCRQDQNECGQKPGICRHHGGTC
 HNEGSYRCVRATHGPNCRPERPYVPCSPSPCQNQGTCRPTGDTVHECACLPGTGTGNCCEENIDD
 CGPNCKNGGACDQGNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQLMPCNACQNGGTCNTHGGYNCVCVN
 GWGECSENIIDCASACFHGATCDRVAESEYCEPHRGTLCLNDACISNPNEGNSNDCDN
 PVNGKAICTCPSCYTPACSDQVDECSLGPANPCBAGHKINTLGSFECOCLOGTYGRCEIDVNE
 CVSNPCQNDATCLDQIGEFQCCIMPGYEGVHCEVNDECASSPCLHNRCLDKINEFQGECPTGF
 TGHLCQYDVDECASTPCKNGAKCLDCPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGV
 TFCCLCRGTYGTHHCETNINECBSQPCRHGCTQDQRDNAYLCFCLGKTTGPNCEINLDDCASSPC
 DSGTCLDRTDGYECACEPYGTCGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHCPPTCLS
 EVNECNSNPVCVHGACRDSLNQYKCDCPGWGSTNCINDNNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVYVCTCR
 EGFSGNCQNTINNECASPLNQGTCIDVAGYKCNCLLVTGATCWLAPCAPS2CRNGGECR
 QSEDEYESFCVCPGTVGQGTCVEVDINECVLSPCRHGCASQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETIIDD
 CRPNPCHNGGSTDGINTAFCDCPGLFRGTFCEEDINECASDPFRNGANCTDCDVSYTCTCPAGE
 SCICENNTDCTESSCENGTCVGDINSFTCLCPGFTGSGYQCHDVNECDSPQCLHGGTCQDG
 GSYRCTCPGTYGFGNCNLVWHDGNSPCFKGKWCQWTHQYCFECFSQWTGLYCDEVFSVSEVA
 QRQGVQVARLCQHGGLCVDAGNTHHRCQAGTYGSYCBLDVDECSPSPCQNQGATLDPDLYGGYSC
 CVAGYHGNCSEEEIDCPLSHPQNGGTCIDLPLTYKCSQPTGCVHCEINVDDCNPVPDVPSRS
 PRKFENGTCDVQVGGYSCITCPGFGVERCEDVNECLSPCDARCTQNCVQRVNDFHCSURAGHT
 GRRCSVINGCKGPKCNGGTCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSI.RCTINGGTCIS
 GPRSPTCUCLCFTGPPCQFPASSPCLGGNCPYNQGTCPEPTSESFFYRCLCPAKFNGLLCHLDY
 SEFGGSGACRDIPPLIEACEPECDAGNKVCSLQCNHNACGWMDGGDCSINFNFDPKWNCQTSQ
 CWKYPSDGHNCQNSAGCLFDGFCQRAEGQCNPLYDQYCKDHFSDGHDQGNCNAECEMDGLD
 CRENHVPRLAAGTIVVVVLMPEQIRNSSFHWFLRELSRV1HTNVFKRDAHQQMIFPYGREEE
 LRKHPKRAECAWGAAPOALLGQVKASLLPGGSECGRRRRELDPMMDVRSIVYLEIDNRQCVQASS
 QCFCQSATDVAFLCALASLGLSLNIPYK1FAVQSETVEPPPAPQIHTMVMVAAAFLVLFVGCY
 LSRKRERRQHGQLWFPEGFTKVEASKKRREPLGEDSVGLKPLXNNSDGA1MDONQNWEDELET
 KKFRFRPEPVLPDLDDQTDHQRWTQHLDAAALRMSAMAPTTPGGEVDACMDVNVPGDGTFL
 MTASCSSGGLETCNSEEEEADAPAVISOFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLEA
 SADANIQDNHGRTPLHAAVSADAQGVFQILIRNRATDLDARMHDGTTPLIAARIAVEGMLEDL
 NSHADVNADVDDLGKS

【図 59B】

図 59B

Figure 59B

ALHWAAPVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGGSYETAKVLLDHFANRDI
 TDHMDRLPRDIAQERMHHIDVRLDQEYNLVRSQPLHGAFLGGPTLSPPLCSPNQYLG
 LKPGVQGKVKRPSSKGACGSKEAKDLKARRRKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLESPH
 GYLSDVASPPLLPSPFQQSPPVPLNHPGMPDTHLGTHGLNVAAKPEMAALGGGRLAF
 ETGPRSLHLPVASGTVLGSSSGJALNFTVGGSTSNGCEWLSRLQSGMVPNQYNP
 LRGSAVPGPLSTQAPSQHGMVCPHSSLAASALSQMMSYOGLPSTRLATQPHLVQTOQ
 VQPQNLQMQQQNLQPANIQQQSLQPFPPPPQPHLGVSSAASGLGRSFLSCEPSPQADV
 QVPLGPSSLAHTILPQESPALPTSLPSSLVPPVTAQFLPPPSQHSHYSSPVONTPSHQL
 QVPEHFLTPSPESPQDWQSSSSPHNSDWSSEGVSPPSTMOSQIARIPEAFK

【図 60】

図 60

Figure 60

DLCGPGEPKSCDKTHTCPCPAPELLGCPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPRBPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENN
 YKTTTPVLDSDGSFFFLYSLKLTVDKSRWQQCNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図 61】

図 61

Figure 61

MPPLAPLLCIALLPALAAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDP
 NPCLSTPCKNAGTCHVDRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCCRNGTC DLL
 TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPANCNGQCCLPFEASYIHCPCPSFHGPTCRQDV
 ECGQPGPLCRHGGTCNEVGSYRCVRATHGPNCRPERPYVPCSPSPCQNQGTCRPTGDT
 HECACLPGTGTQNCNEENIDDCPQNCNCKNGGACVGDVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQ
 LMPNAQNGGTCNTHGGYVCVNWTGECDEDCSENIDDCASACFHGATCDRVAESE
 CPHGRTGLLCHLNDACISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSCYTGTPACSDQVDECSLGA
 NPCEHAGKINTLGSFSCQCLQYGTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCI
 CMPGYEVHCEVNTECASSPCLHNGRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLQYDQVDECASTPCKNG
 AKCLDGRNTYTCVCTEGYTGTHCEVDEDCEPDPDCHYGSCKDGVATFTCLCRPGTYGH
 ETNINCCSSQFCRGGTCQDRDNAYLCFLKGTTGPNCEINLDDCASSPDSGTCLDKID
 GYBCEAPEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDP
 CLTSEVNECNSNPVCVHGACRDSLNQYKCDCPGWGSTNCINDNNNECESNPVCVNGGTC
 MDTSGVYCTCR
 ECGPCPNQNTINNECASNPCLNGTCIDDVAGYKCNCLLPTYGTACVSLAPCAPSPCRN
 GGECRCPNQTYEFSFCVCPGTVQGQTCVEVDINECLSPCRHGCASPCNQHGGYRCHQAGYS
 GRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCDGTQDNTAFCDCPGLFRGTFCEDEINACSDPFRNGANC
 TDCVDSYTCCTCPAGFGSIHCENNTDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPGFTGSGYQH
 DVNECDSPQCLHGGTCQDGCGSYRCTCPQYGTGPNQCNLWHDGSSPCNKGKWCQHTQ
 YRCECPGWTGLYCDVPSVSCRVAAQRQGVDVARLQHGGGLCVDAGNIIHHCRCQAGYTG
 S YCEDLVDCECSBSPCQNQGATCTDLYGGSCCKVAGYHGUNCSSEEDCILSHPCQNGGTC
 LPNTYKCSCPGTVQHCBINVDDCNPPVPSRSRSPKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPGPF
 GECRGDVECLSNPCDARGTQNCVQRVNDFHCECRAGHTGRCEVINGCKGPKCNG
 TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGTC1ISGPSPSTCLCLG
 PFTG
 PECQFPASSPCLGGNCPYQGTCPESTSBSFFYRCLCPAKFNGLLCHLDYSGFDLGP
 GEP
 KSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNW
 YUDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISK
 KAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENN
 YKTTTPV
 LDSDGSFFFLYSLKLTVDKSRWQQCNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図 62】

図 62

Figure 62

MPPLAPLLCIALLPALAAARGPRCSQPGETCLNGGKCEAANGTEACVCGGAFVGPRCQDP
 NPCLSTPCKNAGTCHVDRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCCRNGTC DLL
 TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPANCNGQCCLPFEASYIHCPCPSFHGPTCRQDV
 ECGQPGPLCRHGGTCNEVGSYRCVRATHGPNCRPERPYVPCSPSPCQNQGTCRPTGDT
 HECACLPGTGTQNCNEENIDDCPQNCNCKNGGACVGDVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECQ
 LMPNAQNGGTCNTHGGYVCVNWTGECDEDCSENIDDCASACFHGATCDRVAESE
 CPHGRTGLLCHLNDACISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSCYTGTPACSDQVDECSLGA
 NPCEHAGKINTLGSFECQCLQYGTGPRCEIDVNECVSNPCQNDATCLDQIGEFQCI
 CMPGYEVHCEVNTECASSPCLHNGRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLQYDQVDE
 CASTPCKNG
 CDKTHTCPCPAPELLGCPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWY
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISK
 KGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENN
 YKTTTPV
 LDGSFFFLYSLKLTVDKSRWQQCNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図 6 3】

図 63

Figure 63

MPPLAFLCLALLPALAARGPRCSQFGETCLNGGKCEAANGTEACVGGAFVGPRCQDP
 NPCLSTPCKNAGTCHVDRRGVADYACSCALGFSGPLCLTPLDNACLTNPCCRNGTC DLL
 TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPANCANGQQCLPFEASYIICHCPESFHGPCTQCDVN
 ECGQKPGLCHRGGTCHNEVGSYRVCRAHTGPNCRPVPVCPSPCQNGGCRPTGDVT
 HECACLPGFTGQNCEENIDDCPGNNCKNGACVVDGVNTYNCRCPPEWTGQCYTEDVDECQ
 LMPNACQNGGTCHNTHGCGVNCVNGWTEGDCSENIDDCASAACFHGATCDRVA SFYCE
 CPHGRGTLCLLNDAISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPGTYGHDPTCLSGA
 NPCEHAGKINTLGSFECQCLQGYTGPCEIDVNVCVSNPNCQNDATCLDQIGEFCICMP
 GYEGVHCENNTDECASSPCLHNRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVPDECASTPCNG
 AKCLDPNTYTVCVTEGTYGTHCEVDIDEBCDPDPCHYGSCKDGATFTCLCRPGYTHHC
 ETNINECSSQPCRGHTQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSCTCLDKID
 GYECACEPGYTGSMCNINIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPTCLSEVN
 NSNPVCVHGACRDSLNGYKCDCDPGWSGTMCDINNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVCTCR
 EGFCSPNQTNINECASNPCLNGTCIDDVAGYKCNCLPYTGVATCEVVLAPCAPSPCRN
 GGECPQSEDYESFSCVCPGTVQWQQTCEVDINECVLSPCRHAGSCQNTHGGYRCHCQAGYS
 GRNCETDIDDCRPNPCHNGGSCTDGINTAFCDCPGLFRGTFCEEDINEDLCPGEPKSCDK
 THTCPCPAPFLLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 EVHNAKTKPREEQNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 KAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKT
 PSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【図 6 4】

図 64

Figure 64

MPPLAFLCLALLPALAARGPRCASAACFHFATCDRVASFYCECPHGRGTLCLLNDA
 CISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPGTYGHDPTCLSGA PCHEAGKINTLGS
 FECQCLQGYTGPCEIDVNVCVSNPNCQNDATCLDQIGEFCICMPGYEGVHCEVNTDECAS
 SPCLHNRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVPDECASTPCNGAKCLDGPNNTYTCVCTE
 GYGTGTHCEVDIDECDPPCHYGSCKDGATFTCLCRPGYTHHCETNINECSSQPCRHGG
 TCQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
 INIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPTCLSEVN ECNSNPVCVHGACRDSLNG
 YKCDCPGWSGTMCDINNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVCTCRGFSGPNCQTNINECA
 SNPCLNQGTCDIVAGYKCNCLPYTGVATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSCV
 CPTGWQGQTCEDVINECVLSPCRHAGSCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDLCPGEPK
 SCDFKHTCPCPAPFLLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKT
 PSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【図 6 5】

図 65

Figure 65

MWGKCLFWAVLVTATLCTARCASAAFCHFATCDRVASFYCECPHGRGTLCLLNDA
 ISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPGTYGHDPTCLSGA PCHEAGKINTLGS
 ECQCLQGYTGPCEIDVNVCVSNPNCQNDATCLDQIGEFCICMPGYEGVHCEVNTDECAS
 SPCLHNRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVPDECASTPCNGAKCLDGPNNTYTCVCTE
 GYGTGTHCEVDIDECDPPCHYGSCKDGATFTCLCRPGYTHHCETNINECSSQPCRHGG
 TCQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
 INIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPTCLSEVN ECNSNPVCVHGACRDSLNG
 YKCDCPGWSGTMCDINNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVCTCRGFSGPNCQTNINECA
 SNPCLNQGTCDIVAGYKCNCLPYTGVATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSCV
 CPTGWQGQTCEDVINECVLSPCRHAGSCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDLCPGEPK
 SCDFKHTCPCPAPFLLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKT
 PSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【図 6 6】

図 66

Figure 66

MPPLAFLCLALLPALAARGPRCASAACFHFATCDRVASFYCECPHGRGTLCLLNDA
 CISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPGTYGHDPTCLSGA PCHEAGKINTLGS
 FECQCLQGYTGPCEIDVNVCVSNPNCQNDATCLDQIGEFCICMPGYEGVHCEVNTDECAS
 SPCLHNRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVPDECASTPCNGAKCLDGPNNTYTCVCTE
 GYGTGTHCEVDIDECDPPCHYGSCKDGATFTCLCRPGYTHHCETNINECSSQPCRHGG
 TCQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
 INIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPTCLSEVN ECNSNPVCVHGACRDSLNG
 YKCDCPGWSGTMCDINNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVCTCRGFSGPNCQTNINECA
 SNPCLNQGTCDIVAGYKCNCLPYTGVATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSCV
 CPTGWQGQTCEDVINECVLSPCRHAGSCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDLCPGEPK
 SCDFKHTCPCPAPFLLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKT
 PSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【図 6 7】

図 67

Figure 67

MWGKCLFWAVLVTATLCTARCASAAFCHFATCDRVASFYCECPHGRGTLCLLNDA
 ISNPNEGSNCDTNPVNGKAICTCPGTYGHDPTCLSGA PCHEAGKINTLGS
 ECQCLQGYTGPCEIDVNVCVSNPNCQNDATCLDQIGEFCICMPGYEGVHCEVNTDECAS
 SPCLHNRCRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVPDECASTPCNGAKCLDGPNNTYTCVCTE
 GYGTGTHCEVDIDECDPPCHYGSCKDGATFTCLCRPGYTHHCETNINECSSQPCRHGG
 TCQDRDNAYLCFCLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGSMC
 INIDECAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEGYHDPTCLSEVN ECNSNPVCVHGACRDSLNG
 YKCDCPGWSGTMCDINNNECESNPVCVNGGTCMDTSGVCTCRGFSGPNCQTNINECA
 SNPCLNQGTCDIVAGYKCNCLPYTGVATCEVVLAPCAPSPCRNGGECRQSEDYESFSCV
 CPTGWQGQTCEDVINECVLSPCRHAGSCQNTHGGYRCHCQAGYSGRNCETDIDLCPGEPK
 SCDFKHTCPCPAPFLLGGPSVFLFPFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQNSTRYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 AKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKT
 PSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【 図 6 8 】

68

Figure 68

MPPLAFLLCLALLPALAARGPRCASSPCLHNRCLDKINEQFCPCPTGFTGLHQYDVE
ECASTPKCKNCAKCLDPNITYTCVTEGYTOTHCEVINDECDPDCPHVGSCDKGDVATFTCL
CRPGPYTCHHHCTINNECNSQSPCRHGCTCQDRDNAYLCFLKGTTGPCEINLNDHCCASSP
D5GCLTDLKIDGVECEACPGYTGSMCNINIDEACGNPHNGGTCEDINGFTCRCPGEYHD
PTCLSEVNENCSNPVCVHGACRDSLNGYKCDCPGWSTGNCINNNCECESNPVCVNGTCKD
MTSGYVCTCREGFGSPNCQTNINECASNPCLNQGTICDDVAGYKCNCLPVTGATCEVUL
AECAPSPCRNGGBCRQSDEYESFSCVCPGWWQCGTCVENDEVCLSPRGASCQNTHHG
YRCHQAGYSGRNCETDIDCERPNPCHNGSCTDGINTAFCDCLPGFGRFTCEDINEDP
GPGEPEKSDCKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLPPPKPDLMISRTPEVTVVVVDSHEDPE
YKFNWYVVDGVVHNAAKTKPREREQYNTSYRVVSVLTVLHODWLNKEKEYKCVSNKAHLAPI
EKTTSKAKGQPREPVCPYTLPPSRDELTKNQVSLLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYK
TTPPVPLSDGSFFLY9KLTVDKSRWQCGNVFSCSVMFALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 6 9 】

69

Figure 69

MWGWKCLLFWAVLVATLCTARCASSPCLHNGRCLDKINEFQCECPGFTGHLCQYDVDE
CASTPCPKNGAKCLLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLC
RPGYTGHCTEINBCSSQPCRHGGTCDRDNAYLFCFLKGTTGPNECINLDDCASSPHD
SGTCLDKD1GCEVACEPYGTMSCNMINIDEAGNPCHNGGTCEDGINGFTCRCPGEYHDP
TCLSEVNCECNSPNCVHGACDLSNGYKCDCPGWSGTCNDINNNCECESPVNGGTCMDM
TSGYVCTCRGFGSPGNQCTNINECASNPLCNQGTCIDDVAGYKCNCLLPYTGATEVVLIA
PCAPS,PCRNNGKURQSEDEYESPVCSPCTGWQGQTCEVINECVLSPCRHGAQSQNTKHGGY
RCHCQAGYSGRNCETDIDDCRPNCFHNGGSCTDGINTAFCDCLPGFRGTCCEEDINEDPLG
FGEPKSDCKTHTPCPAPPELLGGPSVLFPPPKPKTDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEV
FKNYWJDGEVEVNAKTKPREEQYNNTTRVSVLTLHQDWLNGKCYKCKVSNKALFAPIE
KTISKAKGQPREEQYVTLPPSRDELTKNQVSLLTCLVKGFYPSDIAWEVEWSNQGPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDSRWWOOGNFESCSVMEHALHNHYTOKSLSI,SPCK

【 図 7-2-A 】

图 72A

Figure 72A

【図70】

図 70

Figure 70

MPPLLAFLCLALLPALAARGPRCAASPCRNAGANCTCDVDSYICTCPAGFGSHCENNTP
DCTESCSFCNGGTCVDGINSPTCLCPGGFTGSYQCQHDVNECDQSPLGLHGTGCGDGSYRC
TCPQGVGPQNCNLVWHDDSPCKNGKGCQPLQHTQYRCCEPSCWGLTGYCDVPSVCVEA
QRQGVDFARLQCQHGLCVDAGNTTHCRCQAGYTGSCEDLWUDRCSPSCPNQGATCTDYLG
GYSCKCVAGYHGVCNCESEIDECILSHPCQNGGTCLDLPNTYKCSCPRTGTVGHCEINVDDC
NPPVDPVSRSPKCFNNGTCTCDVQGGY5CTCPGPGVGERCEGQDVNECLSNPCDARTQNCV
QRVNDHFCECRAGHTRCRCEVSINQGKGPKCKNGGTCAVASNTARFICKCPCAGFEGATC
ENDARTCGSLRCLNGGTISGSPRSPTCLCLGPFTGPECPQFCPPASSPCLGGNPYCQNGDT
TSESPFVRCCLCPAKFNGLLCHILDYSGFDLGPGEPKSCDKUTHTCPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKD7LMSRTPETVTVVVDDVSHEDPEVKIHWYDGEVEHNAKTKPREEQYNTSYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
USLTLCKVGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRLRNQGNV
FSCSVMHEALTHNHYTKOSSLSPCK

【図 7-1】

图 71

Figure 71

EWGKCLLFWAVLTATLCTARASCDPGRNGANCSTDVSDYSTCTCPAGFSGTICENNTPD
CTESSCFNNGTCVGDSNFTCLCPGFTGSYQCHDVNECDSQPCPLHGGTCDVPSVSCEVAQQ
CPQGYTCRPNCONLYHWCDSPCKNGKCWTHTQYRCCEPSWGTLYCDVPSVSCEVAQQ
RQGVDVDARLQCQHGCLCVDAGDNTHHCRQCAGYTGSYCEDLDVECSPSPCQNGATCTDYLQQ
YSCCKVAGYHGNCSEEDIECLSHPCQNNGTCLDLPTNYKCCSPRGQTGVHCEINVDON
PPVPDVPSRSFKCFNNGTCVDQVGGYSCTCPGPGFVRGRFCGDVNECLSNPCDARGTQNCGV
RVNDFHCECRAGHTGRCESVINGCKGPKCNGKTCAVASNTARGETICKPCAGFEGACTE
NDARTCGLSLRNCGTCISGPRTSPLCLPGFTPEQCPQFASSPCLQNGNPVNQGTCTEP
SESPFYRLCPAKFNGLCHILDSYFGDLPGPGEPKSCKDTCTPPCPAPAEELLGEGSVLF
PPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVYDGEVETHNAKTKPREEFYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVQYTLPPSRDELTKNQV
BLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTPPVLSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQOGNWF
SCSMHEALINHYTOKSLSLSPGK

【図72B】

図 72B

Est. 528

【 図 7 3 】

73

Figure 73

(図 7-4-A)

74A

Figure 74A

1 atgcggccgc tccctggccgc cttgtcttcg ctggcgctgc tgccccgcgt cgccgcacga
61 ggccgcgcgt gtccttccaa cgggtggatc tgccatgtg ggccggatgt tgaaaggatgt
121 aatggcgggg aggcgttgtt ctggggggc gtcttcgttg cggccggatgt ccggccggcc
181 aaccggccgt tcagcacccc ctggcaaaac gggccggatgt ccacatgggt ggaccggcc
241 ggccggggac actatgtttt cttgtttttt ctggggggcc ctggggggcc ctggccggcc
301 cccctggatc atggccgtcc caccaaaaac ttggccaaac gggccggatgt ggccggatgt
361 acggcggtt aglataaagtgt cttgtttttt cccgggtttt cggccggatgt ggccggcc
421 ggtttttttt ggccgtttttt cccttgcggcc agatggggcc aggtttttttt ctggggggcc
481 tccatcatctt gccatgtttt ccggccgttc catggcccca cttggggccca tggttttttt
541 gagttttttt aagaatgtttt ggtttttttt cccggggccaa cttggggccca tggttttttt
601 tccatcatctt ggtttttttt ggccatccatc agttttttttt ctggggggcc ggccggatgt
661 cccgttgcattt cttgtttttt cccggggccaa cttggggccca tggtttttttt
721 cccatggatc cttgtttttt cccggggccaa agttttttttt cccggggccaa tggttttttt
781 tgccggggaa acaactttttt cccggggggcc gttttttttt cccggggccaa caccatccaa
841 tgccggggcc cggccggatgtt gacgggtttt tttttttttt cccggggccaa tggttttttt
901 cttgtttttt atgtccatccaa gggccggggcc atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
961 tgccggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1021 aacggccgtt gttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1081 tgccatccatc gggccggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
1141 tgatggggcc gttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1201 cccctggggatc acacggggcc cttgtttttt cccggggccaa tggtttttttt cccggggccaa
1261 aacccggccatc aacatggggcc cttgtttttt cccggggccaa tggtttttttt cccggggccaa
1321 cccggggccatc acacggggcc cttgtttttt cccggggccaa tggtttttttt cccggggccaa
1381 tgccggggcc acggccatccaa cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1441 ggccatggggcc gttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1501 cacaatggggcc gttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1561 actggggccatc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1621 gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1681 aacggccatggggcc atttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1741 aacggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1801 gagccatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
1861 cccggggccatc octaaatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
1921 aacccggatgtt atccggccatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
1981 ggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2041 gagttttttt gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2101 acctggccatc gggccggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2161 aacggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2221 tgccatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2281 cttgtttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2341 gagggccatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2401 ctggccatccaa gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2461 lacatccaaatc cccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2521 gggccatggggcc gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2581 ggccatggggcc agggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2641 gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2701 gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2761 tccgtttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggtttttttt cccggggccaa
2821 ttgtttttttt gggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
2881 acatccatccaa tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
2941 ttcccccggggcc aacccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa
3001 ggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt
3061 ggccatggggcc tttttttttt cccggggccaa atttttttttt cccggggccaa tggttttttt

【 図 7 4 B 】

☒ 74B

Figure 74B

【図75】

图 75

Figure 75

【 図 7 6 】

図 76

Figure 76

【 四 7 7 A 】

図 77A

Figure 77A

1 atccgcggcgc cctggggccgccc cccgtcttcgc ctggcgctgc tgccccggcgat cgccggcaca
61 ggccgcggat gtgcgtggcgc cgccgttgcgc caaggcgccca ctggcgartga cggtgccatgc
121 tccctttactt ggggggtggcc ctatggggcc acggatgtgc ttgtgcacat caaccgcac
181 tggatcggaa accctttgtaa ggagggttgc aacttgtatca caaccatgtt caatggcaag
241 ggccatgttt ctggccggcc ggggatcaccc aatgggggttgc acggggcgat gtacggatgg ctgtatggat
301 tggatgtttt ggccggcaacc cttggcgtatca ggccggatgg acgtatccaa cttggggggcc
361 ttccgtatcc aggtttgttcg ggccgttacccggggccggatggatgtttccggatcc
421 tccgtttttt accgtttgtccaa gaaacgcggcc accgttgcgttccggatggatgtttccggatcc
481 tggatcggcc ccggccggatcc ggagggttgc aacttgtatca tccaaacanaga caatggatgg
541 agccggccctt gcttgcggaaa ccggccggcc tccggccgtttccggatggatggatgtttccggatcc
601 tggcccccacgg qtttcaactgg gcaatcgttgc cagttatgttccggatggatggatgtttccggatcc
661 cttccgtttttt atttgggtttcaaa ggccggatgg ggccggccaaa cttttatccatggatggatgtttccggatcc
721 gagggatcca cggggggccggc cttccggatgg acatccatggatggatgtttccggatcc
781 cttactatggatcc ttccggatggatggatgtttccggatcc
841 accggggccatcc accgttgcggcc aatccatggatggatgtttccggatcc
901 ggccatgtttcc accggccggcc caatccatggatggatgtttccggatcc
961 ccataactttttt aatggatccatggatgtttccggatcc
1021 ttggatcggatcc tttccggatcc
1081 accatccatggatggatgtttccggatcc
1141 ggccatcatggatccgttccggatcc
1201 gggttcaatggatggatgtttccggatcc
1261 gggttcaatggatggatgtttccggatcc
1321 ttggatcggatcc aatccatggatggatgtttccggatcc
1381 gggttcaatggatggatgtttccggatcc
1441 gggttcaatggatggatgtttccggatcc
1501 aatccgtttttt tttccggatcc
1561 ggccatgtttcc accggccggatcc
1621 ttggatcggatcc
1681 accggccgttcc accggccggatcc
1741 cggccggatcc accggccggatcc
1801 ttggatcggatcc aatccatggatggatgtttccggatcc
1861 gggttccggatcc aatccatggatggatgtttccggatcc
1921 aacggggccatcc tttccggatcc
1981 aacggggccatcc tttccggatcc
2041 ggccatgtttcc tttccggatcc
2101 aatccgtttttt tttccggatcc
2161 ttggatcggatcc
2221 ttggatcggatcc
2281 gagccatggatcc
2341 ttggatcggatcc
2401 tttccggatcc
2461 ggccatgtttcc accggccggatcc
2521 aacggggccatcc tttccggatcc
2581 aacggggccatcc tttccggatcc
2641 ggccatgtttcc accggccggatcc
2701 ttggatcggatcc
2761 cttccggatcc tttccggatcc
2821 cttccggatcc tttccggatcc

【 四 77 B 】

図 77B

Figure 77B

【 义 7 8 A 】

図 78A

Figure 7a

〔 78B 〕

图 78B

Figure 78B

〔 図 7 9 〕

图 79

Figure 79

【 四 8 0 】

図 80

Figure 80

【 図 8 1 】

81

Figure 8I

【図 8 2】

図 82

Figure 82

1 atgtggggctt ggaagtgcctt ccttttctgg gctgtgtgg tcacagccac tctctgact
 61 gcaaggatgtc caatgtgaccc ctggccaaac ggggccaaat gcacggactt ctgtgacago
 121 taaaatcgca ctggcccccgg agggcttcacg gggatccat gtgagaacaa caagccctac
 181 tggccatggaa gtccttgctt caacgttggg accttggggg acggccatca ctgttccacc
 241 tggctgttgc caccgggtt caccggatgg tactggcagc acgargtcaa tgatgtggc
 301 tcaacggccctt gcttgcattgg cgacccatgtt cggacgggtt ggggttctta tgatgtggc
 361 tggccctttagg gttatctggg cttcaatggc cggacatgg tggactgtgg tgatgttcc
 421 ctgtgtggaa acggccggcaaa atgtggcag accccacaccg agtacatggg cggatgtggcc
 481 acggggatggg ccggccctta ctggcagatgg cccaggatgtt ccgtgtgggg ggtctgggg
 541 cgacaaatggg ttggatgttc cggccgttgc tagatgggg ggctctgtt ggacqeqggc
 601 aacacgacacttgcggcccttgg
 661 gacggatgttgc caccggatgg cttggccatgggggggggggggggggggggggggggggggg
 721 taactctgttgc agtggatgttgc cggatccacgggggtgttttttttttttttttttttttttt
 781 tggcccttccca accccatcca gggccatgggggggggggggggggggggggggggggggggg
 841 tggccctggcc caacggggccatgg
 901 cccccccatgg
 961 cttgg
 1021 gatgtggatgg
 1081 gggccatgg
 1141 gttcaatgg
 1201 aacacggccatgg
 1261 aatggatgttgcggccatgg
 1321 cccggccatgg
 1381 gggccatgg
 1441 tccggatggatgg
 1501 atcttggatgttgcggccatgg
 1561 cacatggatgg
 1621 cccccaaaaacccggggatgg
 1681 gggggatgg
 1741 gggccatgg
 1801 aggtggatgg
 1861 tccggatgg
 1921 cgaaatgg
 1981 aggtggatgg
 2041 ttt
 2101 ttt
 2161 tcatgtgttgcggatgtgtgttt
 2221 ttt

【図 8 3】

図 83

Figure 83

MQPPSLLLLLCLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGTCLSLSGQGTQCAGPFLGE
 TCQFPDPQCNAQLCQNGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTLPGFTGERCQALED
 PCPPSFCSKRGCHIQASGRPQCSMPGWTEQCQLRDFCSANPCVNGVCLATYPQIQC
 HCPGPFEHACERDVNECPDPGCPKGTSCHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
 RGCSNNGTCQLMPEDSTFHCLCPGPFGTQDCEVNPDCNCVSHQCCQNGGTQDGLDTYTC
 LCPETWTGWDSEDVDCETQGPHCRNGGTQNSAGSFHCVCGWGGTSCENEILDDCI
 AATCPAGSTCIDRVSFSCLCPGRTGLLCHLEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLC
 QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCBEHGGSCLNTPGSFNCLCPGVTGSRCEADHNECL
 SQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGPGLQCEVETNECASAPCLNHADCHDILLNGFCICL
 PGFSGTRCEEDIDEDELGPGEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLPPPFPKDTLMISRT
 PEVTCVV/DVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKKVSNKALPAIEKTISAKAGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYFVPSD
 IAVENESNQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMHEALHNHY
 TCKSLSLSPKG

【図 8 4】

図 84

Figure 84

DLGPEPKSCDKTHTCPBPAPELLGGPSVFLFPFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYDGVVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

【図 8 5】

図 85

Figure 85

QPPSLLLLLCLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGTCLSLSGQGTQCAGPFLGET
 CQFPDPQCNAQLCQNGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTLPGFTGERCQALED
 CPPSFCSKRGCHIQASGRPQCSMPGWTEQCQLRDFCSANPCVNGVCLATYPQIQC
 CPPGPFEHACERDVNECPDPGCPKGTSCHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
 GCSNNGTCQLMPEDSTFHCLCPGPFGTQDCEVNPDCNCVSHQCCQNGGTQDGLDTYTC
 CPEWTGWDSEDVDCETQGPHCRNGGTQNSAGSFHCVCGWGGTSCENEILDDCI
 ATCPAGSTCIDRVSFSCLCPGRTGLLCHLEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLC
 PGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCBEHGGSCLNTPGSFNCLCPGVTGSRCEADHNECL
 QPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGPGLQCEVETNECASAPCLNHADCHDILLNGFCICL
 GFSGTRCEEDIDEDELGPGEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLPPPFPKDTLMISRT
 PEVTCVV/DVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKKVSNKALPAIEKTISAKAGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYFVPSD
 IAVENESNQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMHEALHNHY
 TCKSLSLSPKG

【図 8 6】

図 86

Figure 86

MQPPSLLLLLCLCVSVVRPRGLLCGSFPEPCANGTCLSLSGQGTQCAGPFLGE
 TCQFPDPQCNAQLCQNGSCQALLPAPLGLPSSPSPLTPSFLCTLPGFTGERCQALED
 PCPPSFCSKRGCHIQASGRPQCSMPGWTEQCQLRDFCSANPCVNGVCLATYPQIQC
 HCPGPFEHACERDVNECPDPGCPKGTSCHNTLGSFQCLCPVGQEGPRCELRAGPCPP
 RGCSNNGTCQLMPEDSTFHCLCPGPFGTQDCEVNPDCNCVSHQCCQNGGTQDGLDTYTC
 LCPETWTGWDSEDVDCETQGPHCRNGGTQNSAGSFHCVCGWGGTSCENEILDDCI
 AATCPAGSTCIDRVSFSCLCPGRTGLLCHLEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLC
 QPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCBEHGGSCLNTPGSFNCLCPGVTGSRCEADHNECL
 SQPCHPGSTCLDLLATFHCLCPGPGLQCEVETNECASAPCLNHADCHDILLNGFCICL
 PGFSGTRCEEDIDEDELGPGEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLPPPFPKDTLMISRT
 PEVTCVV/DVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKKVSNKALPAIEKTISAKAGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYFVPSD
 IAVENESNQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCVMHEALHNHY
 TCKSLSLSPKG

【図87】

図87

Figure 87

MQPPSLLLCLLCVSVVRPRGLL CIAATCAGPSTCIDR VGSFSCLCPPRTGLL CH
 LEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQCPHGSTCLDLLATFHLCLCPLEGQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNGFQCICLPGPSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPG
 AFHKCLCPGFEQPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFCCLCPGFTGQLCVEVPLCAP
 NLCPQKQICKDQKDANCLCPDGSPGCAFPEDNCTCHHGCORSSCVCDVGTPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCCTPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 YCTCPSSHTGFCQGTCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 TCVNRPGTFSCSLAMGFGPRCEGKLRLPCADSPCRNATCQDSCPGPRLCPTGTYG
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDV
 CHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
 PSVFLFPPPKPDLMISRTPEVTCVIVDVSHEDPEVKFNWYWDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQDENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG

【図88】

図88

Figure 88

MQPPSLLLCLLCVSVVRPRGLL CIAATCAGPSTCIDR VGSFSCLCPPRTGLL CH
 LEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQCPHGSTCLDLLATFHLCLCPLEGQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNGFQCICLPGPSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPG
 AFHKCLCPGFEQPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFCCLCPGFTGQLCVEVPLCAP
 NLCPQKQICKDQKDANCLCPDGSPGCAFPEDNCTCHHGCORSSCVCDVGTPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCCTPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 YCTCPSSHTGFCQGTCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 TCVNRPGTFSCSLAMGFGPRCEGKLRLPCADSPCRNATCQDSCPGPRLCPTGTYG
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDV
 CHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
 EDPEVKFNWYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQ
 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRSRQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG

【図89】

図89

Figure 89

MWGWCCLLFWAFLVTATLCTAR CIAATCAGPSTCIDR VGSFSCLCPPRTGLL CHLED
 MC LSOPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQCPHGSTCLDLLATFHLCLCPLEGQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNGFQCICLPGPSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPG
 AFHKCLCPGFEQPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFCCLCPGFTGQLCVEVPLCAP
 NLCPQKQICKDQKDANCLCPDGSPGCAFPEDNCTCHHGCORSSCVCDVGTPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCCTPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 YCTCPSSHTGFCQGTCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 TCVNRPGTFSCSLAMGFGPRCEGKLRLPCADSPCRNATCQDSCPGPRLCPTGTYG
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDV
 CHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
 PSHTGPQCQTSTDYCVSACPCFNGGTCVNRPGTFSCCLCAMGFGQPRCEGKLRLPCADSPCR
 NRATCQDSQGPGRCLCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 PLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLG
 PGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDLMISRTPEVTCVIVDVSHEDPEV
 KFNWYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQ
 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRSRQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG

【図90】

図90

Figure 90

MQPPSLLLCLLCVSVVRPRGLL CIAATCAGPSTCIDR VGSFSCLCPPRTGLL CH
 LEDMCLSPQCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQCPHGSTCLDLLATFHLCLCPLEGQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNGFQCICLPGPSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPG
 AFHKCLCPGFEQPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFCCLCPGFTGQLCVEVPLCAP
 NLCPQKQICKDQKDANCLCPDGSPGCAFPEDNCTCHHGCORSSCVCDVGTPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCCTPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 YCTCPSSHTGFCQGTCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 TCVNRPGTFSCSLAMGFGPRCEGKLRLPCADSPCRNATCQDSCPGPRLCPTGTYG
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDV
 CHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
 DSPPCRNATCQDSQGPGRCLCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 QWWTGPCLNLPLOSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVN
 NPCESRPCONGATCMAQPSGYLQCQCAPGVDGQNCSEKELDACOSQPCNNHGTCTPKPGF
 CACPPGFVGLRCEGDVIECLDQCPCHPTGTAACHSLANAFYQCLPGHTGQWCEVIEDPCH
 SQPCFFGGTCEATAGSILGFICHCPKGPEGPTCSHRAPSCGFFHHCHGGGLCPSPKPGFP
 PRCACLSGYCCPDCLTTPAPKCGGPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGPRCSCPFFSSPGPRCQ
 KPGDLPGEPEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDLMISRTPEVTCVIVDV
 HEDPEVKFNWYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 LPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQ
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRSRQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG

【図91】

図91

Figure 91

MWGWCCLLFWAFLVTATLCTAR CIAATCAGPSTCIDR VGSFSCLCPPRTGLL CHLED
 MC LSOPCHGDAQCSTNPLTGSTLCLCQPGYSGPTCHQDLDECLMAQQGSPCEHGG
 SCLNTPGSFNCLCPGTYGSRCEADHNECLSQCPHGSTCLDLLATFHLCLCPLEGQLCE
 VETNECASAPCLNHADCHDLNGFQCICLPGPSGRCEEDIDECRSSPCANGGCQDQPG
 AFHKCLCPGFEQPRCQTEVDECLSDPCVGASCLDLPGAFCCLCPGFTGQLCVEVPLCAP
 NLCPQKQICKDQKDANCLCPDGSPGCAFPEDNCTCHHGCORSSCVCDVGTPECEAE
 LGGCISAPCAHGGTCYPQPSGYNCCTPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 YCTCPSSHTGFCQGTCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 TCVNRPGTFSCSLAMGFGPRCEGKLRLPCADSPCRNATCQDSCPGPRLCPTGTYG
 CQTLMDLCAQKPCPRNSHCLQTGPSFHCLCLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDV
 CHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
 PSHTGPQCQTSTDYCVSACPCFNGGTCVNRPGTFSCCLCAMGFGQPRCEGKLRLPCADSPCR
 NRATCQDSQGPGRCLCPTGTYGTCSEEMTACHSGPCLNGGSCNPSPGG
 PLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDSPGSYFCHCPPGFQGSLCQDHVN
 RPCQNGATCMAQPSGYLQCQCAPGVDGQNCSEKELDACOSQPCNNHGTCTPKPGF
 GFVGLRCEDVIECLDQCPHTPTGAACHSLANAFYQCLPGHTGQWCEVIEDPCHSOPCF
 HGGTCEATAGSPGFIChCPKGPEGPTCSHRAPSCGFFHHCHGGGLCPSPKPGFPPRCAC
 LSGYGGPDCLTPAPKGCGPPSPCLYNGSCSETTGLGGPGPRCSCPFFSSPGPRCQKPGD
 GPGEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDLMISRTPEVTCVIVDV
 VKFNWYWDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQ
 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRSRQOGNVFSCSVVMHEALHNHYTOKSLSLSPKG

【図92】

图 92

Figure 92

MQPSSLLLILLLILLCVSVRPGFLLCASAPCLNHADCHDLNLNGFCQCICLPGFSCTRCE
EDIDECCRSPCCANGQQCDQPGHAKCLPGPEGRCQCVEDECLSPCPVGASNCLDTC
AFFCLCSPSGTQLCVPECAPLNCPKQKIDQDKDQKANCLCPDGSPGCAAPPEDNTCHH
GHCQRSSCVCDVGWTGPECEAEALGGCISA/CADHGGCTYQCPQSPGYNCTCPGTGYIGPZCSEE
MTACHSGPCLNNGSCNPSPGGYYCTCPSPHTGPQCQTSTUDYCVAAPCFNGTCVNRPGT
SCLCAMGFGQPRCEKGKLRPSCADSPCRNRATCQDSFGQPRCLCTGVTGGSCTLMDLCA
QKPCPRNSHSLCZTQGSPFHCLCLQWGTPNLNPLSSCKQAALSGQDVSSLNGHGLC
SPGSPPVCHCPGPGQQLSGHDVNPDLGPGEPKSCDKTHTCPCCPAPESLULGGSVPFLFPK
PKDTLMSRTPETVCCVVDVSHLEPWFKNVYWDGVEVHNIAKTKPKEQEYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGCPREPVQYTLPPRSRDELTKNQVSLS
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENNYKTTPPVLDSGFSFLYSLKLTVDKSRSWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 9 3 】

図 93

Figure 93

MWGWKCLLFWAVLVATLCTARCASAPCLNHDCHDLLNGFQC1CLPGFSGTRCEEDIDE
CRSSPCANQGQQDQPGFAFHCKCLPFGEPGRQCQTEVDECLSDCPVQASCLDLPGAFFCL
CPSGFTQGLCVERPLCAPNLCQPKQICKDQKDNALCPDGSPGCPAPPENDCTCHHQCQR
SSCVDCGWTGFCEAEGLGGCISAPCAHGGTYPQCPGSYNTCTPGTYGPTCSEEMTAH
SPGLCNGGSNCNPSPGYYCTCPSPHTCPCQQTSTDVYCSAPCNGGTCVRPCTFSCLCA
MGFQGPGRCEGKLRLPSCADSPCRNRATCQDSPOGPRCLCPTGYTGHSQSCOTLMDLAQAKPCP
RNSHCLQTGPSFHCLCQLQGWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLCVDGSPSY
FCHCPPGQGSLCQDHVNPDGLPGPEPKSCDKHTTCPCPAPELLGGPSVFLPPPKDTL
MISRTPEVTCVVVUVSHEDPEVKFNWYVGDGEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQ
DWLNKGKEYKCKVSNKALPAPTEKTISKAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHMHEA
IHHNYTQKSLSLSPGK

【図 9 6 A】

图 96A

Figure 96A

【図94】

图 94

Figure 94

MQPPSLLLLL~~LL~~LLC~~V~~S~~V~~R~~P~~G~~L~~C~~D~~S~~P~~C~~R~~N~~R~~T~~C~~D~~S~~P~~Q~~C~~P~~R~~C~~L~~C~~P~~G~~T~~Y~~G~~G~~S~~Q~~
TLMDLCAQKCP~~R~~N~~H~~CL~~Q~~TG~~P~~S~~F~~H~~C~~L~~C~~Q~~G~~W~~T~~G~~L~~C~~N~~.PL~~S~~C~~Q~~K~~A~~L~~S~~Q~~C~~I~~D~~V~~S~~L~~H~~
NGCLC~~V~~D~~S~~G~~P~~S~~Y~~F~~C~~H~~C~~P~~G~~F~~G~~S~~L~~Q~~C~~D~~H~~N~~V~~P~~C~~S~~R~~P~~C~~Q~~G~~N~~A~~T~~C~~MAQ~~P~~G~~S~~Y~~C~~Q~~A~~P~~G~~Y~~D~~
QNC~~S~~K~~E~~D~~A~~C~~Q~~S~~P~~Q~~C~~H~~G~~T~~C~~P~~G~~F~~H~~C~~A~~C~~P~~G~~F~~V~~G~~L~~C~~E~~G~~D~~V~~D~~L~~C~~D~~Q~~P~~C~~H~~F~~T~~G~~T~~A~~A~~
CHSLANAFY~~C~~O~~C~~L~~G~~H~~G~~T~~C~~Q~~V~~E~~I~~D~~P~~C~~H~~S~~C~~Q~~P~~C~~F~~H~~G~~T~~C~~E~~A~~T~~G~~S~~P~~L~~G~~F~~I~~C~~H~~C~~K~~P~~G~~F~~E~~
TC~~S~~HRA~~P~~S~~C~~G~~F~~H~~H~~C~~H~~G~~L~~C~~L~~P~~S~~P~~K~~G~~F~~P~~R~~P~~R~~C~~A~~L~~S~~G~~Y~~G~~G~~P~~D~~C~~L~~T~~P~~P~~A~~K~~G~~C~~G~~P~~F~~S~~P~~C~~L~~
NG~~S~~C~~E~~T~~T~~G~~L~~G~~G~~P~~F~~R~~C~~S~~C~~H~~S~~P~~G~~P~~R~~C~~K~~P~~G~~D~~L~~G~~P~~E~~P~~K~~S~~C~~D~~K~~H~~T~~C~~P~~C~~P~~A~~E~~L~~~~GG~~
SVFLFPPPKD~~T~~L~~M~~IS~~R~~T~~P~~E~~V~~T~~C~~V~~V~~D~~V~~S~~H~~E~~D~~P~~E~~V~~F~~N~~W~~Y~~D~~G~~V~~E~~V~~H~~N~~A~~K~~T~~K~~P~~R~~E~~Q~~Y~~N~~
TYR~~V~~V~~S~~V~~L~~T~~V~~L~~H~~D~~W~~L~~N~~G~~K~~E~~Y~~K~~C~~V~~S~~N~~K~~AL~~P~~A~~I~~E~~K~~T~~I~~S~~K~~A~~G~~Q~~P~~R~~E~~Q~~V~~Y~~L~~P~~P~~R~~D~~E~~L~~
TKN~~Q~~V~~S~~L~~T~~CL~~V~~K~~G~~F~~Y~~P~~S~~D~~I~~A~~V~~E~~W~~S~~E~~N~~Q~~P~~E~~NN~~Y~~K~~T~~PP~~V~~L~~D~~S~~G~~F~~F~~FL~~S~~K~~L~~T~~V~~D~~K~~S~~R~~W~~Q~~
QGNVF~~C~~S~~V~~M~~H~~E~~A~~L~~N~~H~~Y~~T~~Q~~K~~S~~L~~S~~SP~~G~~K

【図95】

図 95

Figure 95

MWGWKCLLFWAALVLTATLCTARCADSPCRNRATCQDSPGQPRCLCPGTYTGGSQCTLMDL
CAQKPCPRNSHCLQTGSPSFHCLCQLQWTGPLCNLPLSSCQKAALSQGIDVSSLCHNGGLC
VDSQCSPYFCHCPCPFQGSQSLCDHVNPCSERCPQCNGATCMQPSGYLCQCAGPYDQCNCNSK
ELDACQSQPNCNHNHTCTPKPGFHCAPPGFVGRLCEGDWDCLDECLQCPCHPTGTAAACHSRA
NAFYCQLCPGHTGOWCEVTFDPCHSQCPCFHGGTCBASAGSPLFGICFHCPKGFWGFTCSHLA
APSGCFHHGHHGCLCPSPKGPPRCACLSGYGGPDCLTTPAPKGCCPPSPCLYNGSCS
ETTGLGPGCFRCSCPHSSPGPRTCQPKGDLGPGEPKSCDKTHTCPPCPAPAEELLGGPSVFLF
PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDSHEDPEVFKNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRV
SVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPVQYTLPPSRDELTKNCV
SLTLCVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVF
SCSVMEHALHNHYTQKSLSLSPGK

【図96B】

図 96B

3001 ctaacgtgtg

【図97】

図97

Figure 97

```

1 atgcagcccc_ctcactgtc_gctgtgtcg_ctgtgtgtc_tgtgtatg_tgtctca
61 gtcagaccca gagggtgtc

```

【図98】

図98

Figure 98

```

1 atgtggggctt ggaagtgcctt ccttttctgg gctgtgtcg tcaacggccac tctctgcact
61 gcccgg

```

【図99】

図99

Figure 99

```

gatct gggccccggc
781 gagcccaaattt ctgtgtacaa aactcacaca tgccacccgtt gcccggacc tgaatctcg
841 gggggaccgtt cagttttccctt ttccccccaa aaacccaaagg acacccctat gatccccccgg
901 aactttggccgg ccacatgtgtt ggtgtggaa gttagccacc agagccctgtt ggtcaatgtt
961 aacttgttacg tggacccggcgg qgagggtgtat aatggccaaaga aaaaaggccgg gtagggggag
1021 tacaacgaca cgttccggcgtt ggtagccgttc ctcacccgtt tgcacccggg tttggccgtt
1081 ggcaaggaaat acaactcgaa ggtctccaaac aaagcccttc cagcccccgtt cagaaaaaac
1141 aacttccaaag ccacaaaggcc gcccggacaa coacccgggtt acacccctggc cccatccccgg
1201 gatgtgtgtt gcaaaaccca ggttccggcc accctggccgg tcaaaagggtt cttatcccgac
1261 gacatccggc tggagggtggaa gaccaatgtt cggccggaaa aaactactaca gaccaacgtt
1321 cccqtgttggg acttccggccgg ttcttccatgtt agtccaccgtt ggacaaaggcc
1381 agggtggccggc agggtttttttt ctctatgttcc tccgtgtatgc atgggttctt gcaaaacacc
1441 lacacgacaaga agaccccttc cctgtgtccgg ggtttatgtt

```

【図100A】

図100A

```

1 atgcagcccc_ctcactgtc_gctgtgtcg_ctgtgtgtc_tgtgtatg_tgtctca
61 gtcagaccca gagggtgtcgtt ggtgtggggat ttcccaaaaa cctgtgtccaa tggaggccacc
121 tgcgtgtggcc tgcgtgtggg acaaggggacc tggccatgtt gccctgggtt cctgggggtt
181 aactgtgttgcgtt ttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
241 caaaggccgtt cttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
301 ttcttggttgc tttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
361 cttccgttcc cttccctggcc tttccaaagg gggccggccgg acatccggcc cttccgggtt
421 ccacagggtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg gccatccggcc cttccgggtt
481 tcacggccaaat cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg gccatccggcc cttccgggtt
541 cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa
561 gacccggacc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
621 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
781 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
841 gtcacccgtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
901 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
961 cttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1021 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1081 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1141 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1201 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1321 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1381 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1441 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1501 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1561 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1621 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1681 gtcacccgtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1741 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1801 gggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1861 gggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1921 aactggccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1981 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2041 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2101 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2161 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2221 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2281 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2341 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2401 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2461 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2521 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2581 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2641 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2701 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2761 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2821 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2881 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2941 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
3001 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg

```

【図100B】

図100B

Figure 100B

```

3061 gcaacccgtcc actctctggc caatccgttc taatccgtgtt gttccgttgg accacacaggcc
3121 cttgtgtgttgg aggtggatg agaccccttgc cacacccaaat cttgtgttttttggaggacc
3181 tggccgttccaa cttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3241 gttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3301 ctgtgtccggcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3361 gggggccctgg actctgtgtt cttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3421 ctataccatgg gcaactgtgtt gttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3481 tggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3541 cccaaatccctt gttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3601 gggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3661 ctgtgtccggcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3721 tggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3781 aacccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3841 aaggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3901 tccaaatccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
3961 gatgtgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
4021 atccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
4081 atccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
4141 tggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc
4201 aecggccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc tttccgttcc

```

【図101】

図101

Figure 101

```

1 atgcagcccc_ctcactgtc_gctgtgtcg_ctgtgtgtc_tgtgtatg_tgtctca
61 gtcagaccca gagggtgtcgtt ggtgtggggat ttcccaaaaa cctgtgtccaa tggaggccacc
121 tgcgtgtggcc tgcgtgtggg acaaggggacc tggccatgtt gccctgggtt cctgggggtt
181 aactgtgttgcgtt ttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
241 caaaggccgtt cttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
301 ttcttggttgc tttccctggcc cttccgggtt cccacgttcc cttttccat cttccgggtt
361 cttccgttcc cttccctggcc tttccaaagg gggccggccgg acatccggcc cttccgggtt
421 ccacagggtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg gccatccggcc cttccgggtt
481 tcacggccaaat cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg gccatccggcc cttccgggtt
541 cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa
561 gacccggacc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
621 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
781 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
841 gtcacccgtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
901 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
961 cttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1021 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1081 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1141 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1201 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1321 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1381 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1441 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1501 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1561 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1621 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1681 gtcacccgtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1741 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1801 tccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1861 tccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1921 aactggccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1981 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2041 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2101 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2161 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2221 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1501 tggccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1561 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1621 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1681 gtcacccgtt cttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1741 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1801 tccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1861 tccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1921 aactggccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
1981 ctgtgtccgg tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2041 tttccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2101 gatgtgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2161 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg
2221 atccgttcc tttccgttcc tggatggacaa ggttggaaatg tggatggacaa ggttggaaatg

```

【 図 1 0 2 A 】

図 102A

【図102B】

図 102B

```
3121 gactacaagt qcaaaaggctc caacaaaagcc ctccccggccc ccatcgaaaa aaccatcc  
3181 aaaggccaaag qggggggccggc agaaacccacg tggtttacccc tgccccccatc cggggatcc  
3141 ctggaaaaaa acggatccgt cttgcggctt ctgtggccaaat ggttttcatac cagccgatcc  
3301 ggccgttgaaat ggaaaaagacat tggggccggcagg gggaaaaactt acaayggacccac ggtttttttt  
3361 ttggactgttcc acggcttccct tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt  
3121 cagaacgggg acggcttccct atggccgttg atggatcgggg rttttttttt tttttttttt  
3381 cagaacaaagg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
```

【 図 1 0 3 】

図 103

【 図 1 0 4 】

図 104

【 义 1 0 5 】

105

Figure 105

(図 1 0 6)

图 106

Figure 106

1 atggggggctt ggaagtggtt cttcttttgg ggctgtgtgg tcacaggcac tcttcgtcat
61 gccggatqta ttgtcgccat ctgtggccccgg gggactcaat gatccggacc ggggtggcc
121 ttttcuucggc tttttcccccacccatggggccaa gggactctgtt gggacttgcg agatcatgtt
181 ctgtggccggc ctgtggccatgg gggatggggccaa ggatccgtttt accccctccatgg accggccatca
241 ctgttcgtctt cttatccctggg ccacatggcc accaggacccatgg gggatggcc
301 ctgtggcccc agcaagggccca aegttccctgtt gaaatggccg gtttcgtccat ccaactctt
361 gggtttttttt acttccctgtt tttatccatgg tttatccatgg ecctgtgtt ggttgtatcc
421 atattgtggcc ttccatccaggc ctgtccaccaa gggatggccat gttttttttt gttttttttt gttttttttt
481 ttccatccatgg tttttccggccgg aggctttttttt gggatggccat gggatggccat gggatggccat
541 tgggtccatgg ctttccatggcc gggatggccat gggatggccat accgtttttttt gttttttttt gttttttttt
601 tggatccatggc tgccatggatgg ctccggccacc ctgtttttttt gggatggccat gggatggccat
661 agctttttttt gggatggccatgg gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gttttttttt
721 tgccatccatgg ggccatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccat gggatggccat
781 ccatccatggc tgggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gttttttttt gttttttttt
841 tttttttttt cttccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gttttttttt gttttttttt
901 aaggatcatgg tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gttttttttt
961 gggtttttttt cttccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gttttttttt gttttttttt
1021 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1081 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1141 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1201 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1261 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1321 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1381 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1441 atttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1501 acggccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1561 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1621 cttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1681 gttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1741 cttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1801 cccggccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1861 ctccggccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1921 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
1981 aaggatcatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2041 gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2101 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2161 aaaaatccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2221 tttttttttt gggatggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2281 cccggccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2341 acggccggccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2401 aaggatcatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg
2461 aaaaatccatgg cttccggccacc ctgtttttttt gggatggccatgg

【 义 1 0 7 】

圖 107

Figure 107

(四 108)

図 108

Figure 108

【 义 1 0 9 】

図 109

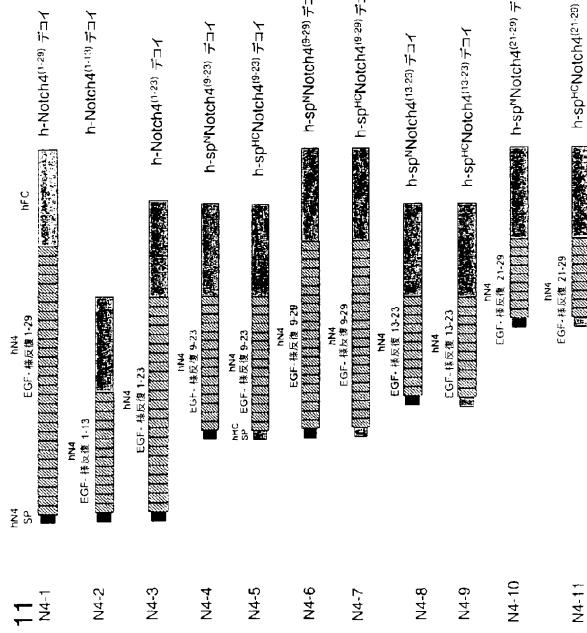
Figure 109

【 図 1 1 0 】

図 110

【 义 1 1 1 】

図 111



(四 1 1 2)

图 112

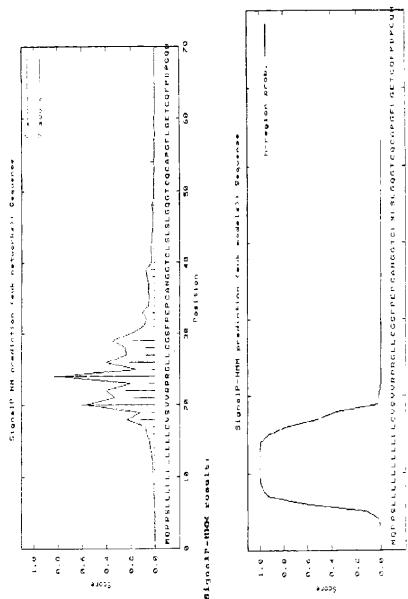


fig. 112

【図 113】

図 113

Fig. 113

ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 1-29)
 ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 9-29)
 ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 21-29)

ヒトN4

cag aaa ccc gga (SEQ ID NO:106)
 gtc ttt ggg cct (SEQ ID NO:107)
 Q K P G (SEQ ID NO:108)

BgII部位の付加

cag aaa ccc gga **GAT CTC** (SEQ ID NO:109)
 gtc ttt ggg cct **CTA GA** (SEQ ID NO:110)
 Q K P G (SEQ ID NO:108)

N4/FC 融合

cag aaa ccc gga GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO:111)
 gtc ttt ggg cct CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO:112)
 Q K P D L G P (SEQ ID NO:113)

【図 114】

図 114

Fig. 114

ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 1-13)

ヒトN4

gat atc gat gag (SEQ ID NO:114)
 cta tag cta ctc (SEQ ID NO:115)
 D I D E (SEQ ID NO:116)

BamHI部位の付加

gat atc gat gag **GAT CC** (SEQ ID NO:117)
 cta tag cta ctc **CTA GG** (SEQ ID NO:118)
 D I D E (SEQ ID NO:116)

N4/FC 融合

gat atc gat gag GAT CTG GGC
 CCG (SEQ ID NO:119)
 cta tag cta ctc CTA GAC CCG
 GGC (SEQ ID NO:120)
 D I D E D L G P
 (SEQ ID NO:121)

【図 115】

図 115

ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 1-23)
 ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 9-23)
 ヒトNotch4デコイ(EGF-LR 13-23)

ヒトN4

cac gtg aac cca (SEQ ID NO:122)
 gtg cac ttg ggt (SEQ ID NO:123)
 H V N P (SEQ ID NO:124)

BgII部位の付加

cac gtg aac cca **GAT GT** (SEQ ID NO:125)
 gtg cac ttg ggt **CTA GCA** (SEQ ID NO:126)
 H V N P (SEQ ID NO:124)

N4/FC 融合

cac gtg aac cca GAT CTG GGC CCG (SEQ ID NO:127)
 gtg cac ttg ggt CTA GAC CCG GGC (SEQ ID NO:128)
 H V N P D L G P (SEQ ID NO:129)

【図 116】

図 116

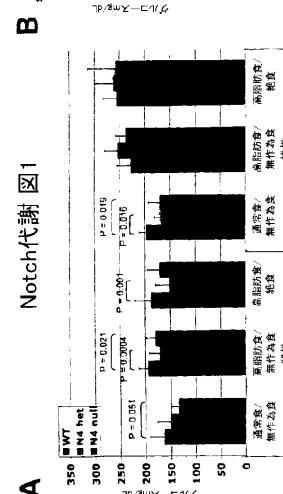
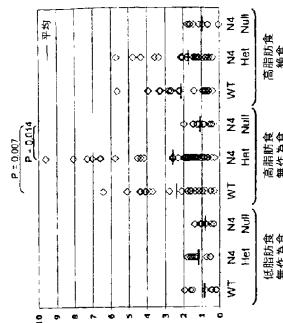
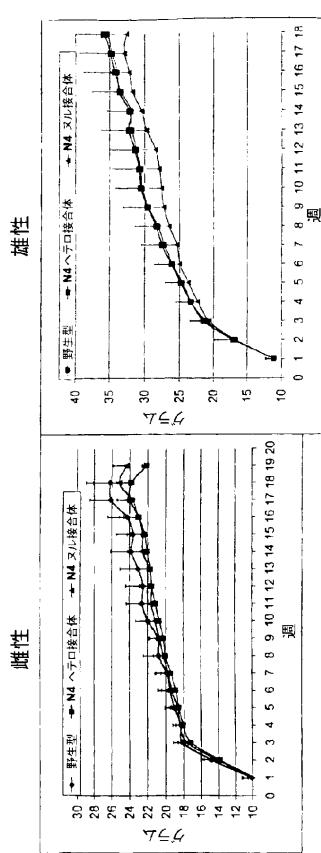


Figure 116

【図 117】

図 117



【図 118】

図 118

Fig. 118

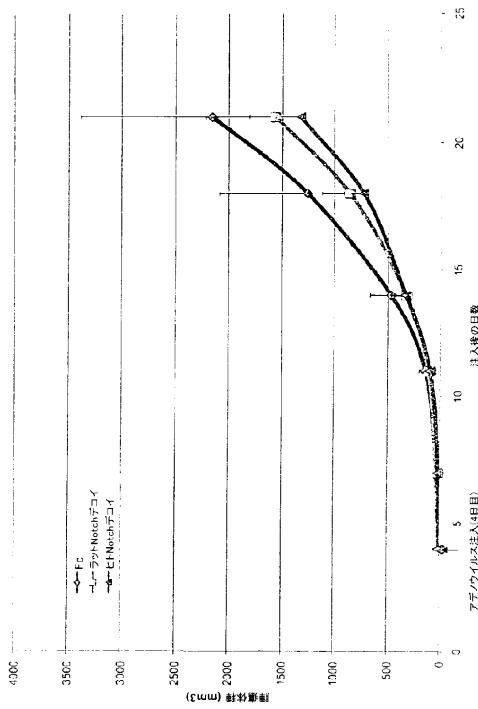


Notch4発現の低下は高脂肪食を与えた
マウスにおける体重増加を抑制した

【図 119】

図 119

Fig. 119 マウスにおけるMm5MT-TGF-β過錫体型の平均



【図 120】

図 120

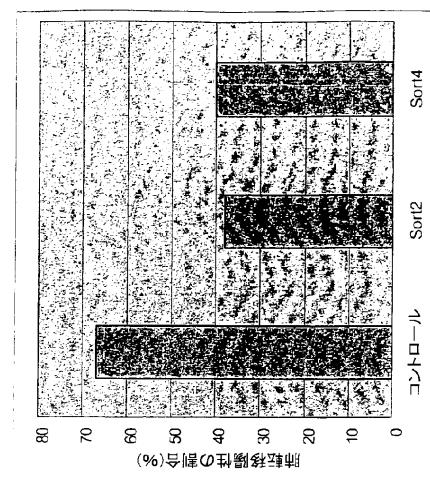
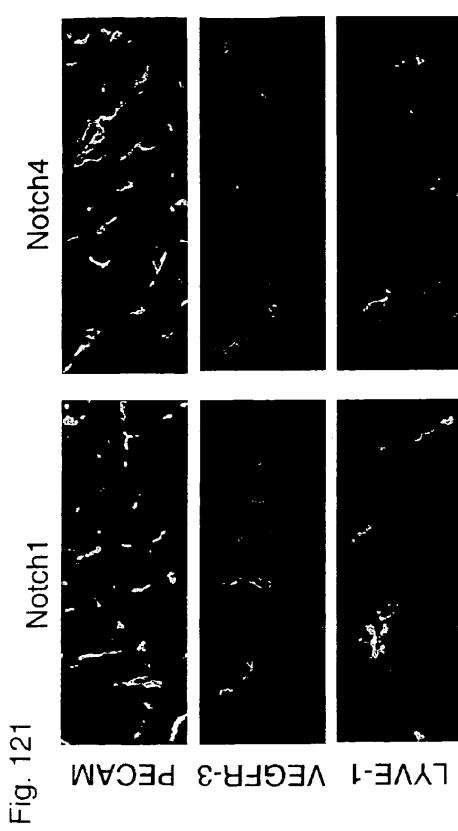


Fig. 120

- コントロール
 - 12の陽性中の8
- ラットNotch1デコイs2:
 - 13の陽性中の5
- ラットNotch1デコイs4:
 - 10の陽性中の4

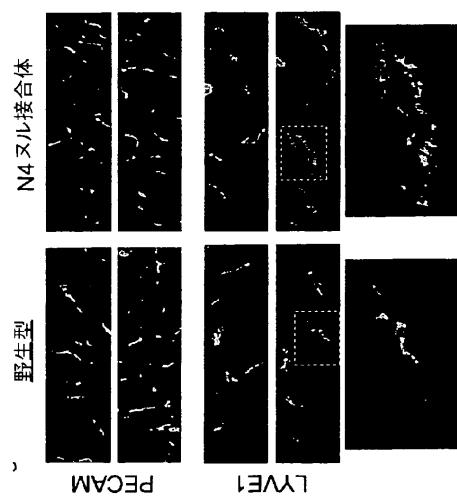
【図 121】

図 121



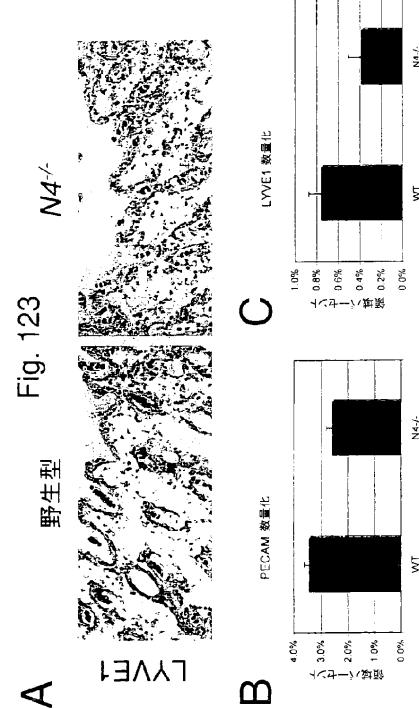
【図 122】

図 122



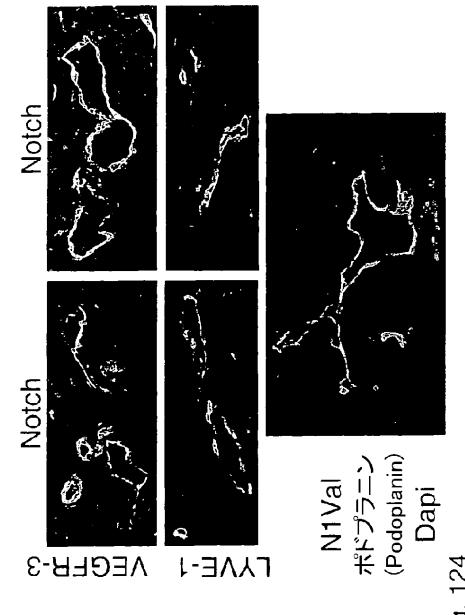
【図 123】

図 123



【図 124】

図 124



【配列表】

2010536855000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/10045
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/705; C07K 16/46; A61K 39/385 (2009.01) USPC - 530/350, 530/391.1, 424/178.1 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) IPC(8) - C07K 14/705; C07K 16/46; A61K 39/385 (2009.01) USPC - 530/350, 530/391.1, 424/178.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 514/12		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ Search terms: notch, notch1, notch\$, PDGF, construct, fusion, HER2/neu, platelet derived growth factor, angiogenesis, administ\$, signal, signaling, label, labeled,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	US 2006/0030894 A1 (KITAJEWSKI et al.) 09 February 2006 (09.02.2006) para [0019]; para [0020]; para [0030]; para [0062]; para [0094]; para [0096]; para [0098]; para [0101]; para [0110]; para [0112]; para [0118]; para [0121]; para [0126]; para [0137]; Fig. 2.	1, 2, 6, 7, 11-18, 74, 75, 79, 80, 86, 87-90 --- 76-78, 81-85, 91-101 26
Y --- A	US 2006/0134121 A1 (THURSTON et al.) 22 June 2006 (22.06.2006) para [0018]; para [0023]; para [0053]; para [0054]; para [0063]; para [0073]; para [0107]; para [0110]; para [0118]; SEQ ID NO: 16.	91-94 --- 26
Y	US 2005/0261477 A1 (CHAMPION et al.) 24 November 2005 (24.11.2005) para [0027]; para [0028]; para [0029]; para [0030]; para [0031]; para [0186]; para [0208]; para [0242]; para [0243]; para [0244]; para [0245]; para [0246]; para [0247]; para [0422]; para [0441]; para [0442]; para [0448]; para [0474]; para [0476]; para [0482]; para [0484].	76-78, 81-85, 99-101
Y	US 2007/0104746 A1 (FUJII et al.) 10 May 2007 (10.05.2007) para [0015]; para [0017]; para [0019]; para [0029].	95-98
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "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 10 February 2009 (10.02.2009)	Date of mailing of the international search report 20 FEB 2009	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/10045						
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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)								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I claims 1, 2, 6, 7, 11-18 and 26-47 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto, wherein the Notch receptor protein is Notch1 receptor protein, with the extracellular domain of Notch1 receptor protein comprising 7 separate EGF-like repeats and the fusion protein comprising 22 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 54-75. For Group I the subspecies are the 7 the extracellular domains of Notch1 receptor protein comprising EGF-like repeats and the fusion protein comprising 22 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 54-75 resulting in 154 possible combinations. The first named invention of the first group is the Notch1 receptor protein with EGF-like repeats 1-36 and SEQ ID:NO:54 and will be searched without an additional search fee.</p> <p>(continued on extra sheet)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input checked="" type="checkbox"/> 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.: 1, 2, 6, 7, 11-18, 26, 74-101 restricted to SEQ ID NO: 54. 								
<p>Remark on Protest</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>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.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	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.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	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.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/10045

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

Group II claims 1, 3, 8, and 11 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch2 receptor protein. If so elected, a search of this group would be restricted to all instances of the Notch2 receptor protein.

Group III claims 1, 4, 9 and 11 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch3 receptor protein. If so elected, a search of this group would be restricted to all instances of the Notch3 receptor protein.

Group IV claims 1, 5, 10, 11, 19-25, and 48-73 are directed to a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein and an Fc portion of an antibody bound thereto wherein the Notch receptor protein is Notch4 receptor protein with the extracellular domain of Notch4 receptor protein comprising 7 separate EGF-like repeats and the fusion protein comprising 26 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 78-103. For Group IV, the subspecies are the 7 extracellular domains of Notch4 receptor protein comprising EGF-like repeats and the fusion protein comprising 26 separate consecutive amino acid sequences represented by SEQ ID NOs: 78-103 resulting in 182 possible combinations. If so elected, the first named invention of the fourth group that would be searched upon payment of additional fees would be the Notch4 receptor protein with EGF-like repeats 1-36 and SEQ ID: NO:54.

Claims 74-101 are generic with respect to any one invention above.

The special technical feature linking Groups I-IV is a fusion protein comprising a signal peptide, an extracellular domain of human Notch receptor protein, and an Fc portion of an antibody bound thereto.

However, Jan et al. (US 2006/0030694) teaches or makes obvious the fusion protein. Thus, the species do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1

フロントページの続き

(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
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
		A 6 1 P 35/04

(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,T
R),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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K
G,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

(74)代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74)代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74)代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘
 (74)代理人 100075672
 弁理士 峰 隆司
 (74)代理人 100095441
 弁理士 白根 俊郎
 (74)代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男
 (74)代理人 100103034
 弁理士 野河 信久
 (74)代理人 100140176
 弁理士 砂川 克
 (72)発明者 キタジュースキー、ジャン
 アメリカ合衆国、ニュージャージー州 0 7 4 5 0、リッジウッド、ヒルクレスト・ロード 3 2
 3
 (72)発明者 ショーバー、キャリー
 アメリカ合衆国、ニュージャージー州 0 7 6 7 6、タウンシップ・オブ・ワシントン、ビーチ・
 ストリート 4 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 BA80 CA04 DA02 EA02 EA04 GA11
 4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA02 BA41 CA53 MA02 NA14 ZA331
 ZA361 ZA401 ZA451 ZA701 ZB261 ZC351 ZC412 ZC422
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74