

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4469180号
(P4469180)

(45) 発行日 平成22年5月26日(2010.5.26)

(24) 登録日 平成22年3月5日(2010.3.5)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 1

請求項の数 5 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-578416 (P2003-578416)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月26日(2003.3.26)
 (65) 公表番号 特表2006-504397 (P2006-504397A)
 (43) 公表日 平成18年2月9日(2006.2.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/003150
 (87) 国際公開番号 W02003/080663
 (87) 国際公開日 平成15年10月2日(2003.10.2)
 審査請求日 平成18年3月23日(2006.3.23)
 (31) 優先権主張番号 0207224.7
 (32) 優先日 平成14年3月27日(2002.3.27)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 502407336
 ノバルティス・フォルシュングスシュティ
 フトUNG・ツヴァイクニエーラッスン
 グ・フリードリッヒ・ミーシェー・インス
 ティトゥート・フォー・バイオメディカル
 ・リサーチ
 Novartis Forschungs
 stiftung Zweigniede
 rlassung Friedrich
 Miescher Institute
 for Biomedical Rese
 arch
 スイス、ツェーハー4058バーゼル、
 マウルペーアシュトラセ66番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テネイシンW組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、核酸ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 4】

配列番号：2 で示されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号：2 または配列番号：4 で示されるアミノ酸配列からなる単離ポリペプチドを特異的に認識する抗体。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、腫瘍で特異的に発現するポリペプチド、抗腫瘍および/または抗腫瘍形成活性を有する活性薬物、および幹細胞分化、特に、例えば、骨形成での骨芽細胞形成に依存する状態を改善するのに有効な薬物、該薬物の医薬組成物、および該薬物および組成物の医薬上の使用に関する。本発明は、試験管内での、抗腫瘍および/または抗腫瘍形成活性

について、ならびに、幹細胞分化を促進するのに有効な薬物についてスクリーニングする方法にも関する。

【 0 0 0 2 】

細胞の互いとの、および細胞外基質 (E C M) との接着、ならびに該結合の結果として伝達される細胞シグナルは、体の形態および機能の発生および維持に基本的に重要である。 E C M は、組織のホメオスタシスでの重要な制御機能を有し、癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子と共に、腫瘍形成に決定的に関与する (Boudreau, N. & Bissell, M. J. (1998) *Curr Opin Cell Biol* 10: 640-646 and Ruoslahti, E. (1999) *Adv Cancer Res* 76: 1-20 に概説) 。

【 0 0 0 3 】

世界の豊かな国では、癌は、5 人中約 1 人の死亡の原因となり、最も一般的な 5 種類の癌は肺、胃、乳房、大腸 / 直腸、および子宮頸部である。この種の腫瘍は、たいてい、リンパ管および血管により、転移する。癌は、全ての場合で致命的であるわけではないが、癌を発症する約半数のヒトがそれにより死亡する。癌患者および彼らの医師に直面する問題は、癌を治癒させようとすることは雑草を駆除しようとすることに似ているということである。

【 0 0 0 4 】

癌を効果的に処置するための 1 つの方法は、初期での診断を受けることである。ほとんどの癌は、発症の初期では、広範には血管新生しない (それゆえ、浸潤性でない) 。高血管新生、浸潤性、および体中に広がった最終的な転移性癌への移行は、通常、 1 0 年以上かかる。浸潤する前に癌が検出されると、癌にかかった組織の外科的除去が効果的な治療となる。しかしながら、癌は、しばしば、臨床的症状が現れた際にのみ検出される。一般的に、該症状は、疾病が十分に確立した場合 (しばしば、転移が生じた後) にのみ現れ、患者の予後は、癌にかかった組織の外科的切除後でさえ、悪い。従って、癌の初期での検出は、検出が罹患率を有意に減少させるという点で重要である。初期で癌を診断する、信頼でき、非侵襲性、かつ正確な技術が、多くの命を助けるだろう。

【 0 0 0 5 】

癌細胞は、外科的に除去されるか、または毒性化合物または照射で破壊され得るが、癌にかかった細胞全てを排除することは大変困難である。従って、一般的な目標は、癌細胞を選択的に殺す一方で、影響を受けていない正常体細胞を残す、よりよい方法を見出すことである。該努力の一部は、新規抗癌薬物を同定することを含む。

【 0 0 0 6 】

腫瘍形成とは別に、 E C M は、組織のホメオスタシス、および体の形態および機能の発生および維持、例えば、骨格の発生またはリモデリング、または骨形態形成での重要な制御機能を有する。骨髄は、骨形成の可能性のある幹細胞を有し、かつ骨形成に係する決定された骨形成前駆体細胞、および誘導可能な骨形成前駆細胞からなる。決定された骨形成前駆細胞は、外因性シグナルなしで、骨に分化できる。誘導可能な骨形成前駆細胞は、分化プログラムを開始するための分子シグナル、例えば、細胞外基質との結合による誘導を必要とする。

【 0 0 0 7 】

細胞接着を仲介する多くの分子が、脊椎動物および無脊椎動物共に分子レベルで同定され、特徴付けられた。テネインは、巨大な多重結合細胞外基質タンパク質のファミリーであり、それぞれが、変動可能な数の繰り返しドメインで構成される相同なサブユニットを有する。これらは、 7 個の繰り返し、上皮成長因子 (E G F) 様繰り返し、フィブロネクチンタイプ I I I ドメイン、およびフィブリノーゲンでも見出される、 C 末端球状ドメインを含む。テネイン C は、ある例では、筋腱間抗原として (Chiquet, M. & Fambrough, DM. (1984) *J Cell Biol* 98(6):1937-1946) 、そして別の例では、神経膠腫の間質で富化されたタンパク質 (すなわち、腱および靱帯、および腫瘍間質の細胞外基質での主要部分のテネイン C 発現を反映する) として (Bourdon, MA. et al (1983) *Cancer Res* 43(6):2796-2805) 発見された、ファミリーの最初のメンバーであった。テネイン C (へ

10

20

30

40

50

キサブレキオン (hexabrachion) と呼ばれる) に関する発見のさらなる例は、そのフィブロネクチンとの相互作用を反映する (Erickson, HP. et al. (1984) *Nature* 311(5983):267-9)。腫瘍細胞のフィブロネクチンとの強制的相互作用は、細胞培養での増殖を遮断し、かつヌードマウスでの腫瘍成長を減少させ得る (Akamatsu H. et al (1996) *Cancer Res* 56: 4541-4546およびGiancotti, F. G & Ruoslahti, E. (1990) *Cell* 60: 849-859)。テネイシン C は、細胞のフィブロネクチンとの相互作用を分断させ、そしてこの方法で、腫瘍細胞の増殖を増大させることが分かった。Chiquet-Ehrismann, R. et al (1988) *Cell* 53: 383-390は、テネイシン C のフィブロネクチンとの結合が、細胞のフィブロネクチンとの接着を遮断し、ラットの乳腺癌腫細胞の増殖を増加させることを最初に示した (Chiquet-Ehrismann, R. et al (1986) *Cell* 47: 131-139)。

10

【 0 0 0 8 】

テネイシン C は、神経系を含む多数の発生中の組織に存在する。成熟靱帯および腱での富化にも関わらず、筋が損傷された骨格および心筋には存在しない。テネイシン C 発現は、本質的には、全癌腫、ならびに多くの他の種類の腫瘍で上昇される (概説として、Chiquet-Ehrismann, R. (1993) *Semin Cancer Biol* 4(5):301-10を参照されたい)。さらに、テネイシン C は、創傷治癒 (Latijnhouwers, MA. et al. (1996) *J Pathol* 178(1):30-5)、骨格形成 (Koyama, E. et al (1996) *J Orthop Res.* 14(3):403-412およびHall, BK. & Miyake, T. (1995) *Int J Dev Biol.* 39(6):881-893)、ならびに、感染および炎症を含む多くの疾病 (Schenk, S. et al. (1995) *Int J Cancer* 61(4):443-9) でアップレギュレートされる。

20

【 0 0 0 9 】

それぞれのテネイシンフェミリーのメンバーは、胚形成中、および成体での特異的遺伝子発現パターンを示し (概説として、Chiquet-Ehrismann, R. (1995) *Experientia* 51(9-10):853-62を参照されたい)、これは、それぞれのメンバーの特異的な役割を示唆する。テネイシン R は、主に脳組織で見出される神経系の細胞外基質成分である (Pasheva, P. et al. (2001) *Prog Brain Res.* 132:103-14. Review) が、テネイシン X は、筋肉と皮膚の結合組織で顕著に発現する。ある患者では、テネイシン X の不測が、エーラーダングロスフェノタイプとなると報告された (Burch, GH. et al. (1997) *Nat Genet* 17(1):104-8)。

【 0 0 1 0 】

現時点で、文献 (Weber, P. et al. (1998) *J Neurobiol* 35(1):1-16) での利用可能なテネイシン W についての報告は 1 つだけである。この研究では、テネイシン W をコード化する cDNA が、全テネイシン分子で見出される保存上皮成長因子様ドメインに基づき、受精後 20 ~ 28 時間のゼブラフィッシュ cDNA ライブラリーから単離された。テネイシン W 転写物の発現パターンは、インサイツハイブリダイゼーションにより、発生中のゼブラフィッシュで研究された。それは、神経堤および硬節細胞、および発生中の骨格で存在することが見出された。Genebank 配列 AJ001423 は、ゼブラフィッシュのテネイシン W を提供し、そして AL049689 は、「テネイシン R 様、1 番染色体由来新規ヒト mRNA」(機能は未知)を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

本発明は、

(a) 配列番号: 1 で説明されるヌクレオチド配列;

(b) 配列番号: 2 で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列;

(c) (a) または (b) の配列と少なくとも 85% の同一性を有するヌクレオチド配列;

(d) (a)、(b)、または (c) の配列のうち 50 個より多くの連続するヌクレオチドの部分配列 (subsequence); および

(e) (a)、(b)、(c)、または (d) の任意のヌクレオチド配列または部分配列と相補的なヌクレオチド配列、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子を含む組成物を提供す

40

50

る。

【0012】

本発明の1つの態様において、ヌクレオチド配列を有する単離核酸分子は、好ましくは、(a)の配列と少なくとも85%の同一性を示し、より好ましくは、配列番号：2で示されるアミノ酸配列のアミノ酸欠損、付加（例えば、融合タンパク質）、または置換を含む変異体の様な、配列番号：2で示されるアミノ酸配列の変異体をコード化する。好ましくは、変異体は、配列番号：2の該アミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸の保存的置換を含み、より好ましくは、該変異体は、幹細胞分化誘導活性、特に、幹細胞からの骨芽細胞発生を誘導する活性を有する。最も好ましいのは、単離核酸分子が、配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する場合である。

10

【0013】

核酸分子はアンチセンス分子であり得る。この場合、それは、リボまたはデオキシリボヌクレオチドの一部または全部を置換するヌクレアーゼ分解に対して抵抗性のヌクレオチド残基を有することが望まれる。

【0014】

本発明の核酸分子を含む核酸ベクター、ならびに、ベクターまたは核酸を含む宿主細胞、および本発明の操作された核酸を含むか、または内在性配列のないトランスジェニック、ノックアウト、または遺伝子改変動物（ヒト以外、特に、マウス）も提供される。

【0015】

本発明は、

20

(a) 配列番号：2で説明されるアミノ酸配列；および
(b) (a)の配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列；および
(c) (a)または(b)の配列の少なくとも30個の連続するアミノ酸の部分配列（ただし、該部分配列は、配列番号：2のアミノ酸番号1102から1152の範囲ではない）、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む組成物も提供する。

【0016】

好ましくは、(b)のアミノ酸配列は、配列番号：2のアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸の保存的置換を含む。より好ましくは、ポリペプチドまたはフラグメントは、上記の幹細胞分化誘導活性を有する。有用なフラグメントは、例えば、配列番号：2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して生じた、ポリクローナル抗体により認識されるエピトープを示す。特に好ましいポリペプチドは、配列番号：2で示されるアミノ酸配列によりコード化されるものである。

30

また、本発明のポリペプチドに対して特異的に反応する抗体も提供される。

【0017】

本発明の別の態様において、組成物は、

(a) 配列番号：1または配列番号：3で説明されるヌクレオチド配列；
(b) 配列番号：2または配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列；
(c) (a)または(b)、好ましくは(a)の配列の任意の1つと少なくとも35%の同一性を有するヌクレオチド配列；
(d) (a)、(b)、または(c)の配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドの部分配列；および
(e) (a)、(b)、(c)、(d)と相補的なヌクレオチド配列、
からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子、
および、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む。

40

【0018】

1つの実施態様において、核酸分子は、好ましくは、幹細胞分化誘導活性を有するタンパク質をコード化する。別の実施態様において、核酸分子は、配列番号：1または配列番

50

号：3に対するアンチセンスである部分配列を有し、該核酸分子は、ヌクレアーゼ分解に対して抵抗性のヌクレオチド残基を含む。別の実施態様において、単離核酸分子は、配列番号：2または配列番号：4で示されるアミノ酸配列をコード化する。なお別の実施態様において、核酸分子は、配列番号：1のヌクレオチド2380～3171、配列番号：3のヌクレオチド2371～3162、配列番号：1のヌクレオチド2380～3171の相補体、および配列番号：3のヌクレオチド2371～3162の相補体からなる群から選択される部分配列、またはそのRNA相当物を有する。

【0019】

従って、上記の薬剤としての使用のための核酸組成物、ならびに癌または骨病変の予防または処置のための医薬の製造のための該組成物の使用も提供される。

10

【0020】

テネイシンW、好ましくは、組換えテネイシンW、および医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む組成物も提供される。好ましい実施態様において、テネイシンWは、

(a) 配列番号：2または4で説明されるアミノ酸配列；

(b) (a)の配列と少なくとも35%の同一性を有するアミノ酸配列；および

(c) (a)または(b)の配列の少なくとも30個の連続するアミノ酸配列の部分配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0021】

20

好ましくは、ポリペプチドは、上記の幹細胞分化誘導活性を有する。より好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号：4で示されるアミノ酸配列によりコード化される。

【0022】

従って、テネイシンWレベルの増加を必要とする任意の疾病または状態、例えば、血栓症、創傷治癒、またはアテローム性動脈硬化症、ならびに骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨折治癒、骨粗鬆症の処置または予防的処置のためのテネイシンWの使用、ならびに、テネイシンWの幹細胞マーカーとしての使用も提供される。

【0023】

転移性癌を含む癌（例えば、膠芽細胞腫、前立腺癌腫、肺癌腫、結腸直腸癌腫、骨癌腫、または乳癌腫）の予防または処置、またはテネイシンWを含む任意の疾病または状態、例えば、過剰骨成長の予防または処置のための薬剤として使用するための、ならびに医薬の製造のための、テネイシンWを特異的に認識する抗体も提供される。

30

【0024】

本発明は、腫瘍形成の予防または予防的処置、または腫瘍または癌の処置または予防的処置のための、またはテネイシンWを含む任意の疾病または状態、例えば、骨形成の促進または阻害により改善される状態の処置または予防的処置のための薬物を同定する方法も提供し、これは、試験化合物をテネイシンW発現細胞試料と接触させること、次に、該試験化合物が非存在である場合と比較して、

(a) 細胞増殖、例えば、細胞周期のS期に入る細胞のプロGRESSION；

(b) DNA合成；

40

(c) 細胞接着；

(d) 細胞伝播；

(e) フィブロネクチンでの病巣接着 (focal adhesion) およびアクチンストレスファイバー形成；および

(f) 細胞の細胞外基質 (ECM) との結合、

のうちの1以上の変化を測定することを含む。

【0025】

必要に応じて、該方法は、試験化合物が非存在である場合と比較して、テネイシンW発現の変化を測定することをさらに含む。テネイシンWは、上記の特徴のうち1以上を有する。特に好ましいアッセイは、酵素結合免疫測定法 (ELISA) の形で行われる。

50

【0026】

テネイシンWの機能のモジュレーターを同定する方法も提供され、これは、
(a) 試験化合物をテネイシンWおよび/または 8 1 インテグリンと接触させること、および、該試験化合物が非存在である場合と比較して、
(b) 該試験化合物のテネイシンWおよび/または 8 1 インテグリンとの結合を測定すること、または
(c) テネイシンWの 8 1 インテグリンとの結合の開裂を測定すること、
を含む。

【0027】

必要に応じて、方法は、対照化合物のテネイシンWとの結合を測定することをさらに含む。1つの実施態様において、テネイシンWは、固体表面に、例えば、テネイシンWに対する抗体反応を用いて結合される。該結合は、蛍光標識、蛍光クエンチャー、放射性標識、シンチレーション標識、または酵素で標識された抗体を用いて、有利に検出され得る。または、結合は、8 1 の固定化テネイシンWとの接着（実施例8に記載）、またはその逆を測定することにより、検出される。テネイシンWの 8 1 インテグリンとの結合の減少は、テネイシンWの 8 1 インテグリンとの相互作用のインヒビター（そしてそれ故、テネイシンWの機能のインヒビター）の指標である。試験化合物の存在下でのテネイシンWの 8 1 インテグリンとの結合の増加は、8 1 インテグリンを活性化し、これにより、テネイシンWの機能のアゴニストとして作用する、可能性のある薬物の指標である。

【0028】

従って、本発明のスクリーニング方法により同定される、腫瘍形成の予防または予防的処置、または腫瘍の診断、または処置または予防的処置、またはテネイシンWを含む任意の疾病または状態、例えば、骨形成の促進により改善される状態の処置または予防的処置のための薬物も提供される。

【0029】

癌を診断または予後診断する方法も提供され、これは、
(a) 個体から採取された試料をテネイシンWの存在について分析すること；および
(b) テネイシンWの存在を、好ましくない予後診断または診断と関連づけること、
を含む。

【0030】

必要に応じて、方法は、健常組織と比較して、試料中のテネイシンWの増加（レベルの上昇）を、好ましくない予後診断または診断と関連づけることをさらに含む。テネイシンWは、テネイシンWに特異的な抗体を用いて有利に検出され得るか、またはテネイシンWは、ポリメラーゼ連鎖反応法（例えば、RT-PCR）の様な当該技術分野でよく知られた技術を用いて、転写物レベルで検出され得る。方法は、対照のさらなる使用を含んでもよい。

【0031】

試料は、例えば、個体由来の血清であり得る。方法は、試料中の細胞を細胞培養で増殖させることもさらに含む。1つの実施態様において、方法は、試料を 8 インテグリンの存在（8 インテグリンの存在は、好ましくない予後診断または診断と関連する）について分析することをさらに含む。

【0032】

本発明者は、細胞外基質分子、発生中のその発現、細胞接着、および腫瘍細胞の増殖を調べ、そして、哺乳類テネイシンファミリーの新規メンバーを特徴付けた。本発明より前に、テネイシンWは哺乳類供給源から同定されておらず、その機能は以前は分かっていなかった。本発明者は、マウスおよびヒトテネイシンWをコードする完全cDNA配列を同定し、特徴付けた。抗血清は、テネイシンWのフラグメントに対して調製され、そして、腫瘍間質、骨膜、および肝臓組織でのテネイシンWを検出し、かついくつかの哺乳類種由来のテネイシンWと交差反応する。具体的に、本発明者は、テネイシンWが、転移性腫

瘍細胞、ならびに骨膜、骨形成のための幹細胞成分で特異的に発現されることを発見した。

【 0 0 3 3 】

従って、1つの態様において、本発明は、

(a) 配列番号： 1 で説明されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号： 2 で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列；

(c) (a) または (b) の配列と少なくとも 8 5 % の同一性を有するヌクレオチド配列；

(d) (a)、(b)、または (c) の配列の 5 0、7 5、1 0 0、2 0 0 個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分配列；および

(e) (a)、(b)、(c)、または (d) の任意のヌクレオチド配列または部分配列と相補的なヌクレオチド配列、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸分子を含む組成物を提供する。

【 0 0 3 4 】

組成物は、例えば、ゲノム DNA、c DNA、および mRNA を含む、様々な種類の核酸を含む。本発明の 1 つの態様において、ヌクレオチド配列を有する単離核酸分子は、好ましくは、(a) の配列 (配列番号： 1) と少なくとも 8 5 % の同一性、より好ましくは、9 0 % の同一性、最も好ましくは、9 5、9 8、または 1 0 0 % の同一性を示す。配列番号： 2 で示されるアミノ酸を有するポリペプチド、または配列番号： 2 で示されるアミノ酸配列と比較して、アミノ酸欠損、付加 (例えば、融合タンパク質)、または置換を含む変異体の様なその変異体をコード化する核酸も包含される。従って、たいていのアミノ酸は 1 以上の 3 塩基コドンによりコード化されるから、遺伝子コードの縮重により、該ポリペプチドをコード化できる様々な核酸は異なり得る。該コドンの同一性は、当該技術分野でよく知られており、該情報は、本発明の範囲の核酸の構築のために用いられ得る。変異体は、野生型タンパク質の生物学的活性を増強、付加または減少させる 1 以上のアミノ酸置換を有する点で、野生型タンパク質と異なる。アミノ酸の変異が選択されると、該変異体をコード化する核酸は、当該技術分野でよく知られた方法に従い、構築される。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、変異体は、配列番号： 2 の該アミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸での保存的置換を含む。変異体は、典型的には、配列番号： 2 で説明されるポリペプチドの生物学的機能、すなわち、幹細胞分化誘導活性、特に、幹細胞から骨芽細胞発生を誘導する活性、またはテネイシン W を特異的に認識する抗体との結合を示す。生物学的活性を維持するために、従って、1 個の保存的置換が好ましく、これは、当該技術分野でよく知られている。最も好ましいのは、単離核酸分子が、配列番号： 2 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する場合である。

【 0 0 3 6 】

核酸分子は、アンチセンス分子であり得る。この場合、それは、リボまたはデオキシリボヌクレオチドの一部または全部を置換するヌクレアーゼ分解に対して抵抗性である、ヌクレオチド残基を有することが望ましい。ヌクレアーゼに対して抵抗性の該ヌクレオチド残基は、当該技術分野でよく知られており、かつ化学的方法により容易に合成され得る。

【 0 0 3 7 】

本発明の核酸分子を含む核酸ベクター、ならびに、ベクターまたは核酸を含む宿主細胞、および本発明の操作された核酸を含むか、または内在性配列のない、トランスジェニック、ノックアウト、遺伝的に改変された動物 (ヒト以外、特にマウス) も提供される。

【 0 0 3 8 】

本発明は、

(a) 配列番号： 2 で説明されるアミノ酸配列；

(b) (a) の配列と少なくとも 8 5 % の同一性、好ましくは、9 0、9 5、9 8、または 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列；および

(c)(a)または(b)の配列の少なくとも30、40、50、75、100個、またはそれ以上の連続するアミノ酸の部分配列(ただし、該部分配列は、配列番号:2のアミノ酸番号1102から1152は含まない)、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する単離ポリペプチドを含む組成物も提供する。

【0039】

好ましくは、(b)のアミノ酸配列は、配列番号:2のアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸の保存的置換を含む。より好ましくは、ポリペプチドまたはフラグメントは、上記の幹細胞分化誘導活性を有する。有用なフラグメントは、例えば、配列番号:2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して生じた、ポリクローナル抗体により認識されるエピトープを示す。特に好ましいポリペプチドは、マウス組織由来の配列番号:2で示されるアミノ酸配列によりコード化されるものである。

10

【0040】

従って、組換え方法、または合成方法により生成されるか、または天然に存在する供給源から単離されるかに関わらず、配列番号:2により記載されるポリペプチドの変異体および誘導体、またはそのフラグメントも本発明の範囲に含まれる。例えば、修飾アミノ酸/ペプチド結合、および安定性または活性の様な改善された特性を有する、非天然に存在するアミノ酸および/または環状ペプチドが含まれる。さらに、本発明のペプチドは、別のタンパク質、例えば、ポリペプチド(そのフラグメントを含む)の標的とされる送達または検出、または精製のためのタグを有する形、または融合したものであってもよい。

20

【0041】

アミノ酸配列の意味での「変異体」は、別のもの、普通は関係アミノ酸配列と1個以上のアミノ酸により異なるアミノ酸配列を定義する。変異体は、「保存的」変化を有し、ここで、置換されたアミノ酸は、類似の構造または化学特性を有する(例えば、ロイシンのイソロイシンでの置き換え)。変異体はあまり「非保存的」変化(例えば、グリシンのトリプトファンでの置き換え)を有さない。類似の少数変異体はまた、アミノ酸欠損または挿入(すなわち、付加)、または両方を含む。いくつかのアミノ酸残基が、活性(例えば、抗癌活性、骨芽細胞促進活性、抗原活性)を破壊することなく、置換、挿入、または欠損されるかを決定する際のガイダンスは、当該技術分野でよく知られたコンピュータプログラムを用いて見出される。本発明のポリペプチドの変異体は、ミュータント変異体の全ての形(例えば、少なくとも1個のアミノ酸が欠損されるか、または置換されている)を含む。アミノ酸の置換を含む任意の変化は、好ましくは、天然または保存的置換である。他の変異体は、配列中に少なくとも1個の付加アミノ酸を含み、および/または当該技術分野でよく知られた、融合タンパク質の様な付加アミノ酸配列またはドメインをさらに含むタンパク質またはポリペプチドを含む。

30

【0042】

さらに、本発明のポリペプチドの変異体は、配列中の少なくとも1個のアミノ酸が天然または非天然の類似体であるものを含む。また、配列中の1個以上のアミノ酸は、例えば、物理的安定性を増加させるために、または酵素、特に、プロテアーゼまたはキナーゼ活性に対する感受性を減少させるために、化学的に修飾されてもよい。

40

【0043】

本発明のポリペプチドに対して特異的に反応する抗体も提供される。抗体産生方法は、当該技術分野でよく知られている。本発明のポリペプチドに特異的な抗体は、動物を免疫原性のある量のポリペプチドで免疫することにより、容易に得られ得る。従って、本発明のポリペプチドを認識する抗体は、動物を免疫することにより得られ、かつ本発明のポリペプチドを特異的に認識することが、ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫染色、または当該技術分野で既知の他の日常的方法により確かめられ得る、ポリクローナル抗体および抗血清を包含する。

【0044】

ポリクローナル抗体が感作により得られ得ると、ハイブリドーマにより分泌されるモノ

50

クローナル抗体は、感作動物のリンパ球から得られることはよく知られている (Chapter 6, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。従って、本発明のポリペプチドを認識するモノクローナル抗体も提供される。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生する方法は、当該技術分野の技術者に既知であり、科学文献および特許文献に記載されている (例えば、Coligan, *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Green, NY (1991); Stites (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein (Stites); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed.) Academic Press, New York, NY (1986); および Kohler (1975) *Nature* 256: 495. を参照されたい)。該技術は、ファージまたは類似の細胞で表された組換え抗体ライブラリーからの抗体の選択を含む。Huse (1989) *Science* 246: 1275 and Ward (1989) *Nature* 341: 544 を参照されたい。組換え抗体は、哺乳類細胞での一過性または安定的発現ベクターにより発現され得る (例えば、Norderhaug (1997) *J. Immunol. Methods* 204: 77-87)。

【0045】

本発明において、抗体は、その活性フラグメントも包含する。活性フラグメントは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味する。特別に名付けられたものは、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、および $F v$ の様な活性フラグメントである。例えば、 $F(a b')_2$ は、本発明の抗体がペプシンで切断されると生じ、そして $F a b$ は、パインで切断されると生じる。 $F a b'$ は、 $F(a b')_2$ が、2-メルカプトエタノールの様な試薬で還元され、そしてモノヨード酢酸でアルキル化されると生じる。 $F v$ は、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域がリンカーで結合されている、単一活性フラグメントである。キメラ抗体は、該活性フラグメントを保存すること、および該活性フラグメント以外のフラグメントを別の動物のフラグメントとに置換することにより得られる。特に、ヒト化抗体が、想定される。

【0046】

本明細書で調べられた核酸およびポリペプチド配列は、転移性癌細胞株から採取された試料で差次的に発現することが見出され、転移性癌組織、ならびに他の種類の癌および疾病でのテネイシン W 発現を予測する。

【0047】

従って、本発明のある種の態様は、腫瘍組織、特に、転移性癌細胞株で差次的に発現される核酸、該核酸によりコード化されるポリペプチド、該ポリペプチドと免疫反応する抗体、および該組成物の製造に関する。さらに、本発明は、診断および治療アッセイ、および例えば、対象核酸の異常発現を含む疾患を検出および処置するための試薬を提供する。

【0048】

従って、本発明のさらなる態様において、テネイシン W またはそのフラグメントをコード化する単離核酸分子、および医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む、組成物が提供される。テネイシン W をコード化する核酸の医薬上の使用は、これまで示されておらず、従って、該実施態様において、医薬組成物の核酸は、本発明の核酸に限られない。具体的には、組成物は、

(a) 配列番号：1 または配列番号：3 で説明されるヌクレオチド配列 (ヒトテネイシン W をコード化する) ;

(b) 配列番号：2 または配列番号：4 で示されるアミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列 ;

(c) (a) または (b)、好ましくは (a) の配列の任意の 1 つと少なくとも 35 % の同一性、好ましくは、少なくとも 40、50、60、70、80、90、95、または 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ;

(d) (a)、(b)、または (c) の配列のうち少なくとも 10、15、20、25、30、40、50、75、100 個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分配列 ; および

(e) (a)、(b)、(c)、または (d) に相補的なヌクレオチド配列、

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離核酸、および医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む。

【0049】

1つの実施態様において、核酸分子は、配列番号：2または配列番号：4で示されるアミノ酸配列、または配列番号：2または4に対応する配列と少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、70%、80%、90%、95%、または100%の同一性を有するアミノ酸を有するテネイシンWをコード化する。核酸分子は、配列番号：1または配列番号：2、またはそれに対する相補鎖の少なくとも10、好ましくは、少なくとも15、20、30、50、75、100個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドである。

【0050】

1つの実施態様において、本発明は、抗体パラトープと結合するエピトープをコード化する、配列番号：1のヌクレオチド2380～3171または配列番号：3のヌクレオチド2371～3162、配列番号：1のヌクレオチド2380～3171または配列番号：3のヌクレオチド2371～3162の相補鎖、およびそのRNA相当物からなる群から選択されるヌクレオチド配列フラグメントを含む組成物を提供する。

【0051】

別の実施態様において、核酸分子は、好ましくは、幹細胞分化誘導活性を有するタンパク質をコード化する。日常的方法論を用いて、適当な活性を有するポリペプチドを同定することは当該技術分野の技術者の十分に範囲内であるが、単離核酸分子は、好ましくは、配列番号：2または配列番号：4で示されるアミノ酸配列、最もこのましくは、配列番号：4のものをコード化する。

【0052】

なお別の実施態様において、核酸分子は、配列番号：1または配列番号：3に対するアンチセンスである部分配列を有し、ここで、該核酸分子は、ヌクレアーゼ分解に抵抗性のヌクレオチド残基を含む。

【0053】

核酸分子は、配列番号：1または配列番号：3と、ストリンジントな条件下でハイブリダイズする核酸の全部または一部に対するアンチセンス、または配列番号：1または配列番号：3（テネイシンWをコード化する）と低ストリンジントな条件下でハイブリダイズできる、配列番号：1または配列番号：3と少なくとも70%の同一性を有する配列に対するアンチセンスであってもよい。低ストリンジントな条件は、約10倍の高濃度を利用する高ストリンジントと比較して、約0.01×SSCバッファーを利用する。または、アンチセンスRNAは、テネイシンW遺伝子の制御配列、特に、該遺伝子の5'上流配列（プロモーター領域）に対するアンチセンスであってもよい。同様に、低分子RNA iオリゴヌクレオチドが、特定の方法で、テネイシンWの発現を阻害するように設計され得る。

【0054】

核酸は、RNAまたはDNA、センスまたはアンチセンスであり得、そしてある実施態様においては、2本鎖（siRNAを含む）または1本鎖であり得る。ある種の実施態様において、核酸（センスまたはアンチセンス）のヌクレオチド残基の少なくともいくつかは、ヌクレアーゼ分解に対して抵抗性とされ、そしてこれは、ホスホロチオエートおよび/またはメチルホスホン酸の様な残基から選択され得る。

【0055】

上記のアンチセンス核酸は、薬剤、好ましくは、癌の様なテネイシンWレベルの上昇に依存する状態の予防または処置のための医薬の製造のためである医薬上の適用として、有利に用いられ得る。

【0056】

従って、本発明は、テネイシンWに依存する状態を予防または処置する方法も提供し、これは、個体に本明細書に記載の核酸を有効量投与することを含む。従って、本発明は、薬剤、ならびに特に、癌または骨病変の予防または処置のための医薬の製造のための該核

10

20

30

40

50

酸分子の使用を包含する。

【 0 0 5 7 】

なお別の態様において、本発明は、1以上のベクター配列、およびテネイン(teneurin) Wをコード化する核酸配列を含む、宿主細胞で複製可能な発現ベクターを提供する。薬剤として使用するための構造物、ならびに、癌の予防または処置、または骨病変の予防または処置のための医薬の製造のためのその使用も提供される。

【 0 0 5 8 】

本発明の他の実施態様は、(a)本発明のテネインWタンパク質またはポリペプチドをコード化する少なくとも1個の核酸配列、(b)上記のアンチセンス核酸(または例えば、細胞でのアンチセンスRNAの発現が予測される場合、その相補体)、または(c)上記の核酸、およびテネインW(またはその相同体)以外のタンパク質をコード化する少なくとも1個の核酸配列、例えば、ベクター配列を含む、宿主細胞で複製可能な核酸構造物を含む。該構造物は、天然に存在する配列ではない。該構造物は、それらがベクターとして機能することを可能とするDNAの必須配列を欠いているが、「ハイブリッド」核酸として天然に存在するものではない。それらは、該核酸構造物の宿主細胞での複製を可能とするために、本発明のヌクレオチド配列と作動可能に結合した転写制御領域を非限定的に含む、リンカーまたは制限酵素部位として機能する核酸配列を含む。好ましい構造物は、当該技術分野の技術者によく知られたオリゴヌクレオチド合成方法を用いて、合成される。

【 0 0 5 9 】

上記の構造物を含むベクターも提供される。好ましいベクターは、発現ベクター、好ましくは、プラスミドまたはウイルスベクターであるが、クローニングベクターも、必要に応じて、プラスミドの形で提供される。

本発明は、ベクターを含有する宿主細胞を提供する。好ましい宿主細胞は、真核生物の細胞、より好ましくは昆虫細胞、または哺乳類細胞である。

【 0 0 6 0 】

本発明の構造物、ベクター、および形質転換された宿主細胞は、薬剤として、ならびに、癌または骨疾病の様なテネインWに依存する状態の予防または処置のための医薬の製造のための使用である。

【 0 0 6 1 】

同様に、本発明のさらなる態様において、テネインW、好ましくは、組換えテネインW、またはそのフラグメント、および医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む組成物が提供される。好ましい実施態様において、テネインWは、

- (a) 配列番号：2または4で説明されるアミノ酸配列；
 - (b) (a)の配列と少なくとも35%の同一性、好ましくは、少なくとも50%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列；および
 - (c) (a)または(b)の配列のうち少なくとも5、10、15、20、30、50、75、100個、またはそれ以上の連続するアミノ酸の部分配列、
- からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、ポリペプチドは、上記の幹細胞分化誘導活性を有する。さらに好ましくは、ポリペプチドは、配列番号：4で示されるアミノ酸配列によりコード化される。

【 0 0 6 3 】

従って、テネインWレベルの増加を必要とする任意の疾病または状態、例えば、血栓症、創傷治癒、またはアテローム性動脈硬化症、ならびに、骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨折治癒、骨粗鬆症の処置または予防的処置のためのテネインWの使用、ならびに、幹細胞マーカーとしてのテネインWの使用も提供される。なおさらなる態様において、テネインWタンパク質は、薬剤として用いられる。

【 0 0 6 4 】

本発明は、例えば、腫瘍形成の予防または予防的処置、または腫瘍または癌の処置また

10

20

30

40

50

は予防的処置のための医薬の製造のための、テネイシンWの使用をさらに提供する。本発明は、骨疾病、リウマチ、喘息、アレルギー疾患、自己免疫疾患、移植の拒絶反応の予防、およびテネイシンを含む任意の他の疾病（例えば、血栓症、癌、創傷治癒、およびアテローム性動脈硬化症）のうち任意の1以上の処置または予防的処置のための医薬の製造のための、テネイシンWの使用も含む。

【0065】

従って、本発明は、テネイシンWの上記の活性フラグメントのうち1つ以上を含む、ヒトのための医薬組成物、または動物で使用するための獣医薬組成物を提供する。該組成物は、他の活性または非活性薬物も含んでいてもよい。非活性薬物は、食塩水、緩衝食塩水、デキストラン、および水に限らず、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含んでもよい。

10

【0066】

従って、本発明の組成物および医薬は、腫瘍が形成されるのを予防するために、予防的に用いられるか、またはそれらは、既に存在する腫瘍状態を処置または抑制するために、治療方法または部分的治療方法で用いられる。腫瘍同様、癌にかかった状態、または悪性状態は、本発明の組成物または医薬で予防または処置される。

【0067】

特定の態様において、本発明は、放射免疫療法のための、上記の核酸、またはタンパク質またはポリペプチドの使用を提供する。放射標識抗体の使用は、腫瘍への直接的な放射療法を目標とするための有望な方法である。抗テネイシンC抗体は、フェーズIおよびI¹の臨床試験で現在試験されている。悪性神経膠腫の患者は、腫瘍に直接注射される¹³¹I標識抗テネイシン抗体を用いた局所領域放射免疫療法（LR-RIT）を受けた（Riva et al., 1999a）。第1の結果は、LR-RITが、特に、微小異常の患者での良好な結果を伴い、安全に行われ得ることを示す。類似の方法は、⁹⁰Y（純線エミッター）標識抗体（Riva et al., 1999b）で行われ、有望な結果となった。より有効な可能性のある放射免疫療法は、患者に過度の毒性のない、²¹¹At標識抗テネイシン抗体（Zalutsky et al., 2001）の場合の様な、他の同位元素を用いて可能であることが示された。腫瘍への特異的標的化同位元素の存在は、腫瘍の連続的シンチグラフィを可能とし（Riva et al., 1999a）、治療の成功の直接的判断を可能とするので、それはさらに、腫瘍の正確な画像化に有用なツールである。類似の方法論は、テネイシンWに特異的な抗体を用いて適用され得る。

20

30

【0068】

本発明の腫瘍または腫瘍細胞は、好ましくは、間質でテネイシンWを発現するものである。特に好ましい実施態様において、腫瘍は、固形腫瘍、例えば、骨肉腫、膠芽細胞腫の様な間葉系腫瘍、または乳癌腫、前立腺癌腫、肺癌腫、および結腸直腸癌腫の様な上皮癌である。

【0069】

本発明は、さらに、骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨粗鬆症、骨関節炎の処置または予防的処置、軟骨および骨病変の処置のための、テネイシンWの使用を提供する。上記のタンパク質またはポリペプチドは、骨形成を促進するための股関節、膝関節、または骨折（これらに限定されない）を含むインプラントに取り込まれるために用いられる。

40

【0070】

本発明は、腫瘍形成の予防または予防的処置、または腫瘍または癌、またはリウマチ、喘息、アレルギー疾患、自己免疫疾患の任意の1以上の処置または予防的処置、テネイシンWを含む任意の疾病、例えば、個体の血栓症、創傷治癒、およびアテローム性動脈硬化症の処置または予防的処置の方法も提供し、これは、テネイシンW、またはそのフラグメントを有効量投与することを含む。

【0071】

本発明は、骨形成の促進により改善される状態、例えば、骨粗鬆症、骨関節炎の処置ま

50

たは予防的処置、個体の軟骨および骨病変の処置の方法も提供し、これは、テネイシンW、またはそのフラグメントを有効量投与することを含む。

【0072】

有効用量の決定は、当該技術分野の技術者の能力の十分範囲内である。任意の化合物について、治療上有効な用量は、まず、細胞培養アッセイ、または適当な動物モデルで評価され得る。動物モデルを用いて、好ましい濃度範囲および投与経路ももたらされる。次に、該情報を用いて、ヒトでの投与のための有効用量および経路が決定され得る。

【0073】

治療上有効な用量とは、症状または状態を改善する活性薬物の量を意味する。該化合物の治療上の効果および毒性は、細胞培養または実験動物での標準的医薬的手順により決定され得る（例えば、ED₅₀、集団の50%で治療上有効な用量；およびLD₅₀、集団の50%で致死用量）。治療と毒性作用との用量比は治療指数であり、それは、LD₅₀/ED₅₀比としても表され得る。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒト使用のための投与量の範囲を明確にするのに用いられる。該化合物の投与量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性のないED₅₀を含む循環濃度範囲にある。投与量は、利用される投与形態、患者の感受性、および投与経路に依存して、該範囲内で変化する。

【0074】

正確な投与量は、処置されるべき患者を考慮して、個々の医師により選択される。投与量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するために、または所望の効果を維持するために、調整され得る。考慮される、さらなる因子は、疾病状態の重症度（例えば、腫瘍の大きさ、および位置）；患者の年齢、体重、および性別；食事；投与時間および頻度；薬物の組合せ；反応感受性；および治療に対する耐容性/応答性を含む。長期間作用する医薬組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に依存して、毎日、3から4日毎、週毎、または2週間に1回投与される。

【0075】

本発明者は、テネイシンWを発現する幹細胞、特に、骨膜、骨形成のための幹細胞成分を観察した。従って、テネイシンWが、骨髄での骨形成前駆細胞（これに限定されない）を含む細胞の幹細胞マーカーとして用いられる、本発明の方法も本発明に包含される。従って、骨芽細胞へ分化する能力のある幹細胞または前駆細胞を、該能力を有さない他の細胞から選択する方法も提供される。テネイシンWを発現する幹細胞は、抗体により検出され得る。テネイシンWを認識する抗体は、必要に応じて、例えば、放射標識、酵素、アビジンまたはビオチン、または蛍光原料（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、またはローダミン）で標識される、テネイシンW抗体に特異的な2次抗体を用いて検出され得る。細胞は、ベースレベル以上のテネイシンW発現を有することを特徴とし、好ましくは、蛍光活性化セルソーター（FACS）を用いて、細胞の混合集団から選択される（例えば、Abe et al., Dev Biol. 1996; 180(2):468-72を参照）。従って、選択された細胞は、蛍光で検出可能なタンパク質を有する。ソートされた細胞は、体の生物学的部分、例えば、骨組織の産生に有用である。

【0076】

薬剤としての使用、ならびに、転移性癌を含む癌（例えば、膠芽細胞腫、前立腺癌腫、肺癌腫、結腸直腸癌腫、骨癌腫、または乳癌腫）の予防または処置、またはテネイシンWを含む任意の疾病または状態、例えば、過剰骨成長の予防または処置のための医薬の製造のための、テネイシンWを特異的に認識する抗体も提供される。本発明の別の態様において、抗体は、テネイシンWまたはそのフラグメントと特異的に反応し、そして癌の予防または処置のための医薬の製造のための抗体の使用、および薬剤としての使用のための抗体が提供される。

テネイシンWまたはそのフラグメントを特異的に認識する抗体、特に、上記のエピトープを認識する抗体も提供される。

【0077】

テネイシンWを検出する方法は、例えば、上記の抗体の使用を、必要に応じて、酵素反応の使用と共に包含する。テネイシンWを認識する抗体は、必要に応じて、例えば、放射標識、酵素、アビジンまたはビオチン、または蛍光原料（F I T C、またはローダミン）で標識される、テネイシンW抗体に特異的な2次抗体を用いて検出され得る。

【0078】

医薬、特に、癌の予防または処置、骨疾病の予防または処置のための医薬の製造のための、または薬剤としての、テネイシンWを特異的に認識する抗体の使用も、本発明により包含される。特に、腫瘍、特に、転移性腫瘍の診断のための、テネイシンWを特異的に認識する抗体の使用も、本発明により包含される。

【0079】

さらなる実施態様において、本発明は、腫瘍形成の予防または予防的処置、または腫瘍または癌の処置または予防的処置、またはテネイシンWを含む任意の疾病または状態、例えば、骨形成の促進（または阻害）により改善される状態の処置または予防的処置のための薬物を同定する方法を提供し、これは、試験化合物をテネイシンW発現試料と接触させること、そして次に、該試験化合物が非存在である場合と比較して、（a）細胞増殖、例えば、細胞周期のS期に入る細胞のプログレッション；（b）DNA合成；（c）細胞接着；（d）細胞伝播；（e）フィブロネクチンでの病巣接着およびアクチンストレスファイバー形成；（f）細胞の細胞外基質（ECM）との結合、のうちの1以上での変化を測定すること、を含む。

【0080】

細胞は、細胞培養へのテネイシンWの添加により、好ましくは、それで固体基質をコートすることにより、増殖を促進される。基質は、細胞接着を促進する任意の表面であり得る。固体基質はまた、フィブロネクチン、コラーゲンなど（これらに限定されない）を含む他のECMによりコートされてもよい。細胞培養は、好ましくは、固体基質上または液体培地中で行われる。（a）から（f）のうちの1つ以上の最初の測定は、細胞を試験物質と接触させる前に行われる。2回目の測定は、その後行われる。多数回のさらなる測定は、細胞の試験化合物との接触後、数時間または数日に渡り行われる。この方法では、細胞応答の時間的経過が得られ、そして分析される。

【0081】

本発明の1つの好ましい実施態様において、液体培地中のテネイシンWの存在が、試験化合物が非存在である場合と比較して、測定される。該試験薬物が非存在である場合と比較して、培地中に存在するテネイシンWレベルの増加は、例えば、骨形成の促進に有効な薬物と関連する。該試験薬物が非存在である場合と比較して、培地中に存在するテネイシンWレベルの減少は、抗増殖性または抗腫瘍性薬物、または骨形成または骨芽細胞形成の阻害に有効な薬物と関連する。

【0082】

好ましい態様において、細胞を試験化合物と接触させた後に生じる次の状態：

- （a）細胞増殖の減少；または細胞周期のS期に入る細胞の割合の減少
 - （b）DNA合成の減少；
 - （c）細胞接着の増加；
 - （d）細胞伝播の増加；
 - （e）フィブロネクチンでの病巣接着およびアクチンストレスファイバー形成の増加；および
 - （f）細胞のECM、好ましくは、フィブロネクチンとの結合の増加、
- の1つ以上が、抗増殖性または抗腫瘍性薬物、または骨芽細胞形成のインヒビターの指標である。

【0083】

他の好ましい態様において、細胞を試験化合物と接触させた後に生じる次の状態：

- （a）細胞増殖での増加；または細胞周期のS期に入る細胞の割合の増加；
- （b）DNA合成の増加；

(c) および (d) アルカリホスファターゼ活性の様な骨特異的マーカーの発現、石灰化、または当該技術分野で既知の他のもの (例えば、Raouf and Seth, 2002, Bone 30: 463-71) の増加、

のうち1つ以上が、骨形成促進薬物を示す。

【0084】

アクチンストレスファイバー形成は、Bloom, L et al (1999) Mol Biol Cell 10: 1521-1536に記載のアクチンアセンブリアッセイに従いアッセイされる。接着アッセイは、Bloom, L et al (1999)に記載の方法に従い、行われる。

【0085】

他の実施態様において、本発明の方法は、試験物質の非存在下で成長させられる対照細胞をさらに含み、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および/または(f)は、対照および試験培養物中で測定される。試験測定値は、これにより、該対照についてさらに標準化され得る。

【0086】

スクリーニング方法はさらに、可能性のある抗腫瘍性薬物または腫瘍予防薬物の同定、または骨形成阻害薬物のための本質的な無細胞システムを提供する。該方法は、ECMとテネイシンW間の結合を予防、阻害、または開裂するための、可能性のある抗腫瘍性薬物の能力による。ECMとテネイシンW結合の任意の開裂の性質は、結合アッセイをECMおよびテネイシン (例えば、実施例10参照) について行うことにより、決定される。例えば、熱量測定法、または標識試薬の測定が用いられる。

【0087】

または、テネイシンWの機能のモジュレーターを同定する方法も提供され、これは、(a) 試験化合物をテネイシンWおよび/または 8 1 インテグリンと接触させること、および (b) 該試験化合物のテネイシンWおよび/または 8 1 インテグリンとの結合を測定すること、または (c) 該試験化合物が非存在である場合と比較して、テネイシンWの 8 1 インテグリンとの結合の開裂を測定すること、を含む。テネイシンWの 8 1 インテグリンとの結合の減少は、該相互作用のインヒビターの指標であり、そして結合の増加は、該試験化合物が 8 1 インテグリンを活性化し、これにより、テネイシンWと 8 1 インテグリン間の相互作用を増加させることを示し得る。

【0088】

試薬および試験物質の相対量または濃度が変わられ、これにより、阻害定数、および他のパラメーター、例えば、結合親和性の計算が可能となる。アッセイ条件の最適化は、当該技術分野の通常の技術者の十分範囲内であろう。システムは、さらに、試験物質を含まない対照を含み、結合が対照で測定され、これにより、試験システムでの対応する測定値が、対照と比較して標準化されることが可能となる。

【0089】

本発明のアッセイ (スクリーニング) システムの1つの成分が、固体粒子または基質と結合される場合、次に、結合されない他の成分の1つ以上が、標識される。標識の例は、例えば、 ^{14}C または ^3H 、ダイ、金属ゾル、酵素、またはビオチン/アビジンを含む。該システムでの該標識の「遊離」成分との接着により、任意の結合アッセイが、当該技術分野でよく知られた方法に従い、溶液中で行われる。成分が反応できた後、固相粒子が、溶液から、例えば、濾過または沈降 (遠心分離を含む) により、分離され得る。ある実施態様において、免疫沈降を用いて、結合と遊離の標識成分とが分離される。普通、抗体を利用して、溶液外に非標識成分 (該成分が、別の標識成分と結合しているかまたはしていないかにかかわらず) を排除する。分離後、溶液中に存在する標識 (遊離)、および固相中または固相上に存在する標識 (結合) が測定される。該結合および遊離データの標準的分析、例えば、スキッチャード・プロット、および結合の親和性および阻害定数の決定は、当該技術分野の通常の技術者によく知られている。

【0090】

固相が粒子でなく、例えば、マイクロタイタープレートのウェルの様な表面形態である

場合、結合および遊離標識を決定する結合アッセイが行われるが、これは、結合反応が生じた後、ウェルからの液相の除去を含む。便宜上、該アッセイ態様は、特異的に標識された反応成分の必要性を省く。その代わり、標識抗体を用いて、既に遊離した反応成分の固相成分との結合が測定される。

【0091】

ある実施態様において、テネインW分子、変異体、またはそのフラグメントは、固相に直接接着される。この種の好ましい免疫アッセイ実施態様において、テネインWのECMとの結合は、テネインWに対して反応性の抗体を用いて測定される。

【0092】

免疫結合アッセイは、当該技術分野で既知である。概論として、Methods in Cell Biology Vol. 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, (Ed.) Academic Press, Inc. New York (1993)を参照されたい。

【0093】

標識は、任意の検出可能な組成物であり、これにより、検出は、分光的、光学的、生化学的、免疫化学的、物理的、または化学的なものであり得る。例えば、有用な標識は、 ^3P 、 ^3S 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、蛍光ダイ（例えば、FITC、ローダミン、およびランタニドリン光体）、高電子密度試薬、例えば、通常ELISAで用いられる酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびアルカリホスファターゼ）、ビオチン、ジオキシゲニン、または抗血清またはモノクローナル抗体を利用可能とするためのハプテンおよびタンパク質を含む。該標識は、検出されるべき標的化合物に直接的に取り込まれるか、またはそれは、標的と結合するプローブまたは抗体と接着される。

【0094】

本発明のアッセイを通じて、インキュベーションおよび/または洗浄段階は、試薬のそれぞれの適用、または試薬の組合せのインキュベーションを必要とする。インキュベーション段階は、約5分から数時間、おそらく、約30分から約6時間で変動する。しかしながら、インキュベーション時間は、普通、アッセイ形態、アナライト、溶液の容量、濃度などに依存する。普通、該アッセイは、環境温度で行われるべきであり、それは、例えば、10 から 40 の範囲の温度で実施される。

特に好ましいアッセイ形態は、酵素結合免疫測定法（ELISA）である。

【0095】

上記の本発明のスクリーニング方法全てが、生物学的活性についての物質のスクリーニング、およびテネインWを含む任意の他の疾病または状態、例えば、創傷治癒、またはアテローム性動脈硬化症の処置のための、可能性のある薬物のスクリーニングに同様に適用できる。

【0096】

抗腫瘍形成、抗腫瘍、抗転移、（抗）骨形成、創傷治癒、または抗アテローム性物質、または本発明の任意のスクリーニング方法により同定される、テネインWを含む任意の疾病または状態の処置または予防的処置のための物質も、本発明の範囲である。該物質は、タンパク質、ポリペプチド、または低有機分子（薬剤）であってもよい。従って、本発明は、腫瘍、転移、または骨病変を予防または処置するための医薬組成物を含み、これは、本発明の方法により同定される物質の1つ以上を含む。例えば、テネインW発現または活性のインヒビターが、可能性のある抗癌性薬物とみなされ、一方、テネインWまたはそのアゴニストは、生体内、またはエキソビボで用いられ得る、骨形成を促進するのに有効な薬物とみなされる。

【0097】

従って、本発明は、テネインファミリーの新規哺乳類メンバー、およびその使用を提供する。それは、本明細書に記載の任意のスクリーニング方法の実施による、テネインWに依存する状態に対して有効な薬物、特に、抗癌性薬物、または骨形成を促進する薬物の同定を可能とする。好ましい抗癌性薬物は、癌細胞の増殖を阻害し、かつ一般的な抗増

10

20

30

40

50

殖性薬物であるものである。

【0098】

本発明は、上記の全核酸、およびタンパク質およびポリペプチド、ならびに本方法の実施により同定される薬物、および該薬物の薬剤、特に、癌およびテネイシンWに依存する他の状態の予防または処置のための医薬としての使用を提供する。

【0099】

従って、さらなる態様において、本発明は、テネイシンW、および本発明のスクリーニング方法で同定される薬物の薬剤としての使用を提供する。

【0100】

本発明は、テネイシンWに依存する状態の予防または処置、癌または骨疾病、または免疫的欠陥を処置するために使用するための医薬の製造のための、テネイシンW、または本発明のスクリーニング方法により同定される薬物をさらに提供する。

【0101】

本発明は、テネイシンWに依存する状態を予防または処置する方法を提供し、これは、個体に上記の構造物、ベクター、宿主細胞、または抗体を有効量投与することを含む。

【0102】

本発明は、テネイシンWに依存する状態を阻害する方法も提供し、これは、癌または骨疾病、または免疫的欠陥の処置のため、上記の本発明のスクリーニング方法により同定されるモジュレーターを有効量投与することを含む。

【0103】

医薬組成物中、可能なら、当該技術分野の通常の技術者に既知の適当な賦形剤の存在下の、上記の核酸分子、タンパク質、および薬物も本発明により提供される。組成物は、当該技術分野の技術者の知識の範囲内である任意の適当な投与方法により、下記の任意の適当な組成物の形で投与される。好ましい投与経路は、非経腸投与である。非経腸投与において、本発明の組成物は、溶剤、懸濁剤、または乳化剤の様な注射可能な単位投与量剤形で、医薬的に許容される賦形剤と共に製剤される。該賦形剤は、本質的に非毒性および非治療性である。該賦形剤の例は、食塩水、リンゲル溶液、ブドウ糖溶液、およびハックス溶液である。固定油およびオレイン酸エチルの様な非水溶性賦形剤が用いられてもよい。好ましい賦形剤は、食塩水中の5%ブドウ糖である。賦形剤は、バッファーおよび保存剤を含む、等張性および化学的安定性を増強する物質の様な添加剤を少量含有してもよい。

【0104】

任意のタンパク質は、同種移植拒絶反応、GVHD、アレルギー疾患、および自己免疫疾患を予防するために、治療上有効な濃度で投与される。投与量および投与方法は、個体に依存するであろう。一般に、組成物は、機能的タンパク質が、 $1 \text{ pg} / \text{kg}$ から $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、より好ましくは、 $10 \text{ } \mu\text{g} / \text{kg}$ から $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 、最も好ましくは、 $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ から $2 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量で与えられるように、投与される。好ましくは、それは、巨丸剤として与えられる。連続する短時間の点滴(30分間)も用いられてもよい。本発明による組成物は、5から $20 \text{ } \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ 、より好ましくは、7から $15 \text{ } \mu\text{g} / \text{kg} / \text{分}$ の用量で点滴されてもよい。

【0105】

特定の場合に従い、必要とされる、組成物の「治療上有効な用量」が、処置が必要な患者を治療するために、または少なくとも部分的に、疾病およびその合併症を抑制するために十分な用量で投与されるべきである。該使用のための有効量は、疾病の重症度、および患者の一般的な健康状態に依存するだろう。1回または多数回投与は、患者により必要とされ、かつ耐容される投与量および頻度に依存して、要求される。

【0106】

本発明は、癌、またはテネイシンWレベルの上昇に依存する任意の他の状態を診断または予後診断する方法も提供し、これは、(a)個体から採取された試料をテネイシンWの存在について分析すること；および(b)テネイシンWの存在を好ましくない予後または

10

20

30

40

50

診断と関連付けること、を含む。

【0107】

本発明の方法は、典型的には、細胞または組織試料中のテネイシンWの存在、レベル、または活性の決定を含む。そして試料は、たいていヒトから採取されるであろうが、本発明の方法により試験される試料は、ウシ、ウマ、ヒツジなどの様な農業上重要な動物、またはネコおよびイヌの様な獣医の対象の他の動物から採取され得ることも、容易に理解され得る。アッセイは、体細胞、生殖系組織、または癌にかかった組織の様な任意の細胞または組織試料、ならびに胸膜液、血液、血清、血漿、および尿の様な体液由来の試料で行われる。方法は、さらに、試料中の細胞を細胞培養で増殖させることを含む。

【0108】

「試料」は、必ずではないが一般的に、アッセイ可能な形のテネイシンWを提供するために事前処置の対象とされ、分析される材料である。これは、例えば、細胞抽出物を形成する、当該技術分野で既知の方法を必要とするだろう（例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y., 1987)を参照）。

【0109】

本発明の広範な態様において、一貫性が維持される限り、試料の収集および取り扱いに対する制限は存在しない。試料は、生検、外科的切除、スミアなどの様な、当該技術分野で既知の方法により採取される。必要に応じて、試料中の採取された細胞は、細胞培地中で増殖させられてもよい。

【0110】

臨床試料でのテネイシンWまたはテネイシンW活性の測定の一貫性は、様々な技術を用いて確かめられ得る。例えば、それぞれの組織抽出物の品質についての対照として、アルカリホスファターゼの様な別の酵素活性が、内部対照として役立ち得る。さらに、内部標準は、アッセイ条件の対照として、試料中のテネイシンWで同時に測定され得る。従って、アッセイ段階は、試料中の対照タンパク質を検出すること、必要に応じて、テネイシンWについて得られた値を、対照タンパク質で得られたシグナルで標準化することを含む。

【0111】

試料中のテネイシンWの存在は、当該技術分野で既知の方法を用いて、テネイシンWタンパク質を検出することにより、決定され得る。本発明において、テネイシンWまたはテネイシンW活性を測定するために用いられるアッセイの種類に対する制限は存在しない。例えば、テネイシンWは、テネイシンWに特異的な抗体を用いる免疫アッセイにより、検出され得る。抗体は、例えば、タンパク質が、酵素結合免疫測定法により、または全細胞タンパク質、または部分的に精製されたタンパク質のドットプロット（抗体サンドイッチ）アッセイで同定される、2次元ゲルのウエスタンブロットで用いられ得る。

【0112】

試料の濃縮およびタンパク質の精製方法は、文献（Scopes, 1987を参照）に記載されている。例えば、必要に応じて、細胞抽出物に存在するテネイシンWが、硫酸アンモニウムでの沈殿により、または市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMilliporeの限外濾過ユニットに抽出物を通すことにより、濃縮され得る。抽出物は、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂の様な適当な濾過マトリックス、またはゲル濾過マトリックスに適用され得るか、または分取ゲル電気泳動法の対象とされ得る。かかる場合、それぞれの精製段階後に生じたテネイシンWおよびタンパク質は、試料中のテネイシンWの量を決定する際に考慮される必要がある。

【0113】

テネイシンWは、テネイシンWに特異的な抗体を用いて検出され、対照アッセイは、別のテネイシン分子に特異的な抗体を用いて行われる。必要に応じて、方法は、健常組織と比較して、試料中のテネイシンWの増加を関連づけることをさらに含む。例えば、テネイシンWは、腫瘍組織で発現したテネイシンWに特異的な抗体を用いて検出され、そして健常組織で発現した任意のテネイシンWとの抗体結合（または、非特異的反応）と比較され

10

20

30

40

50

得る。

【0114】

試料は、好ましくは、組織化学分析のため、固体表面に乗せた組織試料である。到達可能で、検出可能な、テネイシンWの存在は、テネイシンWが結合するために細胞に到達可能であることを示す。このことは、好ましくない診断または予後診断を導く。一方、抗体が組織切片中のテネイシンWと反応しないと、テネイシンWが存在しないと予測される。このことは、好ましい診断または予後診断を導く。

【0115】

本発明者は、テネイシンWが、固形腫瘍、特に、転移性腫瘍またはその間質で特異的に発現することを見出した。従って、テネイシンWの存在は、癌にかかった状態、特に、転移性組織の存在を示すが、テネイシンWの非存在は、健常組織、または非転移性腫瘍組織を示す。テネイシンWは、ウエスタンブロッティングにより、発生中のマウス組織において同定された。テネイシンWの高発現は、*ras*トランスジェニックマウスの転移性腫瘍で見出されたが、*myc*または*neuT*で形質転換された非転移性腫瘍では見出されなかった。テネイシンW (170 kD) の存在は、好ましくない診断の指標である。

【0116】

さらなる実施態様において、本発明の診断および予後診断方法は、試料を 8 インテグリンの存在について分析すること (該 8 インテグリンの存在は、好ましくない予後診断または診断に関連する) を、さらに含む。これは、例えば、以下の実施例 8 に詳細に記載する抗体を用いて、容易に達成され得る。

【0117】

好ましい実施態様において、本発明は、本発明の診断または予後診断方法での使用に適したキットを提供する。該キットは、該方法を行うのに有用な試薬、例えば、テネイシンWおよび 8 インテグリンに特異的な 1 以上の種由来の抗体を含む。該 1 次抗フィブロネクチン抗体のいずれか、または両方を認識する 2 次抗体も、試料と結合している 1 次抗体の認識および検出の目的上、含まれ得る。該 2 次抗体は、検出のため、例えば、フルオロフォア、酵素、放射標識、または他のもので標識され得る。他の検出標識は、当該技術分野の技術者に思いつかれるだろう。または、1 次抗テネイシンW抗体は、直接検出のために標識され得る。

【0118】

本発明は、説明のみの目的上、以下の実施例でさらに説明される。

実施例 1 : マウステネイシンWのクローニング

マウステネイシンWを、胚発生期 19 日全マウス胚 cDNA ライブラリー (DupLEX-A D LM-110 ; OriGene Inc.) からクローン化した。第 1 の段階において、テネイシン R (受託番号 A L 0 4 9 6 8 9) に類似の 1 番染色体由来の配列からもたらされる次の PCR プライマーを、マウス cDNA ライブラリーを鋳型として用いる Expand High Fidelity PCR システム (Roche) でのネステッド PCR に用いた。第 1 の反応を、プライマーセット 5' - T A G C A G C C C A C A G C A T C T A C T T G C C - 3' (配列番号: 5) / 5' - A T T G C T G T T C T G C T G A A C C T G A C T G C A - 3' (配列番号: 6) により、そして第 2 の反応を 5' - A T G G A T C C A G A A A T T G A C G G C C C C A A A A A C C T A G - 3' (配列番号: 7) / 5' - A T A A G C T T G T G G A G A G G G T G G T G G A T A C A T T T C - 3' (配列番号: 8) により行った。第 2 のプライマーセットは、組換えタンパク質の複製のための C 末端 His タグを生じる細菌発現ベクター p Q E 3 0 (Qiagen) への指揮したクローニングを可能とするために、それぞれ B a m H I および H i n d I I I 制限酵素部位を含んでいた。

【0119】

マウスタンパク質 (上記の方法の結果として得た、テネイシンWポリペプチドフラグメント) を、E. coli で発現させ、マトリックス供給源のマニュアルに従い、Ni-NTA マトリックス (Qiagen) のアフィニティークロマトグラフィーにより、精製した。該タンパク質を天然条件下で精製し、250 mM イミダゾールで溶出した。

【0120】

全長テネインシンWを、マウステネインシンWに特異的な、上記のマウステネインシンW cDNA由来のプライマー、および上で用いられた同一の胚発生期19日全マウス胚cDNAライブラリーのベクターと一致するプライマーの使用により、クローン化した。完全5'配列を得るために、上記のcDNAを鋳型として用いた次のPCR反応を行った：第1のPCR反応を、プライマーペア5'-AGGAGATGGTGGCTGTATTTTCGG-3'（配列番号：9）/5'-AGCCTCTTGCTGAGTGGAGATGCC-3'（配列番号：10）を用いて行い、続いて第2のPCR反応を、プライマーセット5'-TAGAATTCGGTCACCTGATTGGTCACTAGG-3'（配列番号：11）/5'-TTATGATGTGCGCAGATTATGCC-3'（配列番号：12）により行った。テネインシンW cDNAの3'部分を完成させるため、次のPCR反応を行った：第1の反応では、プライマーペア5'-CTCAAAATTGATGGCTACATTTTGACC-3'（配列番号：13）/5'-AAGCCGACCAACC TTGATTGGAGAC-3'（配列番号：14）を用い、続いてプライマーペア5'-TACCAAGTTCCCAAAATGGGCACCG-3'（配列番号：15）/5'-AAACCTCTGGCGAAGAAGTCC-3'（配列番号：16）を用いた。それぞれの場合で、最長産物をクローン化した。該オーバーラップテネインシンW cDNAクローンを、1つの全長マウステネインシンW cDNAに集め、発現ベクターpCEP/Pu（Kohfeldt et al. (1997). FEBS Lett. 414:557-61を参照）にクローン化した。テネインシンW cDNAの3'末端において、哺乳類細胞培養で発現した全長マウステネインシンWタンパク質の精製を可能とするために、6×Hisタグを停止コドンの前に挿入した。

【0121】

組換えマウステネインシンWタンパク質は、テネインシンWヌクレオチド配列のヌクレオチド2380～3171によりコード化される、マウステネインシンWの全アミノ酸配列のアミノ酸794～1057により同定される領域に、3つのC末端フィブロネクチンタイプIII繰り返しを含む。

【0122】

実施例2：マウステネインシンWの特徴化

マウステネインシンWの全長cDNAを、実施例1に記載の様にクローン化した。該cDNA配列は、テネインシンタンパク質ファミリーの典型的なメンバーをコード化し、タンパク質のN末端からC末端に、次の構造ドメイン：分泌のためのシグナルペプチド、7回の繰り返しにより集められる2つのテネインシンW3量体の2量体化のためのN末端ドメインを有する。これは、それぞれのサブユニットが、3.5回のEGF様繰り返し、9回のフィブロネクチンタイプIII繰り返し、およびフィブリノーゲン様C末端球状ドメインを含有する、ジスルフィド結合6量体タンパク質複合体となる。

【0123】

全長テネインシンW cDNAを、トランスフェクション試薬fugene（Roche）を用いて、HEK293細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞をピューロマイシンで選択し、分泌テネインシンWタンパク質を含有する培地を集め、そして該タンパク質を、調製物中の任意のコンタミフィブロネクチンを除去するためのゼラチンアガロースカラム（Sigma）での連続的クロマトグラフィーにより、およびNi-NTAマトリックス（Qiagen）への吸着により、精製した。テネインシンWを、250mM イミダゾールにより、ニッケルカラムから溶出した。

【0124】

組換えタンパク質を、還元および非還元条件下での6% ポリアクリルアミドゲルでのSDS-PAGE（硫酸ドデシルナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）により、ならびに、テネインシンCについての記載（Chiquet-Ehrismann, R. et al. (1988) Cell 53, 383-390）と同一の方法を用いて、ロータリシャドーイング後の電子顕微鏡観察によっても分析した。テネインシンWは、6量体テネインシンCタンパク質として、類似のゆっくりとした遊走を示した。ロータリシャドーイング後のテネインシンWの電子顕微鏡観察は

、実際、中心の球状ドメインから四方に広がる約 50 nm の長さの 6 つのサブユニットを有する 6 量体分子を示した。

【 0 1 2 5 】

実施例 3：ヒトテネイシン W のクローニング

ヒトテネイシン W を、本質的に実施例 1 に記載した、同一の P C R プライマーを用いて、骨肉腫細胞株 S a o s - 2 (A T C C ; H T B 8 5) から単離した m R N A 由来の c D N A からクローン化した。ヒトタンパク質を発現させ、マトリックス供給源のマニュアルに従い、N i - N T A マトリックス (Q i a g e n) のアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。該タンパク質を天然の条件下で精製し、250 mM イミダゾールで溶出した。

10

【 0 1 2 6 】

組換えタンパク質は、それぞれ、データベースエントリー A L 0 4 9 6 8 9 のテネイシン W ヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 3 7 1 ~ 3 1 6 3 によりコード化される、ヒトテネイシン W の完全アミノ酸配列のアミノ酸 7 9 1 ~ 1 0 5 4 により定義される領域に、3 つの C 末端フィブロネクチンタイプ I I I 繰り返しを含む。

【 0 1 2 7 】

全長テネイシン W を、骨肉腫細胞株 S a o s - 2 (A T C C ; H T B 8 5) から単離した m R N A からなる c D N A を鋳型として用いて、ヒトテネイシン W に特異的な、上記のヒトテネイシン W c D N A 、および c D N A 配列エントリー A L 0 4 9 6 8 9 のヒトゲノム配列 5 ' から A T G 開始コドン由来のプライマーの使用により、クローン化する。次のプライマーをネステッド P C R の 3 つのセットのために用いる。

20

h T N W 1 : 5 ' C A T C C T G G A G G G T C T G C T C C 3 ' (配列番号 : 1 7)

h T N W 2 : 5 ' G G G C A T T G G T G T C A G C T T T C 3 ' (配列番号 : 1 8)

h T N W 3 : 5 ' G A C T C G A G C T T T C C A A G G A T G A G T C T C C 3 ' (配列番号 : 1 9)

h T N W 4 : 5 ' G A G G A T C C C C T G G T T G C C C C T T T C A G 3 ' (配列番号 : 2 0)

h T N W 5 : 5 ' G C G C T A C A C T T C T G C T G A T G 3 ' (配列番号 : 2 1)

h T N W 6 : 5 ' C T G T G G A G A G G G T G G T G G 3 ' (配列番号 : 2 2)

h T N W 7 : 5 ' G A C T C G A G T G C A C A A G G A T G A G A G C A G 3 ' (配列番号 : 2 3)

30

h T N W 8 : 5 ' G A G G A T C C A C C C T T A A A G G C A A C A A G G G 3 ' (配列番号 : 2 4)

h T N W 8 : 5 ' G A G G A T C C A C C C T T A A A G G C A A C A A G G G 3 ' (配列番号 : 2 4)

h T N W 9 : 5 ' C G C A G T C T G G T G G C A T A T T G 3 ' (配列番号 : 2 5)

h T N W 1 0 : 5 ' C A T G A T T T G T T C T G C G G G C 3 ' (配列番号 : 2 6)

h T N W 1 1 : 5 ' G A C T C G A G C G G C T A C A T T C T G A C T T A C C 3 ' (配列番号 : 2 7)

h T N W 1 2 : 5 ' G A G G A T C C T C A G T G A T G G T G A T G G T G A T G 3 ' (配列番号 : 2 8)

40

【 0 1 2 8 】

次の P C R 反応を、フラグメント A プライマーの組合せ h T N W 1 / h T N W 2 、次に h T N W 3 / h T N W 4 、フラグメント B h T N W 5 / h T N W 6 、次に h T N W 7 / h T N W 8 、そしてフラグメント C h T N W 9 / h T N W 1 0 、次に h T N W 1 1 / h T N W 1 2 を用いて行う。該 3 つのフラグメントを、フラグメント A を X h o I および A c c I で、フラグメント B を A c c I / N a r I で、フラグメント C を N a r I / B a m H I で切断し、そして発現ベクター p C E P / P u (K o h f e l d t e t a l . (1 9 9 7) F E B S L e t t . 4 1 4 : 5 5 7 - 6 1 を参照) の X h o I / B a m H I 部位ヘライゲーションした集合体をクローニングすることにより、全長ヒトテネイシン W を作り出すために、共に結合させ得る。ヒ

50

トネイシンW cDNAの3'末端にて、哺乳類細胞培養での発現の際の精製を容易にするため、6×Hisタグを停止コドンの前に挿入した。ヒトネイシンWを、マウステネイシンWについて記載(実施例2)の様に、精製する。

【0129】

実施例4：抗体産生、免疫組織化学、および免疫プロット：発生中のネイシンWの発現
上の実施例1に記載のマウステネイシンWの細菌で発現した組換えフラグメントを、標準的免疫方法を用いて、ウサギでポリクローナル抗血清を生じさせるために用いた。該抗血清を用いて、ネイシンYについて記載(Hagios, C. et al. (1996) J. Cell Biol. 134, 1499-1512)された方法を用いて、組織抽出物および発生中のマウス胚の凍結切片においてネイシンWを検出した。抗血清は、ウエスタンブロットにより示される様に、精製全長組換えネイシンW、ならびにマウス器官の組織抽出物の内在性ネイシンWと特異的に反応した。両方の場合で、ネイシンWを170kDa分子量種として同定した。

【0130】

抗ネイシンW抗血清を用いて、免疫組織化学により、正常マウス発生中のネイシンWの発現を調べた。免疫組織化学のため、組織を、氷冷、リン酸緩衝食塩水中(PBS)の4%パラホルムアルデヒド中で一晩固定し、PBSで洗浄し、PBS中の25%スクロースで4に overnight凍結保護した。該組織を、OCT(最適切削温度)マウンティング培地(mounting medium)(Ted Pella Inc., CAにより合成された、カタログ番号27050 OCT)に包埋し、12~16μmの切片を切削し、ガラススライド上に集めた。該切片を2時間、風乾し、抗ネイシンW抗血清、次に蛍光標識2次抗体で染色した。

【0131】

ネイシンWは、上顎プロセス中の胚発生期11.5日(E11.5)で最初に出現する。E14.5とE16.5の間で、ネイシンWおよびネイシンCの発現は、顔および顎の発生中の連結組織(口蓋および下顎)でオーバーラップする。さらに、ネイシンWは、平滑筋、中胚葉、および骨の細胞外基質(ECM)で見出される。成体マウスでは、ネイシンWは、大動脈弁および角膜縁のネイシンC陽性ECMのサブセットで見出される。該位置でのその発現は、それぞれの組織の幹細胞コンパートメントで同時に起こる。ネイシンWは、骨形成のための幹細胞コンパートメントである骨膜でも発現する。ネイシンWは、腎臓、およびネイシンC陽性領域のサブセットの消化管でも発現するが、脳では発現しない。

【0132】

実施例5：ヒトネイシンWに対するモノクローナル抗体

上の実施例3に記載のヒトネイシンWの細菌で発現させた組換えフラグメントを用い、標準的方法を用いてヒトネイシンWに対するモノクローナル抗体を生じさせた。該モノクローナル抗体は、ヒトネイシンWに対する抗マウステネイシンWの交差反応活性によるものより、良好な結合を有するヒトネイシンWと特異的に反応した。該モノクローナル抗体は、ヒト組織を染色するのに特に有用である。

【0133】

実施例6：腫瘍細胞でのネイシンW発現

腫瘍細胞でのネイシンW発現を試験し、腫瘍組織で高発現することが見出されたネイシンCについての既知の結果(Chiquet-Ehrismann, R. (1993) Sem. Cancer Biol. 4, 301-310)と比較した。マウス乳房腫瘍は、乳腺特異的プロモーターの制御下で癌遺伝子を発現するトランスジェニックマウスで、容易に発生する。c-mycの過剰発現は、非転移性腫瘍の成長となるが、H-rasの過剰発現は、転移性腫瘍の発生を導く(Li, F. et al. (1994) Int. J. Cancer 59, 560-568)。

【0134】

この実施例において、Hagios, C. et al. (1996)によりネイシンYについて記載された様に、実施例4に記載の抗血清を用いて、マウス乳房腫瘍でネイシンWを検出した。ネイシンW(約170kDa)の高発現は、rasトランスジェニックマウスの腫瘍(転移性)で見出されたが、mycまたはneuTで形質転換した非転移性腫瘍では見出さ

れれなかった。一方、テネイシンCは、両種類の腫瘍で過剰発現した。

【0135】

対照として、テネイシンWの発現を、例えば、血清を用いて健常組織で調べた。血清でのテネイシンW含有量を、ウェスタンブロッティングにより分析する。感度の改善のため、テネイシンCについて既に記載 (Schenk et al. 1995. Int. J. Cancer 61:443-449) された、サンドイッチELISA試験を用い得る。概略、96ウェルプレートに、ポリクロノールまたはモノクロノール抗テネイシンW抗体でコートした。血清試料をアプライし、ウェルを洗浄し、結合テネイシンWを、ポリクロノールまたはモノクロノール抗テネイシンW抗体、次に適当なペルオキシダーゼ標識2次抗体で検出した。テネイシンWの発現を、野生型マウス由来の血清で見出さなかった。対照的に、健常の腎臓、心臓弁、および角膜は、テネイシンWを発現すると分かった。

10

【0136】

neutを過剰発現するトランスジェニックマウスは、非転移性乳房腫瘍を発生するが、neutをEphB4受容体チロシンキナーゼと共に過剰発現するトランスジェニックマウスでは、腫瘍は転移性である (Munarini, N. et al. (2002) Cell Sci. 115, 25-37)。該モデルシステムを用いて、我々は、非転移性ではなく、転移性腫瘍でのテネイシンWの高発現を再び見出した。該発現パターンを、腫瘍抽出物の分画化、ニフッ化重合ビニリデン膜でのブロッティング、および抗テネイシンW抗血清を用いた抽出物の分析によるSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) により、確認した。

【0137】

20

実施例7：接着アッセイ

精製テネイシンWを、MDA-MB435乳癌腫細胞株 (ATTC; HTB-129)、C2C12マウス骨格筋芽細胞 (ATTC; CRL-1772)、T98G膠芽細胞腫細胞 (ATTC; CRL-1690)、およびNIH-3T3線維芽細胞 (ATTC; CRL-1658) の細胞接着研究に用いた。概略、60ウェルマイクロタイタープレート (Nunc) を、2~100 µg/ml テネイシンWで37、1時間、コートした。非コートのプラスチック表面を、PBS中の1% 加熱不活性化BSAでブロックした。細胞をトリプシン処理し、トリプシンをPBS中の100 µg/ml 大豆トリプシン阻害剤で壊し、細胞を無血清培地に再懸濁し、カウントした。1ウェル当たり200~500個の細胞を指示した時間点でまき、グルタルアルデヒド (最終濃度2%) の添加により15分間固定し、20% メタノール中の0.1% クリスタルバイオレットで30分間染色した。細胞を顕微鏡 (Nikon diaphot) 下で観察した。

30

ほとんどの細胞が、2~100 µgでコートされたテネイシンWと接着するが、テネイシンCとの細胞接着は最小であった。

【0138】

我々は、テネイシンW上のC2C12マウス骨格筋芽細胞、およびT98G膠芽細胞腫の形態、およびアクチン細胞骨格を、フィブロネクチンまたはテネイシンC上の細胞と比較した。テネイシンW上の細胞の形態は、フィブロネクチン上の細胞と非常に異なり、そしてこれは、ファロイジンでのFアクチンの染色後、特に明白となる。フィブロネクチン上の細胞は、ストレスファイバーを含有して十分に広がる。しかし、テネイシンW上の細胞は、多くのアクチンリッチのプロセスを有するが、ストレスファイバーを有さず、そして細胞体は比較的円形のままであった。

40

【0139】

実施例8：細胞のテネイシンW受容体の同定

テネイシンWとの細胞接着に関与する細胞受容体を決定するために、我々は、テネイシンW上のT98G膠芽細胞腫の接着に対する、インテグリン機能遮断抗体の作用を試験した。1、2、3、4、5、6、およびVに対する抗体は、T98G細胞のテネイシンWとの接着を阻害できた。しかしながら、10 µg/ml 抗1インテグリン遮断抗体P4C10 (Sigma) が、テネイシンWとの接着を完全に阻害できなかったため、該接着は1インテグリン依存性であった。

50

【 0 1 4 0 】

I D Gトリペプチドモティーフは、 9 1 インテグリンの認識配列であると報告された (Yokosaki et al., 1998)。マウステネイシンWは、3つのI D Gモティーフを含有するので、我々は、 9 インテグリンが、テネイシンWの受容体であり得るか否かを調べた。我々は、空ベクター、または 9 インテグリンのc D N A (Yokosaki et al. J Biol Chem. 1996 Sep 27 ; 271(39):24144-50) 含有ベクターでトランスフェクションしたS W 4 8 0大腸癌腫細胞を、テネイシンWでコートしたウェルにまいた。しかしながら、 9 およびニセのトランスフェクションS W 4 8 0細胞は、テネイシンWと接着できなかったが、それらは、フィブロネクチンおよびコラーゲンと十分に接着した。

【 0 1 4 1 】

インテグリン 8 は、発生中の肋骨、腎臓、および胃・腸管由来の平滑筋で発現する (Denda et al. Biochemistry. 1998 Apr 21 ; 37(16):5464-74)。該発現パターンは、テネイシンWの存在と共に起こるので、インテグリン 8 は依然、テネイシンWの良好な受容体候補であった。我々は、 8 インテグリンでトランスフェクションした白血病細胞株K 5 6 2 (Denda et al. Biochemistry. 1998 Apr 21 ; 37(16):5464-74) を用いることにより、該仮説を研究した。トランスフェクションしたK 5 6 2細胞は、実際、テネイシンWと接着でき、ニセのトランスフェクションした対照細胞は接着しなかった。従って、 8 1 インテグリンはテネイシンWの受容体である。

【 0 1 4 2 】

実施例 9 : D N A複製および増殖アッセイ

9 6ウェルプレート (Falcon) を上記の様にコートする。細胞を一晩血清枯渇させ、トリプシン処理した。 10^4 細胞を、1% 血清、または40 nM P D G F B B (血小板由来成長因子B B) の存在下で、コートしたプレートに移す。14時間後、細胞を放射性 ^3H -チミジン ($0.5 \mu\text{Ci}$ / ウェル) で、37、4時間標識し、取り込んだ ^3H -チミジンを10% T C Aで沈殿させ、0.3 N N a O H、2% S D Sでの細胞溶解後、Beckmanのシンチレーションカウンターで測定した。または、B r d Uの取り込みを測定するか、細胞数を、異なる基質上にまいた細胞の数日間の一定成長期間でカウントする。テネイシンW上で成長した癌細胞は、細胞をカウントすることにより確立した、フィブロネクチン上にまいた細胞の成長速度の増加、または細胞R N Aへの放射性 ^3H -チミジンまたはB r d U取り込みの増加を示す。

【 0 1 4 3 】

実施例 1 0 : 試験管内結合アッセイ (E L I S A)

9 6ウェルE L I S Aプレートを、適当なE C Mタンパク質 (例えば、フィブロネクチン、またはテネイシンW) で、37、1時間コートし、P B S中の1% 粉ミルク、0.05% T w e e n - 2 0でブロックした。E C Mタンパク質 (テネイシンW、またはフィブロネクチン) を、ブロッキング溶液に添加し、1時間おき、ブロッキング溶液で洗浄し、そして適当な抗体を添加する。この方法では、例えば、テネイシンWとフィブロネクチン間の相互作用を試験できる。結合タンパク質を、ペルオキシダーゼ結合2次抗体との免疫反応させ、次いで21 mg / ml クエン酸一水和物、34 mg / ml N a ₂ H P O ₄ · 2 H ₂ O、0.4 mg / ml フェニレンジアミン、1 μ l H ₂ O ₂ と呈色反応させ、これを4 M 硫酸で終結させることにより検出し得る。吸光度は590 nmで読み取った。

【 0 1 4 4 】

実施例 1 1 : 免疫蛍光顕微鏡観察

10^4 細胞を、本質的に上記の様に、E C Mタンパク質でコートした4ウェルCellstarプラスチックプレート (Greiner) に移す。細胞を、P B S中の4% パラホルムアルデヒド、50 mM リン酸バッファー、5 mM E D T Aで、15分間固定し、P B S中の3% B S A、0.5% T w e e n - 2 0でブロックし、ブロッキング溶液中の1次抗体および2次抗体と共にインキュベートする。退色防止剤 (antifade agent) として2.5% D A B C Oを含有した10.5% M o w i o l に、スライドを埋め込む。細胞を

顕微鏡で分析する。該方法は、テネイシンWまたは抗体が入手可能な培地中の細胞によって生産される任意の他のタンパク質の検出に特に有用であり、それぞれの抗原の合成または蓄積に影響する物質を分析するために用い得る。

【 0 1 4 5 】

当該技術分野の通常の技術者に明らかであるが、上記の方法のバリエーションは、同一の目的を達成するために容易に導入され得る。様々なインキュベーション条件、標識、装置、および原料が、個々の優先事項に従い、選択され得る。本明細書で言及された全刊行物は、それぞれが個々に言及されたかのように、全体として引用により取り込まれる。

【 配列表 】

0004469180000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆

(74)代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(72)発明者 ルート・ヒクヴェット・エーリスマン

スイス、ツェーハー - 4 1 5 3 ライナッハ、グスタットシュトラッセ 4 5 番

(72)発明者 アルノー・シェルベリッヒ

フランス、エフ - 6 8 4 0 0 リーディシエム、リュ・デ・エ克蘭 1 番

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 0 7 7 9 4 (J P , A)

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.BB648643, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?16482898:EST:10064444>>, 26-OCT-2001 uploaded, Arakawa,T. et al. , DEFINITION: BB648643 RIKEN full-length enriched, 16 days embryo head Mus musculus cDNA clone C130031C11 5', mRNA sequence.

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AZ748340, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?12533104:GSS:2262065>>, 25-JAN-2001 uploaded, Zhao,S. et al. , DEFINITION: RPCI-24-112D17.TV RPCI-24 Mus musculus genomic clone RPCI-24-112D17, genomic survey sequence.

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AL049689, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?4678723:OLD03:1248085>>, 21-APR-1999 uploaded, Rhodes,S. , DEFINITION: Novel human mRNA from chromosome 1, similar to Tenascin-R.

J. Neurobiol. , 1 9 9 8 年 4 月 , Vol.35, No.1 , pp.1-16

J. Biol. Chem. , 1 9 9 5 年 9 月 2 9 日 , Vol.270, No.39 , pp.23196-23202

生化学 , 2 0 0 0 年 , Vol.72, No.5 , pp.365-372

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/47

C07K 16/18

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAplus(STN)