

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3955352号
(P3955352)

(45) 発行日 平成19年8月8日(2007.8.8)

(24) 登録日 平成19年5月11日(2007.5.11)

(51) Int.C1.

F 1

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

請求項の数 8 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-55468

(22) 出願日

平成9年2月25日(1997.2.25)

(65) 公開番号

特開平10-236974

(43) 公開日

平成10年9月8日(1998.9.8)

審査請求日

平成16年1月22日(2004.1.22)

(73) 特許権者 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 マシュウ・トッド・ギャルスピー
オーストラリア連邦、3065、ビクトリア・パレード・フィッツロイ 41、ザ・ユニバーシティー・オブ・メルボルン・アンド・セイント・ビンセント・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ、デパートメント・オブ・メディシン 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】破骨細胞形成阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターロイキン-18、又は、破骨細胞の形成を阻害する性質を実質的に失わない範囲で、インターロイキン-18のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換したもの、N末端及び/又はC末端に1個又は2個以上のアミノ酸を附加したもの、中間部に1個又は2個以上のアミノ酸を挿入したもの、N末端及び/又はC末端のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したものの、又は、中間部のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したものを含んでなる破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 2】

インターロイキン-18が部分アミノ酸配列として配列表における配列番号1、2及び3に示すアミノ酸配列を有している請求項1に記載の破骨細胞形成阻害剤。 10

【請求項 3】

インターロイキン-18が部分アミノ酸配列として配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有している請求項1又は2に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 4】

インターロイキン-18が配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を有している請求項1、2又は3に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 5】

インターロイキン-18がヒト起源である請求項1、2、3又は4に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 6】

インターロイキン - 18 が配列表における配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有している請求項 1、2 又は 3 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 7】

生体内での破骨細胞の過剰な形成及び / 又は機能に伴う疾患を治療するための薬剤としての請求項 1、2、3、4、5 又は 6 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 8】

安定剤として、蛋白質、緩衝剤又は糖質をさらに含んでなる請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】**【発明の属する技術分野】**

この発明は、インターロイキン - 18 (以下、「IL - 18」と略記する。) 又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤に関する。

【0002】**【従来の技術】**

健常な生体においては、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収はバランスよく保たれ、その結果、骨組織は基本的形状を変えることなく常に新生骨と置換されて健常な状態が保たれている。また、このバランスは、血中のカルシウム濃度を一定に保つなど生体の恒常性維持のためにも重要な役割を果たしている。一方、このバランスが崩れた場合、特に骨吸収量が骨形成量を上回るような場合には、骨関連の疾患のみならずその他の種々の疾患が惹き起こされることとなる。したがって、生体における一連の骨吸収機構の解明、とりわけ、破骨細胞の形成機構の解明は、科学的に意義があるばかりではなく、臨床的にも極めて意義のあることであり、多大な注目を集めている。

20

【0003】

しかしながら、破骨細胞の形成の機構は、例えば、促進因子としてインターロイキン - 1 や阻害因子としてインターロイキン - 4 等が確認されているにも拘わらず、未だ完全に解明されたと言える状況にはない。これは、生体における破骨細胞の形成も、他の生体内での種々の現象と同様に、数多くの促進因子や阻害因子が複雑に且つ密接に関わり合って制御されているためと考えられている。これらのことから、科学的見地のみならず、臨床的見地からも、効果ある破骨細胞形成阻害剤の確立が希求されている。

30

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、効果ある、新規な破骨細胞形成阻害剤を提供することにある。

【0005】**【課題を解決するための手段】****【0006】**

IL - 18 は免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの一種である。本サイトカインは、その発見当初には、特開平 8 - 27189 号公報、特開平 8 - 193098 号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第 378 卷、第 6, 552 号、88 乃至 91 頁 (1995 年) に見られるように、インターフェロン - 誘導因子として記載されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第 156 卷、4, 274 乃至 4, 279 頁 (1996 年) における提案にしたがって、IL - 18 と呼称されるようになった。IL - 18 は、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロン - (以下、「IFN - 」と略記する。) や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (以下、「GM - CSF」と略記する。) の産生を誘導する性質、さらには、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備している。

40

【0007】

50

一方、本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を進める過程で、イン・ビトロで前駆破骨細胞からの破骨細胞の形成を阻害する能力のある、マウス骨髄由来のある種のストローマ細胞株において、特定の遺伝子が特異的に多量に発現していることを見出した。そしてさらに詳細に解析したところ、当該遺伝子は、配列表における配列番号7に示すアミノ酸配列を有するIL-18をコードするものであることが判明した。これら知見に基づき、さらに鋭意研究したところ、当該アミノ酸配列を有するIL-18及びその機能性誘導体が破骨細胞の形成を顕著に阻害すること及び、この阻害は主として当該IL-18により誘導され產生されたGM-CSFの作用によっていることが判明した。この発明は、以上の独自の知見に基づき完成されたものである。

【0008】

10

すなわちこの発明は、上記の課題をIL-18又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤により解決するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

この発明の破骨細胞形成阻害剤はIL-18又はその機能性誘導体を含んでなるものである。ここでいうIL-18とは、IL-18としての上述の如き性質を有するポリペプチドすべてを包含するものであり、その出所・由来は問わない。この発明で用いるIL-18としては、例えば、中間部の部分アミノ酸配列として配列表における配列番号1、2及び3と、さらに配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有し、全体としては配列番号6又は7に示すアミノ酸配列を有しているIL-18を挙げることができる。また、本明細書でいう機能性誘導体とは、上述したようなIL-18の性質のうち、破骨細胞の形成を阻害する性質を実質的に失わない範囲で、そのアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換したもの、これらのアミノ酸配列におけるN末端及び/又はC末端に1個又は2個以上のアミノ酸を付加したもの、これらアミノ酸配列における中間部に1個又は2個以上のアミノ酸を挿入したもの、これらアミノ酸配列におけるN末端及び/又はC末端のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したもの、及び、これらアミノ酸配列における中間部のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したものを意味する。斯かる機能性誘導体としては、例えば、同じ特許出願人による特願平9-20906号（特願平9-329715号において優先権主張）の明細書に、IL-18としての性質を実質的に保持しつつその安定性を向上せしめた機能性誘導体のアミノ酸配列について詳述されている。さらにまた、本明細書でいう機能性誘導体とは、以上のようなIL-18又はその機能性誘導体に糖鎖の付加されてなるポリペプチドをも包含する。以上のようなIL-18又はその機能性誘導体（以下、特に断らない限りIL-18とその機能性誘導体の両者を含めて「当該IL-18」と略記する。）は、細胞培養法等により天然の給源から分離したものであっても、組換えDNA技術やペプチド合成法により人工的に合成したものであっても構わない。

20

【0010】

30

経済的見地に立てば、組換えDNA技術による方法が有利であり、斯かる方法においては、通常、微生物又は動植物由来の適宜宿主に当該IL-18をコードするDNAを導入して形質転換体となし、これを常法により培養後、培養物をサイトカインを精製するための斯界における慣用の方法により精製して当該IL-18を得る。ここで用いられるDNAは、当該IL-18をコードするDNAを含んでなるものであればいずれでもよく、破骨細胞形成阻害剤の使用の目的や適用する方法に応じて適宜の配列のDNAを選択することができる。例えば、同じ特許出願人による特開平8-193098号公報、特開平8-231598号公報及び特開平8-27189号公報には、マウス及びヒト由来のIL-18をコードするcDNAを含むDNAを導入した形質転換体微生物を培養して得る当該IL-18の製造方法が、また、同じ特許出願人による特願平8-185305号（特願平9-187418号において優先権主張）の明細書には、ヒト由来のIL-18をコードする、染色体DNAを含むDNAを導入した形質転換体動物細胞を培養して得る当該IL-18の製造方法が詳述されている。さらに、同じ特許出願人による特願平9-20900

40

50

6号（特願平9-329715号において優先権主張）の明細書には、ヒトIL-18機能性誘導体をコードするDNAを含むDNAを導入した形質転換体動物細胞を培養して得る当該IL-18の製造方法が詳述されている。

【0011】

以上のような組換えDNA技術は、上述のように経済性において有利である反面、斯かる方法により得られる当該IL-18は、用いる宿主やDNAの配列によっては、本来生体内で産生され機能するIL-18とは理化学的性質に若干の相違の生じる場合もある。しかるに、同じ特許出願人による特願平8-67434号（特願平8-269105号（特開平9-289896号公報）において優先権主張）の明細書には、天然の給源として培養株化されたヒト細胞を用いたIL-18の製造方法が、また、同じ特許出願人による特願平8-213267号（特願平9-213885号において優先権主張）の明細書には、インターロイキン-1変換酵素を用いたIL-18の製造方法が詳述されており、これらのことにより得られるIL-18は、生体内で産生され機能するIL-18と理化学的性質が実質的に同一か又は、極めて同一に近いと考えられるため、産生量としてはやや低いものの、例えば、ヒトを含む温血動物への投与を前提とする医薬品等として用いる場合には副作用の低さの点で有利である。なお、同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に開示された、当該IL-18に対して特異的なモノクローナル抗体を用いた精製方法を適用するときには、高純度の当該IL-18を最小限のコストと労力で得ることができる。

【0012】

この発明の破骨細胞形成阻害剤は、斯くして得られる当該IL-18を含んでなるものであり、イン・ビトロ、イン・ビボを問わず、破骨細胞の形成を阻害するために用いられるすべての形態を包含する。例えば、破骨細胞の形成を阻害して、所望の細胞の維持、増殖及び/又は分化を良好ならしめる、動物細胞等の細胞培養用の培地成分として、骨関連の疾患剤のスクリーニング用キットの構成物として、骨吸収調整剤として、また、破骨細胞関連疾患剤として有利に用いることができる。ここでいう骨吸収調整剤とは、生体内での破骨細胞の形成を阻害することにより骨吸収を正常な域に調整して、比較的軽微な関節痛などの体調不良を改善する薬剤及び健康食品等を包含する。また、ここでいう破骨細胞関連疾患剤とは、生体内での破骨細胞の過剰な形成及び/又は機能に伴うすべての疾患を予防及び/又は治療するための薬剤を包含するものであり、対象疾患としては、例えば、高カルシウム血症、破骨細胞腫、ペーチェット病、骨肉腫、関節症、慢性関節リウマチ、変形性骨炎、原発性甲状腺機能亢進症、骨減少症、骨粗鬆症等を挙げることができる。剤型ならびに使用対象にもよるが、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、通常、液状、ペースト状又は固状に調製され、当該IL-18を0.000002乃至100%（w/w）、望ましくは、0.0002乃至0.5%（w/w）含んでなる。

【0013】

この発明の破骨細胞形成阻害剤は当該IL-18単独の形態はもとより、それ以外の、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、免疫助成剤、抗生物質、安定剤として血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質のほか、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、トレハロース、スクロース、イソマルトース、ラクトース、パノース、エルロース、パラチノース、ラクトスクロース、ラフィノース、フラクトオリゴ、ガラクトオリゴ糖、レンチナン、デキストリン及びブルラン等の糖類やソルビトール、マルチトール、ラクチトール及びマルトトリイトール等の糖アルコール類を始めとする糖質、磷酸塩又はクエン酸塩を主体とする緩衝剤、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール及び還元型グルタチオン等の還元剤、さらには、必要に応じて、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン6、インターロイキン12、TNF-、TNF-、GM-CSF、エストロゲン、プロジェステロン、酢酸クロルマジノン、カルシトニン、ソマトカイン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、イプリフラボン、パラサイロイドホルモン、ノルエチステロン、ブスルファン、アンシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、テトラヒドロ

10

20

30

40

50

フリルフルオロウラシル、メトレキセート、ビタミンD₂、活性型ビタミンD、クレスチン、L-アスパラギナーゼ及びピシバニールを始めとする他の生理活性物質や、乳酸カルシウム、塩化カルシウム、磷酸水素カルシウム、L-アスパラギン酸カルシウムを始めとするカルシウム塩の1種又は2種以上との組成物としての形態をも包含する。なお、この発明の破骨細胞形成阻害剤を、ヒトを含む温血動物に投与する、例えば、破骨細胞関連疾患剤として用いる場合には、上記のうちから生理的に許容される物質を適宜に選んで組成物とするのが望ましい。

【0014】

さらに、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、ヒトを含む温血動物に投与して使用する際の、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、当該IL-18を、例えば、1回当たりの用量又はその整数倍(4倍まで)若しくはその約数(1/40まで)に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に分離した一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤などが挙げられる。

【0015】

この発明の、破骨細胞形成阻害剤としての破骨細胞形成阻害剤は、経口的に投与しても非経口的に投与しても、いずれの場合にも、破骨細胞関連疾患の治療・予防に効果を発揮する。疾患の種類や症状にも依るが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約0.5μg乃至100mg/回、望ましくは、約2μg乃至10mg/回の当該IL-18を2乃至6回/日又は2乃至10回/週の用量で1日乃至1年間に亘って経口投与するか、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0016】

次に実験例を示し、当該IL-18の調製及び当該IL-18の理化学的性質並びに生物作用について説明する。

【0017】

【実験例1】

ヒトIL-18の調製

同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に記載された方法にしたがって、ヒトIL-18をコードするcDNAが連結された自律複製可能な組換えDNA『pKGFFHH2』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図1に示すように、この組換えDNAにおいては、配列表における配列番号8に示す塩基配列を含むcDNA『KGFFHH2 cDNA』がTaccプロモータ『P tac』の下流に連結されていた。また、この組換えDNA『pKGFFHH2』は、配列表における配列番号1、2、3、4及び5に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を全て含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号8に示した塩基配列における第46乃至63番目、第88乃至105番目、第400乃至420番目、第151乃至165番目及び第214乃至228番目の塩基によりコードされていた。

【0018】

さらに同じく特開平8-231598号公報に記載された方法にしたがって、この組換えDNA『pKGFFHH2』を大腸菌Y1090株(ATCC 37197)に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製したところ、純度95%以上の精製ヒトIL-18が、培養液11当たり約25mgの収量で得られた。この精製ヒトIL-18を、同じ特許出願人による特開平8-193098号公報に記載された方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18の濃度に依存したIFN-γの產生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞であるリンパ球におけるIFN-γの產生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量1

10

20

30

40

50

8,500 ± 3,000 ダルトンに相当する位置に IFN - 誘導能ある主たるバンドを示す一方、常法にしたがいクロマトフォーカシングすると、4.9 ± 1.0 に等電点を示した。また、その N 末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号 8 に併記したアミノ酸配列における N 末端にメチオニンが結合した配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0019】

【実験例 2】

ヒト IL-18 の調製

同じ特許出願人による特願平 8-67434 号（特願平 8-269105 号（特開平 9-289896 号公報）において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、生後間もないハムスターの新生児の背部皮下にヒト急性単球性白血病由来の骨髄単球系細胞株の一種である THP-1 細胞（ATCC TIB 202）を移植し、3 週間飼育した。そして、皮下に生じた腫瘍塊（約 15 g / 匹）を摘出し、分散させた後、細胞を破碎し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、精製ヒト IL-18 をハムスター 1 匹当たり約 50 ng の収量を得た。

【0020】

この精製ヒト IL-18 を、同じく特願平 8-67434 号の明細書に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒト IL-18 の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒト IL-18 の濃度に依存した IFN - の產生が認められ、この精製 IL-18 が、免疫担当細胞であるリンパ球における IFN - の產生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第 272 卷、680 乃至 685 頁（1970 年）に報告した方法に準じて、還元剤として 2% (w/v) ジチオトレイトル存在下で SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量 18,000 乃至 19,500 ダルトンに相当する位置に IFN - 誘導能ある主たるバンドを示した。さらに同じく特願平 8-67434 号の明細書にその方法が記載されているペプチドマップにしたがって、この精製ヒト IL-18 をシグマ製クロストリパイン剤処理することにより得られるポリペプチド断片を、トーソー製『ODS-120T』のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに供して分取し、個々のペプチド断片のアミノ酸配列を N 末端側から分析したところ、配列表における配列番号 10、11、12 及び 13 に示すアミノ酸配列が得られた。これらアミノ酸配列は、それぞれ、配列表における配列番号 6 に示したアミノ酸配列における第 148 乃至 157 番目、第 1 乃至 13 番目、第 45 乃至 58 番目及び第 80 乃至 96 番目の配列と完全に一致した。以上の結果は、この実験例 2 の方法で得た IL-18 が配列表における配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するものであり、その配列番号 1、2、3、4 及び 5 に示した部分アミノ酸配列を全て有していることを示している。

【0021】

【実験例 3】

機能性誘導体の調製

同じ特許出願人による特願平 9-20906 号（特願平 9-329715 号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、配列表の配列番号 6 に示すアミノ酸配列における第 38 番目のシステインをセリンに、第 68 番目のシステインをセリンに、第 76 番目のシステインをアラニンに置換したヒト IL-18 機能性誘導体をコードする DNA が連結された、自律複製可能な組換え DNA 『pCSHIGIF / MUT 35』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図 2 に示すように、この組換え DNA においては、カーステン・ヘンコラが『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第 185 卷、227 乃至 260 頁（1985 年）に報告しているヒトイントーフェロン - におけるサブタイプ 2b のシグナルペプチドをコードする塩基配列の下流に、同じ読み枠で、配列表における配列番号 14 に示した塩基配列を有する DNA 『IGIF / MUT 35』

10

20

30

40

50

5』が連結され、さらにその下流に蛋白質合成の終始コドンが存在していた。このDNAがコードするアミノ酸配列は、配列表における配列番号14に併記したごとく、配列表における配列番号6におけるアミノ酸配列の第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに置換してなるものであった。また、このDNAは、配列表における配列番号1、2、3及び4に示したすべてのアミノ酸配列と、配列番号5に示したアミノ酸配列の第5のアミノ酸のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号14に示した塩基配列における第46乃至63番目、第88乃至105番目、第400乃至420番目、第151乃至165番目及び第214乃至228番目の塩基によりコードされていた。

10

【0022】

さらに同じ特許出願人による特願平9-20906号（特願平9-329715号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、この組換えDNA『pCSHIGIF/MUT35』を、アフリカミドリザルの腎臓に由来する株化細胞の一種であるCOS-1細胞（ATCC CRL1650）に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18機能性誘導体を培養培地1ml当たり約40ngの収量で得た。そしてさらに、同じ特許出願人による特願平9-20906号（特願平9-329715号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、この精製ヒトIL-18機能性誘導体を、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18機能性誘導体の各種濃度の存在下でヒト急性骨髓性白血病に由来する株化細胞の一種であるKG-1細胞（ATCC CCL246）を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18機能性誘導体の濃度に依存したIFN- γ の產生が認められ、この精製IL-18機能性誘導体が、免疫担当細胞としてのKG-1細胞におけるIFN- γ の產生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁（1970年）に報告した方法に準じて、還元剤として2%（w/v）ジチオトレイトール存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号14に併記したアミノ酸配列におけるN末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する、配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

20

【0023】

【実験例4】

機能性誘導体の調製

同じ特許出願人による特願平9-20906号（特願平9-329715号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列における第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに、第127番目のシステインをセリンに置換したヒトIL-18機能性誘導体をコードするDNAが連結された、自律複製可能な組換えDNA『pCSHIGIF/MUT42』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図3に示すように、この組換えDNAにおいては、カーステン・ヘンコラが『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第185巻、227乃至260頁（1985年）に報告しているヒトイントーフェロン- γ におけるサブタイプ2bのシグナルペプチドをコードする塩基配列の下流に、同じ読み枠で、配列表における配列番号16に示した塩基配列を有するDNA『IGIF/MUT42』が連結され、さらにその下流に蛋白質合成の終始コドンが存在していた。このDNAがコードするアミノ酸配列は、配列表における配列番号16に併記したごとく、その配列番号6におけるアミノ酸配列の第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに、第127番目のシステインをセリンに置換してなるものであった。また、このD

30

40

50

N A は、配列表における配列番号 1、2、3 及び 4 に示したすべてのアミノ酸配列と、配列表における配列番号 5 に示したアミノ酸配列の第 5 のアミノ酸のシスティンがアラニンに置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、配列表における配列番号 16 に示した塩基配列における第 46 乃至 63 番目、第 88 乃至 105 番目、第 400 乃至 420 番目、第 151 乃至 165 番目及び第 214 乃至 228 番目の塩基によりコードされていた。

【0024】

さらに同じ特許出願人による特願平 9-20906 号（特願平 9-329715 号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、この組換え DNA 『p C S H I G I F / M U T 42』を、COS-1 細胞に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製して、精製ヒト IL-18 機能性誘導体を培養培地 1 ml 当たり約 20 ng の収量を得た。そしてさらに、同じ特許出願人による特願平 9-20906 号（特願平 9-329715 号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、この精製ヒト IL-18 機能性誘導体を、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒト IL-18 機能性誘導体の各種濃度の存在下で KG-1 細胞を培養すると、存在させた精製ヒト IL-18 機能性誘導体の濃度に依存した IFN- γ の產生が認められ、この精製 IL-18 機能性誘導体が、免疫担当細胞としての KG-1 細胞における IFN- γ の產生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第 227 卷、680 乃至 685 頁（1970 年）に報告した方法に準じて、還元剤として 2% (w/v) ジチオトレイトル存在下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量 18,000 乃至 19,500 ダルトンに相当する位置に IFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、その N 末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A 型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号 16 に併記したアミノ酸配列における N 末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する、配列表における配列番号 15 に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0025】

【実験例 5】

ヒト IL-18 の調製

同じ特許出願人による特願平 8-185305 号（特願平 9-187418 号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、ヒト IL-18 をコードする染色体 DNA が連結された、自律複製可能な組換え DNA 『p B G H u G F』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図 4 に示すようにこの組換え DNA においては、ヒト IL-18 をコードする染色体 DNA である、配列表における配列番号 17 に示す塩基配列の DNA 『HuIGIF』が、制限酵素 Hind III による切断部位の下流に連結されていた。配列表における配列番号 17 に示すように、この染色体 DNA 『HuIGIF』は 11,464 bp よりなり、この配列の 5' 末端より第 83 乃至 1,453 番目、第 1,466 乃至 4,848 番目、第 4,984 乃至 6,317 番目及び第 6,452 乃至 11,224 番目に位置する 4 個のイントロンによりエクソンが分断されている構成であった。これらイントロンを除いた配列のうち、5' 末端より第 3 乃至 11443 番目の塩基はヒト IL-18 前駆体をコードする部分であり、さらにこの内、第 4866 乃至 4983 番目の塩基は活性あるヒト IL-18 をコードする部分であった。また、この DNA は、配列表における配列番号 1、2、3、4 及び 5 に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を全て含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号 17 に示す塩基配列における第 4,911 乃至 4,928 番目、第 4,953 乃至 4,970 番目、第 11,372 乃至 11,392 番目、第 6,350 乃至 6,364 番目及び第 6,413 乃至 6,427 番目の塩基によりコードされていた。

【0026】

さらに同じ特許出願人による特願平 8-185305 号（特願平 9-187418 号において優先権主張）の明細書に記載の方法にしたがって、この組換え DNA 『p B G H u G F』を用いて分析したところ、この精製ヒト IL-18 を、SDS-PAGE で分析すると、分子量 18,000 乃至 19,500 ダルトンに相当する位置に IFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、その N 末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A 型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号 16 に併記したアミノ酸配列における N 末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する、配列表における配列番号 15 に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

F』を、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞由来の株化細胞であるCHO-K1細胞(ATCC CCL61)に導入し、培養し、培養上清にTHP-1細胞を培養して得た細胞破砕物の上清を作用させて、生成したポリペプチドをイムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18を培養物11当たり約15mgの収量で得た。そしてさらに、この精製ヒトIL-18を、同じ特許出願人による特願平8-185305号(特願平9-187418号において優先権主張)の明細書に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18の濃度に依存したIFN- γ の産生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞であるリンパ球におけるIFN- γ の産生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて、還元剤として2%(w/v)ジチオトレイトル存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端は、配列表の配列番号17に併記したアミノ酸配列のうち、活性あるIL-18のN末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列を有していた。

【0027】

【実験例6】

マウスIL-18の調製

0.5ml容反応管に25mM塩化マグネシウムを8μl、10×PCR緩衝液を10μl、25mM dNTPミックスを1μl、2.5単位/μlアンブリタックDNAポリメラーゼを1μl、特開平8-27189号公報に記載された方法にしたがってファージDNAクローンから調製した、配列表における配列番号18に示す塩基配列を有し、配列番号7に示すアミノ酸配列のマウスIL-18をコードするDNAを含む組換えDNAを1ng、配列表の配列番号7におけるN末端及びC末端付近のアミノ酸配列に基づき化学合成した5'-ATAGAATTCAAATGAACTTTGGCCGACTTCACCTG-3'及び5'-ATAAAGCTTCTAACCTTTGATGTAAGTT-3'で表わされる塩基配列のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの適量を加え、滅菌蒸留水で100μlとした。常法により、この混合物を94℃で1分間、43℃で1分間、72℃で1分間、この順序でインキュベートするサイクルを3回繰返した後、さらに、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間、この順序でインキュベートするサイクルを40回繰返してPCR反応させた。

【0028】

このPCR産物とストラタジーン製プラスミドベクター『pCR-Script SK (+)』を常法にしたがってDNAリガーゼにより連結して組換えDNAとし、これをコンピテントセル法によりストラタジーン製大腸菌株『XL-1 Blue MRF' Kan』に導入して形質転換した。形質転換体を50μg/mlアンピシリンを含むL-プロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した後、培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを単離した。この組換えDNAの一部をとり、ジデオキシ法により分析したところ、配列表の配列番号18に示す塩基配列における5'末端及び3'末端にそれぞれEco RI切断部位及びHind III切断部位を含み、さらに、その配列番号18に併記したアミノ酸配列におけるN末端及びC末端のそれぞれ直前及び直後に對応する部位にポリペプチド合成開始のためのメチオニンコドン及びポリペプチド合成終止のためのTAGコドンを有するDNAを含んでいた。また、この組換えDNAは、配列表における配列番号1、2、3、4及び5に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を全て含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号18に示した塩基配列における第46乃至63番目、第85乃至102番目、第394乃至414番目、第148乃至162番目及び第211乃至225番目の塩基によりコードされていた。

10

20

30

40

50

【0029】

そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素Eco RI及びHind I I Iで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEco RI-Hind I I I DNA断片0.1 μ gと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK 223-3』10ngを16で30分間反応させて連結して複製可能な組換えDNA『pKGFMH2』を得た。コンピテンツセル法により、この組換えDNA『pKGFMH2』で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFMH2』を50 μ g/mlアンピシリンを含むL-プロス培地(pH7.2)に接種し、37で18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のSDS-アルカリ法を適用して組換えDNA『pKGFMH2』を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図5に示すように、組換えDNA『pKGFMH2』においては、配列表における配列番号18に示す塩基配列を含むcDNA『KGFMH2 cDNA』がTacプロモータ『P tac』の下流に連結されていた。

【0030】

オートクレープにより滅菌したL-プロス培地(pH7.2)に、アンピシリンを濃度50 μ g/mlとなるように添加し、37に冷却後、形質転換体KGFMH2を接種し、振盪下、37で18時間種培養した。201容ジャーファーメンタに新鮮な同一培地を181とり、同様に滅菌し、アンピシリンを添加し、37に冷却後、上記で得た種培養物を1%(v/v)接種し、37で8時間通気搅拌培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、150mM塩化ナトリウム、16mM磷酸水素二ナトリウム及び4mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.3)に浮遊させ、超音波破碎後、遠心分離により菌体破碎物を除去し、上清約21を採取した。

【0031】

得られた上清約21に硫酸アンモニウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが40%飽和になるように加え、沈殿物を遠心分離にて除去後、さらに上清に硫酸アンモニウムが85%飽和になるまで加え、4で18時間放置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して沈澱を採取した。次にこの沈澱を1.5M硫酸アンモニウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH6.6)に溶解して約1,300mlとし、濾過後、予め新鮮な同一緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロースCL-4B』約800mlのカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1.5Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、10mM磷酸緩衝液(pH6.6)をSV1.5で通液した。硫酸アンモニウム濃度が1M付近のときに溶出された画分を採取し、膜濃縮し、10mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4で18時間透析後、予め10mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE-5PW』約55mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.5Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV5.5で通液し、塩化ナトリウム濃度が0.2M付近で溶出された画分を採取した。その後、採取した溶出液を上記と同様に濃縮して約9mlとし、PBSに対して4で18時間透析後、予め新鮮なPBSで平衡化させておいたファルマシア製『スーパーDEックス75』のカラムに負荷した。さらにカラムに新鮮なPBSを通液してIFN-誘導能ある画分を採取し、膜濃縮して精製マウスIL-18を得た。この精製マウスIL-18の収量は、培養液11当たり約350 μ gであった。

【0032】

この精製マウスIL-18を、特開平8-27189号公報に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製マウスIL-18の各種濃度の存在下で常法により採取したマウス脾細胞を培養すると、存在させた精製マウスIL-18の濃度に依存したIFN-の産生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞である脾細胞におけるIFN-の産生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680

10

20

30

40

50

乃至 685 頁 (1970 年) に報告した方法に準じて、非還元条件下で SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量 $19,000 \pm 5,000$ ダルトンに相当する位置に IFN - 誘導能ある主たるバンドを示した。また、その N 末端は、配列表の配列番号 18 に併記したアミノ酸配列における N 末端部に相当する、配列番号 19 に示すアミノ酸配列を有していた。

【0033】

次に実験例 7 を示してこの発明で用いる IL - 18 の生物作用についてさらに詳細に説明し、実験例 8 を示してその毒性について説明する。

【0034】

【実験例 7】

生物作用

【0035】

【実験例 7 - 1】

GM - CSF の產生の誘導

ヘパリン加注射器により健常者から血液を採取し、血清無含有の RPMI 1640 培地 (pH 7.4) により 2 倍希釈した。血液をフィコール上に重層し、遠心分離して採取したリンパ球を 10% (v/v) ウシ胎児血清を補足した RPMI 1640 培地 (pH 7.4) により洗浄した後、新鮮な同一培地に細胞密度 1×10^6 個 / ml になるように浮遊させ、12 ウェルプレートに 2 ml / ウェルずつ分注した。

【0036】

別途、実験例 1 の方法により得た IL - 18 を 10% (v/v) ウシ胎児血清を補足した RPMI 1640 培地 (pH 7.4) により濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製して、上記プレートに 20 乃至 200 μl / ウェルずつ分注し、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコンカナバリン A を含む新鮮な上記と同一培地を $10 \mu\text{l}$ / ウェルずつ加えた後、5% CO₂ インキュベータ中、37 度 48 時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を 0.1 ml ずつ採取し、通常の酵素免疫測定法により GM - CSF 含量を測定した。同時に、IL - 18 のみを省略した系を設け、上記と同様に処置して対照とした。結果を表 1 に示す。

【0037】

【表 1】

IL - 18 濃度*	GM - CSF 產生量
(nM)	($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	510
0.7	2150
2.8	3050
5.6	3950

註) * : 濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコンカナバリン A 共存下で IL-18 を添加した。

【0038】

表 1 の結果は、補因子としてコンカナバリン A の共存下で IL - 18 を作用させると、免疫担当細胞としてのリンパ球が IL - 18 の濃度に依存して GM - CSF を產生したことを示している。なお、実験例 2 乃至 5 の方法で得た IL - 18 乃至その機能性誘導体をそれぞれ別個に同様にこの操作に供した場合にも、いずれも同じく GM - CSF の產生を誘

10

20

30

40

50

導することが確認された。一方、実験例 6 の方法で得た I L - 1 8 については、実験例 7 - 1 で用いたヒトの血液より採取したリンパ球に代えて常法によりマウスより採取した脾細胞を用いたこと以外は実験例 7 - 1 に準じて試験したところ、同じく G M - C S F の產生を誘導することが確認された。

【 0 0 3 9 】

【実験例 7 - 2 】

破骨細胞形成の阻害

【 0 0 4 0 】

【実験例 7 - 2 (a) 】

ティー・ジー・マーチンら、『ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミストリー』¹⁰、第 56 卷 (1994 年)、357 乃至 366 頁等にも記載されているように、一般に破骨細胞の前駆細胞が分化し破骨細胞が形成されるためには、骨髓の造血幹細胞に由来する前駆破骨細胞が骨芽細胞や骨髓ストローマ細胞と接触することが必要条件であるとされている。また、ジー・ディー・ルードマン、『エンドクリン・レビュー』、第 17 卷 (1996 年)、¹¹ 308 乃至 332 頁等に記載されているように、破骨細胞の特徴は、多核であること、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (以下、「T R A P」と略記する。) 活性を有すこと、カルシトニン・レセプターを有すこと等であると一般に認識されている。一方、エヌ・ウダガワら、『ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン』、第 182 卷 (1995 年)、1461 乃至 1468 頁に記載の骨芽細胞と骨髓細胞の共培養系においては、例えば、¹² 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D₃、プロスタグランジン E₂、副腎皮質ホルモン、インターロイキン 1、インターロイキン 6 又はインターロイキン 11 のうちのいずれかの因子に応答して破骨細胞様の細胞 (以下、「O C L」と略記することもある。) の形成が認められる。ここで形成される O C L は生体内の破骨細胞の特徴を備えている。したがってこの共培養系は生体内における破骨細胞の形成の過程をイン・ビトロでよく再現するものであり、この系を用いることにより破骨細胞の形成やそれに対する阻害剤についての実験を行うことができる。¹³

【 0 0 4 1 】

この共培養系を用いて、当該 I L - 1 8 の破骨細胞形成の阻害作用を調べた。骨芽細胞は、常法に従い新生マウスの頭蓋冠を 0.1% (w/v) コラゲナーゼ (オーストラリア国、ワシントン・バイオケミカル・カンパニー製) 及び 0.2% (w/v) ディスパーザ (合同酒精製) 処理して調製した。骨髓細胞は、常法に従い成熟したマウスより調製した。48 ウエル・プレートの 1 ウエル当たり、10% (v/v) ウシ胎児血清を補足した - M E M 培地 (以下、この実験例 4 - 2 を通して、単に「培地」という。) 0.4 ml で、¹⁴ 2 × 10⁴ 個の初代骨芽細胞と 5 × 10⁵ 個の骨髓細胞を、5% C O₂ インキュベーター内で 37[°] で 7 日間共培養した。これを陰性対照とした。一方、別のウエルでは、1, 25 - ジヒドロキシビタミン D₃ (和光純薬製) 及びプロスタグランジン E₂ (アメリカ国、シグマ製) を、濃度がそれぞれ 10⁻⁸ M 及び 10⁻⁷ M となるように添加した培地を用いた以外は全て陰性対照と同一の方法で培養した。これを陽性対照とした。また、さらに別のウエルでは、陽性対照と同濃度の 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D₃ 及びプロスタグランジン E₂ とともに実験例 6 の方法で調製した I L - 1 8 を 0.01 乃至 1.0 n g / ml のいずれかの濃度となるように添加した培地を用いた以外は全て陽性対照と同一の方法で培養した。いずれの場合も培養 3 日目に、それぞれのウエルでそれまでに用いていたのと同一組成の新鮮な培地と交換した。6 日間培養した後の細胞を、エヌ・ウダガワら、『ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン』、第 182 卷 (1995 年)、1461 乃至 1468 頁に記載の方法に従って、固定し、T R A P 活性に基づき染色し、1 ウエルあたり染色された細胞 (以下、「T R A P 陽性細胞」という。) の数を数えた。この実験例 4 - 2 を通して、全て同一の培養系を 4 ウエルずつ設け、1 ウエル当たりの T R A P 陽性細胞数の平均値を求めた。結果を表 2 に示す。¹⁵

【 0 0 4 2 】

【表 2】

10

20

30

40

50

IL-18 濃度 (ng/ml)	破骨細胞形成因子*1	1 ウエル当たりの TRAP 陽性細胞数*2
0	-	2
0	+	110
0.01	+	114
0.1	+	111
0.5	+	106
1	+	63
2	+	29
4	+	12
8	+	2
10	+	2

註) *1: +は1α, 25-ジヒドロキシビタミンD₃及びプロスタグランジンE₂を、それぞれ濃度10⁻⁸M

及び10⁻⁷Mとなるように添加したことを表し、-はいずれも添加しなかったことを表す。

*2: 同一条件で4ウエルで培養を行った結果の平均値を示した。

【0043】

表2に示すように、陰性対照ではTRAP陽性細胞の形成はほとんど認められなかったのに対し、陽性対照ではTRAP陽性細胞の形成は顕著であった。一方、陽性対照にさらにIL-18を添加した系では、その濃度に依存してTRAP陽性細胞の形成が阻害され、IL-18濃度が8ng/ml以上のときその阻害は最大で、TRAP陽性細胞数は陰性対照と同等の値となった。以上のことは、当該IL-18には確かにイン・ビトロにおけるOCL形成を阻害する作用のあることを示しており、さらに当該IL-18が破骨細胞形成を阻害することをも強く示唆している。

【0044】

【実験例7-2(b)】

先にも述べたように、この実験例7-2を通して用いられる共培養系において破骨細胞様の細胞の形成を促す因子には種々のものがあると確認されている。そこでこの実験例7-2(b)では、実験例7-2(a)で示された破骨細胞形成に対する当該IL-18の阻害作用が、ある種の因子に特異的なものか否かを調べた。すなわち、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃、プロスタグランジンE₂、副甲状腺ホルモン、インターロイキン1又はインターロイキン11のいずれかを、それぞれ濃度10⁻⁸M、10⁻⁷M、200ng/ml、100ng/ml又は20ng/mlとなるように添加した培地を用いた以外は、全て実験例7-2(a)の陰性対照と同一の方法で培養した。これらを陽性対照とした。一方、別のウエルでは、この陽性対照と同濃度のいずれかの因子に加え、さらに実験例6の方法で得たIL-18を10ng/mlとなるように添加した培地を用いた以外は全て陽性対照と同一の方法で培養した。培養後実験例7-2(a)と同じくTRAP陽性細胞の数を比較した。結果を表3に示す。

10

20

30

40

50

【0045】

【表3】

破骨細胞形成因子*1 (濃度)	I L - 1 8 *2	1 ウエル当たりの T R A P 陽性細胞数*3
D ₃ (10 ⁻⁸ M)	-	9 4
	+	3
P G E ₂ (10 ⁻⁷ M)	-	7 7
	+	3
P T H (200ng/ml)	-	6 3
	+	3
I L - 1 1 (100ng/ml)	-	8 4
	+	3
I L - 1 (20ng/ml)	-	7 1
	+	3

註) *1: D₃、PGE₂、PTH、IL-11及びIL-1は、1α, 25-ジヒドロキシビタミンD₃、プロスタグランジンE₂、副甲状腺ホルモン、インターロイキン11及びインターロイキン1を、それぞれ括弧内で示した濃度になるように添加したことを表している。

*2: +はIL-18を濃度10ng/mlとなるように添加したことを、-はIL-18を添加しなかったことを表している。

*3: 同一条件で4ウエルで培養を行った結果の平均値を示した。

10

20

30

40

【0046】

表3に示すように、いずれも陽性対照では顕著なT R A P 陽性細胞の形成を認めた。これに対し、陽性対照にI L - 1 8 を添加した場合にはいずれもT R A P 陽性細胞の形成はほぼ完全に阻害された。このことは、当該I L - 1 8 が破骨細胞形成の要因によらず、広く一般的に破骨細胞の形成を阻害する作用を有することを強く示唆している。

【0047】

【実験例7-2(c)】

次に、以上実験例7-2(a)及び実験例7-2(b)により確認された、当該I L - 1 8 による破骨細胞の形成の阻害が、当該I L - 1 8 により產生の誘導されたG M - C S

50

Fの作用によるものか否かを調べた。陰性対照及び陽性対照は、それぞれ実験例7-2(a)で示したのと同一の系を用いた。別のウエルでは、この陽性対照と同じ濃度の1,25-ジヒドロキシビタミンD₃及びプロスタグランジンE₂を添加するとともに、さらに(i)抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体(アメリカ国、アール・アンド・ディー・システムズ製)を濃度10μg/mlとなるように添加するか、(ii)実験例6の方法で得たIL-18を濃度10ng/mlとなるよう添加するか、(iii)iiに加えさらに抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体を濃度10μg/mlとなるよう添加するか、(iv)マウスGM-CSF(アメリカ国、アール・アンド・ディー・システムズ製)を濃度0.1ng/mlとなるように添加するか、又は(v)ivに加えさらに抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体を濃度10μg/mlとなるように添加した培地のいずれかを用いたこと以外は、全て陽性対照と同じ方法で培養した。培養後実験例7-2(a)と同じくTRAP陽性細胞の数を比較した。結果を表4に示す。なお、表4中に示したi乃至vの符号は、ここで説明した対照系以外の培養系の符号と一致している。
10

【0048】

【表4】

培養系*1	破骨細胞 形成因子*2	IL-18 *3	GM- CSF*4	抗GM- CSF抗体*5	1ウェル当たりの TRAP陽性細胞数*6
N	-	-	-	-	3
P	+	-	-	-	1 2 2
i	+	-	-	+	1 1 2
ii	+	+	-	-	3
iii	+	+	-	+	1 1 1
iv	+	-	+	-	4
v	+	-	+	+	1 0 6

註)

*1 : Nは陰性対照を、Pは陽性対照を、それぞれ表す。i乃至vは、5種類の培養系の符号と同一。

*2 : +は1a, 25-シ"ヒド"ロキシビ"タミンD₃及びフ"ロスタグ"ラシ"ンE₂を、それ
ぞれ濃度10⁻⁸M及び10⁻⁷Mとなるように添加したことを表し、-はいずれも添加しなか
ったことを表している。*3 : +はIL-18を濃度10ng/mlとなるように添加したことを表し、-はIL-18を添加
しなかったことを表している。*4 : +はGM-CSFを濃度0.1ng/mlとなるように添加したことを表し、-はGM-CSF
を添加しなかったことを表している。*5 : +は抗GM-CSFポリクローナル抗体を濃度10μg/mlとなるように添加したことを表
し、-は抗GM-CSFポリクローナル抗体を添加しなかったことを表している。

*6 : 同一条件で4ウェルで培養を行った結果の平均値を示した。

【0049】

表4に示すように、TRAP陽性細胞の形成はIL-18によりほぼ完全に阻害された(培養系ii)が、この阻害は、抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体の添加によりほぼ完全に解除された(培養系iii)。一方マウスGM-CSFにも、IL-18と同様にTRAP陽性細胞の形成を阻害する作用が認められた(培養系iv)が、この阻害は、抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体の添加によりほぼ完全に解除された(培養系v)。また、当該抗体単独ではTRAP陽性細胞の形成には何の影響も与えなかった(培養系i)。以上の結果は、当該IL-18の破骨細胞形成に対する阻害は、主として、当該IL-18により誘導され產生したGM-CSFの作用によるものであることを強く示唆している。

【0050】

【実験例8】

急性毒性試験

10

20

30

40

50

常法にしたがって、8週齢のマウスに実験例1乃至6の方法で得た当該IL-18のいずれかをそれぞれ別個に経皮、経口又は腹腔内に注射投与した。その結果、これら当該IL-18のLD50は、いずれの投与経路によっても約1mg/kgマウス体重以上であった。このことは当該IL-18がヒトを始めとする温血動物への投与を前提とする医薬品に配合して安全であることを裏付けている。

【0051】

また、当該IL-18により誘導され產生されるGM-CSFは、日経BP社発行、『日経バイオ年鑑96』(1995年)、498乃至499頁に記載されているように、日本国内ではまだ臨床応用されるに至ってはいないものの、米国や欧州では既に臨床応用されており、その安全性については問題がないといえる。以上のこととは、この発明の破骨細胞形成阻害剤が重篤な副作用を惹起することなくヒトを始めとする温血動物に長期連用でき、破骨細胞の形成及び/又は機能が関与する疾患の治療・予防に効果を発揮することを示している。

【0052】

以下に実施例を示し、この発明の破骨細胞形成阻害剤を説明する。

【0053】

【実施例1】

液剤

安定剤として1%(w/v)ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例1乃至6の方法により得たいずれかの当該IL-18を2mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌して液剤を得た。

【0054】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての注射剤、点眼剤、点鼻剤として有用である。

【0055】

【実施例2】

乾燥剤

安定剤として1%(w/v)精製ゼラチンを含む生理食塩水100mlに実験例1乃至6の方法により得たいずれかの当該IL-18を50mg溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥後、密栓した。

【0056】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての乾燥注射剤として有用である。

【0057】

【実施例3】

乾燥剤

安定剤として1%(w/v)トレハロースを含む生理食塩水100mlに実験例1乃至6の方法により得たいずれかの当該IL-18を50mg溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥後、密栓した。

【0058】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての乾燥注射剤として有用である。

【0059】

【実施例4】

軟膏剤

滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー『ハイビスワロー104』及び高純度トレハロースをそれぞれ濃度1.4%(w/w)及び2.0%(w/w)になるよう

10

20

30

40

50

に溶解し、実験例 1 乃至 6 の方法により得たいずれかの当該 IL - 18 を均一に混合後、pH 7.2 に調製して、1 g 当たり当該 IL - 18 を約 1 mg 含むペースト状物を得た。

【0060】

本品はいずれも延展性と安定性に優れ、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての軟膏剤として有用である。

【0061】

【実施例 5】

錠剤

林原製無水結晶 - マルトース粉末『ファイントース』に実験例 1 乃至 6 の方法により得たいずれかの当該 IL - 18 と細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られる混合物を常法により打錠して製品 1錠(約 200 mg)当たり当該 IL - 18 及びルミンをそれぞれ約 2 mg 含む錠剤を得た。

10

【0062】

本品はいずれも摂取性、安定性に優れ、しかも細胞賦活作用をも有し、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての錠剤として有用である。

【0063】

【発明の効果】

以上説明したように、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、イン・ビトロ、イン・ビボを問わず、破骨細胞の形成を顕著に阻害するので、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症を始めとする破骨細胞関連疾患を治療・予防するための疾患剤としても効果を発揮する。

20

【0064】

この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明といえる。

【0065】

【配列表】

配列番号：1

30

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Asn Asp Gln Val Leu Phe

40

1

5

【0066】

配列番号：2

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

10

Phe Glu Asp Met Thr Asp

1 5

【0067】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys

1 5

【0068】

30

配列番号：4

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

40

Met Tyr Lys Asp Ser

1 5

【0069】

配列番号: 5

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメントの種類: 中間部フラグメント

配列

Ser Thr Leu Ser Cys

1

5

【 0 0 7 0 】

配列番号 : 6

配列の長さ : 157

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ポリペプチド

配列

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	10
1				5				10				15				
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
				20				25				30				
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
				35				40				45				
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
				50				55				60				20
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
				65				70				75				80
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
				85				90				95				
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
				100				105				110				
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	30
				115				120				125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
				130				135				140				
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
				145				150				155				

【 0 0 7 1 】

配列番号 : 7

配列の長さ : 157

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ポリペプチド

配列

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	10
1																15
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
20																30
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
35																45
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
50																20
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65																80
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
85																95
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
100																110
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
																30
115																125
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp		
130																140
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
145																
150																
155																

【 0 0 7 2 】

配列番号 : 8

配列の長さ : 471

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

10

生物名 : ヒト

組織 : 肝臓

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..471

特徴を決定した方法 : E

配列

20

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT 48

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn

1

5

10

15

GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT 96

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

20

25

30

ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT 144 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile

35

40

45

ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC 192

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile

50

55

60

TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT 240

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile

65

70

75

80

40

ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288	
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys		
85	90	95
AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG	336	
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys		
100	105	110
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA	384	10
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu		
115	120	125
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG	432	
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu		
130	135	140
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC	471	
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		20
145	150	155

【 0 0 7 3 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

配列

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser

1 5 10

【 0 0 7 4 】

30

10

配列番号: 10

配列の長さ: 10

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: C末端フラグメント

配列

10

Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

1 5 10

【0075】

配列番号: 11

配列の長さ: 13

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

20

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg

1 5 10

【0076】

30

配列番号: 12

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

40

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg

1 5 10

【0077】

配列番号: 13

配列の長さ: 17

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

10

Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys

1

5

10

15

【 0 0 7 8 】

配列番号: 14

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列の特徴

10

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 1..471

特徴を決定した方法: S

配列

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT	48
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn	
1 5 10 15	20
GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	96
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp	
20 25 30	
ATG ACT GAT TCT GAC TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile	
35 40 45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	192
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile	30
50 55 60	
TCT GTG AAG TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC GCT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys	
85 90 95	40

AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG	336	
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asn Lys		
100	105	110
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA	384	
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu		
115	120	125
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG	432	
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu		
130	135	140
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC	471	
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		
145	150	155

【 0 0 7 9 】

配列番号 : 15

20

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser	30	
1	5	10

【 0 0 8 0 】

配列番号 : 16

配列の長さ : 471

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列の特徴

10

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..471

特徴を決定した方法 : S

配列

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT	48
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn	
1 5 10 15	20
GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	96
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp	
20 25 30	
ATG ACT GAT TCT GAC TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile	
35 40 45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	192
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile	30
50 55 60	
TCT GTG AAG TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC GCT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys	
85 90 95	40

AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG	336	
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asn Lys		
100	105	110
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TCT GAA	384	
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Ser Glu		
115	120	125
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG	432	
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu	10	
130	135	140
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC	471	
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		
145	150	155

【 0 0 8 1 】

配列番号 : 17

配列の長さ : 11464

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の特徴

10

起源

生物名 : ヒト

株名 : 胎盤

配列の特徴

特徴を表す記号 : 5' UTR

存在位置 : 1..3

特徴を決定した方法 : E

20

特徴を表す記号 : leader peptide

存在位置 : 4..82

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 83..1453

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : leader peptide

30

存在位置 : 1454..1465

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 1466..4848

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : leader peptide

存在位置 : 4849..4865

40

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 4866..4983

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 4984..6317

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

10

存在位置 : 6318..6451

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 6452..11224

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

20

存在位置 : 11225..11443

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 11444..11464

特徴を決定した方法 : E

配列

AAG ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA 48

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala

-35 -30 -25

ATG AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA G GTAAGG CTAATGCCAT 98

Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala

-20 -15 -10

AGAACAAATA CCAGGTTCAAG ATAAATCTAT TCAATTAGAA AAGATGTTGT GAGGTGAAC 158

ATTAAGTGAC TCTTGTGTC ACCAAATTTC ACTGTAATAT TAATGGCTCT TAAAAAAATA 218

GTGGACCTCT AGAAATTAAC CACAACATGT CCAAGGTCTC AGCACCTTGT CACACCACGT 278

40

GTCCTGGCAC TTTAATCAGC AGTAGCTCAC TCTCCAGTTG GCAGTAAGTG CACATCATGA 338

AAATCCCAGT TTTCATGGGA AAATCCCAGT TTTCATGGGA TTTCCATGGG AAAAATCCCA	398	
GTACAAAACG GGGTGCATTC AGGAAATACA ATTTCCAAA GCAAATTGGC AAATTATGTA	458	
AGAGATTCTC TAAATTTAGA GTTCCGTGAA TTACACCATT TTATGTAAAT ATGTTGACA	518	
AGTAAAAATT GATTCTTTT TTTTTTTCT GTTGCAGG CTGGAGTGCA GTGGCACAAT	578	
CTCTGCTCAC TGCAACCTCC ACCTCCTGGG TTCAAGCAAT TCTCCTGCCT CAGCCTCTG	638	
AGTAGCTGGG ACTACAGGTG CATCCGCCA TGCCCTGGCTA ATTTTGCGT ATTTTACTA	698	
GAGACAGGGT TTTGGCATGT TGTCCAGGCT GGTCTGGAC TCCTGATCTC AGATGATCCT	758	10
CCTGGCTCGG GCTCCAAAG TGCTGGGATT ACAGGCATGA ACCACCACAC ATGGCCTAAA	818	
AATTGATTCT TATGATTAAT CTCCGTGAA CAATTGGCT TCATTTGAAA GTTGCCTTC	878	
ATTGAAACC TTCATTTAAA AGCCTGAGCA ACAAAAGTGAG ACCCCATCTC TACAAAAAAC	938	
TGCAAAATAT CCTGTGGACA CCTCCTACCT TCTGTGGAGG CTGAAGCAGG AGGATCACTT	998	
GAGCCTAGGA ATTTGAGCCT GCAGTGAGCT ATGATCCCAC CCCTACACTC CAGCCTGCAT	1058	
GACAGTAGAC CCTGACACAC ACACACAAAA AAAAACCTTC ATAAAAAATT ATTAGTTGAC	1118	
TTTCTTAGG TGACTTTCCG TTTAAGCAAT AAATTAAAAA GTAAAATCTC TAATTTAGA	1178	20
AAATTATTT TTAGTTACAT ATTGAAATT TTAAACCTTA GGTTTAAGTT TTATGTCTAA	1238	
ATTACCTGAG AACACACTAA GTCTGATAAG CTTCATTTA TGGGCCTTT GGATGATTAT	1298	
ATAATATTCT GATGAAAGCC AAGACAGACC CTTAAACCAT AAAAATAGGA GTTCGAGAAA	1358	
GAGGAGTAGC AAAAGTAAAA GCTAGAATGA GATTGAATTC TGAGTCGAAA TACAAAATT	1418	
TACATATTCT GTTCTCTCT TTTCCCCCT CTTAG CT GAA GAT GAT G GTAAA	1470	
Ala Glu Asp Asp Glu		
-10		30
GTAGAAATGA ATTTATTTT CTTGCAAAC TAAGTATCTG CTTGAGACAC ATCTATCTCA	1530	
CCATTGTCAG CTGAGGAAAA AAAAAATGG TTCTCATGCT ACCAATCTGC CTTCAAAGAA	1590	
ATGTGGACTC AGTAGCACAG CTTGGAATG AAGATGATCA TAAGAGATAC AAAGAAGAAC	1650	
CTCTAGCAAA AGATGCTCT CTATGCCTTA AAAAATCTC CAGCTCTTAG AATCTACAAA	1710	
ATAGACTTTG CCTGTTCAT TGGTCCTAAG ATTAGCATGA AGCCATGGAT TCTGTTGTAG	1770	
GGGGAGCGTT GCATAGGAAA AAGGGATTGA AGCATTAGAA TTGTCCAAA TCAGTAACAC	1830	
CTCCTCTCAG AAATGCTTG GGAAGAAGCC TGGAAGGTTC CGGGTTGGTG GTGGGGTGGG	1890	40
GCAGAAAATT CTGGAAGTAG AGGAGATAGG AATGGGTGGG GCAAGAAGAC CACATTAGA	1950	

GGCCAAAAGC TGAAAGAAC CATGGCATT ATGATGAATT CAGGGTAATT CAGAATGGAA	2010	
GTAGAGTAGG AGTAGGAGAC TGGTGAGAGG AGCTAGAGTG ATAAACAGGG TGTAGAGCAA	2070	
GACGTTCTCT CACCCCAAGA TGTGAAATT GGACTTTATC TTGGAGATAA TAGGGTTAAT	2130	
TAAGCACAAT ATGTATTAGC TAGGGTAAAG ATTAGTTGT TGTAAACAAAG ACATCCAAAG	2190	
ATACAGTAGC TGAATAAGAT AGAGAATTTC TCTCTCAAAG AAAGTCTAAG TAGGCAGCTC	2250	
AGAAGTAGTA TGGCTGGAAG CAACCTGATG ATATTGGGAC CCCCAACCTT CTTCAAGTCTT	2310	
GTACCCATCA TCCCCTAGTT GTTGATCTCA CTCACATAGT TGAAAATCAT CATACTTCCT	2370	10
GGGTTCATAT CCCAGTTATC AAGAAAGGGT CAAGAGAACT CAGGCTCATT CCTTCAAAG	2430	
ACTCTAATTG GAAGTTAAC ACATCAATCC CCCTCATATT CCATTGACTA GAATTAAATC	2490	
ACATGGCCAC ACCAAGTGCA AGGAAATCTG GAAAATATAA TCTTTATTCC AGGTAGCCAT	2550	
ATGACTCTT AAAATTAGA AATAATATAT TTTAAAATA TCATTCTGGC TTTGGTATAA	2610	
AGAATTGATG GTGTGGGTG AGGAGGCCAA AATTAAGGGT TGAGAGCCTA TTATTTAGT	2670	
TATTACAAGA AATGATGGTG TCATGAATTA AGGTAGACAT AGGGGAGTGC TGATGAGGAG	2730	
CTGTGAATGG ATTTAGAAA CACTTGAGAG AATCAATAGG ACATGATTAA GGGTTGGATT	2790	20
TGGAAAGGAG AAGAAAGTAG AAAAGATGAT GCCTACATT TTCACTTAGG CAATTGTAC	2850	
CATTCAAGTGA AATAGGGAAC ACAGGAGGAA GAGCAGGTTT TGGTGTATAC AAAGAGGAGG	2910	
ATGGATGACG CATTTCGTTT TGGATCTGAG ATGTCGTGG AACGTCCTAG TGGAGATGTC	2970	
CACAAACTCT TCTACATGTG GTTCTGAGTT CAGGACACAG ATTTGGCTG GAGATAGAGA	3030	
TATTGTAGGC TTATACATAG AAATGGCATT TGAATCTATA GAGATAAAA GACACATCAG	3090	
AGGAAATGTG TAAAGTGAGA GAGGAAAAGC CAAGTACTGT GCTGGGGGGA ATACCTACAT	3150	
TTAAAGGATG CAGTAGAAAG AAGCTAATAA ACAACAGAGA GCAGACTAAC CAAAAGGGGA	3210	30
GAAGAAAAAC CAAGAGAATT CCACCGACTC CCAGGAGAGC ATTTCAAGAT TGAGGGGATA	3270	
GGTGTGTGT TGAATTTCGAG AGCCTTGAGA ATCAAGGGCC AGAACACAGC TTTTAGATTT	3330	
AGCAACAAGG AGTTGGTGA TCTCAAGTGA AGCAGCTTGA TGGTGAATG GAGGCAGAGG	3390	
CAGATTGCAA TGAGTGAAC AGTGAATGGG AAGTGAAGAA ATGATACAGA TAATTCTTGC	3450	
TAAAAGCTTG GCTGTAAAAA GGAGGAGAGA AACAAAGACTA GCTGCAAAGT GAGATTGGGT	3510	
TGATGGAGCA GTTTAAATC TCAAAATAA GAGCTTGTG CTTTTTGAT TATGAAAATA	3570	
ATGTGTTAAT TGTAACATAAT TGAGGCAATG AAAAAAGATA ATAATATGAA AGATAAAAAT	3630	40
ATAAAAACCA CCCAGAAATA ATGATAGCTA CCATTTGAT ACAATATTC TACACTCCTT	3690	

TCTATGTATA TATA CAGACA CAGAAATGCT TATATTTTA TTAAAAGGGA TTGTACTATA	3750	
CCTAAGCTGC TTTTCTAGT TAGTGTATA TATGGACATC TCTCCATGGC AACGAGTAAT	3810	
TGCAGTTATA TTAAGTCAT GATATTCAC AATAAGGGCA TATCTTGCC CTTTTATTT	3870	
AATCAATTCT TAATTGGTGA ATGTTGTTT CCAGTTGTT GTTGTATT ACAATGTTCC	3930	
CATAAGCATT CCTGTACACC AATGTTACA CATTGTCTG ATTTTTCTT CAGGATAAAA	3990	
CCCAAGGAGGT AGAATTGCTG GTTGATAGA AGAGAAAGGA TGATTGCCAA ATAAAGCTT	4050	
CAGTAGAGGG TACATGCCGA GCACAAATGG GATCAGCCCT AGATACCAGA AATGGCACTT	4110	10
TCTCATTCC CCTTGGGACA AAAGGGAGAG AGGCAATAAC TGTGCTGCCA GAGTTAAATT	4170	
TGTACGTGGA GTAGCAGGAA ATCATTGCT GAAAATGAAA ACAGAGATGA TGTGTAGAG	4230	
GTCCTGAAGA GAGCAAAGAA AATTGAAAT TGCGGCTATC AGCTATGGAA GAGAGTGCTG	4290	
AACTGGAAAA CAAAAGAAGT ATTGACAATT GGTATGCTTG TAATGGCACC GATTGAACG	4350	
CTTGTGCCAT TGTTCACCAAG CAGCACTCAG CAGCCAAGTT TGGAGTTTG TAGCAGAAAG	4410	
ACAAATAAGT TAGGGATTAA ATATCCTGGC CAAATGGTAG ACAAAATGAA CTCTGAGATC	4470	
CAGCTGCACA GGGAAAGGAAG GGAAGACGGG AAGAGGTTAG ATAGGAAATA CAAGAGTCAG	4530	20
GAGACTGGAA GATGTTGTGA TATTAAGAA CACATAGAGT TGGAGTAAAA GTGTAAGAAA	4590	
ACTAGAAGGG TAAGAGACCG GTCAGAAAGT AGGCTATTG AAGTTAACAC TTCAGAGGCA	4650	
GAGTAGTTCT GAATGGTAAC AAGAAATTGA GTGTGCCCTT GAGAGTAGGT TAAAAAACAA	4710	
TAGGCAACTT TATTGTAGCT ACTTCTGGAA CAGAAGATTG TCATTAATAG TTTAGAAAA	4770	
CTAAAATATA TAGCATACTT ATTTGTCAAT TAACAAAGAA ACTATGTATT TTTAAATGAG	4830	
ATTAATGTT TATTGTAG AA AAC CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT	4880	
Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu		
-5	1	5
GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC	4928	
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe		
10	15	20
ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC	4976	
Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp		
25	30	35
TGT AGA G GTATTTTT TTAATTCGCA AACATAGAAA TGACTAGCTA CTTCTTCCCA	5032	

Cys Arg Asp

40

TTCTGTTTA CTGCTTACAT TGTCCTGTC TAGTCCAAT CCTCAGATGA AAAGTCACAG 5092
 GAGTGACAAT AATTCACCT ACAGGAAACT TTATAAGGCA TCCACGTTT TTAGTTGGGG 5152
 TAAAAAATTG GATACAATAA GACATTGCTA GGGGTCTGAC CTCTCTGAGC CTGCCCTTGA 5212
 ATCACCAATC CCTTTATTGT GATTGCATTA ACTGTTAAA ACCTCTATAG TTGGATGCTT 5272
 AATCCCTGCT TGTTACAGCT GAAAATGCTG ATAGTTACC AGGTGTGGTG GCATCTATCT 5332 10
 GTAATCCTAG CTACTTGGGA GGCTCAAGCA GGAGGATTGC TTGAGGCCAG GACTTGAGG 5392
 CTGTAGTACA CTGTGATCGT ACCTGTGAAT AGCCACTGCA CTCCAGCCTG GGTGATATAAC 5452
 AGACCTTGTC TCTAAAATTA AAAAAAAAAC CTTAGGAAAG GAAATTGATC 5512
 AAGTCTACTG TGCCCTCCAA AACATGAATT CCAAATATCA AAGTTAGGCT GAGTTGAAGC 5572
 AGTGAATGTG CATTCTTAA AAATACTGAA TACTTACCTT AACATATATT TTAAATATT 5632
 TATTTAGCAT TTAAAAGTTA AAAACAATCT TTTAGAATTTC ATATCTTAA AATACTCAAA 5692
 AAAGTTGCAG CGTGTGTGTT GTAATACACA TTAAACTGTG GGGTTGTTG TTTGTTGAG 5752 20
 ATGCAGTTTC ACTCTGTAC CCAGGCTGAA GTGCAGTGCA GTGCAGTGGT GTGATCTCGG 5812
 CTCACTACAA CCTCCACCTC CCACGTTCAA GCGATTCTCA TGCCCTCAGTC TCCCGAGTAG 5872
 GTGGGATTAC AGGCATGCAC CACTTACACC CGGCTAATT TTGTATTTT AGTAGAGCTG 5932
 GGGTTTCACC ATGTTGGCCA GGCTGGTCTC AAACCCCTAA CCTCAAGTGA TCTGCCTGCC 5992
 TCAGCCTCCC AAACAAACAA ACAACCCCAC AGTTAATAT GTGTTACAAC ACACATGCTG 6052
 CAACTTTAT GAGTATTTA ATGATATAGA TTATAAAAGG TTGTTTTAA CTTTAAATG 6112
 CTGGGATTAC AGGCATGAGC CACTGTGCCA GGCCTGAAC GTGTTTTAA AAATGTCTGA 6172 30
 CCAGCTGTAC ATAGTCTCCT GCAGACTGGC CAAGTCTCAA AGTGGGAACA GGTGTATTAA 6232
 GGACTATCCT TTGGTTAAAT TTCCGCAAAT GTTCCGTGTC AAGAATTCTT CTAACTAGAG 6292
 TTCTCATTTA TTATATTTAT TTCAG AT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT 6343

Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile

40

45

ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC 6391
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile 40

50

55

60

TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT	6439
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GTAAG ACTGAGCCTT ACTTTGTTT CAATCATGTT AATATAATCA	6496
Ile Ser Phe Lys	
ATATAATTAG AAATATAACA TTATTCTAA TGTTAATATA AGTAATGTA TTAGAAAACT	6556
CAAATATCCT CAGACCAACC TTTGTCTAG AACAGAAATA ACAAGAAGCA GAGAACCTT	6616
AAAGTGAATA CTTACTAAAA ATTATCAAAC TCTTACCTA TTGTGATAAT GATGGTTTT	6676
CTGAGCCTGT CACAGGGAA GAGGAGATAC AACACTGTT TTATGACCTG CATCTCCTGA	6736
ACAATCAGTC TTTATACAAA TAATAATGTA GAATACATAT GTGAGTTATA CATTAAAGAA	6796
TAACATGTGA CTTTCCAGAA TGAGTTCTGC TATGAAGAAT GAAGCTAATT ATCCTCTAT	6856
ATTCTACAC CTTTGAAAT TATGATAATA TTTTAATCCC TAGTTGTTT GTGCTGATC	6916
CTAGCCTAA GTCTTAGACA CAAGCTTCAG CTTCCAGTTG ATGTATGTTA TTTTAATGT	6976
TAATCTAATT GAATAAAAGT TATGAGATCA GCTGAAAAG TAATGCTATA ATTATCTCA	7036
AGCCAGGTAT AAAGTATTTC TGGCCTCTAC TTTTCTCTA TTATTCTCCA TTATTATTCT	7096
CTATTATTT TCTCTATTTC CTCCATTATT GTTAGATAAA CCACAATTAA CTATAGCTAC	7156
AGACTGAGCC AGTAAGAGTA GCCAGGGATG CTTACAAATT GGCAATGCTT CAGAGGAGAA	7216
TTCCATGTCA TGAAGACTCT TTTGAGTGG AGATTGCCA ATAAATATCC GCTTCATGC	7276
CCACCCAGTC CCCACTGAAA GACAGTTAGG ATATGACCTT AGTGAAGGTA CCAAGGGGCA	7336
ACTTGGTAGG GAGAAAAAAG CCACTCTAAA ATATAATCCA AGTAAGAACAA GTGCATATGC	7396
AACAGATACA GCCCCCAGAC AAATCCCTCA GCTATCTCCC TCCAACCAGA GTGCCACCCC	7456
TTCAAGGTGAC AATTGGAGT CCCCATTCTA GACCTGACAG GCAGCTTAGT TATCAAAATA	7516
GCATAAGAGG CCTGGGATGG AAGGGTAGGG TGAAAGGGT TAAGCATGCT GTTACTGAAC	7576
AACATAATTA GAAGGGAAGG AGATGGCCAA GCTCAAGCTA TGTGGGATAG AGGAAAACCTC	7636
AGCTGCAGAG GCAGATTCAAG AACTGGGAT AAGTCCGAAC CTACAGGTGG ATTCTGTTG	7696
AGGGAGACTG GTGAAAATGT TAAGAAGATG GAAATAATGC TTGGCACTTA GTAGGAAC	7756
GGCAAATCCA TATTTGGGGG AGCCTGAAGT TTATTCAATT TTGATGGCCC TTTAAATAA	7816
AAAGAATGTG GCTGGCGTG GTGGCTACA CCTGTAATCC CAGCACTTG GGAGGCCGAG	7876
GGGGGCGGAT CACCTGAAGT CAGGAGTTCA AGACCAGCCT GACCAACATG GAGAAACCCC	7936

10

20

30

40

ATCTCTACTA AAAATACAAA ATTAGCTGGG CGTGGTGGCA TATGCCTGTA ATCCCAGCTA	7996	
CTCGGGAGGC TGAGGCAGGA GAATCTTTG AACCCGGGAG GCAGAGGTTG CGATGAGCCT	8056	
AGATCGTGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCA ACAAGAGCAA AACTCGGTCT CAAAAAAA	8116	
AAAAAAAAG TGAAATTAAC CAAAGGCATT AGCTTAATAA TTTAATACTG TTTTAAGTA	8176	
GGGCGGGGGG TGGCTGGAAG AGATCTGTGT AAATGAGGGA ATCTGACATT TAAGCTTCAT	8236	
CAGCATCATA GCAAATCTGC TTCTGGAAAGG AACTCAATAA ATATTAGTTG GAGGGGGGA	8296	
GAGAGTGAGG GGTGGACTAG GACCAGTTT AGCCCTTGTC TTTAATCCCT TTTCTGCCA	8356	10
CTAATAAGGA TCTTAGCAGT GTTATAAAA GTGGCCTAGG TTCTAGATAA TAAGATACAA	8416	
CAGGCCAGGC ACAGTGGCTC ATGCCTATAA TCCCAGCACT TTGGGAGGGC AAGGCGAGTG	8476	
TCTCACTTGA GATCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAGC ATGGCGATAC TCTGTCTCTA	8536	
CTAAAAAAA TACAAAATT AGCCAGGCAT GGTGGCATGC ACCTGTAATC CCAGCTACTC	8596	
GTGAGCCTGA GGCAGAAGAA TCGCTTGAAA CCAGGAGGTG TAGGCTGCAG TGAGCTGAGA	8656	
TCGCACCAC TCACTCCAGC CTGGGCGACA GAATGAGACT TTGTCTCAA AAAAGAAAAA	8716	
GATACAACAG GCTACCCCTA TGTGCTCACC TTTCACTGTT GATTACTAGC TATAAAGTCC	8776	20
TATAAAGTTC TTTGGTCAAG AACCTTGACA ACACATAAGAG GGATTTGCTT TGAGAGGTTA	8836	
CTGTCAGAGT CTGTTTCATA TATATACATA TACATGTATA TATGTATCTA TATCCAGGCT	8896	
TGGCCAGGGT TCCCTCAGAC TTTCCAGTGC ACTTGGGAGA TGTTAGGTCA ATATCAACTT	8956	
TCCCTGGATT CAGATTCAAC CCCTTCTGAT GTAAAAAAA AAAAAAAA GAAAGAAATC	9016	
CCTTCCCCCT TGGAGCACTC AAGTTTCACC AGGTGGGGCT TTCCAAGTTG GGGGTTCTCC	9076	
AAGGTATTG GGATTGCTTT CACATCCATT TGCTATGTAC CTTCCCTATG ATGGCTGGGA	9136	
GTGGTCAACA TCAAAACTAG GAAAGCTACT GCCCAAGGAT GTCCCTTACCT CTATTCTGAA	9196	30
ATGTGCAATA AGTGTGATTA AAGAGATTGC CTGTTCTACC TATCCACACT CTCGCTTTCA	9256	
ACTGTAACTT TCTTTTTTC TTTTTCTT TTTTCTTT TTTTGAAAC GGAGTCTCGC	9316	
TCTGTCGCC AGGCTAGAGT GCAGTGGCAC GATCTCAGCT CACTGCAAGC TCTGCCTCCC	9376	
GGGTTCACGC CATTCTCCTG CCTCACCCCTC CCAAGCAGCT GGGACTACAG GCGCCTGCCA	9436	
CCATGCCCAAG CTAATTTTT GTATTTTAG TAGAGACGGG GTTTCACCGT GTTAGCCAGG	9496	
ATGGTCTCGA TCTCCTGAAC TTGTGATCCG CCCGCCTCAG CCTCCCAAAG TGCTGGGATT	9556	
ACAGGCGTGA GCCATCGCAC CCGGCTCAAC TGTAACTTTC TATACTGGTT CATCTTCCCC	9616	40
TGTAATGTTA CTAGAGCTTT TGAAGTTTG GCTATGGATT ATTTCTCATT TATACATTAG	9676	

ATTCAGATT AGTTCAAAT TGATGCCAC AGCTAGGGT CTCTCCTAA ATTGTATATT	9736	
GTAGACAGCT GCAGAAAGTGG GTGCCAATAG GGGAACTAGT TTATACTTTC ATCAACTTAG	9796	
GACCCACACT TGTTGATAAA GAACAAAGGT CAAGAGTTAT GACTACTGAT TCCACAACTG	9856	
ATTGAGAAGT TGGAGATAAC CCCGTGACCT CTGCCATCCA GAGTCTTCA GGCATCTTG	9916	
AAGGATGAAG AAATGCTATT TTAATTTGG AGGTTCTCT ATCAGTGCTT AGGATCATGG	9976	
GAATCTGTGC TGCCATGAGG CAAAATTAA GTCCAAAACA TCTACTGGTT CCAGGATTAA	10036	
CATGGAAGAA CCTTAGGTGG TGCCCACATG TTCTGATCCA TCCTGCAAAA TAGACATGCT	10096	10
GCACTAACAG GAAAAGTGCAG GGCAGCACTA CCAGTTGGAT AACCTGCAAG ATTATAGTTT	10156	
CAAGTAATCT AACCAATTCT CACAAGGCC C TATTCTGTGA CTGAAACATA CAAGAATCTG	10216	
CATTTGGCCT TCTAAGGCAG GGCCCAGCCA AGGAGACCAT ATTCAAGGACA GAAATTCAAG	10276	
ACTACTATGG AACTGGAGTG CTTGGCAGGG AAGACAGAGT CAAGGACTGC CAACTGAGCC	10336	
AATACAGCAG GCTTACACAG GAACCCAGGG CCTAGCCCTA CAACAATTAT TGGGTCTATT	10396	
CACTGTAAGT TTTAATTCA GGCTCCACTG AAAGAGTAAG CTAAGATTCC TGGCACTTTC	10456	
TGTCTCTCTC ACAGTTGGCT CAGAAATGAG AACTGGTCAG GCCAGGCATG GTGGCTTACA	10516	20
CCTGGAATCC CAGCACTTGT GGAGGCCGAA GTGGGAGGGT CACTTGAGGC CAGGAGTTCA	10576	
GGACCAAGCTT AGGCAACAAA GTGAGATACC CCCTGACCCCC TTCTCTACAA AAATAAATT	10636	
TAAAAATTAG CCAAATGTGG TGGTGTATAC TTACAGTCCC AGCTACTCAG GAGGCTGAGG	10696	
CAGGGGGATT GCTTGAGCCC AGGAATTCAA GGCTGCAGTG AGCTATGATT TCACCACTGC	10756	
ACTTCTGGCT GGGCAACAGA GCGAGACCT GTCTCAAAGC AAAAAGAAAA AGAAACTAGA	10816	
ACTAGCCTAA GTTTGTGGGAGG GGAGGTCATC ATCGTCTTA GCCGTGAATG GTTATTATAG	10876	
AGGACAGAAA TTGACATTAG CCCAAAAAGC TTGTGGTCTT TGCTGGAACT CTACTTAATC	10936	30
TTGAGCAAAT GTGGCACCCA CTCATGGGA GAGGAGAGAA GTAAGCTGTT TGATGTATAG	10996	
GGGAAACTA GAGGCCTGGA ACTGAATATG CATCCCATGA CAGGGAGAAT AGGAGATTG	11056	
GAGTTAAGAA GGAGAGGAGG TCAGTACTGC TGTTCAGAGA TTTTTTTAT GTAACCTTG	11116	
AGAAGCAAAA CTACTTTGT TCTGTTGGT AATATACTTC AAAACAAACT TCATATATT	11176	
AAATTGTTCA TGTCCCTGAAA TAATTAGGTA ATGTTTTTT CTCTATAG GAA ATG AAT	11233	
	Glu Met Asn	
	85	40
CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG	11281	

Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Glu
 90 95 100
 AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA 11329
 Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
 105 110 115
 TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA 11377
 Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys 10
 120 125 130 135
 CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC 11425
 Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe
 140 145 150
 ACT GTT CAA AAC GAA GAC TAGCTATTAA AATTCATGC C 11464
 Thr Val Gln Asn Glu Asp
 155

[0 0 8 2]

配列番号: 18

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

10

生物名: マウス

組織の種類: 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号: mat peptide

存在位置: 1..471

特徴を決定した方法: S

配列

20

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 48

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn

1 5 10 15

GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG 96

Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met

20 25 30

ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA 144

Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile

35 40 45

TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT 192

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser

50 55 60

GTG AAG GAT AGT AAA ATG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240

Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile

65 70 75 80

40

TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT	288	
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser		
85	90	95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG	336	
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu		
100	105	110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA	384	10
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu		
115	120	125
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT	432	
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp		
130	135	140
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT	471	
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser		
145	150	155

【 0 0 8 3 】

配列番号：19

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド
フラグメント型：N末端フラグメント
配列
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr
1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】組換えDNA pKGFHH2の構造を示す図である。

〔図2〕組換えDNA pC5H1G1F/MUT35の構造を示す図である。

【図3】組換えDNA pC5H1G1F/MUT42の構造を示す図である。

【図4】組換えDNA pBGHuGFの構造を示す図である。

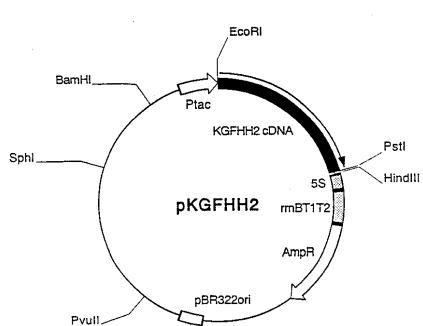
【図5】組換えDNA pKGFMH2の構造を示す図である。

【符号の説明】

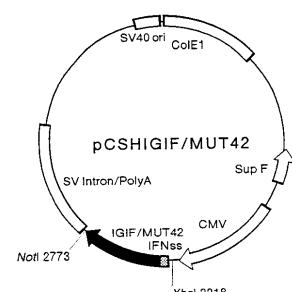
K G F H H 2 c D N A	当該 I L - 1 8 をコードする c D N A
I G I F / M U T 3 5	当該 I L - 1 8 をコードする D N A
I G I F / M U T 4 2	当該 I L - 1 8 をコードする D N A
H u I G I F	当該 I L - 1 8 をコードする 染色体 D N A
K G F M H 2 c D N A	当該 I L - 1 8 をコードする c D N A

5 S	5 S リボゾーム RNA 遺伝子
P t a c	t a c プロモータ
r r n B T 1 T 2	リボゾーム RNA オペロンの転写終止領域
A m p R	アンピシリン耐性遺伝子
p B R 3 2 2 o r i	大腸菌における複製開始点
C M V	サイトメガロウイルス・プロモーター
I F N s s	ヒトインターフェロン- β におけるサブタイプ
2 b のシグナルペプチドをコードする配列	

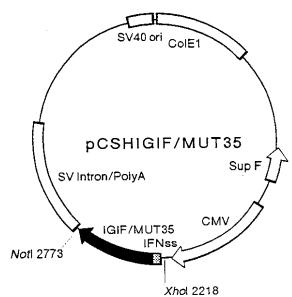
【図 1】



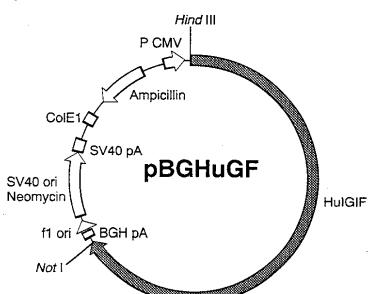
【図 3】



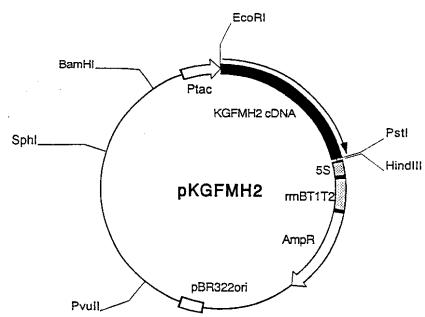
【図 2】



【図 4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

(72)発明者 ニコル・ジョイ・ホーワッド

オーストラリア連邦 3065、ピクトリア・パレード・フィッツロイ 41、ザ・ユニバーシティ・オブ・メルボルン・アンド・セント・ビンセント・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ、デパートメント・オブ・メディシン 内

(72)発明者 宇田川 信之

千葉県柏市明原3丁目16番7号

(72)発明者 栗本 雅司

岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特開平08-169841 (JP, A)

特開平08-193098 (JP, A)

USHIO Shimpei, Journal of Immunology, 1996年, Vol.156, Pages 4274-4279

岡村 春樹, インターロイキン18, Molecular Medicine, 1997年 9月 1日, Vol.34, Pages 62-72

UDAGAWA Nobuyuki, Journal of Experimental Medicine, 1997年 3月17日, Vol.185, N 0.6, Pages 1005-1012

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00

C07K 14/54

BIOSIS(STN)

CA(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)