

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7520726号
(P7520726)

(45)発行日 令和6年7月23日(2024.7.23)

(24)登録日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
		請求項の数 18 (全124頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2020-568717(P2020-568717)	(73)特許権者	512006066
(86)(22)出願日	令和1年6月11日(2019.6.11)		カイマブ・リミテッド
(65)公表番号	特表2021-535078(P2021-535078 A)		イギリス・C B 2 2・3 A T・ケンブリ
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)		ッジ・バブラハム・リサーチ・キャンパ
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/065257		ス・ザ・ベネット・ビルディング・(B
(87)国際公開番号	WO2019/238713	(74)代理人	100094569
(87)国際公開日	令和1年12月19日(2019.12.19)		弁理士 田中 伸一郎
審査請求日	令和4年6月10日(2022.6.10)	(74)代理人	100103610
(31)優先権主張番号	18177441.5		弁理士 ▲吉▼田 和彦
(32)優先日	平成30年6月13日(2018.6.13)	(74)代理人	100109070
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 須田 洋之
(31)優先権主張番号	1820215.0	(74)代理人	100119013
(32)優先日	平成30年12月12日(2018.12.12)		弁理士 山崎 一夫
最終頁に続く		(74)代理人	100123777
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 骨の疾患の治療に用いるためのトランスフェリン受容体2のアンタゴニスト及びアゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象ヒト若しくは対象動物の疾患又は症状を治療若しくは予防する方法で使用するため
の、骨形成タンパク質（BMP）結合因子を含む医薬組成物であって、前記方法が対象に当
該医薬組成物を投与する工程を含み、当該BMP結合因子がBMPとの結合について可溶性Tf
r2-細胞外ドメイン（ECD）と競合し、当該疾患又は症状が前記BMPによって媒介され、
（i）因子がTfr2細胞外ドメイン（Tfr2-ECD）を含む、および；
（ii）疾患又は症状が硬化性疾患若しくは症状、病理学的骨形成を含む疾患若しくは症状
、または、骨化疾患若しくは症状である、
前記医薬組成物。

【請求項2】

因子が第二の部分を含む融合タンパク質に含まれる、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】

第二の部分が捕捉因子の半減期を対象において増強するための半減期延長部分である、
請求項2記載の医薬組成物。

【請求項4】

第二の部分が抗体Fc領域、ポリエチレングリコール（PEG）部分、血清アルブミン、及
び抗血清アルブミン結合部分から選択される、請求項2記載の医薬組成物。

【請求項5】

疾患又は症状がヘテロ型骨化（HO）疾患若しくは症状、又は進行性骨化性線維形成異常

(FOP) 疾患若しくは症状である、請求項1～4のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項6】

疾患又は症状が筋肉のHO、ファン・ブーム病及び硬結性骨化症から選択される、請求項1～4のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項7】

方法が、レチノイン酸受容体ガンマ (RAR- γ) アゴニストをTfr2アゴニスト又はBMP捕捉因子と同時に若しくは逐次的に対象に投与する工程を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

RAR- γ アゴニストがパロパロテンである、請求項7記載の医薬組成物。

10

【請求項9】

方法が、BMPシグナリングアンタゴニストをTfr2アゴニスト又はBMP捕捉因子と同時に若しくは逐次的に対象に投与する工程を含む、請求項1から8のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項10】

方法が

(i) 対象において軟骨形成を阻害する、および／または、

(ii) 対象において軟骨細胞形成を阻害する、および／または、

(iii) 疾患又は症状が、BMP-2誘発HO、BMP-4誘発HO、BMP-6誘発HO又はBMP-7誘発HOである、

20

請求項1から9のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

骨形成タンパク質 (BMP) 結合因子が、

(i) Tfr2-ECDモノマー、又は

(i) Tfr2-ECDダイマーである、

請求項1から10のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項12】

Tfr2-ECDモノマーがTfr2-ECD-Fcモノマーであり、Tfr2-ECDダイマーがTfr2-ECD-Fcダイマーであり、さらにECD及びFcがヒトTfr2 ECD及びヒトFcである、請求項11に記載の医薬組成物。

30

【請求項13】

Tfr2-ECDがTfr2 α -ECD又はTfr2 β -ECDである、請求項11又は12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

さらにまた抗スクレロスチン抗体、抗Dkk1抗体又は抗アクチビンA抗体、又は前記のフラグメントを含む、請求項11または12に記載の医薬組成物。

【請求項15】

抗スクレロスチン抗体がロモソズマブである、請求項14記載の医薬組成物。

【請求項16】

請求項11から15のいずれか1項に列挙されたダイマー又はモノマーを含む医薬組成物。

40

【請求項17】

さらにまたレチノイン酸受容体ガンマ (RAR- γ) アゴニスト及び/又はBMPアンタゴニストを含む、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項18】

RAR- γ アゴニストがパロパロテンである、請求項17記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は硬化性疾患の診断、治療又は予防に関する。本発明はまた、骨疾患、鉄代謝異常及び造血異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2阻害剤に関する。

50

【背景技術】

【0002】

トランスフェリン受容体2 (Tfr2) は主として肝臓で発現される。市販の抗Tfr2抗体は利用可能である。例えば、1B1 (MyBioSource, MBS833691)、3C5 (Abnova, H00007036-M01)、CY-TFR (Abnova, MAB6780) 及びB-6 (Santa Cruz Biotechnology, sc376278)、353816 (R&D Systems, MAB3120) 及び9F8 1C11 (Santa Cruz Biotechnology, sc32271)。

【発明の概要】

【0003】

第一の構成では、本発明は、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用されるタンパク質、融合タンパク質、ヌクレオチド配列及びベクター、並びに、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される医薬組成物に関する。

第二の構成では、本発明は、骨疾患、鉄代謝異常、及び造血異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2阻害剤に関する。

したがって本発明は以下を提供する：

一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、配列番号:1の配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質又はそのフラグメント。

一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、配列番号:1又は配列番号:2の配列を含むタンパク質。

骨疾患、鉄代謝異常及び/又は造血異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2阻害剤。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】骨形成におけるBMPの影響(1)を示す模式図(左側)。BMPはBMP受容体(BMPR-I(2)又はBMPR-II(3))と結合し、骨芽細胞遺伝子の発現(9)によって骨形成(10)を活性化するシグナリングカスケードを始動する(Smadタンパク質(6)及びMAPキナーゼ(7)のリン酸化(8))。BMP(1)のTfr2 α (4)との結合を示す模式図(中央)。骨形成(10)における本発明のタンパク質の影響を示す模式図(右側)。本発明のタンパク質(5)はBMP(1)と結合し、その結果としてBMP受容体(BMPR-I(2)又はBMPR-II(3))との結合は生じず、骨形成は活性化されない。

【図2a】BMPと本発明のタンパク質との結合のSPR測定を示す。図2Aは、BMP-2、BMP-4、BMP-6及びBMP-7とTfr2-ECDとの結合を示す。

【図2b】BMPと本発明のタンパク質との結合のSPR測定を示す。図2Bは、BMPR-II及びBMPR-IAの結合レベルと比較した、BMP-2、BMP-4、BMP-6及びBMP-7対Tfr2-ECDのモル質量に基づく結合レベルの定量を示す。

【図3a】BMP-2競合ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)を模式的に示す：BMP(1)(特にBMP-2)と補足抗体(11)との結合及び検出抗体(12)とBMP-2との結合によるシグナル(左側)。本発明のタンパク質(5)又はBMPR-I(2)とBMP-2との結合によるシグナル減少、その結果として補足抗体(11)と検出抗体(12)との結合は生じない(右側)。

【図3b】BMP-2競合ELISA：本発明のタンパク質又はBMP-1の濃度のBMP検出抗体に対する影響(BMP-2濃度は無変化のままである)。

【図4a】本発明のタンパク質(特にTfr2-ECD)を用いBMP-2の結合によるマウス(C57BL/6マウス)のHOの抑制を示す。図4Aは、 μ CT(微細断層撮影法)により骨体積を決定することによって石灰化を示す。図4Aは、BMP-2を適用するとき及びBMP-2をTfr2-ECDと一緒に適用するときの骨形成のCTスキャンを示す。

【図4b】本発明のタンパク質(特にTfr2-ECD)を用いBMP-2の結合によるマウス(C57BL/6マウス)のHOの抑制を示す。図4Bは、 μ CT(微細断層撮影法)により骨体積を決定することによって石灰化を示す。図4Bは骨体積の定量を示す。PBSを陰性コントロール

10

20

30

40

50

として用いる。BMPを適用するとき、2週間後の骨体積の増加は明瞭である。Tfr2-EC Dと一緒にBMP-2を適用するとき、参照としてのBMP-2と比較して、有意な骨形成の減少が示される（平均値±標準偏差；n=3-6/グループ；PBS（コントロール）と対比して***p<0.001）。

【図5】種々の小柱骨の体積を示すグラフである。

【図6】種々の皮質骨の厚さを示すグラフである。

【図7】種々の骨の品質を示すグラフである。

【図8】種々の骨の形成を示すグラフである。

【図9】種々の骨の再吸収を示すグラフである。

【図10a】Trf2欠損は高い骨質量をもたらす。（a-l）10週齢雄のWT又はTfr2^{-/-}マウスの骨及び血清骨代謝回転マーカーをμCT、組織学及びELISAを用いて分析した。（a）WT又はTfr2^{-/-}マウスの遠位大腿骨及び第四椎体の3D再構築並びに骨体積/総体積（BV/TV）の定量。大腿骨、n=5/グループ；椎体、n=4/グループ。全てのサブパネルのデータは平均±SDとして提示され、有意性は*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001と定義される。両側t-検定が統計分析に用いられた。

10

【図10b-d】Trf2欠損は高い骨質量をもたらす。（a-l）10週齢雄のWT又はTfr2^{-/-}マウスの骨及び血清骨代謝回転マーカーをμCT、組織学及びELISAを用いて分析した。（b）大腿骨中軸における皮質骨無機質密度（BMD）。N=4/グループ。（c-d）脊椎の小柱数（Tb.N）、小柱の太さ（Tb.Th）、及び小柱間隔（Tb.Sp）の定量。N=4/グループ。全てのサブパネルのデータは平均±SDとして提示され、有意性は*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001と定義される。両側t-検定が統計分析に用いられた。

20

【図10e-g】Trf2欠損は高い骨質量をもたらす。（a-l）10週齢雄のWT又はTfr2^{-/-}マウスの骨及び血清骨代謝回転マーカーをμCT、組織学及びELISAを用いて分析した。（e）脊椎の小柱数（Tb.N）、小柱の太さ（Tb.Th）、及び小柱間隔（Tb.Sp）の定量。N=4/グループ。（f）三点曲げによって評価された大腿骨軸における最大力。（WT、n=6；Tfr2^{-/-}、n=7）。（g）WT及びTfr2^{-/-}マウスの第三椎体のカルセイン二重染色を示す代表的組織学切片。バーは100μmを示す。これらの実験は4回繰返され同様な結果が得られた。全てのサブパネルのデータは平均±SDとして提示され、有意性は*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001と定義される。（e-f）両側t-検定が統計分析に用いられた。

【図10h-j】Trf2欠損は高い骨質量をもたらす。（a-l）10週齢雄のWT又はTfr2^{-/-}マウスの骨及び血清骨代謝回転マーカーをμCT、組織学及びELISAを用いて分析した。（h）骨形成速度/骨表面（BFR/BS）の定量。（WT、n=4；Tfr2^{-/-}、n=5）。（i）骨形成のマーカーとしての血清P1NPの定量。（WT、n=4；Tfr2^{-/-}、n=5）。（j）WT及びTfr2^{-/-}マウスの第四椎体の桃色で染色された破骨細胞を示す代表的な酒石酸耐性酸性ホスファターゼ組織学切片。バーは100μmを示す。これらの実験は4回実施され同様な結果が得られた。全てのサブパネルのデータは平均±SDとして提示され、有意性は*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001と定義される。（h-i）両側t-検定が統計分析に用いられた。

30

【図10k-m】Trf2欠損は高い骨質量をもたらす。（a-l）10週齢雄のWT又はTfr2^{-/-}マウスの骨及び血清骨代謝回転マーカーをμCT、組織学及びELISAを用いて分析した。（k）破骨細胞数/骨周囲長（N.Oc/B.Pm）の定量。（WT、n=4；Tfr2^{-/-}、n=5）。（l）骨再吸収のマーカーとしての血清CTXの定量。（WT、n=4；Tfr2^{-/-}、n=5）。（k-l）両側t-検定が統計分析に用いられた。（m）12週齢の擬似手術（SHAM）又は卵巣摘出（OVX）WT及びTfr2^{-/-}マウスの大腿骨のμCT分析。（WT Sham、n=6-10；WT OVX、n=9；Tfr2^{-/-} Sham、n=5；Tfr2^{-/-} OVX、n=10）。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。全てのサブパネルのデータは平均±SDとして提示され、有意性は*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001と定義される。

40

【図11a-d】Tfr2^{-/-}マウスの高い骨質量は鉄過負荷及びTfr2の肝機能に左右されない。（a、c）雄WT及びTfr2^{-/-}マウスに鉄を含まない精製飼料（-Fe）を離乳から10週齢まで与えた。コントロールマウスには飼料1kg当たり0.2gの鉄を含む標準飼料（+Fe）を与えた。肝臓鉄含有量は測光を用い乾燥組織で決定した。（平均±SD；n=10/グループ）

50

。(c) 骨体積/総体積 (BV/TV) は μ CT を用いて評価した。(平均 $\pm$ SD ; WT +Fe、n = 9 ; WT -Fe、Tfr2^{-/-} +Fe 及び Tfr2^{-/-} -Fe、n = 8/グループ)。(b、d) 10週齢雌WT 及び Tfr2^{-/-} マウスに 250mg/kg のデフェロキサミン (DFO) 又は PBS の i.p. 注射を3週間毎日投与した。13週齢で、マウスを犠牲にし、(b) 肝臓鉄含有量及び (d) BV/TV を測定した。(n = 3-5/グループ)。(a-d) ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVA が統計分析に用いられた。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

【図 1 1 e】Tfr2^{-/-} マウスの高い骨質量は鉄過負荷及び Tfr2 の肝機能に左右されない。

(e) Tfr2 ノックイン (KI) マウス (Tfr2 β アイソフォームを欠く) の模式図。10週齢雄 Tfr2 KI マウス及びコントロールマウスの BV/TV 及び肝臓鉄含有量。(BV/TV、WT n = 11、KI n = 15 ; 肝臓鉄、WT n = 8、KI n = 7)。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

10

【図 1 1 f】Tfr2^{-/-} マウスの高い骨質量は鉄過負荷及び Tfr2 の肝機能に左右されない。

(f) Tfr2 KI バックグラウンドにある肝特異的 Tfr2 α ノックアウト (LCKO) マウスの Tfr2 セットアップの模式図。10週齢雄 LCKO 及び WT マウスの BV/TV 及び肝臓鉄含量 (n = 8/グループ)。両側 t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

【図 1 2 a - b】骨原性細胞の Tfr2 欠損は骨質量を増加させる。(a) WT マウスの椎骨における Tfr2 の免疫組織化学分析。3つのうちから1つの代表的な画像が示される。矢印は多核破骨細胞及び骨芽細胞/骨細胞における Tfr2 発現を示す (骨芽細胞 : 黒色矢印、骨細胞 : 橙色矢印)。スケールバーは 20 μ m である。(b、e) WT 細胞の破骨細胞 (b) 及び骨芽細胞 (e) 分化時の Tfr2 mRNA 発現 (n = 4)。

20

【図 1 2 c - d】骨原性細胞の Tfr2 欠損は骨質量を増加させる。(d) WT マウスの椎骨における Tfr2 の免疫組織化学分析。3つのうちから1つの代表的な画像が示される。矢印は多核破骨細胞及び骨芽細胞/骨細胞における Tfr2 発現を示す (骨芽細胞 : 黒色矢印、骨細胞 : 橙色矢印)。スケールバーは 20 μ m である。(c、f) 成熟破骨細胞 (c) 及び未成熟骨芽細胞 (f) における Tfr2 の免疫蛍光染色。スケールバーは 20 μ m である。これらの染色は2回繰返され、同様な結果が得られた。

【図 1 2 e - g】骨原性細胞の Tfr2 欠損は骨質量を増加させる。(b、e) WT 細胞の破骨細胞 (b) 及び骨芽細胞 (e) 分化時の Tfr2 mRNA 発現 (n = 4)。(c、f) 成熟破骨細胞 (c) 及び未成熟骨芽細胞 (f) における Tfr2 の免疫蛍光染色。スケールバーは 20 μ m である。これらの染色は2回繰返され、同様な結果が得られた。(g) WT マウスの7日目の骨芽細胞タンパク質溶解物の細胞内部分の画分。3つのうちから1つの代表的なプロットが示される。CP : 細胞質、M : 膜、Nuc : 核画分、Cx-43 : コネクシン-43。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

30

【図 1 2 h - i】骨原性細胞の Tfr2 欠損は骨質量を増加させる。(h) 骨髄を、12週齢雄 WT 又は Tfr2^{-/-} マウスから致死的放射線照射9週齢雄 WT 又は Tfr2^{-/-} レシピエント (recip) マウスに移植した。16週間後に、骨体積/総体積 (BV/TV) を μ CT を用いて測定した (L4、WT-WT n = 11、Tfr2^{-/-}-WT n = 11、Tfr2^{-/-}-Tfr2^{-/-} n = 7、WT-Tfr2^{-/-} n = 9 ; 大腿骨、WT-WT n = 12、Tfr2^{-/-}-WT n = 10、Tfr2^{-/-}-Tfr2^{-/-} n = 8、WT-Tfr2^{-/-} n = 10)。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVA が統計分析に用いられた。(i) 10週齢雄 cre 陽性及び cre 陰性 Trf2^{f/f};Lysm-Cre 並びに Trf2^{f/f};Ctsk-Cre マウスの第四腰椎の BV/TV。(Trf2^{f/f};Lysm-Cre、Cre- n = 16、Cre+ n = 9 ; Ctsk-Cre、Cre- n = 8、Cre+ n = 12)。(i) 両側 t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

40

【図 1 2 j】骨原性細胞の Tfr2 欠損は骨質量を増加させる。10週齢雄 cre 陽性及び cre 陰性の同腹仔コントロール Tfr2^{f/f};Ox-Cre マウスの骨分析。(j) BV/TV (L4、Cre- n = 18、Cre+ n = 12 ; 大腿骨、Cre- n = 18、Cre+ n = 13)。両側 t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均 $\pm$ SD として提示される。^{*}p < 0.05、^{**}p < 0.01、^{***}p < 0.001。

50

【図12k-l】骨原性細胞のTfr2欠損は骨質量を増加させる。10週齢雄cre陽性及びcre陰性の同腹仔コントロールTfr2^{f/f};Osx-Creマウスの骨分析。(k)小柱数(Tb.N)及び小柱間隔(Tb.Sp)(Tb.N、Cre- n=18、Cre+ n=13; Tb.Sp、Cre- n=19、Cre+ n=12)。(l)P1NPの血清レベル。(n=6/グループ)。両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図12m-o】骨原性細胞のTfr2欠損は骨質量を増加させる。(l)P1NPの血清レベル。(n=6/グループ)。(m)腰椎で決定した石灰化表面/骨表面(MS/BS)、石灰化速度(MAR)、及び骨形成速度/骨表面(BFR/BS)。(MS/BS、Cre- n=11、Cre+ n=10; MAR、Cre- n=9、Cre+ n=6; BFR、Cre- n=10、Cre+ n=6)。(n)腰椎で分析した破骨細胞表面/骨表面(Oc.S/BS)。(Cre- n=7、Cre+ n=6)。(o)血清CTXレベル(n=6/グループ)。両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図13a】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(a)WT及びTfr2^{-/-}マウスの7日目骨芽細胞の次世代配列決定を用いて認定された最も増加及び減少する上位25遺伝子(n=4/遺伝子型)。

【図13b-d】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(b)Tfr2^{f/f};Osx-Creマウス及び同腹仔コントロールの7日目分化骨芽細胞におけるDkk1及びSostの遺伝子発現。β-アクチンに対して正規化。(n=4/グループ)。

(c)WT及びTfr2^{-/-}マウスのDickkopf-1及びスクレロステチンの血清濃度。(スクレロステチン、WT n=13、Tfr2^{-/-} n=10; Dickkopf、WT n=15、Tfr2^{-/-} n=14)。(d)WT及びTfr2^{-/-}マウスの大腿骨切片におけるβ-カテニン及びアキシン-2の免疫組織化学分析。スケールバーは20μmである。細胞はそれらの染色強度にしたがって定量された(陰性(*で表示)、弱(#)、強(\$記号))。(n=9/グループ)。(b)両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される(パーセンテージを示す(d)を除く)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図13e】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(e)Tfr2^{-/-}マウスのex vivo分化骨芽細胞(7日目)の活性化Smad及びMAPKシグナリングの状態の分析(WT骨芽細胞に対して正規化)。リン酸化タンパク質をそれらの非リン酸化対応物に対して正規化した。β-カテニンの発現はβ-アクチンに対して正規化された。定量は、別個の5ウェスタンブロット実験のデンストメトリーの結果である。点線はWTレベルを表す。(Smad1/5/8 n=4; pERK、pp38及びβ-カテニン n=3)。両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される(パーセンテージを示す(d)を除く)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図13f】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。WT及びTfr2^{-/-}マウスのex vivo分化骨芽細胞を50ng/mLのBMP-2で0-20-40分処理した。タンパク質を抽出した後、シグナリングタンパク質のリン酸化をウェスタンブロットを用いて分析した(f)。

【図13g】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。WT及びTfr2^{-/-}マウスのex vivo分化骨芽細胞を50ng/mLのBMP-2で0-20-40分処理した。(g)グラフは4つの別個の実験の定量を示す。(n=4/グループ)。両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される(パーセンテージを示す(d)を除く)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図13h】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(h)50ng/mLのBMP-4又はBMP-6で刺激してから20分後のWT及びTfr2^{-/-}骨芽細胞におけるSmad1/5、ERK、及びp38の誘発。点線はWTレベルを表す。(n=3/グループ)。両側t-検定が統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される(パーセンテージを示す(d)を除く)。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

【図14a-b】Tfr2欠損における高い骨質量はSOST過剰発現又はMAPKシグナリングの再活性化によってレスキューされる。(a)WT又はTfr2^{-/-}骨芽細胞を7日間分化させ、

10

20

30

40

50

50ng/mLのBMP又はTGF- β 1で48時間刺激した。Sost mRNA発現をqPCRを用いて決定した。(n=4)。両側t-検定を統計分析に用いた。(b) 7日目のWT又はTfr2^{-/-}骨芽細胞に空pcDNA3.1ベクター (CO) 又はTfr2遺伝子を含むpcDNA3.1ベクター (Tfr2-OE) をトランスフェクトした。細胞を50ng/mLのBMP-2又はPBSで処理した。48時間後、SostのmRNA発現をqPCRで決定した(n=3)。全てのデータは平均±SDとして提示される。^{*}p<0.05、^{**}p<0.01、^{***}p<0.001。

【図14c-e】Tfr2欠損における高い骨質量はSOST過剰発現又はMAPKシグナリングの再活性化によってレスキューされる。(c) SOSTトランスジーンの一つの対立遺伝子(SOST^{+/tg}) 又は対立遺伝子を含まない(SOST^{+/+}) 10週齢雌Tfr2^{-/-}又はWTマウスの骨体積/総体積(BV/TV) (WT/Sost^{+/+} n=6、WT Sost^{+/tg} n=4、Tfr2^{-/-} Sost^{+/+} n=8、Tfr2^{-/-} Sost^{+/tg} n=5) 及び(d) 骨形成速度/骨表面(BFR/BS) (WT/Sost^{+/+} n=5、WT Sost^{+/tg} n=3、Tfr2^{-/-} Sost^{+/+} n=7、Tfr2^{-/-} Sost^{+/tg} n=6)。(b-d) ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。(e) アニソマイシン処理(100nM)の24時間後のWT又はTfr2^{-/-}マウスのex vivo分化骨芽細胞におけるSost mRNA発現。(n=3/グループ)。一元配置ANOVAが統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。^{*}p<0.05、^{**}p<0.01、^{***}p<0.001。

【図14f-h】Tfr2欠損における高い骨質量はSOST過剰発現又はMAPKシグナリングの再活性化によってレスキューされる。(f-h) 10週齢雄WT又はTfr2^{-/-}マウスを5mg/kgのアニソマイシンで3週間処理した。示されているものは、(f) スクレロステチンの血清レベル(WT/PBS n=5、WT/Aniso n=4、Tfr2^{-/-}/PBS n=4、Tfr2^{-/-}/Aniso n=5)、(g) 骨芽細胞数/骨周囲長(N.Ob/B.Pm) (n=6/グループ)、及び(h) 第四腰椎のBV/TV (n=5/グループ)。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。^{*}p<0.05、^{**}p<0.01、^{***}p<0.001。

【図14i-j】Tfr2欠損における高い骨質量はSOST過剰発現又はMAPKシグナリングの再活性化によってレスキューされる。(i-j) 7日目のWT及びTfr2^{-/-}骨芽細胞のERK (pCMV6-Mapk1) 及びp38 α (pCMV6Mapk14) の過剰発現。Sost発現は48時間後に分析し、 β -アクチンに対して正規化した(n=3)。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。^{*}p<0.05、^{**}p<0.01、^{***}p<0.001。

【図14k】Tfr2欠損における高い骨質量はSOST過剰発現又はMAPKシグナリングの再活性化によってレスキューされる。(k) 骨芽細胞におけるTfr2作用の模式図：Tfr2はBMPに結合し、BMP/MAPKシグナリングを直接活性化するか(1.)、又はBMPRとの結合を介してそれらを活性化して(2.)、Sost及びDkk1の転写を誘発する。分泌されたスクレロステチンはWntアンタゴニストとして機能し、骨形成を阻害し骨質量を減少させる。

【図15a-b】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(a-b) センサーチップに固定されたTfr2-ECD及び分析物として1mg/mLのホロトランスフェリン(ホロ-Tf)、種々のBMPリガンド(50nM)、又はBMP受容体(200nM)を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)。全ての実験を別個に3回実施した。(a) 分子量に対して正規化した結合レベルの定量。(BMP-2 n=6、BMP-4、6、7、BMPR-II及びBMPR-IA n=4/グループ、ホロ-Tf n=3)。(b) ホロ-Tf及び/又はBMP-2の種々の濃度の結合応答。(n=3、ホロ-Tf単独に対しては^{###}p<0.001；BMP-2単独に対しては^{***}p<0.001)。(b) 一元配置ANOVAが統計分析に用いられた。

【図15c】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(c) 競合BMP-2サンドイッチELISAを実施して、Tfr2-ECD(又は陽性コントロールとしてBMPR-IA)とBMP-2との結合を試験した。Tfr2-ECD及びBMPR-IAの濃度を増加させながらBMP-2の所定濃度(1,500pg/mL)を用いた。アッセイの原理を右の模式図に示す。(n=4)。

【図15d】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(d) SPR分析。BMP-2を単独で、又はBMPR-IAの濃度を増加させながら一緒に注入した。結合応

10

20

30

40

50

答はBMP-2単独と対比される。(n=4、BMPr-1A単独に対しては### $p<0.001$; BMP-2単独に対しては*** $p<0.001$)。一元配置ANOVAが統計分析に用いられた。

【図15e】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(e) μ CTによる定量から2週間後の12週齢雌WT及びTfr2^{-/-}マウスのHO(脛骨の骨体積無し)。右に代表的な画像が示される。(WT PBS n=5、WT Tfr2-ECD n=3、Tfr2^{-/-} PBS n=4、Tfr2^{-/-} Tfr2-ECD n=4; * $p<0.05$; 対応するPBSコントロールに対しては*** $p<0.001$; WTに対しては### $p<0.001$)。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。

【図15f】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(f) μ CTによる定量から2週間後の12週齢雌WTマウスのHO(脛骨の骨体積無し)。(PBS n=12、局所Tfr2-ECD n=6、全身Tfr2-ECD n=8、Pal n=11; PBSコントロールに対しては* $p<0.05$)。全てのデータは平均±SDとして提示される。

【図15g】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。12週齢雌WTマウスの外傷誘発HOモデル。 μ CTを用いた評価から3週間後のHO。(n=6/グループ; PBSコントロールに対しては* $p<0.05$ 、*** $p<0.001$)。一元配置ANOVAが統計分析に用いられた。全てのデータは平均±SDとして提示される。

【図15h】Tfr2はBMPリガンドと結合して異所性石灰化(HO)を阻止する。(h) HOの処理におけるTfr2-ECDの作用態様の模式図。左: HOは過活動BMPシグナリングによって誘発され、骨芽細胞遺伝子の誘発及び骨形成をもたらす。右: Tfr2-ECDはBMPを中和し、それらのBMPシグナリング活性化を防ぐ。したがって、骨芽細胞性骨形成が阻害される。

【図16a-c】Tfr2欠損は鉄過負荷を生じる。(a) トランスフェリン飽和(n=4/グループ)。(b) 鉄及び(c) フェリチンが、10週齢雄Tfr2^{-/-}及びWTマウスの血清で測定された。鉄、n=4/グループ; フェリチン、n=5/グループ。平均±SD; * $p<0.05$ 、*** $p<0.001$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図16d-e】Tfr2欠損は鉄過負荷を生じる。(d) 肝臓の鉄含有量は測光を用い乾燥組織で測定した(n=4/グループ)。(e) 皮質骨の鉄含有量は原子吸光分光法を用いて決定した(n=6/グループ)。平均±SD; * $p<0.05$ 、*** $p<0.001$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図17a-c】骨質量は鉄過負荷モデルで減少する。骨体積/総体積を、10週齢雄トランスジェニック及びWTマウスの第四椎体で μ CTを用いて測定した。(a) Hfe^{-/-}マウス(n=5/グループ)、(b) Slc40a1^{C326S}マウス(機能不全のヘプシジン結合ドメインを有する)(n=5/グループ)、及び(c) 鉄富裕飼料を8週間与えられたWTマウス。(CO n=4、鉄富裕飼料n=5)。(a-c) 平均±SD; * $p<0.05$ 、*** $p<0.001$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図18a-b】Tfr2欠損は雄及び雌の種々の年齢にわたって骨体積に影響する。(a) 骨体積/総体積(BV/TV)を10週齢雄並びに雌WT及びTfr2^{-/-}マウスで μ CTを用い評価した(雌、WT n=6、Tfr2^{-/-} n=5; 雄、WT+Tfr2^{-/-} n=5/グループ)。(b) BV/TVを雄WT及びTfr2^{-/-}マウスで10週齢、6ヶ月齢及び12ヶ月齢で分析した(10週齢、n=4/グループ; 6ヶ月齢、n=4/グループ; 12ヶ月齢、WT n=6、Tfr2^{-/-} n=5)。平均±SD; * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図18c】Tfr2欠損は雄及び雌の種々の年齢にわたって骨体積に影響する。(c) 12週齢雄WT及びTfr2^{-/-}マウスの第四腰椎の擬似着色qBSE-SEM画像であり、問題の小柱骨領域は白四角として示されている。グレースケールピクセル分布は、方法で示されたハロゲン添加ジメタクリレート標準物に対比して0から256レベルに引き伸ばされた。グレースケール画像は8つの等間隔に分割され、各々は異なる色で表示されてデジタル画像の視覚的提示を補助する。これらの擬似着色画像では、低石灰化密度は黄色で高密度は灰色である。グラフは微小石灰化密度の相対度数及び累積度数を示し、グラフでは、グレースケールピクセル分布は8つの等しいサイズの着色ピンの各々に対して示される。骨微小石灰化密度の累積度数分布は、コルモゴロフ-スミルノフ検定を用いて比較された。(平均; WT

10

20

30

40

50

$n=4$ 、 $Tfr2^{-/-}$ $n=5$; $*p<0.05$)。バーは200 μ mである。

【図18d-e】Tfr2欠損は雄及び雌の種々の年齢にわたって骨体積に影響する。種々の年齢の雄及び雌WT及びTfr2^{-/-}マウスの血清P1NP及びCTXレベル。(P1NP雌、WT $n=10$ 、 $Tfr2^{-/-}$ $n=9$; 雄10週齢、WT $n=4$ 、 $Tfr2^{-/-}$ $n=5$; 雄12ヶ月齢、WT $n=6$ 、 $Tfr2^{-/-}$ $n=5$)。平均 $\pm$ SD ; $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図19a-c】骨組織におけるTfr2の発現。(a) WTマウスから単離された多様な器官におけるTfr2a mRNA発現(平均 $\pm$ SD ; $n=3$)。 (b) 12週齢Tfr2^{-/-}マウスの骨におけるTfr2の免疫組織化学分析。3つのうちの代表的な1つの画像が示される。スケールバーは100 μ mである。 (c) 12週齢Tfr2^{-/-}マウスに由来する骨芽細胞におけるTfr2の免疫蛍光。4つのうちの代表的な1つの画像が示される。スケールバーは20 μ mである。

【図20a-c】骨細胞特異的Tfr2欠損マウスにおける骨体積及び鉄の取り扱い。雄10週齢Tfr2^{f/f};Lysm-cre及びTfr2^{f/f};Ctsk-creマウス並びにそれらの同腹仔コントロールの大腿骨体積/総体積(BV/TV)。(Tfr2^{f/f};Lysm-cre、Cre- $n=17$ 、Cre+ $n=9$; Tfr2^{f/f};Ctsk-cre、Cre- $n=8$ 、Cre+ $n=12$)。 (b-c) 鉄含有量を以下の10週齢雄の肝臓で測定した : Tfr2^{f/f};Ctsk-cre (Cre- $n=7$ 、Cre+ $n=6$) 及びTfr2^{f/f};Osx-creマウス並びにそれらの同腹仔コントロール ($n=4$ /グループ)。平均 $\pm$ SD ; $*p<0.05$ 。両側t検定が統計分析に用いられた。

【図21a】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(a) WT及びTfr2^{-/-}マウスの骨髄に由来する7日間分化骨芽細胞で次世代配列決定を実施した ($n=4$ /グループ)。Tfr2^{-/-}骨芽細胞で過少提示される(ダウンレギュレーション、カットオフ : -1.5 (log2)) 又は過大提示される(アップレギュレーション、カットオフ : +1.0 (log2))、生物学的プロセス、分子機能及び細胞成分についての遺伝子腫瘍学分析。DESeq2に実装されたワルド検定を統計分析に用いた。

【図21b】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。遺伝子セットエンリッチメント解析をブロードインスティテュートGSEAソフトウェアを用いて実施した。エンリッチメント図表はWntシグナリング及び骨芽細胞分化について示される ($n=4$ /グループ)。

【図21c-d】Tfr2欠損におけるBMPシグナリング及びWnt阻害因子のダウンレギュレーション。(c) Tfr2^{-/-}マウスから単離した種々の骨芽細胞セットにおいてqPCRを用い、WTマウスに対して正規化した、制御される遺伝子の検証。遺伝子を β -アクチン及びGAPDHに対して正規化した(平均 $\pm$ SD ; $n=4$ /グループ ; $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$)。両側t検定を統計分析に用いた。(d) WT及びTfr2^{-/-}マウスからのex vivo分化骨芽細胞を、50ng/mLのBMP-4又はBMP-6で0-20-40分処理した。タンパク質抽出後、シグナリングタンパク質のリン酸化をウェスタンブロットを用いて分析した。4つの実験のうちの1つを示す。

【図22a-d】Tfr2及びアニソマイシン処理によるSost発現の調節。(a) 7日目の分化WT又はTfr2^{-/-}骨芽細胞に空pcDNA3.1ベクター(CO)又はTfr2 α 遺伝子を含むpcDNA3.1ベクター(Tfr2-OE)をトランスフェクトした。48時間後、Tfr2aのmRNA発現をqPCRで決定した ($n=3$)。 (b) 10週齢雌WTマウス及び1つのトランスジェニックSOST対立遺伝子を含むか(SOST^{+/-}) 又は含まない(SOST^{+/+}) Tfr2^{-/-}マウスの骨芽細胞表面/骨表面(Oc.S/BS) (WT Sost^{+/+} $n=5$ 、WT Sost^{+/-} $n=3$ 、Tfr2^{-/-} Sost^{+/+} $n=9$ 、Tfr2^{-/-} Sost^{+/-} $n=5$)。 (c-f) 7日目の分化WT又はTfr2^{-/-}骨芽細胞のSmad1 (pCMV6-Smad1) 及びSmad4 (pCMV6-Smad4) の過剰発現。Sost、Mapk1、及びMapk14発現を48時間後に分析し、 β -アクチンに対して正規化した ($n=3$)。 (a-f、h) 平均 $\pm$ SD ; $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$ 。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。

【図22e-h】Tfr2及びアニソマイシン処理によるSost発現の調節。(c-f) 7日目の分化WT又はTfr2^{-/-}骨芽細胞のSmad1 (pCMV6-Smad1) 及びSmad4 (pCMV6-Smad4) の過剰発現。Sost、Mapk1、及びMapk14発現を48時間後に分析し、 β -アクチンに対して正規化した ($n=3$)。 (g) WT又はTfr2マウスから骨芽細胞を単離し、アニソマイ

10

20

30

40

50

シン (100nM) で20分刺激した。ウェスタンブロット分析を用いて、ERK (pERK) 及び p38 (pp38) シグナリングの活性化を評価した。3つの別個の実験のうち1つの代表的なブロットを示す。(h) 5mg/kg アニソマイシンで3週間処理した雄の10週齢WT及びTfr2^{-/-}マウスの骨芽細胞表面/骨表面 (Oc.S/BS) (n=5/グループ)。(a-f, h) 平均±SD; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAが統計分析に用いられた。

【図23 a-c】Tfr2-ECDはBMPと結合する。Tfr2-ECD溶出液でのTfr2のSDS-PAGE及びウェスタンブロットのクマシー染色。レーン1はカラムの洗浄液を表し、一方、2-6はTfr2-ECDの最初のカラム溶出画分を示す。(b) 濃度50nMにおけるBMPの固定Tfr2-ECDに対する代表的センソグラム。(a+b) これらの実験を3回繰返し同様な結果が得られた。(c) 高塩濃度の泳動緩衝液 (500mMのNaCl) でのTfr2-ECDと固定BMP-2、4及び6との結合。実験を2回繰返した。

【図23 d-e】Tfr2-ECDはBMPと結合する。(d-e) センサーチップ表面固定BMP-2又はBMP-4及びチップ上を流れる多様な濃度のTfr2を用いるTfr2-BMP-2及びTfr2-BMP-4結合のSPRにより決定された安定状態の親和性。この実験は2回繰返された。

【図23 f】Tfr2-ECDはBMPと結合する。(f) Tfr2-ECDとのホロ-トランスフェリン (ホロ-Tf)結合のセンソグラム。濃度を増加させながらホロ-Tfを連続的に中間再生無しにチップ上を流した。この実験は2回繰返された。

【図23 g-h】Tfr2-ECDはBMPと結合する。(g-h) 連続結合実験。最初にBMPを注入するか又はホロ-Tfを注入し、続いてホロ-Tf又はBMP-2を注入した (n=3; 平均±SD)。(i) 固定Tfr2-ECDに対するBMPr-IA、BMPr-II及びホロ-Tfの代表的センソグラム。(g-i) これらの実験を3回繰返し、同様な結果が得られた。

【図23 i-j】Tfr2-ECDはBMPと結合する。(i) 固定Tfr2-ECDに対するBMPr-IA、BMPr-II及びホロ-Tfの代表的センソグラム。(g-i) これらの実験を3回繰返し、同様な結果が得られた。(j) BMPr-IAとHuH7ヘパトマ細胞過剰発現Tfr2の共免疫沈降 (Co-IP)。BMPr-IAとLDLRとの共免疫沈降を陰性コントロールとして用いた。Tfr2とBMPr-IAとの共免疫沈降をBMP-2の存在下及び非存在下で実施した。3つのうち1つの実験を示す。

【図24 a】Tfr2-ECDは異所性骨化を阻止する。WT及びTfr2^{-/-}マウスの前脛骨筋に2.5 µgのBMP-2を注射することによって、異所性骨化を誘発した。いくつかの実験では、Tfr2-ECDを追加してBMP-2と等濃度で注射した。2週間後、HE染色 (骨化は矢印で示される) を用いて、当該筋肉の骨化を評価した。グループに付き1つの代表的画像を示す (n=3-6/グループ)。スケールバーは200 µmである。これらの実験を2回繰返し、同様な結果が得られた。

【図24 b】Tfr2-ECDは異所性骨化を阻止する。WT及びTfr2^{-/-}マウスの前脛骨筋に2.5 µgのBMP-2を注射することによって、異所性骨化を誘発した。いくつかの実験では、Tfr2-ECDを追加してBMP-2と等濃度で注射した。2週間後、フォン・コッサ/ファン・ギーソン染色 (黒色領域は骨化を示す) を用いて、当該筋肉の骨化を評価した。グループに付き1つの代表的画像を示す (n=3-6/グループ)。スケールバーは200 µmである。これらの実験を2回繰返し、同様な結果が得られた。

【図24 c】Tfr2-ECDは異所性骨化を阻止する。(c-d) WTマウスの前脛骨筋に2.5 µgのBMP-2を注射することによって、異所性骨化を誘発した。マウスをPBS (1日おきにi.p.注射)、パロパロテン (最初の5日間経口的に100 µg/マウス、続いて残りの実験について50 µg/マウス)、又はTfr2-ECD (最初の10日間10mg/kg BW i.p.、続いて残りの期間5mg/kg BW) のいずれかでマウスを毎日処理した。8日後、筋肉の軟骨生成をサフラニンO染色を用いて評価した。軟骨細胞 (矢印で示される) の数及びサフラニンO陽性面積の定量 (平均±SD、PBS n=5、Tfr2-ECD n=4、Pal n=6; *p<0.05、***p<0.001)。

【図24 d】Tfr2-ECDは異所性骨化を阻止する。(c-d) WTマウスの前脛骨筋に2.5 µgのBMP-2を注射することによって、異所性骨化を誘発した。マウスをPBS (1日おきにi.

10

20

30

40

50

p.注射)、パロパロテン(最初の5日間経口的に100 µg/マウス、続いて残りの実験について50 µg/マウス)、又はTfr2-CED(最初の10日間10mg/kg BW i.p.、続いて残りの期間5mg/kg BW)のいずれかでマウスを毎日処理した。8日後、筋肉の軟骨生成をサフニンO染色を用いて評価した。代表的画像。スケールバーは100 µmである。これらの実験を2回繰返し、同様な結果が得られた。

【発明を実施するための形態】

【0005】

特段の規定がなければ、学術用語及び技術用語は、当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。さらにまた、文脈が特段に必要としないかぎり、単数用語は複数性を含み、複数用語は単数性を含む。単数用語“a”、“an”、及び“the”は、文脈が明らかにそうでない10ことを指示しないかぎり複数の対応語を含む。同様に、“又は(or)”という語は、文脈が明らかにそうでないことを指示しないかぎり“及び(and)”を含む。本明細書に記載するものと類似又は等価の方法及び材料を本開示の実施又は試験で用いることができるが、適切な方法及び材料を下記に記載する。略語“e.g.(例えば)”はラテン語のexempli gratiaに由来し、非限定的な例を示すために本明細書で用いられる。したがって、略語“e.g.”は“for example(例えば)”という用語と同義である。

本明細書及び特許請求の範囲で、“about(約)”という用語は、例えば、本開示の実施態様の記載に用いられる組成物の成分の量、濃度、体積、プロセス温度、プロセス時間、収量、流速、圧力、及び同様な値、並びのその範囲を修正するために用いられる。“約”という用語は、例えば、典型的な測定手順及び化合物、組成物、濃縮物又は使用処方物の製造に用いられる取扱い手順により；これら手順における不注意な誤りにより；当該方法の実施に用いられる出発材料又は成分の製造、供給源又は純度の相違、及び同様な近似概念により生じ得る数値量の変動を指す。“約”という用語はまた、特定の初期濃度を持つ処方物又は混合物のエイジングにより相違する量、及び特定の初期濃度を持つ処方物又は混合物の混合又はプロセッシングにより相違する量を包含する。“約”という用語によって修飾される場合、本明細書に添付される特許請求の範囲はこれらの量と等価のものを含む。

【0006】

本明細書で用いられるように、“投与する”又は“投与”は、身体外に存在する物質(例えば本明細書で提供される抗Tfr2抗体)を患者に注射するか、または、例えば粘膜、皮内、静脈内、筋肉内デリバリー、及び/又は本明細書に記載の若しくは当業界で公知の他のいずれかの物理的デリバリー方法又は別の態様で物理的にデリバリーする行為を指す。疾患又はその症候が処置されているとき、当該物質の投与は、典型的には当該疾患又はその症候の開始後に生じる。疾患又はその症候が予防されているとき、当該物質の投与は、典型的には当該疾患又はその症候の開始前に生じる。

【0007】

“抗体”、“免疫グロブリン”又は“Ig”という用語は本明細書では互換的に用いることができ、標的(例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、又は前述の組合せ)を認識し、さらに免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通して結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で用いられるように、“抗体”という用語は、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体フラグメント(例えばFab、Fab’、F(ab)₂)及びFvフラグメント)、単鎖Fv(scFv)変異体、マルチ特異性抗体(例えば二重特異性抗体(二重結合性抗体を含む))、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を、抗体が所望の生物学的活性を示す限り包含する。“抗体”という用語はまた、4つのポリペプチド鎖(2つの軽(L)鎖及び2つの重(H)鎖)で構成される、約150kDaの分子量をもつYの形状の糖タンパク質を指すことができる。ギリシャ文字アルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ε)、ガンマ(γ)、及びミュー(μ)によって示される4つのタイプの哺乳動物Ig重鎖アイソタイプが存在する。重鎖のタイプは抗体のクラスを規定する(すなわちそれぞれIgA、IgD、IgE、IgG及びIgM)。γ及びαクラスはさらにまた、定常ドメイン配列及び機能の相違を

基準にしてサブクラスに分割される（例えばIgG1、hIgG2、mIgG2A、mIgG2B、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）。哺乳動物では、2つのタイプの免疫グロブリン軽鎖（ λ 及び κ ）が存在する。抗体の“可変領域”又は“可変ドメイン”は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ“ V_H ”及び“ V_L ”と呼ばれることがある。これらのドメインは概ね（同じクラスの他の抗体と対比して）抗体の最可変部分であり、抗原結合部位を含む。抗体の例は、重鎖単独（すなわちH2）抗体であり、この抗体は重鎖のダイマー（5'-VH(場合によってヒンジ)-CH2-CH3-3'）を含み、軽鎖を欠いている。

【0008】

本明細書に記載される抗体は、オリゴクローナル、ポリクローナル、モノクローナル（完全長モノクローナル抗体を含む）、ラクダ化、キメラ、CDR移植、マルチ特異性、二重特異性（二重結合性抗体を含む）、触媒性、キメラ、ヒト化、完全ヒト、抗イディオタイプ抗体でよく、可溶性又は結合形の標識可能な抗体とともに、そのフラグメント、変種又は誘導体で、単独又は公知の技術によって提供される他のアミノ酸配列と組み合わせられたものを含む。抗体は任意の種に由来し得る。本明細書に記載する抗体は裸であっても、又は他の分子（例えば毒素、放射性同位元素など）と複合体化されてもよい。

“抗原結合部位”、“抗原結合ドメイン”、“抗原結合領域”、“抗原結合フラグメント”及び同様な用語は、抗原と相互作用し抗原に対するその特異性及び親和性を結合因子に付与するアミノ酸残基（例えば相補性決定領域（CDR））を含む抗体の部分の指す。抗原結合領域は、任意の動物種、例えばげっ歯類（例えばウサギ、ラット又はハムスター）及びヒトに由来し得る。好ましくは、抗原結合領域はヒト起原であろう。

【0009】

本明細書に記載する抗原結合フラグメントには以下が含まれ得る：単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、F(ab')₂フラグメント、所望の生物学的活性を示す抗体フラグメント、ジスルフィド安定化可変領域（dsFv）、ダイマー性可変領域（ジアボディ）、抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば抗体に対する抗Id抗体を含む）、イントラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子、並びに抗体フラグメント及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントから形成されるマルチ特異性抗体。特に、本明細書に記載する抗体及び抗体フラグメントは、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント（すなわち抗原結合部位を含む分子）を含むことができる。酵素（パパイン）による抗体の消化は、2つの同一の抗原結合フラグメント（“Fab”フラグメントとしてもまた知られる）及び“Fc”フラグメント（抗原結合活性を持たないが結晶化能力を有する）を生じる。本明細書で用いられるとき、“Fab”は、1つの定常ドメイン並びに重鎖及び軽鎖の各々の1つの可変ドメインを含む抗体のフラグメントを指す。本明細書の“Fc領域”という用語は、免疫グロブリン重鎖のC-末端領域を定義するために用いられる（自然のままのFc領域配列及び変種Fc領域を含む）。“Fcフラグメント”は、ジスルフィドによって一緒に保持される両方のH鎖のC-末端部分を指す。抗体のエフェクター機能はFc領域の配列によって決定される。Fc領域はまた、ある種の細胞タイプで見出されるFc受容体（FcR）によって認識される。酵素（ペプシン）による抗体の消化は、F(ab')₂フラグメントを生じ、前記フラグメントでは、抗体分子の2本のアームは結合したままで2つの抗原結合部位を含む。F(ab')₂フラグメントは抗原を架橋する能力を有する。

【0010】

本明細書で用いられるとき、“Fv”は、抗原認識及び抗原結合部位の両方を保持する抗体の最小フラグメントを指す。この領域は、堅固な非共有又は共有結合関係にある1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインのダイマーから成る。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して V_H - V_L ダイマーの表面で抗原結合部位を規定するのはこの立体配置においてである。集合的に、6つのCDRは抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一可変ドメイン（又はある抗原に特異的なCDRの3つしか含まないFvの半分）でさえも抗原を認識し結合する能力を有するが、ただし完全な結合部位よりも親和性は低い。

本明細書で用いられる“モノクローナル抗体”という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。均質な抗体集団とは、すなわち当該集団を構成する個々の抗体が、ごく少量存在し得る天然に生じる可能な変異及び/又は翻訳後修飾（例えば異性化、アミド化）を除いて同一である集団である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原決定基又はエпитープに誘導される。対照的に、ポリクローナル抗体調製物は、典型的には、種々の抗原決定基（又はエпитープ）に誘導される種々の抗体を含む。本明細書で用いられる“モノクローナル抗体”という用語は、無傷かつ完全長のモノクローナル抗体とともに抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab)₂、Fv）、単鎖（scFv）変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を包含する。さらにまた、“モノクローナル抗体”は多数の方法で作製される抗体を指す。前記多数の方法には、ハイブリドーマ、ファージ選別、組換え発現、及びトランスジェニック動物が含まれるが、ただしそれらに限定されない。

【0011】

本明細書のモノクローナル抗体は“キメラ”抗体（免疫グロブリン）とともに所望の生物学的活性を示す前記のフラグメントを含むことができる。前記キメラ抗体においては、重鎖及び/又は軽鎖の一部は、特定の種に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、一方、当該鎖の残余は、別の種に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である。

“ヒト化抗体”という用語はキメラ抗体のサブセットを指し、非ヒト免疫グロブリン（ドナー抗体）由来の“超可変領域”がヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）の超可変領域由来の残基と入れ替わっている。概して、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、前記ドメインでは、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン配列のそれと一致し、さらにフレームワークの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれであるが、ただしフレームワーク領域は、抗体の性能（例えば結合親和性、異性化、免疫原性など）を改善する1つ以上の置換を含むことができる。

【0012】

“二重特異性抗体”という用語は2つの標的分子に対する特異性を含む抗体を意味し、前記には例えば以下の様式が含まれる（ただしそれらに限定されない）：DVD-Ig（以下を参照されたい：Digiammario et al., “Design and generation of DVD-IgTM molecules for dual-specific targeting”, Meth. Mo. Biol., 2012, 889, 145-156）、mAb²（WO2008/003103参照、mAb²様式の説明は参照により本明細書に含まれる）、FIT-Ig（WO2015/103072参照、FIT-Ig足場の説明は参照により本明細書に含まれる）、mAb-dAb、ドックアンドロック（dock and lock）、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ（Triomab）、LUZ-Y、Fcab、κλボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、Diabody-CH3、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH3 KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig及びzybody。二重特異性様式の概括については、以下を参照されたい：C. Spiess et al., Mol. Immunol., 2015。別の実施態様では、二重特異性分子は、例えば以下の別の非Ig様式に融合している抗体を含む：T細胞受容体結合ドメイン；免疫グロブリンスーパーファミリドメイン；無顎類可変リンパ球受容体；フィブロネクチン受容体（例えばAdnectinTM）；抗体定常ドメイン（例えばCH₃ドメイン、例えばFcabTMのCH₂及び/又はCH₃）（ここで定常ドメインは機能的CH₁ドメインではない）；scFv；(ScFv)₂；sc-ジアボディ；scFab；センチリン及びCTLA-4から

選択される足場から誘導されるエピトープ結合ドメイン (EvibodyTM) ; リボカリンドメイン ; タンパク質A、例えばタンパク質AのZ-ドメイン (例えばAffibodyTM又はSpA) ; Aドメイン (例えばAvimerTM又はMaxibodyTM) ; 熱ショックタンパク質 (例えばGroE I及びGroESから誘導されるエピトープ結合ドメイン) ; トランスフェリンドメイン (例えばトランスボディ) ; アンキリンリピートタンパク質 (例えばDARPinTM) ; ペプチドアプタマー ; C型レクチンドメイン (例えばTetranectinTM) ; ヒトγ-クリスタリン又はヒトユビキチン (アフィリン) ; PDZドメイン ; サソリ毒素 ; 及びヒトプロテアーゼ阻害剤のクーニッツ型ドメイン。

【0013】

ある実施態様では、二重特異性抗体はmAb²である。mAb²は、改変定常領域と融合されたインタクト抗体由来のV_H及びV_Lを含み、前記改変定常領域は、抗原結合部位を形成するように操作されている (“Fcab”として知られる)。Fcab/mAb²様式の背景技術はWO2008/003103にさらに詳細に記載されている。mAb²様式の説明は参照により本明細書に含まれる。

別の実施態様では、二重特異性抗体は“二重結合性抗体”である。本明細書で用いられるように、“二重結合性抗体”という用語は二重特異性抗体であり、当該抗体では、両方の抗原結合ドメインはV_H/V_L対によって形成され、さらに以下を含む：FIT-Ig (WO2015/103072参照、参照により本明細書に含まれる)、mAb-dAb、ドックアンドロック、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、Diabody-CH3、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、scFv-CH3 KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、FabscFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、及びscFv4-Ig。

【0014】

“超可変領域”、“CDR領域”又は“CDR”という用語は、配列中で超可変性であり及び/又は規定されたループを形成する抗体の可変ドメイン領域を指す。概して、抗体の抗原結合部位は6つの超可変領域、すなわちV_Hに3つ (CDRH1、CDRH2、CDRH3) 及びV_Lに3つ (CDRL1、CDRL2、CDRL3) を含む。抗体の重鎖及び軽鎖のこれらの領域は抗体に抗原結合特異性を付与する。CDRはKabatの系にしたがって規定され得る (以下を参照されたい：E.A. Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th ed., NIH Publication no. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services)。他の系をCDRの規定に用いることができる。他の系は、Chothiaらによって考案された系 (以下を参照されたい：C. Chothia & A.M. Lesk, 1987, “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, J. Mol. Bio., 196, 901-917) 及びIMGT系 (以下を参照されたい：M.P. Lefranc, 1997, “Unique database numbering system for immunogenetic analysis”, Immunol. Today, 18, 50) である。抗体は、典型的には3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。CDR (又はCDRs) という用語は、これらの領域の1つ又はいくつかを示すために本明細書で用いられる。当業者は、異なる命名の系を容易に比較し、特定の配列をCDRと規定できるか否かを決定することができる。

【0015】

本明細書の阻害剤は例えばヒト抗体であり得る。“ヒト抗体”は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を所有し、及び/又はヒト抗体を作製する技術のいずれかを用いて作製されてある抗体であり、特に非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。“特異的に結合する”という用語は、標的と抗体間の測定可能で再現可能な相互作用 (例えば結合) を指し、前記作用は、生物学的分子を含む複数の分子の不均質

集団の存在下で標的の存在を確定させる。例えば、標的（エピトープであり得る）と特異的に結合する抗体は、他の標的と結合するよりも強い親和性、アビジティーでより容易に及び/又はより長期にわたってこの標的と結合する抗体である。ある実施態様では、抗体が無関係の標的と結合する程度は、例えば放射性免疫アッセイ（RIA）によって測定したとき、抗体とこの標的との結合の約10%未満である。

Tfr2抗原と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントは、関係する抗原と交差反応性であり得る。好ましくは、Tfr2抗原と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントは、他の抗原と交差反応しない（しかしながら、異なる種（例えばアカゲザル又はマウス）のTfr2と場合によって交差反応し得る）。Tfr2抗原と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントは、例えば免疫アッセイ、BIAcoreTM、又は当業者に公知の他の技術によって識別され得る。抗体又はそのフラグメントが、実験的技術（例えば放射性免疫アッセイ（RIA）及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA））を用いて決定したとき、いずれの交差反応性抗原よりも高い親和性でTfr2抗原と結合するとき、当該抗体又はそのフラグメントはTfr2抗原と特異的に結合する。典型的には、特異的又は選択的反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10倍超（例えば15倍超、20倍超、50倍超又は100倍超）であろう。例えば以下を参照されたい：Paul, ed., 1989, Fundamental immunology Second Edition, Raven Press, New York（抗体特異性に関する考察については332－336ページ）。

【0016】

本明細書で用いられるように、“承認番号”又は“販売承認番号”は、特定の医薬品及び/又は組成物を規制庁の所管する領域内で市販してもよい及び/又は販売に供してもよいという規制庁の決定に際して当該規制庁が発行する番号を指す。本明細書で用いられる“規制庁”は、例えば医薬品及び/又は組成物の安全性及び有効性の評価及びそのような製品及び/又は組成物の所定の領域における販売/市販を管理する責任を有する担当庁の1つを指す。米国の食品医薬局（FDA）及びヨーロッパの欧州医薬品庁（EMA）がそのような規制庁のほんの2つの例である。他の非限定的な例には、SDA、MPA、MHPRA、IMA、ANMAT、保健医薬局香港部、CDSCO、Medsafe、及びKFDAが含まれ得る。

本明細書で用いられるように、“緩衝剤”は、pHの強い変動を生じることなく一定量の酸及び塩基を吸収することができる化学薬剤を指す。

本発明の組成物は担体を含むことができる。この文脈で用いられるように、“担体”という用語は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイントのアジュバント（完全及び不完全））、賦形剤、又は治療薬と一緒に投与されるビヒクルを指す。そのような医薬担体は無菌的液体、例えば水及び油（石油、動物、植物又は合成起原（例えば落花生油、大豆油、鉱物湯、ゴマ油など）を含む）であり得る。医薬組成物が静脈内に投与されるとき、水は好ましい担体である。生理食塩水溶液並びにデキストロース及びグリセロール水溶液もまた、特に注射可能溶液のために液性担体として利用され得る。

本明細書で用いられるように、“組成物”という用語は、指定成分（例えば本発明の抗体）を場合によって指定量で含む製品とともに、指定成分の（場合によって指定量の）組合せにより直接的又は間接的にもたらされる任意の製品を包含することが意図される。

例として、本発明の阻害剤又はタンパク質は、エフェクター機能を有する抗体定常領域を含む。本明細書で用いられる“エフェクター機能”（又は“エフェクター有効化”）は、抗体依存細胞媒介細胞傷害活性（ADCC）、補体依存細胞傷害活性（CDC）媒介応答、Fc媒介食作用又は抗体依存細胞性食作用（ADCP）、及びFcRn受容体を介する抗体再循環の1つ以上を指す。

【0017】

“有効量”は、投薬において及び必要な期間に、所望の効果（治療的及び予防的結果を含む）を達成するために有効な量を指す。“治療的に有効な量”は、特定の異常の測定可能な改善又は防止を達成するために必要な最小濃度を指す。本明細書の治療的に有効な量は、複数の要因（例えば患者の疾患の状態、年齢、性別、及び体重、並びに個体で所望の応答を引き出す抗体の能力）にしたがって変動し得る。治療的に有効な量はまた、抗体の毒性

又は有害な作用を治療的に有益な作用が上回る量である。“予防的に有効な量”は、投薬において及び必要な期間に、所望の予防的な結果を達成するために有効な量を指す。いくつかの実施態様では、本発明の抗体の有効量は、約0.1mg/kg（対象動物の体重1kg当たりの抗体のmg）から約100mg/kgである。ある種の実施態様では、本明細書で提供される抗体の有効量は、約0.1mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約60mg/kg、約70mg/kg、約80mg/kg、約90mg/kg、又は約100mg/kg（又はその中のある範囲）である。いくつかの実施態様では、本明細書で用いられる“有効量”はまた、指定の結果（例えば細胞のTfr2の生物学的活性の阻害）を達成する本発明の抗体の量を指す。

10

【0018】

本明細書で用いられる“エピトープ”という用語は、抗原（例えばTfr2ポリペプチド又はTfr2ポリペプチドフラグメント）表面上の局在化領域を指し、前記領域は、抗体の1つ以上の抗原結合領域と結合することができ、さらに免疫応答を引き出すことができる、動物（好ましくは哺乳動物、もっとも好ましくはヒト）において抗原性若しくは免疫原性活性を有する。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を引き出すポリペプチドの部分である。抗原性活性を有するエピトープは、当業界で周知の任意の方法（例えば本明細書に記載の免疫アッセイ）によって決定されるように、抗体が特異的に結合するポリペプチドの部分である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。エピトープは通常、分子の化学的に活性な表面グループ（例えばアミノ酸又は糖側鎖）から成り、特異的な三次元構造特性とともに特異的な荷電特性を有する。エピトープに寄与するポリペプチドの領域はポリペプチドの連続的なアミノ酸であっても、又はエピトープはポリペプチドの2つ以上の非連続的な領域が一体となって生じてよい。エピトープは、抗原の三次元表面の特質であることもそうでないこともある。ある種の実施態様では、Tfr2エピトープはTfr2ポリペプチドの三次元表面の特質である。他の実施態様では、Tfr2エピトープはTfr2ポリペプチドの線状の特質である。

20

【0019】

ある例では、本明細書の組成物は賦形剤を含む。本明細書で用いられる“賦形剤”という用語は、薬のために希釈剤、ビヒクル、保存料、結合剤、又は安定化剤として通常的に用いられる不活性物質を指し、以下が含まれる（ただしそれらに限定されない）：タンパク質（例えば血清アルブミンなど）、アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、グリシン、ヒスチジンなど）、脂肪酸及びリン脂質（例えばスルホン酸アルキル、カプリル酸アルキルなど）、界面活性剤（例えばSDS、ポリソルベート、非イオン性界面活性剤など）、糖類（例えばシュクロース、マルトース、トレハロースなど）、及びポリオール（例えばマンニトール、ソルビトールなど）。以下もまた参照されたい：Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.（参照によってその全体が本明細書に含まれる）。

30

【0020】

本明細書の抗体又はそのフラグメントは、このパラグラフに記載する重鎖を含む。抗体に関して用いられるとき“重鎖”という用語は、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列を基準にする5つの別個の型（アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）及びミュー（ μ ）と呼ばれる）を指す。重鎖のこれらの別個の型は周知であり、5クラスの抗体（それぞれIgA、IgD、IgE、IgG及びIgM）を生じ、IgGの4つのサブクラス（すなわちIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）を含む。好ましくは、重鎖はヒト重鎖である。ヒト集団では、各免疫グロブリン又は免疫グロブリンサブクラスの多数の重鎖定常領域対立遺伝子が存在する。これらの対立遺伝子変種のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、公開の利用可能なデータベース（例えばIMGT、ENSEMBL Swiss-Prot及びUniprot）でアクセスできる。対立遺伝子変種はまた多様なゲノム配列決定プロジェクトで識別され得る。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体及び抗体フラグメントは、IgG1定常領域対立遺伝子によってコードされる重鎖を含む。前記にはヒトIGHG1*01、IGHG1*02、IGHG1*03、I

40

50

IGHG1*04、及びIGHG1*05が含まれるが、ただしそれらに限定されない。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体及び抗体フラグメントはIgG2定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。前記にはヒトIGHG2*01、IGHG2*02、IGHG2*03、IGHG2*04、IGHG2*05、及びIGHG2*06が含まれるが、ただしそれらに限定されない。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはIgG3定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。前記にはヒトIGHG3*01、IGHG3*02、IGHG3*03、IGHG3*04、IGHG3*05、IGHG3*06、IGHG3*07、IGHG3*08、IGHG3*09、IGHG3*10、IGHG3*11、IGHG3*12、IGHG3*13、IGHG3*14、IGHG3*15、IGHG3*16、IGHG3*17、IGHG3*18、及びIGHG3*19が含まれるが、ただしそれらに限定されない。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはIgG4定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。前記にはヒトIGHG4*01、IGHG4*02、IGHG4*03、及びIGHG4*04が含まれるが、ただしそれらに限定されない。別の例では、重鎖は機能喪失IgGアイソタイプ、例えば機能喪失IgG4である。ある種の実施態様では、本発明の抗体はヒトガンマ4定常領域を含む。別の実施態様では、重鎖定常領域はFc-γ受容体と結合せず、例えばLeu235Glu変異を含む。別の実施態様では、重鎖定常領域は、安定化の増加のためにSer228Pro変異を含む。別の実施態様では、重鎖定常領域はIgG4-PEである（例えば本明細書の配列表を参照されたい）。別の実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントは、マウスIgG1定常領域対立遺伝子によってコードされる重鎖定常領域を含む。前記にはマウスIGHG1*01又はIGHG1*02が含まれるが、ただしそれらに限定されない。本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントは、マウスIgG2定常領域対立遺伝子によってコードされる重鎖定常領域を含む。前記にはマウスIGHG2A*01、IGHG2A*02、IGHG2A*0、IGHG2B*01、IGHG2B*02、IGHG2C*01、IGHG2C*02、又はIGHG2C*03が含まれるが、ただしそれらに限定されない。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはマウスIgG3定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含む。前記にはIGHG3*01が含まれるが、ただし前記に限定されない。

【0021】

本発明のタンパク質、阻害剤又は組成物は、別の治療法と組合わせて対象動物に投与され得る。他の治療法の実施という文脈での“組合わせて”という用語は、2つ以上の治療法の使用を指す。“組合わせて”という用語の使用は、複数の治療法が疾患を有する対象動物において実施される順番を制限しない。第一の治療法は、対象動物（Tfr2媒介疾患を有していた、有している、又は当該疾患に感受性がある）で、第二の治療法の前（例えば1分、45分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間又は12週間前）に、同時に、後に（例えば1分、45分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間又は12週間後に）実施され得る。任意の追加の治療法を他の追加の治療法との任意の順序で実施することができる。ある種の実施態様では、本発明の抗体を1つ以上の治療法（例えば、現在投与されている本発明の抗体ではない治療法）と組合わせて投与して、Tfr2媒介疾患を予防し治療し管理し及び/又は緩和することができる。本発明の抗体と組合わせて実施できる治療法の非限定的な例には、鎮痛剤、麻酔剤、抗生物質、若しくは免疫調整薬剤、又は米国薬局方及び/又は米医薬品便覧に掲載されている任意の他の因子が含まれる。

【0022】

本明細書で用いられるように、“注射装置”は注射を実施するために設計された装置を指し、注射は、対象者の組織（典型的には皮下組織）に注射装置を一時的に流動的に連結する工程を含む。注射はさらにまた、ある量の液状薬を組織に投与し、さらに注射装置を組織から分離又は除去する工程を含む。いくつかの実施態様では、注射装置は静脈内装置（IV装置）であることができ、標的組織が循環系内の血液（例えば静脈内血液）であるときに用いられるタイプの装置である。注射装置の一般的な（ただし非限定的な）例は針及び

注射器である。

本明細書で用いられるように、“指示書”は、製品の直接の容器上に記載された物、印刷物又は図表の表示（例えば医薬的に活性な因子を含むバイアル上に表示された文書）、又は組成物若しくは問題の組成物を含むキットに含まれる問題の製品の使用に関する詳説を指す。指示書は投与又は実施が意図される治療方法を説明する。

“Kabat番号付け”という用語又は同様な用語は当業界で認知されており、抗体又はその抗原結合部分の重鎖可変領域で他のアミノ酸残基よりも可変性（すなわち超可変性）であるアミノ酸残基の番号付けのシステムを指す（Kabat et al., (1971) Ann. NY Acad. Sci., 190:382-391；及びKabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）。重鎖可変領域については、超可変領域は、典型的にはCDR1でアミノ酸31位から35位、CDR2でアミノ酸50位から65位、CDR3でアミノ酸95位から102位の範囲である。

【0023】

本発明の抗体、タンパク質又は阻害剤は本パラグラフに記載する軽鎖を含むことができる。抗体に関して用いられるとき、“軽鎖”という用語は免疫グロブリン軽鎖を指し、前記には哺乳動物で2つの型（ラムダ（λ）及びカッパ（κ））が存在する。好ましくは、軽鎖はヒト軽鎖である。好ましくは、軽鎖定常領域はヒト定常領域である。ヒト集団では、多数の軽鎖定常領域対立遺伝子が存在する。これらの対立変種のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、公開の利用可能なデータベース、例えばIMGT、ENSEMBL、Swiss-Prot及びUniprotでアクセスできる。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはヒトκ定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含み、前記には、IGKC*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGKC*02（例えば本明細書の配列表参照）、IGKC*03（例えば本明細書の配列表参照）、IGKC*04（例えば本明細書の配列表参照）及びIGKC*05（例えば本明細書の配列表参照）が含まれるが、ただしそれらに限定されない。ある実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはヒトλ定常領域対立遺伝子によってコードされるタンパク質を含み、前記には、IGLC1*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC1*02（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC2*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC2*02（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC2*03（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC3*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC3*02（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC3*03（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC3*04（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC6*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC7*01（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC7*02（例えば本明細書の配列表参照）、IGLC7*03（例えば本明細書の配列表参照）が含まれるが、ただしそれらに限定されない。別の実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはマウスκ定常領域対立遺伝子によってコードされる軽鎖定常領域を含み、前記にはIGKC*01、IGKC*03又はIGKC*03が含まれるが、ただしそれらに限定されない。別の実施態様では、本明細書に開示する抗体又は抗体フラグメントはマウスλ定常領域対立遺伝子によってコードされる軽鎖定常領域を含み、前記にはIGLC1*01、IGLC2*01又はIGLC3*01が含まれるが、ただしそれらに限定されない。

【0024】

対象動物は任意の動物であり得る（哺乳動物が含まれるが、ただしこれらに限定されない）。本明細書で用いられるように、“哺乳動物”という用語は、その幼若体に授乳し、かつ生命力のある幼若体を出産するか（真獣類又は胎盤性哺乳類）又は産卵する（後獣類又は非胎盤性哺乳類）任意の脊椎動物を指す。哺乳動物種の例には以下が含まれる（ただしそれらに限定されない）：ヒト及び他の霊長類（非ヒト霊長類、例えばチンパンジー及び他の類人猿並びにサルの種を含む）；家畜、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、及びウマ；家庭内哺乳動物（例えばイヌ）；実験動物（げっ歯類（例えばマウス、ラット（コットラットを含む）及びモルモット）を含む）；鳥類（家禽、野鳥及び獵鳥を含む）、例えばニワトリ、シチメンチヨウ及び他のキジ類、アヒル、カモなど。

本明細書で用いられるように、“実質的に全て”は、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は約100%を指す。

“可変領域”又は“可変ドメイン”は、軽鎖及び重鎖の部分、典型的には重鎖ではアミノ末端約120から130アミノ酸及び軽鎖では約100から110アミノ酸を指し（抗体の配列間で大いに相違する）、各々特定抗体のその特定抗原に対する結合及び特異性で用いられる。配列の可変性は相補性決定領域（CDR）と呼ばれる領域に集中するが、一方、可変ドメイン内のより高度に保存される領域はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。重鎖のCDRは抗体の抗原との相互作用に主として必要である。本明細書で用いられるアミノ酸の位置の番号付けは、Kabatら（Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed. (“Kabat et al.”)）のようにEUインデックスにしたがう。好ましい実施態様では、可変領域はヒト可変領域である。

【0025】

細胞生物学及び分子生物学における一般用語の定義は以下で見出すことができる：“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 19th Edition (Merck Research Laboratories, 2006刊行) (ISBN 0-911910-19-0) ; Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., 1994刊行) (ISBN 0-632-02182-9) ; Benjamin Lewin, Genes X (Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10:0763766321) ; Kendrew et al. (Eds), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference (VCH Publishers, Inc., 1995刊行) (ISBN 1-56081-569-8) ; 及びCurrent Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds.

特段の説明がなければ、本発明は、例えば以下に記載される標準的な手順を用いて実施された：Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) ; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995) ; 又はMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S.L. Berger and A.R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987) ; Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.) ; Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.) ; 及びCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005) ; Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol.57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998 (いずれも参照によってその全体が本明細書に含まれる))。

他の用語は本発明の多様な特徴の記載の中で本明細書中に定義される。

【0026】

第一の構成：一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び治療のためのトランスフェリン受容体2細胞外ドメインの使用

第一の構成では、本発明は、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用されるタンパク質、融合タンパク質、ヌクレオチド配列及びベクター、並びに一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される医薬組成物に関する。

進行性骨化性線維形成異常（FOP）を含む、無制御骨形成に関連する多数の硬化性疾患が存在する。この希少疾患は異所性骨化（HO）を特徴とし、HOは骨格外（特に筋肉、腱及び軟部）の骨化をもたらし、したがって患者の可動性を大きく障害する。FOP罹患者は56歳の平均寿命を有し、死亡原因はしばしば正常な呼吸を支援する胸郭の不能である。FOP患者はACVR1/ALK2受容体をコードするACVR1遺伝子に変異を有する。この受容体は、骨形成タンパク質（BMP）シグナリング経路の部分であり、軟骨及び骨の発生の調節で

決定的に重要である。この変異はACVR1/ALK2受容体の活性の増加をもたらし、したがって過剰なBMPシグナリングを生じて、骨形成の増加及び無制御をもたらす（Shore and Kaplan 2008）。

FOPに加えて他の硬化性疾患が存在し、それらは異なるメカニズムから生じる。前記には以下が含まれる：ファン・ブヘム病、硬結性骨化症、メロレオストーシス、肥大性皮膚骨膜症、線維性骨形成異常、骨軟骨異形成、ムコ多糖体症、強直性脊椎炎、外傷後HO（例えば関節置換術、爆発、切断、対麻痺後、又はカルシフィラキシー後、又は悪性疾患若しくは変性疾患（例えば前立腺癌、腎細胞癌、腫瘍状石灰沈着症、乳癌、関節症又は良性骨病巣）の症例時）。これらの硬化性疾患は骨格内外における無制御骨化を特徴とする。本発明はこれらの疾患のいずれかの治療に用いることができる。本発明はこれらの疾患のいずれかの診断に用いることができる。本発明はこれらの疾患のいずれかのリスクの予防又は軽減に用いることができる。

【0027】

硬化性疾患を治療する従来の方法は、非特異的治療、ステロイド、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、切除、又は放射線療法を含む（Kolbl et al. 2003）。WO 2016/039796 A2は硬化性疾患（進行性骨化性線維形成異常（FOP））の治療方法を記載する。前記方法は、アクチビン受容体2A型（ACVR2A）アンタゴニスト及び/又はアクチビン受容体2B型（ACVR2B）アンタゴニスト又はアクチビン受容体1型（ACVR1）アンタゴニストの投与を含む。

しかしながら、これらの治療の適用は限定され、通常では単に症候を緩和するが疾患の進行を防ぐことはできない。例えば、切除後、HO再発の可能性は最大80%である。特にステロイドは骨形成の阻害を引き起こすが、多くの副作用（例えば肥満、糖尿病、乾燥肌又は筋消耗）を有する。

WO 2015/107075 A1は、トランスフェリン受容体2の細胞外ドメインのヒトアミノ酸配列を開示する（本明細書では配列番号:1）。Baschantらは、トランスフェリン受容体2を用いた、鉄依存性である細胞固有の負の破骨細胞形成調節を記載する（Baschant et al. 2017）。

本発明の目的はしたがって硬化性疾患の治療薬を提供することである。

本発明の目的はさらにまた、公知の治療方法よりも副作用が少ない薬を提供することである。

本発明にしたがえば、これらの目的は、配列番号:1の配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのフラグメントを、一次性若しくは二次性硬化性疾患の診断及び治療での使用に用いることによって達成される。

【0028】

“同一性”は、アミノ酸総数を基準にして一致するアミノ酸の数と理解される。

本発明のタンパク質に関して“フラグメント”は、タンパク質のアミノ酸配列の部分、好ましくはPAドメイン（配列番号:5、又は前記と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列）から成るフラグメント、ペプチダーゼM28ドメイン（配列番号:6、又は前記と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列）から成るフラグメント、又はTfr様ダイマー化ドメイン（配列番号:7、又は前記と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列）から成るフラグメントと理解される。

“一次性又は二次性疾患”は、組織の骨化と関連する疾患と理解され、骨化は当該疾患の一次性又は二次性の結果として生じる。

一次性又は二次性硬化性疾患は、進行性骨化性線維形成異常（FOP）、ファン・ブヘム病、硬結性骨化症、メロレオストーシス、肥大性皮膚骨膜症、線維性骨形成異常、骨軟骨異形成、ムコ多糖体症、強直性脊椎炎、外傷後HO、好ましくは関節置換術、爆発、切断、対麻痺、若しくはカルシフィラキシー後のもの、又は悪性疾患若しくは変性疾患（特に好ましくは前立腺癌、腎細胞癌、腫瘍状石灰沈着症、乳癌、関節症又は良性骨病巣の症例）

時のものを含む。

好ましい実施態様では、使用は、異所性骨化（HO）、ファン・ブヘム病、硬結性骨化症、又は進行性骨化性線維形成異常（FOP）の診断及び/又は治療における使用である。

【0029】

“HO”（骨化性筋炎としてもまた知られている）は、組織損傷の結果として骨格系外の軟部組織の骨化が生じる疾患と理解される。

“進行性骨化性線維形成異常（FOP）”（多発性進行性骨化性線維形成異常、進行性骨化性筋炎又はマンヒマイヤー病としてもまた知られている）は、ヒトの体の結合支持組織の進行性骨化が生じる遺伝性疾患と理解される。

“ファン・ブヘム病”（ファン・ブヘム症候群、硬結性硬化症、家族性全身性皮質性過剰骨化症、ファン・ブヘム型骨内膜過剰骨化症としてもまた知られている）は、長骨及び頭蓋冠の過剰形成を含む遺伝性骨格形成異常（常染色体劣性疾患である）と理解される。

“線維性骨形成異常”はGNAS遺伝子の変異によって引き起こされ骨瘤を生じる疾患と理解される。

“メロレオストーシス”は、LEMD3遺伝子の変異によって引き起こされ骨瘤を生じる疾患と理解される。この遺伝子は形質転換増殖因子β（TGF-β）シグナリング経路に必要とされるタンパク質をコードする。

“ムコ多糖体症”は、常染色体劣性であり骨変化を生じるリソソーム貯蔵疾患グループと理解される。

“強直性脊椎炎”又はベヒテレフ病、マリー-ストランベル病、強直性脊椎関節炎は、脊柱及び仙腸関節に好発する慢性炎症性疾患である。この症例では、強直及びこわばりはしばしば脊柱で発生する。

【0030】

配列番号:1のアミノ酸配列を有するタンパク質は、ヒトトランスフェリン受容体（Tfr）2α又はヒトトランスフェリン受容体（Tfr）2β、好ましくはヒトTfr2αの細胞外ドメインから単離され得る。

本発明のタンパク質は、好ましくは形質転換増殖因子β（TGF-β）/骨形成タンパク質BMPファミリーのメンバーと結合し、特に好ましくはBMP-2、BMP-4、BMP-6及びBMP-7の1つ以上と結合し、好ましくはこれらBMPの全てと結合する。

“形質転換増殖因子β（TGF-β）/骨形成タンパク質、BMPファミリー”は、TGF-β受容体ファミリーのメンバーと結合する同様なシグナリングタンパク質のグループと理解される。TGF-β/BMPファミリーは、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、BMP、増殖分化因子（GDF）、アクチビン及びインヒビン、ミオスタチン、抗ミューラー管ホルモン（AMH）及びノウダル（nodal）を含む。

“骨形成タンパク質（BMP）”は、BMP受容体と結合するパラクリンシグナリングタンパク質のグループと理解される。ある実施態様では、BMPは、BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP-9、BMP10又はBMP15、好ましくはBMP-2、BMP-4、BMP-6又はBMP-7から選択される。

本発明のタンパク質を用いて一次性又は二次性硬化性疾患を治療するとき、有利には、BMPシグナリング経路（したがって骨形成）及びWntシグナリング経路が特異的に阻害される。

ある実施態様では、本発明のタンパク質を用いる一次性又は二次性硬化性疾患の診断は、TGF-β/BMPファミリーのメンバー、好ましくはBMP、特に好ましくはBMP-2、BMP-4、BMP-6又はBMP-7の1つ以上、好ましくはこれらBMPの全てを検出することによって実施される。

ある実施態様では、本発明のタンパク質を用いる一次性又は二次性硬化性疾患の診断は血液で、血漿で、血清で、又は組織で実施される。好ましい実施態様では、組織は骨又は軟骨である。“血漿”は血液の液体成分と理解される。“血清”は凝固因子の存在しない血漿と理解される。

【0031】

10

20

30

40

50

ある実施態様では、本発明のタンパク質を用いる一次性又は二次性硬化性疾患の診断は免疫アッセイの手段によって実施される。“免疫アッセイ”は、分析物が液相で抗原-抗体結合の手段によって検出される検出手順と理解される。

ある実施態様では、免疫アッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）又は酵素結合免疫スポットアッセイ（ELIspotアッセイ）から選択される。“ELISA”は、酵素着色反応に基づく抗体をベースとする検出手順と理解される。“ELIspotアッセイ”は、抗原を用いた刺激後に免疫細胞によって分泌され、膜上に固定された抗体を検出する検出手順と理解される。

ある実施態様では、一次性又は二次性硬化性疾患の診断は、疾患の予後を判定するために、治療応答を判定するために、及び/又はリスク階層化のために実施される。“リスク階層化”は、疾患進行又は合併症若しくは死亡に至るリスクを判定することと理解される。

ある実施態様では、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び治療に使用される本発明のタンパク質は、配列番号:1又は配列番号:2の配列を含む。

配列番号:2のアミノ酸配列を有するタンパク質は、マウストランスフェリン受容体（Tfr） 2α 、又はマウストランスフェリン受容体（Tfr） 2β 、好ましくはマウスTfr 2α の細胞外ドメインから単離され得る。

ある実施態様では、本発明のタンパク質は、232アミノ酸から801アミノ酸、好ましくは487アミノ酸から801アミノ酸、特に好ましくは600アミノ酸から750アミノ酸を含むか、又は前記から成る。

ある実施態様では、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療に使用される本発明のタンパク質は、ヒトトランスフェリン受容体（Tfr） 2α （配列番号:3）、マウストランスフェリン受容体（Tfr） 2α （配列番号:4）、ヒトトランスフェリン受容体（Tfr） 2β （配列番号:1）又はヒトTfr 2α の細胞外ドメイン（配列番号:1）、マウストランスフェリン受容体（Tfr） 2β （配列番号:2）又はマウスTfr 2α の細胞外ドメイン（配列番号:2）である。

【0032】

本発明はさらにまた、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療に使用される少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質に関する。

ある実施態様では、融合タンパク質は少なくとも1つのタンパク質タグを含む。ある実施態様では、少なくとも1つのタンパク質タグは、ポリヒスチジン（His）タグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグ、マルトース結合タンパク質（MBP）タグ、ストレプトアビジン（Strep）タグ、又は色素、好ましくは蛍光色素、特に好ましくは緑色蛍光タンパク質（GFP）若しくは黄色蛍光タンパク質（YFP）から選択される。

ある実施態様では、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質は少なくとも1つの改変を含む。

ある実施態様では、少なくとも1つの改変は、D-アミノ酸、疑似ペプチド結合、アミノアルコール、非タンパク原性アミノ酸、改変側鎖基含有アミノ酸及び/又は環状タンパク質を含むタンパク質から選択される。

改変を含むタンパク質は有利にはより安定である。

ある実施態様では、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質は、BMP受容体の活性化の増加と関連する疾患の治療で用いられる。

本発明はさらにまた、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質をコードする配列を含むヌクレオチド配列に関する。

ある実施態様では、ヌクレオチド配列は配列番号:8又は配列番号:9を含む。

【0033】

本発明のさらに別の特徴は、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用されるベクターに関し、前記ベクターは、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質をコードする配列を含むヌクレオチド配列を含む。

“ベクター”は、トランスフェクション又は形質導入の手段によって細胞に核酸を移転さ

10

20

30

40

50

せるための核酸担体と理解される。ある実施態様では、ベクターは、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質をコードする配列を含むヌクレオチド配列を遺伝子組み換え（組換え体）の手段によって含むプラスミド、ウイルスベクター又は他の核酸担体から選択される。

本発明はさらにまた、一次性又は二次性硬化性疾患の治療で使用される医薬組成物に関し、前記医薬組成物は、少なくとも1つの本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質を含む。

ある実施態様では、医薬組成物は溶液、錠剤又はカプセルである。ある実施態様では、本発明のタンパク質は、インプラント材（好ましくは金属又はプラスチック材）及び/又はインプラント（好ましくはプロテーゼ、ネジ又は釘）のためのコーティングとして用いられる。

10

ある実施態様では、医薬組成物は、局所的に関節内若しくは筋肉内に、又は全身的に皮下若しくは静脈内に、又は経口的に投与される。ある実施態様では、医薬組成物は、関節内、筋肉内、皮下、静脈内又は経口投与に適切な形態にある。

【0034】

ある実施態様では、医薬組成物は、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質を、投与当たり体重1kgにつき10µgから100mgの用量で含む。

さらに別の実施態様では、医薬組成物はさらにまた、医薬的に許容できる希釈剤又は基剤を含む。ある実施態様では、医薬的に許容できる希釈剤又は基剤は、水溶液（好ましくは緩衝水溶液、生理食塩水溶液又はグリシン水溶液）である。ある実施態様では、緩衝水溶液は、ヒスチジン緩衝水溶液（pH5.0からpH7.0のpHを有する）、又はコハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カリウム緩衝水溶液から選択される。ある実施態様では、緩衝水溶液は、1mmol/L（mM）から500mM、好ましくは1mMから50mMの濃度を有する。さらに別の実施態様では、医薬的に許容できる希釈剤又は基剤は、塩化ナトリウムを好ましくは0mMから300mMの濃度で、特に好ましくは150mMの濃度で含む。

20

ある実施態様では、医薬組成物はさらにまた少なくとも1つの医薬的に許容できる賦形剤を含む。“賦形剤”は、pH及び/又はイオン強度に関して生理学的条件を調整する、及び/又は医薬組成物の安定性を高める化合物であると理解される。ある実施態様では、少なくとも1つの医薬的に許容できる賦形剤は、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム又は乳酸ナトリウムから選択される。

30

ある実施態様では、医薬組成物は無菌的である。医薬組成物は公知の方法によって滅菌される。

【0035】

本発明のさらに別の特徴は、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び治療における医薬組成物の使用に関する。

ある実施態様では、医薬組成物の使用は対象動物の投与のためである。“対象動物”は個体又は患者と理解される。ある実施態様では、対象動物は、ヒト又は動物（例えば男性、女性、成人又は小児）から選択される。ある実施態様では、対象動物は、げっ歯類（好ましくはマウス、ラット、ハムスター又はモルモット）；イヌ、ウサギ、農場動物（好ましくはヤギ、ヒツジ、ブタ）；及び非ヒト霊長類（好ましくはチンパンジー、オランウータン又はゴリラ）から選択される。ある例では、例えばヒトは補綴インプラントを施され、例えばヒトは股関節移植を施される。

40

ある実施態様では、医薬組成物は、TGF-β/BMPファミリーのメンバーの診断及びBMP受容体活性化の増加に関連する疾患の治療で用いられる。

本発明はさらにまた、一次性又は二次性硬化性疾患を診断及び治療する方法に関し、前記方法は、本発明のタンパク質及び/又は医薬組成物を投与する工程を含む。

ある実施態様では、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療はヒトで、例えば成人で実施される。

50

診断及び/又は治療のためには、1つ以上の本発明のタンパク質の医薬的に活性な用量を含む無菌的医薬組成物を対象動物に投与して、一次性又は二次性硬化性疾患を診断及び/又は治療する。

ある実施態様では、投与は、局所的に（好ましくは関節内又は筋肉内注射として）、又は全身的に（好ましくは皮下、筋肉内又は静脈内注射若しくは輸液として）、又は経口若しくは経皮投与の手段によってもたらされる。

【0036】

本発明のさらに別の特徴は、TGF- β /BMPファミリーメンバーの診断及びBMP受容体活性化増加に関連する疾患の治療における、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質の使用に関する。

“BMP受容体活性化の増加”は、その活性化がBMP受容体の変異、好ましくは構成的に活性化する変異によって生じる、少なくとも1つのBMP受容体の活性化と理解される（Shore and Kaplan 2008）。“構成的に活性化する変異”は、少なくとも1つのBMP受容体がBMPの非存在下で活性化される変異と理解される。

本発明のさらに別の特徴は、TGF- β /BMPファミリーメンバーの診断又はBMP受容体活性化増加に関連する疾患の診断における、ヌクレオチド配列及び/又はベクターの使用に関し、前記ヌクレオチド配列は、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質をコードする配列を含み、前記ベクターは、本発明のタンパク質又は少なくとも1つの本発明のタンパク質を含む融合タンパク質をコードする配列を含むヌクレオチド配列を含む。

一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療における使用に加えて、本発明のタンパク質は、生物学的研究及びTGF- β /BMPファミリーメンバーの検出が重要である他の利用のために適切である。この種類の利用は、特にウェスタンブロット、細胞の免疫染色（例えばフローサイトメトリー及び顕微鏡検査のため）及びELISA、並びに画像化技術（例えばCT（コンピュータ断層撮影）、PET/CT（陽電子放出断層撮影））におけるトレーサーとしての使用である。

【0037】

第一の構成の概念

1. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び治療で使用される、配列番号:1の配列と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質又はそのフラグメント。

2. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、配列番号:1又は配列番号:2の配列を含むタンパク質。

3. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、232アミノ酸から801アミノ酸の長さを有する、概念1又は概念2に記載のタンパク質。

4. 当該タンパク質が、一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用されるトランスフェリン受容体（Tfr）2 α 、トランスフェリン受容体（Tfr）2 β 、又はTfr2 α の細胞外ドメインである、概念1から3のいずれかに記載のタンパク質。

5. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び治療で使用される概念1から4のいずれかに記載のタンパク質であって、当該タンパク質が、ヒトトランスフェリン受容体（Tfr）2 α （配列番号:3）、マウストランスフェリン受容体（Tfr）2 α （配列番号:4）、ヒトトランスフェリン受容体（Tfr）2 β （配列番号:1）又はヒトTfr2 α の細胞外ドメイン（配列番号:1）、マウストランスフェリン受容体（Tfr）2 β （配列番号:2）又はマウスTfr2 α の細胞外ドメイン（配列番号:2）であることを特徴とする、前記タンパク質。

6. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療に使用される、概念の1から5のいずれかに記載の少なくとも1つのタンパク質を含む融合タンパク質。

7. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念1から5のいずれかに記載のタンパク質又は概念6に記載の融合タンパク質であって、当該タンパク質又は融合タンパク質が、D-アミノ酸、疑似ペプチド結合、アミノアルコール、非タンパク原性アミノ酸、改変側鎖基含有アミノ酸及び/又は環状タンパク質を含むタンパク質から選択

される少なくとも1つの改変を含むことを特徴とする、前記タンパク質又は融合タンパク質。

8. BMP受容体活性化増加に関連する疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念1から5若しくは7のいずれかに記載のタンパク質、又は概念6若しくは7のどちらかに記載の融合タンパク質。

9. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念1から5若しくは7のいずれかに記載のタンパク質、又は概念6若しくは7のどちらかに記載の融合タンパク質をコードする配列を含むヌクレオチド配列。

10. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念9に記載のヌクレオチド配列を含むベクター。

11. 一次性又は二次性硬化性疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念1から5若しくは7のいずれかに記載の少なくとも1つのタンパク質、又は概念6若しくは7のどちらかに記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。

12. BMP受容体活性化増加に関連する疾患の診断及び/又は治療で使用される、概念1から5若しくは7のいずれかに記載の少なくとも1つのタンパク質、又は概念6若しくは7のどちらかに記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。

13. TGF- β /BMPファミリーメンバーの診断又はBMP受容体活性化増加に関連する疾患の診断における、概念1から5若しくは7のいずれかに記載のタンパク質、又は概念6若しくは7のどちらかに記載の融合タンパク質の使用。

14. GF- β /BMPファミリーメンバーの診断又はBMP受容体活性化増加に関連する疾患の診断における、概念9に記載のヌクレオチド、又は概念10に記載のベクターの使用。

【0038】

第二の構成：骨疾患、鉄代謝異常、及び造血性異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2阻害剤

本発明の第二の構成は、骨疾患、鉄代謝異常、及び造血性異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2阻害剤に関する。

骨粗しょう症は、骨密度及び骨質が低下するもっとも一般的な骨疾患であり、骨折リスクの増加と結びついている。骨低下には多様な原因があり、破骨細胞による骨再吸収の増加及び骨芽細胞による骨形成の阻害に遡ることができる。今日までの治療形態、例えばビスホスホネート又はモノクローナル抗体（例えばデノスマブ（抗RANKL抗体））は破骨細胞（したがって骨再吸収）の阻害を目的とする。特異的に骨合成を促進する骨合成、骨同化療法選択肢は、テリパラチドの形でのみ今日存在し、骨粗しょう症の重篤例でのみ用いられ得る。

【0039】

貧血は、血中の酸素運搬ヘモグロビンの量が低すぎることを特徴とし、遺伝性又は後発性であり得る。貧血のもっとも一般的な形態は鉄欠乏貧血であり、通常は貧栄養又は出血によって引き起こされる。貧血は通常は病因学的に治療され、鉄欠乏貧血の場合にはしたがって鉄が医薬的に投与される。

本発明は、骨疾患、鉄代謝異常、及び造血性異常の治療で使用されるトランスフェリン受容体2の調整又は阻害に関する。

トランスフェリン受容体2（Tfr2）は主として肝臓で発現され、肝臓で鉄代謝を調節する。Tfr2の低下は、肝におけるヘプシジン発現のダウンレギュレーションの結果としてマウス及びヒトで鉄過負荷を生じ、続いて鉄再吸収の増加をもたらす。加えて、Tfr2は赤血球分化に必要である。

本発明の実施態様は、一次性及び/又は二次性骨粗しょう症の治療で使用される阻害剤に関する。

本発明の実施態様は、腫瘍に起因する貧血又は慢性疾患（炎症、透析、糖尿病など）の状況での貧血の治療に使用される阻害剤に関する。この状況では、ヘプシジンはアップレギュレートされ、フェロポーチンの分解を介して単球及びマクロファージ内での鉄保持を生じる。Tfr2の可溶形は（BMPに対する）リガンド捕捉因子として機能し、したがってTf

10

20

30

40

50

r2シグナリングカスケードを疑似阻害して肝臓でのヘプシジン発現のダウンレギュレーション、続いて鉄再吸収の増加及びMPSからのより良好な供給をもたらすであろう。

本発明の実施態様は、骨髄異形成症候群、ベータサラセミア、腎不全、及び慢性疾患の貧血（ACD）の治療に使用される阻害剤に関する。

本発明の実施態様では、阻害剤はTfr2 α 又はTfr2 β から選択される少なくとも1つのアイソフォームと相互作用する。

【0040】

本発明の実施態様では、阻害剤は、抗体若しくはそのフラグメント、ペプチド、融合タンパク質、アプタマー又はRNA干渉因子、例えばsiRNA、shRNA、miRNA、Crispr/Cas、他のリコンビナーゼなどから選択される。

阻害剤のタイプの例は下記に示される（しかしながら、本発明の阻害剤は、Tfr2を阻害するものであって、これら例の主題である生物学的タンパク質の阻害剤ではないという点で異なる）：

アプタマー：

－ペガプタニブ、ペグ化抗VEGF（血管内皮増殖因子）アプタマー：Adamis AP, Altaweil M, Bressler NM, et al. “Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals（糖尿病個体のペガプタニブ（Macugen）療法後の網膜の新生血管形成における変化）”，Ophthalmology 2006;113(1):23-8.

－腫瘍治療における抗PDGF（血小板由来増殖因子）アプタマー：Pietras K, Rubin K, Sjoblom T. “Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy（腫瘍間質のPDGF受容体シグナリングの阻害は化学療法の抗腫瘍作用を増強する）”，Cancer Res 2002;62:5476-84.

ペプチド：

－STI-571：タンパク質チロシナーゼ（c-Abl、Bcr-Abl、c-kit）の阻害剤：Biochem Biophys Res Commun. 2003 Oct 3;309(4):709-17. STI-571；抗癌タンパク質チロシナーゼ阻害剤：Roskoski R Jr.

【0041】

RNA干渉：

－喘息治療のための抗IL-13 siRNA：Lively, TN, Kossen, K, Balhorn, A, Koya, T, Zinnen, S, Takeda, K et al. (2008). “Effect of chemically modified IL-13 short interfering RNA on development of airway hyperresponsiveness in mice（マウスの気道過敏応答の発達における化学改変IL13 siRNAの作用）”，J Allergy Clin Immunol 121: 88-94.

－薬剤耐性前立腺癌治療のための抗Hsp27 siRNA：Liu, C, Liu, X, Rocchi, P, Qu, F, Iovanna, JL and Peng, L (2014). “Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery in vitro and in vivo（機能的siRNAのin vivo及びin vitroデリバリーのための効果的ナノベクターとしてのアルギニン末端を有する4 PAMAMデンドリマーの生成）”，Bioconjug Chem 25: 521-532.

－リコンビナーゼ：Karpinski J, Hauber I, Chemnitz J, Schafer C, Paszkowski-Rogacz M, Chakraborty D, Beschorner N, Hofmann-Sieber H, Lange UC, Grundhof A, Hackmann K, Schrock E, Abi-Ghanem J, Pisabarro MT, Surendranath V, Schambach A, Lindner C, van Lunzen J, Hauber J, Buchholz F. “Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity（大半のHIV-1主要単離株のプロウイルスを高い特異性で切り取るリコンビナーゼの指定進化）”，Nat Biotechnol. 2016 Apr;34(4):401-9.

－Crispr/Cas：Modzelewski AJ, Chen S, Willis BJ, Lloyd KCK, Wood JA, He L. “Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology（CRISPR-EZ技術による効率的なマウスのゲノム操作）”，Nat Protoc. 2018 Jun;13(6):1253-1274.

【0042】

10

20

30

40

50

抗体：

－抗サイトカイン抗体、例えば自己免疫疾患治療のためのTNFα又はIL-1b：Susan J. Lee, MD,a,b Javier Chinen, MD, PhD,c and Arthur Kavanaugh, M “Immunomodulator therapy: Monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins (免疫調節薬療法：モノクローナル抗体、融合タンパク質、サイトカイン、及び免疫グロブリン)”，J Allergy Clin Immunol. 2010, 125 (2).

－キメラ抗原受容体T細胞療法：Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Löff S, Ehninger A, von Bonin M, Bejestani EP, Ehninger G, Bachmann MP. “Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts (CAR T細胞のOn及びOffスイッチング：T細胞のAML芽細胞再標的化のための新規な調整プラットフォーム)”，Blood Cancer J. 2016 Aug 12;6(8):e458.

－多様な癌タイプの免疫療法における抗PD-1抗体：Riley JL. “Combination checkpoint blockade--taking melanoma immunotherapy to the next level (組合せチェックポイント遮断--メラノーマ免疫療法を次のレベルに高める)”，N Engl J Med. 2013 Jul 11;369(2):187-9. doi: 10.1056/NEJMe1305484. Epub 2013 Jun 2.

－MDSの貧血の治療における抗TGFβ抗体：Platzbecker et al. Lancet Oncology 2017.

【0043】

本発明の実施態様では、阻害剤は抗体又はそのフラグメントである。本発明の関係では、フラグメントは、少なくとも1つのTfr2結合配列を含む抗体フラグメントと理解される。この事例では、例示すればフラグメントはscFv、Fab又はFcフラグメントであり得よう。

本発明の実施態様では、阻害剤は二重特異性抗体である。この事例では、二重特異性抗体は、Tfr2に対して第一の親和性及びさらに別の組織特異的膜タンパク質に対して第二の親和性を有する。膜タンパク質CD（分化クラスター）抗原が好ましい。

“分化クラスター”（略してCD）という用語は、生化学的又は機能的基準にしたがって分類することができる、細胞の免疫表現型表面特性のグループを示す。その組織特異的な発現により、組織特異的態様で二重特異性抗体を標的誘導するためにCD分子を用いることができる。結果として、Tfr2を組織特異的態様で阻害することができる。

本発明はまた、本発明の少なくとも1つのトランスフェリン受容体2阻害剤を含む医薬組成物に関する。

本発明の実施態様では、医薬組成物は容積、錠剤又はカプセルである。本発明の実施態様では、本発明の阻害剤は、インプラント材（好ましくは金属又はプラスチック材）及び/又はインプラント（好ましくはプロテゼ、ネジ又は釘）のためのコーティングとして同様に用いられる。

ある実施態様では、医薬組成物は、局所的に関節内若しくは筋肉内態様で、又は全身的に皮下若しくは静脈内態様で、又は経口投与の手段によって投与される。ある実施態様では、医薬組成物は、関節内、筋肉内、皮下、静脈内、吸入又は経口投与に適切な形態にある。

ある実施態様では、医薬組成物は、本発明の阻害剤を投与当たり体重1kgにつき10 µgから100mgの用量で含む。

【0044】

さらに別の実施態様では、医薬組成物はさらにまた、医薬的に許容できる希釈剤又は基剤を含む。ある実施態様では、医薬的に許容できる希釈剤又は基剤は、水溶液（好ましくは緩衝水溶液、生理食塩水溶液又はグリシン水溶液）である。ある実施態様では、緩衝水溶液は、ヒスチジン緩衝水溶液（pH5.0からpH7.0のpHを有する）、又はコハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カリウム緩衝水溶液から選択される。ある実施態様では、緩衝水溶液は、1mmol/L（mM）から500mM、好ましくは1mMから50mMの濃度を有する。さらに別の実施態様では、医薬的に許容できる希釈剤又

は基剤は、塩化ナトリウムを好ましくは0mMから300mMの濃度で、特に好ましくは150mMの濃度で含む。

ある実施態様では、医薬組成物はさらにまた少なくとも1つの医薬的に許容できる賦形剤を含む。“賦形剤”は、pH及び/又はイオン強度に関して生理学的条件を調整する、及び/又は医薬組成物の安定性を高める化合物であると理解される。ある実施態様では、少なくとも1つの医薬的に許容できる賦形剤は、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム又は乳酸ナトリウムから選択される。

本発明の実施態様では、医薬組成物は無菌的である。医薬組成物は公知の方法によって滅菌される。

【0045】

本発明はまた、骨疾患、鉄代謝異常及び造血性異常の治療のための本発明の阻害剤又は医薬組成物の使用に関する。

本発明の実施態様は、一次性及び/又は二次性硬化性疾患の治療で使用される阻害剤に関する。

われわれの研究室の新しいデータは、Tfr2はまた骨で発現されることを示している。Tfr2欠損マウスは骨質量の2倍の増加を示し、骨形成及び骨再吸収の両方が増加する。前記データは、Tfr2の遮断は、赤血球生成及び骨代謝の両方で正の効果を有し得ることを示唆する。

本発明の実施態様は、腫瘍に起因する貧血又は慢性疾患（炎症、透析、糖尿病など）の状況での貧血の治療に使用される阻害剤に関する。この状況では、ヘプシジンはアップレギュレートされ、フェロポーチンの分解を介して単球及びマクロファージ内での鉄保持を生じる。Tfr2の可溶形は（BMPに対する）リガンド捕捉因子として機能し、したがってTfr2シグナリングカスケードを疑似阻害して肝臓でのヘプシジン発現のダウンレギュレーション、続いて鉄再吸収の増加及びMPSからのより良好な供給をもたらすであろう。

本発明の実施態様は、骨髄異形成症候群、ベータサラセミア、腎不全、及び慢性疾患の貧血（ACD）の治療に使用される阻害剤に関する。

【0046】

第二の構成の項目

1. 骨疾患、鉄代謝異常、及び/又は造血性異常の治療に使用される、トランスフェリン受容体2阻害剤。

2. 骨粗しょう症の治療に使用される、項目1に記載の阻害剤。

3. 貧血の治療に使用される、項目1に記載の阻害剤。

4. 骨髄異形成症候群の治療に使用される、項目1に記載の阻害剤。

5. 阻害剤が、抗体又はそのフラグメント、ペプチド、融合タンパク質、アプタマー又はRNA干渉因子から選択されることを特徴とする、項目1から4のいずれかに記載の阻害剤。

6. 阻害剤が抗体又はそのフラグメントであることを特徴とする、項目1から5のいずれかに記載の阻害剤。

7. 阻害剤が二重特異性抗体であることを特徴とする、項目1から6のいずれかに記載の阻害剤。

8. 項目1から7のいずれかに記載の少なくとも1つの阻害剤及び医薬的に許容できる賦形剤を含む、医薬組成物。

9. 骨疾患、鉄代謝異常、及び造血性異常の治療のための、項目8に記載の医薬組成物の使用。

【0047】

更なる実施態様

本発明の構成はまた以下の特徴を提供する。

アンタゴニスト（抗体）、例えば骨粗しょう症用

1. ヒト又は動物対象で骨の疾患若しくは症状を治療若しくは予防する、又は前記のリスクを軽減する方法であって、当該対象動物においてトランスフェリン受容体2（Trf2）

10

20

30

40

50

と拮抗することを含む、前記方法。

2. 当該方法が、細胞のTfr2と拮抗することによって骨細胞（場合によって骨芽細胞）でp38 MAPキナーゼ経路を阻害することを含む、特徴1に記載の方法。

骨細胞の例は骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞である。

3. 当該方法が、対象動物のTfr2と拮抗することによって骨細胞（場合によって骨芽細胞）でWnt発現をアップレギュレートすることを含む、特徴1又は2に記載の方法。

対象動物のTfr2は、細胞結合Tfr2（例えば細胞が骨芽細胞である場合）又は可溶性Tfr2であり得る。

4. 当該方法が、細胞のTfr2と拮抗することによって、スクレロスチン、Dkk1、及び/又は骨細胞のアクチビンA活性又は発現を阻害することを含む、特徴1から3のいずれかに記載の方法。

10

我々の研究は、Dkk1（Wntアンタゴニスト）は激しくダウンレギュレートされることを示した。

5. 当該方法が、細胞のTfr2と拮抗することによって、骨細胞（場合によって骨芽細胞）でPhex、Dmp1、Dkk1及び/又はSostの発現を阻害することを含む、特徴1から4のいずれかに記載の方法。

6. 当該方法が、Tfr2とBMP及び/又はトランスフェリンとの結合を対象動物において阻害することを含む、特徴1から5のいずれかに記載の方法。

【0048】

7. 当該BMPがBMP2、BMP4、BMP6及び7の1つ以上である、特徴6に記載の方法。

20

8. 当該BMPがBMP2である、特徴7に記載の方法。

9. 当該BMPがBMP4である、特徴7に記載の方法。

10. 当該BMPがBMP6である、特徴7に記載の方法。

11. 当該BMPがBMP7である、特徴7に記載の方法。

12. 当該疾患又は症状が骨粗しょう症である、特徴1から11のいずれかに記載の方法。

例えば、当該骨粗しょう症は一次性骨粗しょう症である。例えば、当該骨粗しょう症は二次性骨粗しょう症である。例えば、当該骨粗しょう症は成熟前の骨粗しょう症である。例えば、当該骨粗しょう症は閉経後の女性の骨粗しょう症である。

ある実施態様では、対象動物は閉経後の女性又は雌動物である。

13. 当該方法が（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨で）下記の1つ以上を生じさせるための方法である、特徴1から12のいずれかに記載の方法：

30

(a) 骨体積の増加、(b) 骨密度の増加、(c) 小柱数 (Tb.N) の増加、(d) 小柱の太さ (Tb.Th) の増加、(e) 小柱間隔 (Tb.Sp) の減少、(f) 骨無機質密度の増加、(g) 骨微細石灰化密度の増加、(h) 骨質量の増加、及び (i) 骨強度の増加。

これらの当該技術分野で知られた用語の説明については、例えば<http://microctworld.net/trabecular-thickness-tb-th-trabecular-spacing-tb-sp-trabecularnumber-tb-n/> を参照されたい。

場合によって、当該骨は頭蓋骨、下顎骨、鎖骨、肋骨又は長骨である。

【0049】

ある例では、本発明の方法は、（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨で）下記の1つ以上を生じさせるための方法である：(a) 小柱骨体積の増加、(b) 皮質骨密度の増加、(c) 小柱数 (Tb.N) の増加、(d) 小柱の太さ (Tb.Th) の増加、(e) 小柱間隔 (Tb.Sp) の減少、(f) 小柱骨微細石灰化密度の増加、(g) 骨質量の増加、及び (h) 骨強度の増加。

40

14. 当該方法が、対象動物において骨形成を増加させるための方法、及び/又は対象動物において骨再吸収を低下させるための方法である、特徴1から13のいずれかに記載の方法。

15. 当該方法が、対象動物において骨芽細胞（又はその骨形成活性）を増加させるための方法、及び/又は対象動物において破骨細胞（又はその骨再吸収活性）を減少させるための方法である、特徴1から14のいずれかに記載の方法。

50

ある例では、当該方法は、例えばオステリックスを発現する骨芽細胞を増加させるため、又は対象動物においてオステリックス（aka転写因子Sp7）発現を増加させるための方法である。

骨芽細胞増加は、先駆細胞の骨芽細胞への分化増加及び/又は骨芽細胞の代謝回転低下を含むことができる。破骨細胞の減少は、先駆細胞の破骨細胞への分化減少及び/又は骨芽細胞の代謝回転増加を含むことができる。

16. 当該方法が対象動物において骨代謝回転を増加させるための方法である、特徴1から15のいずれかに記載の方法。

17. 当該方法が、対象動物においてプロコラーゲン1型N-末端ペプチド（P1NP）を増加させるため、及び/又は対象動物においてI型コラーゲンのC-末端テロペプチド（CTX）を増加させるための方法である、特徴1から16のいずれかに記載の方法。

場合によって、当該方法は、対象動物においてオステオカルシン、骨特異的アルカリ性ホスファターゼ又はOB又はNTX又はDPDを増加させるための方法である。

18. 当該方法が、対象動物において骨細胞を増加させるための方法である、特徴1から17のいずれかに記載の方法。

【0050】

19. 当該方法が、対象動物にTfr2アンタゴニストを投与する工程を含み、場合によって当該アンタゴニストが、抗Tfr2抗体又はTfr2と特異的に結合する抗体フラグメントである、特徴1から18のいずれかに記載の方法。

例えば、当該アンタゴニストは、Tfr2-ECD（例えばヒトTfr2ECD）と特異的に結合する抗体である。

本発明の任意の特徴のある例では、Tfr2はヒトTfr2である。

20. 当該抗体又はフラグメントが、表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定すると、Tfr2との結合について1B1（MyBioSource, MBS833691）、3C5（Abnova, H00007036-M01）、CY-TFR（Abnova, MAB6780）及びB-6（Santa Cruz Biotechnology, sc-376278）、353816（R&D Systems, MAB3120）及び9F8 1C11（Santa Cruz Biotechnology, sc-32271）から選択される抗体と競合する、特徴19に記載の方法。

ある例では、SPRは下記の条件下で実施される：

- －流速：50 µL/分
- －接触時間：220秒
- －泳動緩衝液：HBS-P
- －37℃
- －再生：1) 120秒 Gly-HCl（pH1.5）、2) 120秒4M MgCl₂、3) 60秒 5M NaCl+50mM NaOH、4) 60秒 100mM NaOH。

ある例では、SPRはBiacore™によって（例えばBiacore T200を用いて）実施され、エバリュエーションソフトウェア3.1を用いて分析される。

21. 当該方法が、対象動物にスクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAアンタゴニストを投与する工程を含み、場合によって当該アンタゴニストが抗スクレロスチン抗体又はスクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAと特異的に結合する抗体フラグメントである、特徴1から20のいずれかに記載の方法。

【0051】

22. マルチ特異性抗体又はフラグメントが対象動物に投与され、当該抗体又はフラグメントが、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びスクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAと特異的に結合する、特徴21に記載の方法。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びスクレロスチン（例えばヒトスクレロスチン）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びDkk1（例えばヒトDkk1）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びアクチビンA（例えばヒトアクチビンA）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びCD63（例えばヒトCD63）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びシンデカン-3（例えばヒトシンデカン-3）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びFGFR1（例えばヒトFGFR1）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びLIFR（例えばヒトLIFR）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びCD47（例えばヒトCD47）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びCX3CR1（例えばヒトCX3CR1）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びCD68（例えばヒトCD68）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びオステオカルシン（例えばヒトオステオカルシン）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びDMP-1（例えばヒトDMP-1）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びオステオアドヘリン（例えばヒトオステオアドヘリン）と特異的に結合する。

ある例では、当該抗体は、Tfr2（例えばヒトTfr2）及びアルカリ性ホスファターゼ（例えばヒトアルカリ性ホスファターゼ）と特異的に結合する。

【0052】

H0、FOPなどに対するアゴニスト

23. 骨の疾患又は症状をヒト対象若しくは動物対象で治療又は予防する方法であって、前記方法が、対象動物においてトランスフェリン受容体2（Tfr2）をアゴナイズする工程を含む、前記方法。

したがって、当該方法は、当該疾患又は症状のリスクを対象動物において軽減することができる。

24. 当該方法が、細胞のTfr2をアゴナイズすることによって、骨細胞（場合によって骨芽細胞）でp38 MAPキナーゼ経路シグナリングを刺激することを含む、特徴23に記載の方法。

25. 当該方法が、細胞のTfr2をアゴナイズすることによって、骨細胞（場合によって骨芽細胞）でWnt発現をダウンレギュレートすることを含む、特徴23又は24に記載の方法。

26. 当該方法が、細胞のTfr2アゴナイズすることによって、骨細胞（場合によって骨芽細胞）でスクレロスチン活性又は発現を刺激することを含む、特徴23から25のいずれか1つに記載の方法。

27. 当該方法がTfr2のBMP結合を促進することを含む、特徴23から26のいずれか1つに記載の方法。

28. BMPがBMP2、4、6及び7の1つ以上である、特徴27に記載の方法。

29. BMPがBMP2である、特徴28に記載の方法。

30. BMPがBMP4である、特徴28に記載の方法。

31. BMPがBMP6である、特徴28に記載の方法。

32. BMPがBMP7である、特徴28に記載の方法。

33. 当該方法が、対象動物にTfr2アゴニストを投与する工程を含み、場合によって当該アゴニストが、抗Tfr2抗体又はTfr2（例えばヒトTfr2）と特異的に結合する抗体フラグメントである、特徴23から32のいずれか1つに記載の方法。

34. 当該方法が、対象動物にスクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAアゴニストを投与する工程を含み、場合によって当該アゴニストが、抗スクレロスチン、Dkk1若しくはアクチビンA抗体、又はスクレロスチン、Dkk1若しくはアクチビンAと特異的に結合する抗

10

20

30

40

50

体フラグメントである、特徴23から32のいずれか1つに記載の方法。

ある例では、アゴニスト抗体は、ロモソズマブであるか又はそのスクレロスチン結合部位を含む。

35. マルチ特異性抗体若しくはフラグメントが対象動物に投与され、当該抗体若しくはフラグメントがTfr2及びスクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAと特異的に結合する、特徴34に記載の方法。

【0053】

H0、FOPなどのためのBMP捕捉

36. 疾患若しくは症状をヒト対象若しくは動物対象で治療又は予防する方法であって、前記方法が、BMP結合因子を対象動物に投与する工程を含み、当該因子が、BMPとの結合について可溶性Tfr2-ECDと競合し、当該疾患若しくは症状が前記BMPによって媒介される、前記方法。

したがって、当該方法は対象動物において当該疾患又は症状のリスクを軽減する。

ある例では、当該因子はタンパク質因子であり、例えば1つ以上のポリペプチド（例えばFc融合ポリペプチド）を含む。ある例では、当該因子は、BMP捕捉因子、例えば半減期延長部分（例えばPEG、血清アルブミン、抗体Fc若しくはドメイン、又は抗血清アルブミン結合部分）と融合されたBMPのための結合部位を含む捕捉因子である。

本明細書では、“Tfr2-ECD-Fc”のTfr2はFcに対してN-末端又はC-末端であり得る。例えば、Tfr2-ECD-FcはNからC方向にFc及びECDを含む。

37. 当該因子がBMP捕捉因子である、特徴36に記載の方法。

38. 当該BMPがBMP2である、特徴36又は37に記載の方法。

39. 当該BMPがBMP4である、特徴36又は37に記載の方法。

40. 当該BMPがBMP6である、特徴36又は37に記載の方法。

41. 当該BMPがBMP7である、特徴36又は37に記載の方法。

42. 当該可溶性Tfr2-ECDが融合タンパク質に含まれ、当該ECDが（場合によってリンカー、例えばIEGRリンカーを介して）抗体Fc領域と融合している、特徴36から41のいずれか1つに記載の方法。

場合によって、可溶性Tfr2-ECDが融合タンパク質に含まれ、当該ECDはヒト抗体IgG Fc領域に（場合によってリンカーを介して）融合している。

ある例では、本明細書のFcはヒトFcである。ある例では、本明細書のFcは、ヒトガンマFc（例えばガンマ-1、ガンマ-2、ガンマ-3又はガンマ-4）である。ある例では、本明細書のFcはヒトアルファFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトデルタFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトイプシロンFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトミューFcである。

【0054】

43. 当該融合タンパク質がTfr2-ECD-Fcダイマーを含む、特徴42に記載の方法。

44. 当該因子が、ホロ-トランフェリン及び/又はBMPRと前記BMPとの結合よりも強く、BMP2、4、6及び7の1つ、2つ以上又は全てと結合する、特徴36から43のいずれか1つに記載の方法。

45. 当該因子が、ホロ-トランフェリン及び/又はBMPRと前記BMPとの結合よりも強く、BMP2と結合する、特徴36から44のいずれか1つに記載の方法。

結合強度は例えばSPRによって決定されるKDであり得る。

46. 当該因子が、ホロ-トランフェリンと前記BMPとの結合よりも強く、BMP4と結合する、特徴36から45のいずれか1つに記載の方法。

47. 当該因子が、ホロ-トランフェリンと前記BMPとの結合よりも強く、BMP6と結合する、特徴36から46のいずれか1つに記載の方法。

48. 当該因子が、ホロ-トランフェリンと前記BMPとの結合よりも強く、BMP7と結合する、特徴36から47のいずれか1つに記載の方法。

49. 当該因子が、融合タンパク質に含まれるTfr2-ECDを含み、当該ECDが、抗体Fc領域に（場合によってリンカー、例えばIEGRリンカーを介して）融合している、特徴36か

10

20

30

40

50

ら48のいずれか1つに記載の方法。

場合によって、可溶性Tfr2-ECDが融合タンパク質に含まれ、当該ECDはヒト抗体IgG Fc領域に（場合によってリンカーを介して）融合している。

ある例では、本明細書のFcはヒトFcである。ある例では、本明細書のFcは、ヒトガンマFc（例えばガンマ-1、ガンマ-2、ガンマ-3又はガンマ-4）である。ある例では、本明細書のFcはヒトアルファFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトデルタFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトイプシロンFcである。ある例では、本明細書のFcはヒトミューFcである。

50. 当該融合タンパク質がTfr2-ECD-Fcダイマーを含む、特徴49に記載の方法。

51. 当該因子がTfr2細胞外ドメイン（Tfr2-ECD）を含み、場合によって当該因子が第二の部分を含む融合タンパク質に含まれる、特徴36から50のいずれか1つに記載の方法。

52. 当該第二の部分が、当該捕捉因子の半減期を対象動物において増強するための半減期延長部分である、特徴51に記載の方法。

53. 当該第二の部分が、抗体ドメイン（例えばFc領域）、ポリエチレングリコール（PEG）部分、血清アルブミン又は抗血清アルブミン結合部分（場合によって抗体フラグメント又はドメイン、例えばscFv、Fab又はドメイン抗体（又はNanobodyTM））から選択される、特徴51又は52に記載の方法。

54. 当該疾患又は症状が骨の疾患又は症状である、特徴36から53のいずれか1つに記載の方法。

【0055】

具体的な適応症

55. 当該疾患又は症状が硬化性疾患又は症状である、特徴1から54のいずれか1つに記載の方法。

場合によって、硬化性疾患は骨格の硬化性疾患である。場合によって、硬化性疾患は骨格外の硬化性疾患である。

場合によって、対象動物は、ステロイド療法、NSAID療法、切除又は放射線照射療法を受けたことがあるか、又は受けている。場合によって、対象動物は、（Tfr2アゴニスト療法と同時に又は逐次的に）ステロイド療法、NSAID療法、切除又は放射線照射療法を実施される。

56. 当該疾患又は症状が病理学的骨形成を含む疾患又は症状である、特徴1から55のいずれか1つに記載の方法。

57. 当該疾患又は症状が、骨化疾患又は症状、場合によってヘテロ型骨化（HO）疾患又は症状、又は進行性骨化性線維形成異常（FOP）疾患又は症状である、特徴55又は56に記載の方法。

58. 当該疾患又は症状が、ヘテロ型骨化（HO）（場合によって筋肉のHO）、ファン・ブーム病、硬結性骨化症、及び進行性骨化性線維形成異常（FOP）から選択される、特徴55又は56に記載の方法。

FOPはまた、多発性進行性骨化性線維形成異常、進行性骨化性筋炎又はマンヒマイヤー症候群としてもまた知られている。

場合によって、HOは外傷助長HOであり、例えば、外傷は爆風による損傷又は股関節手術又は膝の手術である。

ある例では、当該方法は、頭蓋骨、下顎骨、鎖骨、肋骨又は長骨の骨疾患を治療又は予防する。

59. 当該方法が、レチノイン酸受容体ガンマ（RAR- γ ）アゴニスト（場合によってパロバロテン）をTfr2アゴニスト又は捕捉因子と同時に又は逐次的に対象動物に投与する工程を含む、特徴36から58のいずれか1つに記載の方法。

場合によって、当該アンタゴニスト、アゴニスト、薬剤、捕捉因子、抗体又はフラグメントは、対象動物の静脈内に、皮下に又は筋肉内に投与される。

60. 当該方法が、BMPシグナリングアンタゴニストをTfr2アゴニスト又は捕捉因子と同時に又は逐次的に対象動物に投与する工程を含む、特徴36から59のいずれか1つに記載

10

20

30

40

50

の方法。

61. 当該方法が対象動物において軟骨形成を阻害する、特徴36から60のいずれか1つに記載の方法。

62. 当該方法が対象動物において軟骨細胞形成を阻害する、特徴36から61のいずれか1つに記載の方法。

【0056】

抗体

63. 特徴1から62のいずれかに記載の方法で使用される、又は骨疾患若しくは症状をヒトで治療又は予防するために使用される、Tfr2と特異的に結合する抗Tfr2抗体又はフラグメント。

64. 当該抗体又はフラグメントがヒト抗体又はフラグメントである、特徴63に記載の抗体又はフラグメント。

ある例では、当該抗体又はフラグメントは1つ以上のTfr2結合部位を含み、各結合部位はヒトVHドメイン（場合によってヒトVLドメインとペアを形成する）を含む。

ある例では、当該抗体又はフラグメントは1つ以上のTfr2結合部位を含み、各結合部位はヒトVLドメイン（場合によってヒトVHドメインとペアを形成する）を含む。

各VHドメインは、例えば、ヒトVH、DH及びJH遺伝子セグメントの組換え体であるヌクレオチド配列によってコードされる。例えば、VHは表7に開示するVH遺伝子セグメントから選択される。加えて或いはまた別に、例えばDHは表7に開示するD遺伝子セグメントから選択される。加えて或いはまた別に、例えばJHは表7に開示するJ遺伝子セグメントから選択される。例えば、VH、DH及びJHは、表7に開示する遺伝子セグメントから選択される。ある例では、VHはVH1ファミリーVH遺伝子セグメントで、場合によってJH1、JH2、JH3、JH4、JH5又はJH6と組み合わせられ、例えば、JH4と組み合わせられたVH1又はJH6と組み合わせられたVH1である。ある例では、VHはVH2ファミリーVH遺伝子セグメントで、場合によってJH1、JH2、JH3、JH4、JH5又はJH6と組み合わせられ、例えば、JH4と組み合わせられたVH2又はJH6と組み合わせられたVH2である。ある例では、VHはVH3ファミリーVH遺伝子セグメントで、場合によってJH1、JH2、JH3、JH4、JH5又はJH6と組み合わせられ、例えば、JH4と組み合わせられたVH3又はJH6と組み合わせられたVH3である。

各VLドメインは、例えば、ヒトVL及びJL遺伝子セグメントの組換え体であるヌクレオチド配列によってコードされる。例えば、VLは表8に開示するVL遺伝子セグメントから選択される。加えて或いはまた別に、例えばJLは表8に開示するJ遺伝子セグメントから選択される。例えば、VL及びJLは、表8に開示する遺伝子セグメントから選択される。ある例では、VLはVk1ファミリー遺伝子セグメントで、場合によってJk1、Jk2、Jk3、Jk4、又はJk5と組み合わせられ、例えば、Jk1と組み合わせられたVk1又はJk4と組み合わせられたVk1である。

【0057】

加えて或いはまた別に、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントは表4に開示する重鎖定常領域を含む。加えて或いはまた別に、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントは表4に開示するラムダ軽鎖定常領域を含む。また別に、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントは表4に開示するカッパ軽鎖定常領域を含む。ある例では、VLはラムダ定常領域と融合したラムダVLである。別の例では、VLはカッパ定常領域と融合したカッパVLである。別の例では、VLはラムダ定常領域と融合したカッパVLである。

加えて或いはまた別に、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントは、哺乳動物パターンのグリコシル化、例えばハムスター、マウス、又はヒトグリコシル化を含む。例えば、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントはHEK293細胞の発現生成物である。例えば、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントはCHO細胞の発現生成物である。例えば、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントはCos細胞の発現生成物である。例えば、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントはピキア（*Picchia*）細胞の発現生成物である。例えば、阻害剤、Trf2-ECD-Fc、抗体又はフラグメントは大腸菌（*E. coli*）

10

20

30

40

50

）細胞の発現生成物である。

65. 当該抗体又はフラグメントが、SPRによって測定されるとき、ヒトTfr2（場合によってヒトTfr2-ECD）との結合について参照抗体と競合し、当該参照抗体が、1B1（MyBioSource, MBS833691）、3C5（Abnova, H00007036-M01）、CY-TFR（Abnova, MAB6780）及びB-6（Santa Cruz Biotechnology, sc-376278）、353816（R&D Systems, MAB3120）及び9F8 1C11（Santa Cruz Biotechnology, sc-32271）から選択される、特徴63又は64に記載の抗体又はフラグメント。

66. 特徴63から65のいずれか1つに記載の抗体、フラグメント、ダイマー又はモノマー及び医薬的に許容できる希釈剤、賦形剤又は担体を含む医薬組成物。

67. さらにまた抗スクレロスチン抗体（場合によってロモソズマブ）、抗Dkk1抗体、又は抗アクチビンA抗体（例えばREGN-2477）を含む、特徴66に記載の組成物。

ある例では、当該抗体は抗スクレロスチン抗体である。ある例では、当該抗体はロモソズマブである。ある例では、当該抗体は抗Dkk1抗体である。ある例では、当該抗体は抗アクチビンA抗体である。これらの例では、当該疾患又は症状はFOPであり得る。

【0058】

Fc融合

68. Tfr2-ECD-Fcダイマーであって、場合によって特徴1から67のいずれかに記載の方法で使用されるか、又はヒトの骨疾患又は症状を治療若しくは予防するために使用される、前記Tfr2-ECD-Fcダイマー。

ある実施態様では、当該ダイマーはポリペプチド鎖の第一及び第二のコピーを含み、各ポリペプチド鎖は（N-末端からC-末端の方向に）Fc及びECDを含む。別の実施態様では、当該ダイマーはポリペプチド鎖の第一及び第二のコピーを含み、各ポリペプチド鎖は（N-末端からC-末端の方向に）ECD及びFcを含む。

本発明はまたTfr2-ECD-Fcモノマーを提供する。ある例では、当該モノマーはポリペプチド鎖を含み、当該鎖は（N-末端からC-末端の方向に）Fc及びECDを含む。ある例では、当該モノマーはポリペプチド鎖を含み、当該鎖は（N-末端からC-末端の方向に）ECD及びFcを含む。

ある例では、本発明のモノマー、ダイマー、タンパク質又は阻害剤の各ポリペプチド鎖は、配列番号:10、又は配列番号:10と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列を含むか又は前記から成る。

ある例では、本発明のモノマー、ダイマー、タンパク質又は阻害剤の各ポリペプチド鎖は、配列番号:11、又は配列番号:11と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列を含むか又は前記から成る。

ある例では、本発明のモノマー、ダイマー、タンパク質又は阻害剤の各ポリペプチド鎖は、配列番号:12、又は配列番号:12と少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98又は99%同一性を有する配列を含むか又は前記から成る。

場合によって、当該ダイマー又はモノマーは、哺乳動物細胞、CHO、HEK293又はCos細胞から単離される発現生成物である。

【0059】

69. Tfr2-ECDモノマーであって、場合によって特徴1から68のいずれかに記載の方法で使用されるか、又はヒトの骨疾患又は症状を治療若しくは予防するために使用される、前記Tfr2-ECDモノマー。

70. 当該ECD及びFcがヒトである、特徴68に記載のダイマー又は特徴69に記載のモノマー。

71. 当該FcがヒトガンマFcである、特徴68から70のいずれか1つに記載のダイマー又はモノマーに記載のモノマー。

72. 当該Tfr2-ECDがTfr2 α -ECDである、特徴68から71のいずれか1つに記載の抗体又はフラグメント。

73. 当該Tfr2-ECDがTfr2 β -ECDである、特徴68から71のいずれか1つに記載の抗体又はフラグメント。

10

20

30

40

50

74. 当該疾患又は症状が病理学的骨形成である、特徴68から73のいずれか1つに記載のダイマー又はモノマーに記載のモノマー。

75. 当該疾患又は症状が、骨化疾患又は症状、場合によってヘテロ型骨化（HO）疾患又は症状、及び進行性骨化性線維形成異常（FOP）疾患又は症状である、特徴68から74のいずれか1つに記載のダイマー又はモノマー。

76. 当該疾患又は症状がBMP2誘発HOである、特徴75に記載のダイマー又はモノマー。

77. 当該疾患又は症状がBMP4誘発HOである、特徴75に記載のダイマー又はモノマー。

78. 当該疾患又は症状がBMP6誘発HOである、特徴75に記載のダイマー又はモノマー。

79. 当該疾患又は症状がBMP7誘発HOである、特徴75に記載のダイマー又はモノマー。

80. 特徴63から79のいずれか1つに記載の抗体、フラグメント、ダイマー又はモノマーを含む医薬組成物。

81. さらにまたレチノイン酸受容体ガンマ（RAR- γ ）アゴニスト（場合によってパロバロテン）を含む、特徴80に記載の組成物。

82. さらにまたBMPアンタゴニスト、場合によって抗BMP抗体又はフラグメントを含む、特徴80又は81に記載の組成物。

83. 当該BMPがBMP2、4、6又は7である、特徴82に記載の組成物。

適切な抗BMP抗体及びフラグメントの例は、WO2016098079、US20160176956A1及びWO2017191437に開示される。

84. 当該Tfr2がTfr2 α である、特徴1から83のいずれかに記載の方法、抗体、フラグメント、ダイマー、モノマー又は組成物。

【0060】

85. 当該Tfr2がTfr2 β である、特徴1から83のいずれかに記載の方法、抗体、フラグメント、ダイマー、モノマー又は組成物。

86. 以下をもたらす、特徴1から85のいずれかに記載の方法、抗体、フラグメント、ダイマー、モノマー又は組成物：

(a) 小柱骨体積（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(b) 皮質骨密度（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(c) 小柱数（Tb.N）（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(d) 小柱の太さ（Tb.Th）（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(e) 小柱間隔（Tb.Sp）（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の減少を引き起こす；

(f) 小柱骨微細石灰化密度（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(g) 骨強度（場合によって大腿骨及び/又は椎骨及び/又は脊柱骨）の増加を引き起こす；

(h) 対象動物の骨形成の増加及び/又は対象動物の骨再吸収の低下；

(i) 対象動物の骨芽細胞（又はその骨形成活性）の増加及び/又は対象動物の破骨細胞（又はその骨再吸収活性）の増加；

(j) 対象動物の骨代謝回転の増加；

(k) 対象動物のプロコラーゲンI型N-末端ペプチド（P1NP）の増加及び/又は対象動物のI型コラーゲンのC-末端テロペプチド（CTX）の増加；

(l) 対象動物の骨細胞の増加；

(m) 対象動物の硬化性疾患又は症状、場合によって骨化疾患又は症状、場合によってヘ

10

20

30

40

50

テロ型骨化（HO）疾患又は症状、又は進行性骨化性線維形成異常（FOP）疾患又は症状の治療又は予防；

（n）対象動物の病理学的骨形成の治療又は予防；

（o）対象動物のヘテロ型骨化（HO）（場合によって筋肉のHO、又は外傷助長HO（例えば、外傷は爆風による損傷又は股関節手術若しくは膝の手術である）、ファン・ブヘム病、硬結性骨化症、及び進行性骨化性線維形成異常（FOP）の治療又は予防。

【0061】

ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は対象動物の骨代謝回転を高めるためである。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は対象動物の骨形成（BFR/BS）を高めるためである。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は対象動物の骨再吸収（Oc.S/BS）を高めるためである。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は、対象動物の骨体積を増加又は維持するためである（例えば微細コンピュータ支援断層撮影法で決定される）。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は、対象動物の小柱骨体積（BV/TV）を増加又は維持するためである（例えば微細コンピュータ支援断層撮影法で決定される）。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は、対象動物の骨の剛性を増加又は維持するためである（例えば三点曲げ試験で決定される）。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は、対象動物の骨断断耐性を増加又は維持するためである（例えば三点曲げ試験で決定される）。ある例では、Tfr2阻害剤（例えば抗体）は、対象動物の骨強度を増加又は維持するためである（例えば三点曲げ試験で決定される）。場合によって、曲げ試験は骨に力を適用する工程を含む。ある例では、これらの測定のいずれも、代用非ヒト動物モデル（例えば非ヒト霊長動物、ブタ、げっ歯類、ラット又はマウス）で実施される。

本明細書のいずれの構成でも、本発明のタンパク質又は阻害剤は、場合によって、抗体CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む抗体Fc領域を含む。例えば、Fc領域は、ガンマ-1、ガンマ-2、ガンマ-3、ガンマ-4 Fc、ミュー、デルタ、イプシロン又はアルファFc領域である。好ましくは、Fc領域はガンマ-1 Fc領域である。好ましくは、Fc領域はヒトFc領域である。

本明細書のいずれの構成でも、本発明の組成物、タンパク質又は阻害剤は、好ましくは医療装置又は容器（例えば、無菌的容器又は封じられて無菌的内容物を収納する容器）に含まれる。場合によって、組成物、タンパク質、阻害剤、装置又は容器は、ラベルと、又は硬化性疾患、骨疾患、鉄代謝異常若しくは造血性異常をヒトで治療及び/又は予防するために使用する指示書と一緒にされている。場合によって、当該ラベル又は指示指示書は販売認可番号（場合によってFDA又はEMA認可番号）を含み、場合によって、当該装置は、IV又は注射装置を含み、前記装置は当該タンパク質又は阻害剤（例えば抗体又はフラグメント）を含む。

場合によって、任意のタンパク質、阻害剤、因子、抗体又はフラグメントは以下から選択される二重特異性様式を含む：DVD-Ig、mAb²、FIT-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、SEEDbody、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、ミニボディ、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、特にmAb²、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対及びFIT-Igを有するノブインホール、例えばmAb²及びFIT-Ig。

【0062】

ある実施態様では、二重特異性様式は以下から選択される：DVD-Ig、mAb²、FIT-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH₃ KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール

、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig及びzybody。

ある実施態様では、二重特異性様式は以下から選択される：DVD-Ig、FIT-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディDART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH₃ KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig及びzybody、例えばDVD-Ig、FIT-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、SEEDbody、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、ミニボディ、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、特にノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対及びFIT-Igを有するノブインホール、例えばFIT-Ig。

【0063】

ある実施態様では、二重特異性様式は以下から選択される：DVD-Ig、mAb²、mAb-dAb、ドックアンドロック、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH₃ KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig及びzybody、例えばDVD-Ig、mAb²、mAb-dAb、ドックアンドロック、SEEDbody、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、ミニボディ、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、特にmAb²、ノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、及び共通軽鎖を有するノブインホール、例えばmAb²。

ある実施態様では、二重特異性様式は以下から選択される：DVD-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、オルトゴナルFab、scDiabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH₃ KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価Hcab、ImmTAC、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig及びzybody、例えばDVD-Ig、mAb-dAb、ドックアンドロック、SEEDbody、scD

iabody-Fc、ジアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、イントラボディ、BiTE、ジアボディ、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH₃、Diabody-CH₃、ミニボディ、ノブインホール、共通軽鎖を有するノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、荷電対、共通軽鎖を有する荷電対、特にノブインホール、共通軽鎖及び荷電対を有するノブインホール、及び共通軽鎖を有するノブインホール。

【0064】

ある例では、対象動物はヒトである。また別には、対象動物は非ヒト動物である。ある例では、対象動物は成人である。ある例では、対象動物は小児である。

例えば、%同一性は少なくとも85%である。例えば同一性は少なくとも90%である。例えば同一性は少なくとも95%である。

ある例では、本発明の抗体又はフラグメントの重鎖は、ヒトガンマ-1、ガンマ-2、ガンマ-3、ガンマ-4、ミュー、デルタ、イプシロン又はアルファアイソタイプ、好ましくはガンマアイソタイプ（例えばIgG4アイソタイプ）である。ある例では、本発明の抗体又はフラグメントの軽鎖はヒトカッパ定常領域を含む。また別には、ある例では、本発明の抗体又はフラグメントの軽鎖はヒトラムダ定常領域を含む。場合によって、本発明の抗体はヒトIgG4定常領域を含む。場合によって、本発明の抗体はヒトIgG1定常領域を含む。

場合によって、抗体は、軽鎖のダイマーと結合した重鎖のダイマーを含む4鎖抗体である。

ある実施態様では、抗体又はフラグメントはヒト抗体又はフラグメントである。ある実施態様では、抗体又はフラグメントは完全にヒトの抗体又はフラグメントである。ある実施態様では、抗体又はフラグメントは完全にヒトのモノクローナル抗体又はフラグメントである。

ある実施態様では、抗体又はフラグメントはヒト化抗体又はフラグメントである。ある実施態様では、抗体又はフラグメントはヒト化モノクローナル抗体又はフラグメントである。

【0065】

ある例では、本発明の抗体又はフラグメントは、例えば $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ 又は約 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ のKaでヒトTfr2（又はスクレロスチン、アクチビンA若しくは他の列挙抗原）と結合する。ある例では、本発明の抗体又はフラグメントは、例えば4若しくは 5 s^{-1} 又は約4若しくは 5 s^{-1} のKdで結合する。ある例では、本発明の抗体又はフラグメントは、例えば0.07若しくは0.14 nM又は約0.07若しくは0.14 nMのKDで結合する。ある実施態様では、フラグメントはFabフラグメントである。ある実施態様では、フラグメントはscFvである。

好ましくは、Tfr2（例えばヒトTfr2）と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントは、他の抗原と交差反応しない（しかし場合によって異なるTfr2種（例えばアカゲザル、カニクイザル又はマウス）と交差反応することがあり、及び/又は異なるTfr2と場合によって交差反応することがある）。Tfr2抗原と特異的に結合する抗体又はそのフラグメントは、例えば免疫アッセイ、BiacoreTM、又は当業者に公知の他の技術によって識別することができる。ある抗体又はそのフラグメントが、例えば放射性免疫アッセイ（RIA）及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）のような実験的技術を用いて決定したとき、任意の交差反応性抗原よりも高い親和性でhBMP6抗原と結合するとき、当該抗体又はそのフラグメントはTfr2抗原と特異的に結合する。典型的には、特異的又は選択的反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10倍以上であろう。抗体特異性に関する考察のためには、例えば以下を参照されたい：Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336。

ある実施態様では、抗体が線状Tfr2エピトープを認識する場合、当該抗原配列に基づく短いペプチドを生成し、抗体とこれらのペプチドとの結合を標準的な技術を用いて評価することができる。

ある実施態様では、限定的なタンパク質分解放酵及び質量分析法を用いて結合エピトー

プを識別することができる。

ある実施態様では、エピトープの接触残基はX-線結晶学によって識別される。ある実施態様では、エピトープの接触残基は凍結電子顕微鏡法によって識別される。ある実施態様では、エピトープの接触残基は、限定的タンパク質分解消化及び質量分析法の組合せによって識別される。

本明細書に開示する1つの構成、例、実施態様又は特徴のいずれの特色も、本明細書の任意の他の構成、例、実施態様又は特徴と必要な変更を加えて組み合わせることが可能である。

本発明を実施するために、上記実施態様及び特許請求の範囲の特色を組み合わせることは得策である。本発明は、本明細書に記載する使用とともにまた対応する方法、例えば対象動物において診断、治療又は予防する方法を提供する。

【実施例1】

【0066】

実施例1：第一の構成の実施態様

本発明は、いくつかの実施態様及び付随する図1から4を参照しながら、下記で極めて詳細に説明されるであろう。この場合、当該実施態様は本発明の記載を意図するが、限定作用を有するものではない。

Tfr2細胞外ドメイン (Tfr2-ECD) の調製：

Tfrのマウス細胞外ドメイン (ECD、aa103-798) の全体の核酸配列 (Hisタグを含む) は、Genscript (Germany) で実施される。組換え体His-Trf2-ECDは、バキュロウイルス発現系 (pOCC211-Tfr2-ECD) を用い、Sf9昆虫細胞で発現される。細胞培養上清を収集し、His Trapカラムを用いて精製する。リン酸緩衝生理食塩水溶液 (PBS) を用いる洗浄工程の後で、His-Tfr2ECDタンパク質をPBSを用いてイミダゾールで溶出させる。

表面プラズモン共鳴測定 (SPR)：

Tfr2-ECD及びBMP (BMP-2、-4、-6、-7 (R&D Systems)) 及びBMP受容体 (BMPRI-A、BMPRII (R&D Systems)) 間の相互作用を、Biacore™ T100 (GE Healthcare) を用いて分析する。

この目的のために、Tfr2-ECDを25℃でのアミノ基のカップリングによってシリーズSセンサーチップC1 (GE Healthcare) に固定する。チップ表面のカルボキシル基を7分間活性化する。196mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-ヒドロクロリド及び50mM n-ヒドロキシスクシンイミドの混合物を10µL/分の流速で用いる。続いて、5µg/mLのTfr2-ECD (酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で希釈) を200RUの相対占有まで5µL/分の流速で注入する。1Mのメタノールアミン-HCl (pH8.5) を流速10µL/分で7分間注入することによって未反応基を不活化する。参照表面の調製のために、同じ手順を繰り返すが、ただしTfr2-ECDは注入されない。

結合アッセイは37℃、流速30µL/分で実施する。各分析物は泳動緩衝液 (50nM FeCl₃を含むHBS-P (pH7.4)) で希釈する。BMPは50nMの濃度で、BMP受容体は200nMの濃度で用いる。Tfr2-ECD上に分析物を300s注入し、続いて1000s解離させることによって結合アッセイを実施する。結合レベル値を注入終了10s前に基準線と対比して読み取り、モル質量に対して修正する。1000sの解離に続いて、5M NaCl及び50mM NaOHを含むHBS-Pの手段によってチップ表面を60sかけて再生し、1000sかけて安定化させる。結合パラメータはBiacore™ T100評価ソフトウェア2.03を用いて決定する。

図2は、本発明のタンパク質と多様なBMPリガンド (BMP2、BMP-4、BMP-6、BMP-7) との結合を示す。

【0067】

BMP-2競合ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ)：

BMP-2競合ELISAを実施するために、Duo Set BMP-2 ELISAキット (R&D Systems) を用いる。BMP-2捕捉抗体で一晩プレートを被覆した後で、1.5ng/mL BMP-2と一緒にTfr2-ECD又はBMPRI-A (陽性コントロール (R&D Systems)) の濃度を増加させながらアッセイに加える。室温で1時間インキュベートし十分に洗浄した後、検出抗体を製

造業者の指示にしたがって添加し、Tfr2-ECD又はBMPR-1Aと結合しないBMP-2（捕捉及び検出抗体と結合）の量を定量する。

図3は、本発明のタンパク質とBMP（特にBMP-2）との結合を示す。本発明のタンパク質の濃度が増加するにつれ、BMP-2検出抗体のシグナルは、BMP濃度が同じであるにもかかわらず低下する。その進行はBMP-2とBMP受容体（BMPR-1）との結合に匹敵する。

異所性骨化（HO）のマウスモデル：

雄及び雌のC57BL/6マウスをHOモデルに用いる。HOはBMP-2を筋肉に注射することによって惹起する（Woszczyzna et al. 2012）。

全てのマウスに標準飼料及び水を自由に与え、1ケージ当たり5匹のマウスのグループで維持する。マウスを12時間の明/暗サイクル及び23℃に冷却した空気に暴露する（指定病原体フリールームではない）。充実性は段ボール巣箱及び寝床素材の形で提供される。マウスを無作為に異なる治療グループに分け、その後アッセイをブラインド実験として実施する。

1mg/mLの組換えBMP-2溶液（Thermo Fisher Scientific）の2.5 μ L、又は0℃で47.5 μ Lのマトリゲル（BD Bioscience）と混合した2.5 μ Lの1mg/mL Tfr2-ECDを用いる処置手段によってHOを調査する。組合せ処置のためには、2.5 μ Lの1mg/mL組換えBMP-2溶液を2.5 μ Lの1mg/mL Tfr2-ECD及び45 μ Lマトリゲルと混合する。マトリゲル混合物を10週齢の雌野生型マウスの前脛骨筋に注射する。2週間後に脚を調査する。

μ CT（マイクロ断層撮影法）及び骨微細石灰化密度：

vivaCT40（Scanco Medical, Switzerland）を用いて骨微細構造を分析する。X線（70kVp、114mA及び200sの積分時間）を用い、10.5 μ mの解像度で全下肢骨を測定する。業者（Scanco Medical）の事前原稿を用いて骨（#1）を分析する。

マウスのHOモデルは筋肉組織のBMP-2誘発骨化を発達させる。図4は、BMP-2の結合の手段によってTfr2-ECDによるマウス（C57BL/6マウス）の骨化又はHOの阻害を示す。

統計分析：

データは平均値±標準偏差（SD）として明示される。グラフパッドプリズム（Graphpad Prism）6.0-ソフトウェアを用いて、グラフ及び統計が作成される。データの正規性は、コルモゴロフ-スミルノフ（Kolmogorow-Smirnov）検定の手段によって決定される。正規分布の場合には、統計評価は、スチューデントT検定の2標本検定を用い2標本比較の手段によって実施される。3グループ以上を有する実験については、一元配置分散分析（ANOVA）を用いる。治療効果の分析にはボンフェローニ事後検定を含む二元配置分散分析を用いる。データが正規分布に対応しない場合、マン-ホイットニーU検定及びウィルコクソンの符号順位検定をデータ分析に用いる。

【実施例2】

【0068】

第二の構成の実施態様

ある実施態様では、コンピュータ支援微細断層撮影法を採用したTfr2欠損マウスの骨測定は、Tfr2消失は、より高い小柱骨体積（骨体積/総体積、BV/TV）（図5）及びより厚い皮質骨（図6）をマウスで生じることを示す。加えて、骨の質は、野生型マウス（WT）と比較してTfr2非存在下でより良好である（剛性パラメータ）。骨の機械的特性（例えば破断耐性）を三点曲げ試験の手段によって決定した（当該試験では骨を破断するために適用されねばならない力が決定される）。

Tfr2欠損マウスの試験はさらにまた、図8及び図9において、Tfr2欠損は、より高い骨代謝回転、すなわちより高い骨形成速度（骨表面当たりの骨形成速度（BFR/BS））（図8）及びより高い骨再吸収速度（骨表面当たりの破骨細胞表面（Oc.S/BS））（図9）を生じることを示す。

【実施例3】

【0069】

トランスフェリン受容体2はBMP及びWntシグナリングを介して骨質量及び病理的骨形成を制御する

10

20

30

40

50

要約

トランスフェリン受容体2 (Tfr2) は主として肝臓で発現されて鉄ホメオスタシスを制御する。本明細書で、我々はTfr2を骨形成を抑制する骨ホメオスタシス調節因子として確認する。Tfr2を欠くマウスは、鉄ホメオスタシス及び肝Tfr2に依存しない骨質量及び石灰化の増加を示す。細胞特異的Tfr2ノックアウトマウスの骨髄移植実験及び研究は、Tfr2はBMP-p38MAPKシグナリングを障害し、さらにWnt阻害因子スクレロステチンの発現を骨芽細胞で特異的に低下させることを提示する。MAPKの再活性化及びスクレロステチンの過剰発現は、Tfr2ノックアウトマウスの骨格異常をレスキューする。我々はさらにまた、Tfr2の細胞外ドメインはBMPと結合し、おとり受容体として機能することによってBMP-2誘発異所性骨化を阻害することを示す。これらのデータは、Tfr2は、おそらくは受容体として又は他のBMP受容体との複合体における共同受容体としてBMPと直接的に相互作用することにより、BMPシグナリングを調整し骨形成を制限することを示している。最後に、Tfr2細胞外ドメインは、病理学的骨形成に関連する症状の治療で有効であるかもしれない。

10

鉄は赤血球産生、細菌防衛及び細胞呼吸に必須であるが¹、しかしながら鉄過剰は細胞傷害性である。したがって、全身の鉄レベルは狭い範囲内に維持され、鉄欠乏及び貧血又は多臓器損傷をもたらす鉄過負荷を回避する。他の臓器の中でとりわけ骨は鉄ホメオスタシスの変化に高度に敏感である。骨無機質密度は全身の鉄濃度と負の関連を有し²、遺伝性ヘモクロマトーシス（鉄過負荷を特徴とする異常）を罹患する患者は成熟前骨粗しょう症を発達させる³。これらの観察にもかかわらず、鉄ホメオスタシスと骨代謝回転との間の関係はほとんど探求されないままである。

20

全身の鉄濃度は、バランスのとれた食事性鉄吸収及び細網内皮系に由来する鉄再利用によって維持される¹。ヘプシジンは肝性ペプチドホルモンであり鉄ホメオスタシスの重要な調節因子である⁴。フェロポーチン（鉄エクスポーター）と結合することによって、ヘプシジンはフェロポーチンの内在化及び分解を引き起こし、それによって循環への鉄の搬出を制限する。このメカニズムの調節異常は鉄過負荷をもたらす。したがって、ヘプシジンをコードする遺伝子又はヘプシジン調節遺伝子の変異は遺伝性ヘモクロマトーシスを生じる⁵。

【0070】

トランスフェリン受容体2 (Tfr2) はヘプシジンの重要な調節因子である。ヒトと同様に、Tfr2の全体的又は肝特異的欠失を有するマウスは肝臓に鉄を蓄積する⁶⁻⁹。Tfr2は、ヘプシジン発現を調節することによって鉄ホメオスタシスを制御すると提唱され、2つのアイソフォームTfr2 α 及びTfr2 β を有する。Tfr2 α は、完全長タンパク質であり肝臓で鉄ホメオスタシスを調節し、Tfr2 β は、細胞内ドメイン及びトランスメンブレンドメインを欠き脾臓の鉄流出で重要な役割を果たす⁸。今日まで、Tfr2が全身の鉄濃度を感知し調節するメカニズムは完全には理解されていない。しかしながら、ホロ-トランスフェリンはTfr2と結合しその半減期を延長することができる¹⁰。したがって、Tfr2は循環する鉄を感知し、トランスフェリン飽和の上昇に応答してヘプシジンを活性化すると説明されている。

30

Tfr2欠損肝細胞は、骨形成タンパク質 (BMP) 及びp37MAPK/ERKシグナリングを低下させ¹¹⁻¹³、そのシグナル伝達におけるこれらの経路を示唆する。BMPシグナリングは、骨発生及び出生後の骨ホメオスタシスにおけるその決定的な役割についてはほぼ知られているが¹⁴、また鉄ホメオスタシスの重要な調節因子として浮上してきた。BMP経路のいくつかの構成要素 (Bmpr1a、Bmpr2、Acvr1、Acvr2a、Smad4、Bmp2、Bmp6) の欠損又はそれらの薬理的障害は鉄過負荷をもたらす¹⁵⁻²⁰。さらにまた、ヘモジュベリン（もう1つのヘプシジン発現の調節因子）が肝性BMP共同受容体として識別されており、BMPシグナリングを鉄ホメオスタシスにさらに関連させる。重要なことに、鉄ホメオスタシスを制御するBMP受容体の1つにおける活性化変異、ACVR1は、希少なヒトの疾患、進行性骨化性線維形成異常 (FOP)（過剰な異所性骨化を特徴とする²¹）を引き起こす。したがって、BMPシグナリングのバランスをとることが、生理学的範囲にある骨及び鉄ホ

40

50

メオスタシスの維持に必要である。

最近の証拠により、Tfr2は肝臓に限定されないが、赤血球系先駆細胞でも発現されそれらの適切な分化を担保する^{8,22,23}ことが示されている。BMPは骨格で重要な役割を有するので^{14,24}、我々は、Tfr2は別の肝臓外機能を有し骨ホメオスタシスを調節し得ると仮説を立てた。本明細書では、我々は、Tfr2は骨代謝回転の新規な負の調節因子であることを示す。BMPリガンドと結合することによって、Tfr2は、骨芽細胞でp38MAPKシグナリングを活性化させ、Wnt阻害因子スクレロステチンの発現を誘発して骨形成を阻害する。最後に、Tfr2細胞外ドメインのBMP結合特性を利用することによって、我々は、このタンパク質フラグメントが2つの前臨床モデルで効果的に異所性骨化を阻害することを示し、また病理学的な骨形成異常の治療に有効であり得ることを提起する。

10

【0071】

結果

Tfr2欠損は高い骨質量をもたらす：

鉄感受性受容体Tfr2が骨ホメオスタシスを調節するか否かを解明するために、我々はTfr2^{-/-}マウス（鉄過負荷である）を調べた。以前の報告^{8,25}と一致して、トランスフェリン飽和、血清の鉄及びフェリチン濃度、並びに肝臓の鉄含有量は、野生型（WT）マウスと比較してTfr2^{-/-}マウスで増加した（補充図10a-d）。加えて、原子吸光分析は、Tfr2^{-/-}マウスの皮質骨でより高い鉄含有量を明らかにした（補充図10e）。鉄過負荷は骨低下と関連するので³、我々はTfr2^{-/-}マウスでの骨体積低下を期待した。しかしながら、食事誘発鉄過負荷を有するマウス及び種々のヘモクロマトーシスマウスモデル（Hfe^{-/-}マウス²⁶及びFpn^{C326S}変異マウス²⁷を含む）（補充図11a-c）の低い骨質量表現型とは対照的に、Tfr2^{-/-}マウスは、WTコントロールと比較して、大腿骨及び脊椎で1.5-3倍高い小柱骨体積並びに1.5倍高い皮質骨密度を提示した（補充図11a-c）。高い骨質量は性別及び経年には左右されなかった（補充図12a-b）。構造的レベルでは、Tfr2^{-/-}脊椎は、小柱骨数（Tb.N）及び太さ（Tb.Th）の増加を示した（図10c-e）。さらにまた、Tfr2^{-/-}マウスは小柱骨微細石灰化密度の増加を示し（補充図12c）、この増加は骨体積の増加とともに骨強度を増強した（図10f）。

20

我々は、動的及び静的な組織形態計測を実施して、高い骨質量表現型が骨形成増加又は骨再吸収低下の結果であるか否かを決定した。Tfr2欠損は骨芽細胞及び破骨細胞パラメータの両方で増加を生じた。骨形成速度及び骨形成マーカー（プロコラーゲンI型N末端ペプチド（P1NP））の血清濃度は、Tfr2^{-/-}マウスで2倍を超えて上昇し、破骨細胞数及び骨再吸収マーカー（I型コラーゲンのC末端テロペプチド（CTX））の血清濃度も同様に増加した（図10g-l）。高い骨代謝回転は試験した全ての齢の雄及び雌の両方で存在した（補充図12d-e）。興味深いことに、Tfr2^{-/-}マウスは、卵巣摘出誘発骨低下から防御されなかったが、WTマウスよりも多くの骨を失った（図10m）。総合すれば、これらのデータは、Tfr2は鉄ホメオスタシスだけでなく骨代謝回転も制御することを示している。

30

【0072】

Tfr2欠損マウスの高い骨質量は肝における鉄の状況又は肝のTfr発現に左右されない：

Tfr2^{-/-}マウスは鉄過負荷及び高骨質量を有し、一方で鉄過負荷は通常骨質量低下と結びついているので^{3,28}、我々は、異常な鉄代謝がTfr2^{-/-}マウスの骨格表現型に寄与しているか否かを精査した。したがって、Tfr2^{-/-}マウスに離乳から8週間の間鉄非含有飼料を与えるか、又は10週齢から3週間の間鉄キレート剤デフェロキサミンで処置した。両レジメンによる鉄枯渇は成功したものの、Tfr2^{-/-}マウスでは骨質量は上昇したままで（図11a-d）、Tfr2^{-/-}マウスの高い骨質量表現型は肝臓の鉄の状況に左右されないことを示した。

40

これらの発見を裏付けるために、我々は2つの別個のTfr2変異マウスモデルを研究した。このモデルはTfr2 β を全体的に欠くが、対照的なTfr2 α 発現を有し、これにより鉄ホメオスタシスの多岐にわたる異常を生じる⁸。Tfr2ノックインマウス（KI）は全体的にTfr2 β を欠くが正常なTfr2 α を有し、したがって正常な鉄パラメータを有する。対照的に、肝細胞特異的Tfr2ノックアウト（LCKO）マウスは全体的にTfr2 β を欠き、肝に限定されるTfr2 α 欠損を有するが、重度に鉄過負荷である。両モデルはコントロールと比較して類似

50

する骨体積の割合を有し（図11e-f）、Tfr2 β も肝Tfr2 α も骨ホメオスタシスの制御に役割を持たないことを示した。

【0073】

骨芽細胞のTfr2欠損は高骨質量表現型を駆動する：

Tfr2が骨格細胞におけるその発現を介して骨質量を直接的に調節するか否かを探索するために、我々は多様なマウス組織におけるTfr2 α 及びTfr2 β の発現を測定した。Tfr2 α は優先的に肝で発現され、大腿皮質骨の発現の次に高かった（補充図13a）。Tfr2 β mRNA発現もまた大腿皮質骨で検出されたが、ただしはるかに低いレベルであった（脾臓（陽性コントロール）C_T値は26、骨C_T値は32）。Tfr2の細胞外ドメインと結合する（したがってTfr2 α 及びTfr2 β アイソフォームの両方を検出する）抗体を用いて、我々は脊椎骨切片でTfr2発現を確認し、Tfr2陽性の破骨細胞、骨芽細胞及び骨細胞を示した（図12a、d）。Tfr2 $^{-/-}$ マウス由来の骨切片の染色はTfr2抗体の非特異的結合を示した（補充図12b）。WTマウスの骨髄から分化した破骨細胞及び骨芽細胞は両方ともTfr2 α 及びTfr2 β mRNA転写物をex vivoで発現したが、Tfr2 β の発現は各細胞型で非常に低かった（Tfr2 β のデータは示されていない）。Tfr2 α は破骨細胞及び骨芽細胞で容易に検出でき、成熟破骨細胞（7日目/7）及び未成熟骨芽細胞（7日目/21）でピーク発現レベルを示した（図12b、e）。免疫細胞化学によって、破骨細胞及びオステリックス発現骨芽細胞（ex vivoで分化）でのTfr2発現が確認された（図12c、f）。骨芽細胞を細胞内分画することによってさらにTfr2の大半が膜画分に局在された（図12g）。細胞質でも低いシグナルが検出された。

破骨細胞のTfr2又は骨芽細胞のTfr2が骨代謝回転を調節するか否かを決定するために、我々は相互骨髄移植を実施した。WT及びTfr2 $^{-/-}$ マウスで、骨髄移植は、ドナーの遺伝子型に関係なく椎骨又は大腿骨体積に影響を与えず（図12h）、造血区画におけるTfr2欠損はTfr2 $^{-/-}$ マウスの高骨質量表現型の原因ではないことを示唆した。これらの発見と一致して、特に骨髄系統（Lysm-cre）及び成熟破骨細胞（Ctsk-cre）のTfr2欠損は脊椎の骨体積に影響しなかった（図12i）。しかしながら、大腿骨体積は、Tfr2 $^{f/f}$;Lysm-creマウスで低下したが、Tfr2 $^{f/f}$;Ctsk-creマウスでは低下しなかった（補充図20a）。対照的に、骨芽細胞の先駆細胞（Tfr2発現は最高である）のTfr2欠損は大腿骨及び脊椎の骨質量を増加させ（図12j）、小柱数を増加させ、小柱間隔を減少させた（図12k）。骨形成は、より高い血清P1NPレベル（図12l）及びより高い骨形成速度（図12m）によって反映されるように、Tfr2 $^{f/f}$;Osx-creで増加した。最後に、骨芽細胞のTfr2欠損は破骨細胞数を変化させないが、CTXの血清レベルを増加させる傾向があった（図12n-o）。発表されたTfr2 $^{f/f}$;Lysm-creマウス²⁹と一致して、Tfr2 $^{f/f}$;Ctsk-cre及びTfr2 $^{f/f}$;Osx-creマウスもまた、正常な肝臓鉄含有量を示した（補充図20b-c）。総合すれば、これらのデータは、Tfr2はもっぱら骨芽細胞で骨形成を調節するが、全身的な鉄ホメオスタシスには寄与しないことを示している。

【0074】

骨芽細胞のTfr2欠損はBMP-MAPKシグナリングを減弱させ、Wnt阻害因子の発現低下をもたらす：

データは骨芽細胞におけるTfr2の直接的な役割を示しているので、我々は、WT及びTfr2 $^{-/-}$ マウスの初代骨芽細胞を用いてゲノム全体のRNA配列決定分析を実施し、Tfr2の欠失によって影響を受けるシグナリング経路を識別した。合計5,841の弁別的に発現される遺伝子（DEG）を識別した。我々は遺伝子オントロジー分析を実施して、Tfr2欠損によって影響を受ける生物学的プロセスを決定した。Tfr2 $^{-/-}$ 骨芽細胞でアップレギュレートされる遺伝子は、タンパク質分泌及び筋肉系の負の調節に関する生物学的プロセスに属した。対照的に、骨化、細胞外マトリックス組織化、Wntシグナリングの負の調節、及びSmadリン酸化に必要な遺伝子は、Tfr2 $^{-/-}$ 骨芽細胞でダウンレギュレートされた（補充図21a）。これらのデータは分子機能及び細胞成分分析と一致した（前記分析は、グリコサミノグリカン及びヘパリン結合、並びにBMP受容体結合とともにタンパク質性細胞外マトリックス及びコラーゲンの形成に必要とされる遺伝子の過小評価を明らかにした）（補充図21a）

。遺伝子セットエンリッチメント解析はさらにまた、後期骨芽細胞分化及びWntシグナリングに必要とされる遺伝子の過小評価を提示した（後者はWnt阻害因子Dickkopf-1 (Dkk1) の顕著な抑制に関連する）（補充図21b-c）。有意に濃縮される遺伝子セットの完全なリストは補充表2で提供される。

Dkk1及びSost（Wnt阻害因子スクレロステチンをコードする）は、ex vivoのTfr2^{-/-}骨芽細胞でもっともダウンレギュレートされる25の遺伝子に入る（図13a）。2つのWnt阻害因子の発現低下はqPCRによって立証され、Wnt標的遺伝子（Axin2、Lef1、Cd44）の発現増加と一致する（補充図21c）。Dkk1及びSost mRNAレベルもまた、Tfr2^{f/f};Ox-creマウスから得られる骨芽細胞でダウンレギュレートされた（図13b）。さらにまた、骨細胞関連遺伝子Phex及びDmp1の発現は低下した（補充図21c）。重要なことには、骨細胞マーカーの発現障害は、Tfr2^{-/-}骨の骨細胞数減少のためではなかった（WT: 8.73 ± 2.74に対してTfr2^{-/-}: 9.77 ± 0.85の骨細胞/骨体積率）。さらにまた、Tfr2^{-/-}マウスの血清で、スクレロステチン及びDkk1の低い濃度（図13c）が、β-カテニン及びアキシンの高発現を示す極めて高率の骨芽細胞/骨細胞（図13d）と併せて検出された。最後に、7日間分化させたTfr2^{-/-}骨芽細胞で、Wntシグナリング増加がβ-カテニンのウェスタンブロット分析を用いて示された（図13e）。

ディープシーケンシング分析はまたTfr2^{-/-}骨芽細胞におけるBMPシグナリング低下を示唆し、最近の研究は、Sost及びDkk1はBMPシグナリングの下流標的であることを示している^{30,31}。したがって、我々は、Tfr2^{-/-}及びWT骨芽細胞で、BMP標的遺伝子を基本的カノニカル（Smad）及び非カノニカル（MAPK）BMPシグナリング経路とともに分析した。Smad6及びId1はTfr2^{-/-}骨芽細胞で有意にダウンレギュレートされたが、Id2は異ならなかった（補充図21c）。Smad1/5/8リン酸化とともにERK及びp38は、WT骨芽細胞と比較して両方ともTfr2^{-/-}で低下した（図13e）。さらにまた、BMP-2処理に続くBMPシグナリングの活性化は、Smad活性化はTfr2^{-/-}骨芽細胞で遅延されるがp38MAPK及びERKの活性化は永続的に障害されることを示した（図13f-g）。Tfr2^{-/-}骨芽細胞における非カノニカルBMPシグナリングの活性化低下はBMP-2に制限されず、BMP-4刺激後及びより低い程度でBMP-6刺激後にもまた観察された（図13h、補充図21d）。全体として、骨芽細胞におけるTfr2欠損は、BMPシグナリングの障害及びWnt経路の活性化増加をもたらす。

【0075】

MAPKシグナリングの再活性化及びスクレロステチンの過剰発現はTfr2欠損において高骨質量をレスキューする：

我々は次にSost発現のTfr2媒介調節の基礎となるメカニズムを精査した。なぜならば、このメカニズムは骨におけるTfr2依存作用の主要な駆動機関の可能性からである。In vitroでTfr2^{-/-}骨芽細胞を用いて、我々は、BMP-2、BMP-4、及びBMP-7による刺激後のSost発現誘発の欠如を確認した（図14a）。逆に、WT及びTfr2^{-/-}骨芽細胞におけるTfr2の過剰発現は、特にBMP-2による刺激後にSostを顕著に増加させた（図14b、補充図22a）。Tfr2^{-/-}マウスの高骨質量産生におけるスクレロステチンの影響を調べるために、我々は、Tfr2^{-/-}マウスを後期骨芽細胞/骨細胞で（Dmp1-8kb-プロモーター下において）ヒトSOSTを過剰発現するマウスと交配した。SOSTの過剰発現は、Tfr2^{-/-}マウス（図14c）の脊椎小柱骨体積を有意に低下させ、さらに骨形成速度（図14d）を正常化させた。破骨細胞被覆骨表面は、正常なSost発現を示すマウスと比較して、骨芽細胞/骨細胞でSOSTを過剰発現するTfr2^{-/-}マウス及びWTマウスで高かった（補充図22b）。

以前の研究は、BMPはBMP-Smad及びBMPMAPK経路を介してSost発現を刺激することを示した^{30,31}。pERK及びpp38はTfr2^{-/-}骨芽細胞でもっとも顕著に減少し、さらにTfr2^{-/-}骨芽細胞のSmad1過剰発現もSmad4過剰発現もSost mRNAレベルを回復させなかった（補充図22c-f）、我々は、アニソマイシンを用いてMAPK経路を再活性化してSost発現をレスキューした。アニソマイシンによる処理はERK及びp38リン酸化を誘発し（補充図22g）、さらにTfr2^{-/-}及びWT骨芽細胞でSost mRNA発現を増加させた（Tfr2^{-/-}骨芽細胞で19倍、WT骨芽細胞で14倍（100nMアニソマイシン））（図14e）。同様に

、Tfr2^{-/-}マウスの3週間アニソマイシン処理は、スクレロステインの血清レベルを増加させ（図14f）、骨芽細胞数を減少させ（図14g）、骨体積をWTレベルにまで減少させた（図14h）。破骨細胞数はアニソマイシン処理で変化しなかった（補充図22h）。最後に、我々は、どの特異的MAPK経路、ERK又はp38がSost発現を調節するかを精査した。Mapk14（p38αをコードする）の過剰発現のみがTfr2^{-/-}骨芽細胞のSostレベル減少を回復させたが、Mapk1（ERK2をコードする）では回復されなかった（図20i-j）。したがって、Tfr2は、p38MAPKシグナリング経路を介してSost発現を誘発することによって骨質を制御する。

【0076】

Tfr2はBMPの新規な相互作用パートナーである：

最後に、我々は、どのようにしてTfr2はBMP-MAPKシグナル伝達障害を骨芽細胞で生じさせ得るのかを問い、それゆえ、Tfr2がBMP受容体として作用できるか否かを探索した。我々は、Tfr2の細胞外フラグメントを含むタンパク質フラグメント（Tfr2-ECD）を生成し（その存在はSDS-PAGE及びウェスタンブロットで確認された（補充図23a））、表面プラズモン共鳴（SPR）分析を実施した。センサーチップに固定されたTfr2-ECDは、ホロトランスフェリン（Tf）（ただ1つの公知のTfr2リガンド¹⁰）よりも強いアビジニティーでBMP-2、4、6及び7と結合した（図21a、補充図23b）。BMP-2、4、6及び7はまた、より低いレベルではあるがTfr2-ECDと高塩濃度（非特異的結合を減少させるために用いられた）で結合した（補充図23c）。Tfr2-BMP結合はさらにまた、BMP-2又はBMP-4をセンサーチップに固定し分析物としてTfr2-ECDを用いる逆のアプローチでも立証された（補充図23d-e）。このアプローチを用いて、我々は、定常状態分析を介して、Tfr2/BMP-2（488.0±37.0nM）及びTfr2-BMP-4（409.1±39.0nM）結合のK_d値を決定した。ホロ-TfはTfr2とマイクロモル濃度で結合し、K_d値はマイクロモル濃度範囲であることを示唆した（図23f）。ホロ-Tfの後でBMP2を、又はBMP-2の後でホロ-Tfを連続注入しても初期結合応答に変化がなかったため、ホロ-Tf及びBMP-2はTfr2結合について競合しなかった（補充図23g-h）。興味深いことに、BMP-2及びホロ-Tfの同時注入は、どちらかの分析物単独よりもはるかに強いTfr2との応答をもたらした（図15b）。BMPは、通常はI型及びII型BMPから成る受容体複合体を通してシグナルを発するので、我々は、BMPRがTfr2-ECDと結合するか否かを試験した。BMPR-IA及びBMPR-IIの両方がBMPよりも弱い結合応答を示した（図15a、補充図23i）。Tfr2とBMPR-IAとの物理的相互作用を、それらが両方とも過剰発現される細胞系でさらに精査した。それらの相互作用は共免疫沈降によって確認され、当該相互作用はBMP-2の存在によって影響されなかった（補充図23j）。BMP-2のTfr2-ECDとの結合はさらにまた、競合サンドイッチELISA（コントロールとしてBMPR-IAを使用）を用いて立証された（図15c）。追加のSPR実験は、BMPR-IAはTfr2とBMP-2結合について競合することを明らかにした（BMPR-IAの濃度を増加させながら添加したとき、BMP-2のTfr2-ECDとの結合は減少したからである（図15d））。特記すれば、高いナノモル濃度のBMPR-IAがTfr2/BMP-2との競合に必要であった。

我々は、異所性骨化モデルを用いてin vivoでのTfr2-ECDのBMPリガンド結合特性を立証した。このモデルでは、BMP-2がマウスの前脛骨筋に注射された（筋肉の骨化を生じる³²）。BMP-2単独はWTマウスで筋肉の異所性骨化を生じたが、Tfr2-ECDの添加はこの作用を完全に停止させ（図15e、補充図24a-b）、Tfr2はBMP-2と結合し、前記がその同族体BMPRと結合するのを防ぐことを示唆した。Tfr2^{-/-}マウスの同様な実験は、WTマウスと比較してBMP-2注射後の異所性骨化の増加を示し、これはTfr2-ECDの共同適用によって有意に抑制された（図15e、補充図25a-b）。したがって、Tfr2-ECDのin vivoにおける機能的なBMP-結合活性の確認に加えて、これらのデータは、BMP-依存状態における骨化の負の調節因子としてのTfr2の役割を強調する。

【0077】

Tfr2-ECDは2つの別個の前臨床モデルで異所性骨化を強力に阻害する：

BMP-2誘発異所性骨化を弱めるTfr2-ECDの強力な作用のために、我々はTfr2-ECDをパロバロテンと比較した。パロバロテンは、間接的にBMPシグナリングを阻害する選択的

10

20

30

40

50

レチノイン酸受容体- γ アゴニストであり³³、現在FOPの治療のために臨床的精査下にある。Tfr2-ECDは、筋肉内への単独局所治療として又は全身的治療（1日おきに腹腔内注射）として用いられた。両レジメンがWTマウスでBMP誘発異所性骨化を低下させ、2週間後に毎日パロパロテンを投与する場合と同様な有効性を示した（図15f）。WTマウスで8日目の異所性骨化の軟骨形成期の精査は、全身性Tfr2-ECD及びパロパロテン処置は両方とも軟骨細胞数及び軟骨生成を抑制することを明らかにした（補充図24c-d）。全身性Tfr2-ECD処置による副作用は、血液計測、鉄パラメータ、骨ホメオスタシス又は内部器官の肉眼的形態学で観察されなかった。最後に、外傷誘発異所性骨化（外傷、爆風による損傷又は股関節交換手術後の頻発する合併症）のモデルで、我々は両化合物を試験した。Tfr2-ECDの単一用量が、パロパロテンに匹敵する新規骨形成阻害を示した（図15g）。イブプロフェンの毎日の投与（股関節手術後に頻繁に行われる異所性骨化の治療³⁴）は、外傷誘発異所性骨化を予防しなかった（図15g）。これらのデータは、Tfr2-ECDは異所性骨化の強力な阻害剤であり、過剰な骨形成異常の治療のための潜在的な新規治療戦略であることを示している。

【0078】

考察

遺伝的に改変された一連のマウス及びin vitro解析を用いて、これらの研究は、骨芽細胞におけるBMP及びWntシグナリングの調整因子としてTfrの新規な役割を明らかにする。Tfr2は、BMPリガンド及び受容体と相互作用し、p38MAPKシグナリングを活性化し、Wnt阻害因子Sostの発現を誘発する。これは次々と進行してカノニカルWntシグナリングを遮断し、それによって骨形成及び骨質量増加を制限する（図14k）。さらにまた、おとり受容体の形でTfr2-ECDのBMP結合特性の利用は、異所性骨化の予防のための新規な治療戦略としての有望性を示す。前記戦略は、現在のところ先天的又は外傷誘発異所性骨化に対して具体的治療が存在しないので特に興味深い。

全身的鉄レベルの調節におけるその周知の機能⁶⁻⁹の他に、Tfr2は適切な赤血球生成を担保する^{8,22,23}。今や我々の研究は、Tfr2の新規な肝臓外の役割（骨芽細胞における直接的な作用を介する骨質量の制御）を明らかにした（ただし初期破骨細胞を含む骨髄系細胞における小さな作用は排除できない）。この役割は、他の鉄調節タンパク質の中ではとりわけTfr2の固有の特性であるように思われる。なぜならば、精査した他の全てのマウスヘモクロマトーシスモデルは低骨質量を示すからである。したがって、他のタンパク質は、HFE依存ヘモクロマトーシス³の患者並びにHfe-及びヘプシジン-欠乏マウス^{35,36}で低骨質量を示している。両症例で、骨形成抑制は低骨質量の主要な基本メカニズムと提唱された^{35,37}。しかしながら、Hfe-及びヘプシジン-欠乏マウスは両方とも鉄過負荷であるので、低骨質量が鉄過負荷の負の作用の間接的結果であるのか、又はHfe及びヘプシジンが骨細胞で直接的な作用を行使しているのかは不明である。重要な事に、Tfr2欠損マウスの高骨質量は鉄の状況及びTfr2の肝機能には左右されず、Tfr2は、骨芽細胞（すなわちマトリックス生成の制御）で及び肝細胞（すなわちヘプシジン発現及び全身的鉄ホメオスタシスの調節）で別個の役割を有することを示した。

Tfr2が15年にわたって鉄ホメオスタシスの調節因子として知られてきたとはいえ、その作用メカニズムは曖昧なままである。Tfr2欠損肝細胞におけるSmad1/5/8及びMAPK/ERKシグナリングレベルの低下は、BMPシグナリングが関与する可能性を示唆したが^{11,13,38}、Tfr2がどのようにしてBMPシグナリングを活性化するかは依然として不明であった。肝細胞における以前の研究は、Tfr2はHfe及びヘモジュベリンとの三重複合体を形成しヘプシジン発現を活性化することを示唆した¹²。しかしながら、我々のデータは、Tfr2はBMPと直接結合して下流のシグナリングを活性化できることを示すin vitro及びin vivoの証拠を提供する。BMP-2のTfr2との結合は、ホロ-Tf（Tfr2のための唯一の公知のリガンド¹⁰）のそれよりも10倍以上高かった。BMP-BMPR相互作用^{39,40}と比較して、BMP-Tfr2結合は顕著に低く、Tfr2はBMPシグナリングを微調整するために機能し得ることを示唆した。我々の研究はまたTfr2のBMPRとの直接的相互作用を示したので、Tfr2は、単独で又は複数の受容体によるBMPR及び/又は他のBMP共同受容体との複合体内でBMPと

結合するのか否かが精査されなければならない。Tfr2はBMP（共同）受容体であるという最初の指摘にもかかわらず、化学両論、受容体ダイマー化又はオリゴマー化の可能性、及びTfr2-ECD純度の説明となる正確な結合親和性を規定するために追加の実験が要求されるであろう。興味深いことに、ホロ-Tf及びBMP-2の組合せは、ホロ-Tf又はBMP-2のどちらか単独よりもはるかに高いアビジティでTfr2と結合し、ホロ-TfはBMPの存在下でのみ有意なTfr2結合を示し得ることを示唆した。このことは、肝内皮細胞はBMP-2及びBMP-6（ヘプシジン発現及び鉄ホメオスタシスを制御するために局所的に及び肝細胞で機能する^{41,42}）の主要な産生細胞と認定されているので特に重要であるかもしれない。ヘモジュベリンはBMP-6のシグナルを伝達してヘプシジン発現を調整すると認識されてきたが、一方、BMP-6はヘモジュベリンノックアウトマウスでなおヘプシジン発現を誘発することができ⁴³、他の受容体が関与しなければならないことが示唆された。したがって、新規に明らかにされたTfr2のBMP結合特性はBMPを介するヘプシジン調節のミッシングリンクであるかもしれない。

【0079】

我々の研究はさらにまた、BMP下流シグナリング（特にBMP-p38MAPK経路）はTfr2^{-/-}骨芽細胞で障害され、カノニカルWnt阻害因子Dkk1及びSostの発現低下をもたらすことを示した（前記因子は両方とも骨形成の強力な負の調節因子である⁴⁴⁻⁴⁶）。最近の研究により、BMP依存Smadシグナリングを活性化することによって、さらにDkk1の場合にはERK及びp38を介するMAPKシグナリングによってもまた、BMP-2はDkk1及びSostの発現を刺激することが示されている^{30,47}。より最近の研究（我々自身の研究を含む）は、Sost発現もまた骨芽細胞でp38MAPKシグナリングによって誘発されることを示す。したがって、アニソマイシン治療（3つのMAPKを全て活性化する⁴⁹）は、Tfr2^{-/-}マウスでSost発現をレスキューし骨質を回復させた。Tfr2^{-/-}マウスの表現型と同様でかつ骨芽細胞の骨形成におけるBMPシグナリングの支援的作用に対しては反直感的であるが、骨芽細胞のBmpr1a又はAcvr1の標的照準破壊はSostの発現を障害し高骨質を生じる^{47,50}。加えて、Bmpr1a欠損頭蓋冠の組換えスクレロステンのex vivo治療は正常な骨の形態を回復させ⁴⁷、Tfr2^{-/-}マウスのSOST過剰発現が骨体積をWTレベルにまで減少させたことと同様であった。しかしながら、Tfr2欠損マウスは、Bmpr1a欠損又はSost欠損マウスの骨格表現型を完全には表現型複製しない。骨芽細胞/骨細胞特異的ノックアウト株を考慮すれば、3つの遺伝子全ての欠失は高骨質をもたらす。しかしながら、Bmpr1a条件付けノックアウトマウスは低い骨代謝回転を有するが^{30,47,51}、Tfr2条件付けノックアウトマウスは高い骨形成速度及び正常な破骨細胞パラメータを有し、Sost条件付けノックアウトマウスは高い骨形成速度を有する⁵²。破骨細胞パラメータはSost条件付けノックアウトマウスでは報告されていないが、Sost^{-/-}マウスでは正常である⁴⁴。骨形成の増加は、Tfr2^{-/-}及びSost^{-/-}条件付けノックアウトマウスの高骨質の主要なメカニズムであるように思われるが、Bmpr1a^{-/-}条件付けノックアウトマウスの高骨質の主要な駆動因子は、骨芽細胞の低いRANKL対OPG比による破骨細胞形成の低下であるように思われる^{30,47}。このメカニズムは、Sostの過剰発現がBmpr1a条件付けノックアウトマウスで骨芽細胞表現型をレスキューしなかったため、Wntシグナリングに左右されないと報告された。対照的に、Tfr2^{-/-}マウスは、破骨細胞数の上昇及びRANKL対OPG比の増加を有するが（WT：0.225±0.046、Tfr2^{-/-}：0.696±0.120、n=4、p=0.0003）、Bmpr1a条件付けノックアウトマウスとは類似し、この表現型はSost過剰発現によってレスキューされなかった。興味深いことに、骨芽細胞におけるBmpr2の欠損は、高骨形成速度及び正常な骨再吸収を伴う高骨質を生じ⁵³、Tfr2はBmpr1aよりもBmpr2とより多くの類似性を共有することを示唆した。最後に、Bmpr1a条件付けノックアウトマウスは組織化不良の骨マトリックスを有し、骨強度の低下を生じた^{54,55}。これはTfr2^{-/-}及びSost^{-/-}マウスと対照的である（これらは両方とも正常な骨マトリックスの組織化及び骨強度の増加を有する⁴⁴）。総合すれば、類似性にもかかわらず（当該類似性は、Tfr2は同様な態様で又は場合によってBMPRと一緒に機能すると提唱する）、追加された経路は、BMPシグナリングに左右されずに骨においてTfr2の作用を媒介するように思われる。総合すれば、Tfr2は、骨芽細胞にお

10

20

30

40

50

るSost発現の明らかに重要な調節因子であり、BMPとWntシグナリングとの間のもう1つのつながりを提供する。

【0080】

最後に、我々は、BMPと結合しておとり受容体として機能し異所性骨化を減少させるTfr2-ECDの能力を2つの前臨床モデルで示す。異所性骨化は、爆風による損傷後（例えば兵士及び市民で見出される）、火災の犠牲者、及び全体的股関節体内プロテアーゼを受けた者の重篤かつ一般的な医療合併症である。股関節交換手術を受けた患者の最大30%及び重度負傷兵士の50%が異所性骨化を発症する^{56,57}。広範囲の異所性骨化はまた、FOP（BMP I型受容体ACVR1の活性化変異によって引き起こされるヒトの希少疾患²¹）の特徴である。この変異が識別されて以来、BMPシグナリングが異所性骨化の病理発生で示唆されてきた。今日まで、FOP及び外傷誘発異所性骨化のための治療選択肢は限られている。放射線照射及び非ステロイド性抗リウマチ薬が、外科手術誘発異所性骨化の抑制にしばしば用いられ、成功するか否かは様々である³⁴。我々の研究では、イブプロフェンは、異所性骨化を有意には減少させなかった。FOPでは、グルココルチコイドが再燃時の炎症の軽減に用いられる。しかしながら、それらは進行する骨化を遮らない。ラパマイシン、抗アクチビン抗体、及びパロパロテンが、FOPの前臨床モデルで異なるメカニズムを介して異所性骨化を減少させることが最近示された^{33,58-60}。パロパロテンは間接的にBMP経路と干渉し、現在のところ臨床的に精査されている唯一の薬である。Tfr2-ECDによる局所的及び全身的治療の両方が、パロパロテンと同様な程度で異所性骨化を阻害した。Tfr2-ECDによる全身的治療は2週間の治療期間内では鉄又は骨代謝において有害な作用を示さなかった。このことは、Tfr2 β （Tfr2-ECDと類似の構造を有する）を欠くマウスは脾臓の鉄レベルを増加させる⁸ので妥当なことであり、したがって鉄代謝における相違は予想され得ることであった。Tfr2-ECDの安全性プロフィールを結論付けるために、より長期でより範囲の広い薬理学的研究が将来要求される。

総合すれば、我々は、BMP-p38MAPK-Wntシグナリング軸の調整を介する新規な骨質量調節因子としてTfr2を見出し、異所性骨化及び骨過剰形成異常を治療する有望な治療選択肢としてTfr2-ECDを認定した。

【0081】

方法

マウス

Tfr2^{-/-}マウス及びTfr2ノックインマウス（Tfr2-KI）（Tfr2 β アイソフォームのみを欠く）の作製は以前に述べた⁸。条件付けTfr2ノックアウトマウスは、Tfr2-KIマウス（129X1/svJ）のバックグラウンドにより作製し、それによって細胞型特異的Tfr2 α ノックアウトマウス（Tfr2 β も全体的に欠く）を作製した。肝臓特異的Tfr2ノックアウトマウス（LCKO）はアルブミンcre（sv129バックグラウンド）を用いて作製した。骨芽細胞の前駆細胞でTfr2を欠失させるために、ドキシサイクリン-抑制性osterix-cre（OSX-cre）を用いた⁶¹。ペアを交配し、5週齢までマウスをドキシサイクリン（0.5 μ g/mL）で維持した。成熟骨芽細胞でのTfr2 α の欠失のためには、カテプシンK cre（Ctskcre）を用いた⁶²。リゾチームM（Lysm-cre）を初期破骨細胞でのTfr2欠失に用いた⁶³。Tfr2f/f;Ox-c re、Tfr2f/f;Lysm-cre、及びTfr2f/f;Ctsk-creは、混合sv129/C57BL/6バックグラウンドを土台にした。同腹仔をコントロールとして用いた。

ヒトスクレロステチンを過剰発現するTfr2-欠損マウスを得るために、Tfr2^{-/-}マウスをDmp1-SOSTトランスジェニックマウスと交配してTfr2^{-/-};Dmp1-SOST^{+tg}マウスを得た⁶⁴。点変異（C326S）を有するフェロポーチンノックインマウス及びHfeノックアウトマウスの作製は以前に述べた^{26,27}。標準的PCRプロトコールを用いて、全てのマウスの遺伝子型を日常的に判定した。

【0082】

in vivo実験

動物に関する全手順が、本院の動物管理委員会及びザクセン州管理局（Landes direktion Sachsen）に認可された。全てのマウスを標準的飼料で飼育し水は自由に摂取させ、

1ケージに5匹の動物のグループで維持した。マウスを12時間の明/暗サイクルの23℃に空調した部屋に置いた（指定病原体フリールームではない）。充実性は段ボール巣箱及び寝床素材の形で提供された。マウスを無作為に治療グループに分け、その後ブラインド態様で分析を実施した。

骨表現型決定：10–12週齢の雄及び雌のTfr2^{-/-}マウス及び野生型マウスを用いた。Tfr2^{-/-}マウスの特徴決定のためには、高齢マウス（6及び12ヶ月）もまた用いた。骨表現型分析のために、雄のTfr2^{f/f};Osx-cre及びTfr2^{f/f};Ctsk-cre並びに対応するcre陰性同腹仔コントロールを10–12週に犠牲にした。

卵巣摘出：11–14週齢の雌WT又はTfr2^{-/-}マウスで両側卵巣摘出術又は擬似手術を実施した。4週間後、マウスを更なる分析のために犠牲にした。各グループは510匹のマウスから成っていた。

鉄豊富飼料：WTマウスに離乳（14日齢）から犠牲にする（8週間の治療）まで2%鉄豊富標準飼料を与えた。4–5マウス/グループ。

鉄非含有飼料：雄のTfr2^{-/-}及びWTマウスに離乳から10週齢まで鉄非含有飼料（Envigo, Italy）を与えた。コントロールマウスには、食品1kg当たり0.2gの鉄を含む標準飼料（GLOBAL DIET 2018, Envigo, Italy）を与えた。9マウス/グループ。

鉄キレート：10週齢の雄Tfr2^{-/-}及びWTマウスに、毎日250mg/kgのDFO（Sigma, Germany（PBSに溶解））又はPBSの腹腔内注射を3週間実施した。この実験は3–5匹のマウスを用い別個に2回実施された。

完全骨髄移植：12週齢の雄Tfr2^{-/-}マウス又はWTコントロールマウスから骨髄細胞を単離した。雄の致死放射線照射（8Gy）WT又はTfr2^{-/-}マウスに、2百万個の細胞を後眼窩静脈叢注射によって移植した。移植効率は4週間毎にフローサイトメトリーを用いてモニターした。この実験は、それぞれ7–12マウス/グループで2回実施された。

アニソマイシン処置：11週齢の雌WT及びTfr2^{-/-}マウスを5mg/kgのアニソマイシン（i.p.）により3回/週で3週間処置した。この実験はそれぞれ5マウス/グループで2回実施された。

【0083】

異所性骨化（HO）：HOモデルをWoszczynaら³²にしたがって実施した。簡単に記せば、1mg/mLの組換えBMP-2（2.5 µL）（Thermo Fisher）又は1mg/mLのTfr2-ECD（2.5 µL）を47.5 µLのマトリゲル（BD Bioscience）と氷上で混合した。局所の組合せ処置のために、2.5 µLのBMP-2を2.5 µLのTfr2-ECD及び45 µLのマトリゲルと混合した。マトリゲル混合物を10週齢の雌WT及びTfr2欠損マウスの前脛骨筋に穏やかに注射した。以前に発表されたプロトコール⁵⁸を用いて経口胃管栄養法により、数匹のマウスを毎日パロパロテンで処置した。パロパロテン（Hycultec）はDMSOに溶解し、トウモロコシ油で1：4に希釈した。マウスには最初の5日間に100 µg/マウス、残りの実験で（6–14日目）50 µg/マウスの用量でパロパロテンを与えた。BMP-2注射から2週間後に、脚部を分析のために採集した。前記実験を3–11マウス/グループを用いて3回実施した。HOの軟骨発生期を分析するために、我々は8日目に終了する上記実験を実施した。前記実験を4–6マウス/グループを用いて1回実施した。

全身的Tfr2-ECD処置のために、WTマウスを1日おきに2週間Tfr2-ECDにより腹腔内処置した。マウスにはBMP2/マトリゲル筋肉注射後最初の10日間にTfr2-ECD 250 µg/注射（10mg/kg BW）を、残りの期間に125 µg/注射（5mg/kg BW）を投与した。前記実験を8–10マウス/グループで1回実施した。重量物落下HO：この実験は小さな変更を加えつつLiuらにしたがって実施した⁶⁵。10–12週齢の雌WTマウスを麻酔してプラスチック容器の隆起部に寝かせ、大腿部が水平に横たわるように当該隆起部上で右脚を曲げた。50 µLマトリゲルに混合した1 µgのBMP-2の注射をマウスに投与した。その後、16gステンレススチール球（直径16mm）を80cmの高さから大腿四頭筋上に落下させた。マウスには1 µgのTfr2-ECDの単一用量（BMP-2/マトリゲル混合物と共同注射）又はパロパロテン（Hycultec）（経口胃管栄養法によって毎日投与）を投与した。パロパロテンはDMSOに溶解し、トウモロコシ油で1：4に希釈した。パロパロテンを最初の5日間は100 µ

10

20

30

40

50

g/マウス、残りの実験中（621日間）は50 μ g/マウスの用量でマウスに投与した。1グループのマウスには100mg/mLの用量のイブuproフェンを飲み水で与え、飲み水は1日おきに交換した⁶⁶。痛みを緩和するために、メタミゾール（200mg/kg）を実験の全期間中マウスに投与した。前記実験を6マウス/グループで2回実施した。

【0084】

微細CT、骨微細石灰化密度、及びバイオメカニカルテスト

骨微細構造をvivaCT40（Scanco Medical, Switzerland）を用いて分析した。X線（70kVp、114mA及び200sの積分時間）を用い、10.5 μ mの解像度で大腿骨及び第四腰椎を画像化した。150スライスを用い成長板から下の骨幹端20スライスで大腿骨の小柱骨を評価した。椎骨では、両成長板の間で150スライスを測定した。皮質骨は大腿骨中央骨幹（150スライス）で決定した。業者（Scanco）の事前原稿を評価に用いた。

定量的後方散乱電子走査電子顕微鏡検査（qBSE-SEM）により骨微細石灰化密度を決定した。12週齢雄マウスの中性緩衝ホルマリン固定第四腰椎（L4）をメタクリレートに包埋した。標本を通して長軸方向のブロック面を切出し、続いてそれらを磨き、さらに高解像度のスパッタコーティング装置（Agar Scientific Stanstead UK）を用いて25nmの炭素でコーティングした。Deben 24mm 4四分儀反射検出装置（Deben, Bury St. Edmunds, UK）を搭載したTescan VEGA3 XMU（Tescan, Brno, Czech Republic）で、反射電子（20kV、0.4nA、作業ディスタンス0.17mm）を用いてサンプルを画像化した。ハロゲン添加ジメタクリレート標準物との比較によって骨微細石灰化密度を決定し、以前に記載されたように⁶⁷、8間隔擬似カラースキームを用いて微細石灰化度を表す。

大腿骨の三点曲げを実施して骨強度を評価した。大腿骨を70%エタノール中で保存し、試験前にPBS中で再水和した。Zwick社（Germany）のzwicki-Lineを用いてメカニカルテストを実施した。大腿骨骨幹部の前側に付加を適用して破断しない最大付加（Fmax, N）を測定した。

【0085】

骨の組織形態計測

犠牲にする5日及び2日前に、マウスに20mg/kgのカルセイン（Sigma）を注射した。以前に記載されたように、動的な骨の組織形態計測を実施した⁶⁸。簡単に記せば、第三腰椎及び脛骨を4%のPBS緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、さらにエタノール濃度上昇シリーズで脱水した。続いて、骨をメタクリレートに包埋し7 μ m切片に切出して蛍光カルセイン標識を評価した。蛍光顕微鏡を用いて非染色切片を分析して、石灰化表面/骨表面（MS/BS）、石灰化速度（MAR）、及び骨形成速度/骨表面（BFR/BS）を、骨体積/総体積（BV/TV）、小柱数（Tb.N）、小柱間隔（Tb.Sp）、及び小柱の太さ（Tb.Th）とともに決定した。

破骨細胞数の決定のために、大腿骨及び第四腰椎をOsteosoft（Merck）で1週間脱灰し、脱水してパラフィンに包埋した。酒石酸耐性ホスファターゼ（TRAP）染色を用いて、破骨細胞表面/骨表面（Oc.S/BS）を評価した。Osteomeasureソフトウェア（Osteometrics, USA）を国際標準にしたがって用い骨切片を分析した。

ヘマトキシリン/エオシン染色を用いてH0を評価するために、ふくらはぎ（H0）及び大腿（重量物落下）を脱灰し脱水してパラフィンに包埋した。四肢を2 μ mの切片に切出し、ヘマトキシリン/エオシンで染色した。フォンコッサ/ファンギエムソン染色及びサフラニノO染色のためには、脚を脱灰しないでメタクリレートに包埋し4 μ mの厚さの切片に切出した。

免疫組織化学

免疫組織化学分析のために、Wt及びTfr2^{-/-}骨のパラフィン切片を脱口ウし、再水和し、さらに抗原を加熱から回復させた。0.3% H₂O₂/PBSを室温で10分間用いて内因性ペルオキシダーゼ活性を遮断し、さらにVECTASTAIN Elite ABCキット（VECTOR Laboratories）の遮断緩衝液を室温で45分間用いて非特異的結合部位を遮断した。その後、抗Tfr2抗体（H-140, Santa Cruz）、 β -カテニン抗体（BD Bioscience）又はアキシン-2抗体（#ab107613, Abcam）とともに切片を4℃で一晩インキュベートした。続いて、スラ

イドをビオチン結合抗マウス二次抗体で処理し、続いてアビジン結合HRPを用い基質としてのジアミノベンジジン (DAKO) とともに反応させた。Zeiss Axio Imager M.1顕微鏡を用いてスライドを調べた。スライド当たり200個の細胞を数え、無染色 (0)、弱染色 (1)、及び強染色 (2) にしたがって等級付けした。

肝臓及び骨の鉄含有量の測定

以前に記載されたように⁸²、20mgの乾燥肝組織を用いて肝臓の鉄濃度を決定した。骨の鉄濃度は、以前に記載されたように⁶⁹、乾燥骨組織 (骨髄フラッシュ洗浄大腿骨及び脛骨) の原子吸光分光法 (PerkinElmer Analyst 800) を用いて決定した。

血清分析

骨代謝回転マーカー (C-末端テロペプチド (CTX) 及びプロコラーゲンI型N-末端ペプチド (P1NP)) は、ELISA (IDS, Germany) を用いて血清で測定した。血清dickkopf-1及びBMP-2は、R&Dシステム社 (Germany) のELISAを用いて測定した。マウススクレロスチンはAlpco (USA) のELISAを用いて測定した。血清フェリチンは、臨床分析の日常的方法を用い分析装置 (Roche Modular PPE analyzer) で測定した。トランスフェリン飽和は全鉄結合性能キット (Randox) を用いて決定した。

【0086】

初代破骨細胞培養

破骨細胞をWTマウスの骨髄から作製し、 1×10^6 細胞/cm²の密度で播種した。10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン及び25ng/mL M-CFS (いずれもLife Technologies) を含むAlpha-MEM (Biochrom, Germany) を分化の最初の2日間に用いた。その後、残りの培養 (5-7日間) のために、培地に30ng/mLのRANKL (Life Technologies) を補充した。種々の時点でRNAを単離し、成熟破骨細胞を免疫蛍光分析に用いた。

初代骨芽細胞培養

初代マウス骨芽細胞を、標準的な骨原性培地を用い10% FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM (Life Technologies) 中で骨髄から分化させた。種々の時点でRNAを単離し、7日目の骨芽細胞をTfr2の免疫蛍光分析及びディープシーケンシング分析に用いた。

シグナリング試験: 7日目分化細胞をBMP-2、BMP-4又はBMP-6で0、20及び40分間処理し、タンパク溶解緩衝液で溶解した (各々3nの少なくとも2つの別個の実験)。アニソマイシンを用い、7日目分化骨芽細胞でMAPKシグナリングを活性化した。その後のタンパク質分析のためには、細胞を100nMのアニソマイシンで20分間処理した。RNA単離及び遺伝子発現の検出のためには、細胞を種々の用量のアニソマイシンで24時間処理した (各々3nの少なくとも2つの別個の実験)。

過剰発現: マウスTfr2遺伝子を含む1µgのpcDNA3.1ベクターを、70-80%コンフルエント細胞にFugene HD (Roche) を用いてトランスフェクトした⁸。空のpcDNA3.1ベクターをコントロールとして用いた。加えて、過剰発現ベクター (pCMV6-MAPK1(ERK2)、pCMV6-MAPK14(p38α)、pCMV6-Smad1、及びpCMV6-Smad4) を業者 (Origen) から購入し対応するシグナリングタンパク質を過剰発現させた。pCMV6-空ベクターをコントロールとして用いた。4匹の異なるマウスの細胞を用い、各実験を1回実施した。

【0087】

RNA単離、RT及びリアルタイムPCR

細胞培養由来RNAは、High Pure RNA単離キット (Roche) を用いて単離し、マウスの骨由来RNAは、フラッシュ洗浄骨 (大腿骨及び脛骨) を液体窒素中で破碎しTrifast (Peqlab, Germany) 中に骨粉末を収集することによって単離した。他の器官は、ウルトラターラックス (IKA, Germany) を用いTrifast中で直接均質化した。500ngのRNAをSuperscript II (Invitrogen, Germany) を用いて逆転写し、続いて標準的プロトコール (Life Technologies) を用いるSYBRグリーン系リアルタイムPCRのために用いた。結果はΔΔCT方法を用いて計算し、βアクチン (又は表示されている場合にはGAPDH) mRNAに対してx倍増加で提示する。

タンパク質単離及びウェスタンブロット

20mM Tris/HCl (pH7.4)、1% SDS、及びプロテアーゼ阻害剤（コンプリートミニ、Roche, Germany）を含む緩衝液中で細胞を溶解した。組織からタンパク質を単離するために、Trifastによるタンパク質分画を用い、製造業者のプロトコールにしたがってさらに処理した。タンパク質濃度はBCAの方法（Pierce, Germany）を用いて決定した。20 μ gの熱変性タンパク質を10%ゲルにローディングして分離し、0.2 μ mのニトロセルロース膜（Whatman, Germany）に移行させた。1% Tween-20含有Tris緩衝生理食塩水（TBS-T）中で5%脱脂粉乳又は2%BSAを用い遮断した後、膜をシグナルタンパク質に対する一次抗体（Cell Signaling）とともに一晚インキュベートし、TBS-Tで3回洗浄した。Tfr2の検出のために、H-140抗体（Santa Cruz, Germany）を用いた（この抗体はアミノ酸531-670と一致するエピトープを検出する）。使用した他の抗体は以下であった：ラミンA/C（#sc-20681, Santa Cruz）、コネキシン-43（#3512, Cell Signaling）、チューブリン（#2146, Cell Signaling）、GAPDH（#5G4, Hytes）。その後、膜を適切なHPR結合二次抗体とともにRTで1時間インキュベートした。最後に、膜をTBS-Tで洗浄し、ECL基質（Thermo Fisher Scientific）とともにインキュベートした。MF-ChemiBIS 3.2バイオイメージング系（Biostep, Germany）を用いて、タンパク質を可視化した。

細胞内タンパク質分画

骨芽細胞の細胞質、膜及び核内タンパク質抽出物の分離のために、3匹のWTマウスの骨髄から初代マウス骨芽細胞を分化させた。7日目に、細胞を採集し、細胞内タンパク質分画キット（Thermo Fisher Scientific）を用い、製造業者の推奨にしたがって細胞内タンパク質画分を単離した。

免疫蛍光染色

免疫蛍光染色のために、ガラススライド上で細胞を増殖させた。所望の時点で、細胞を100%メタノールで15分間固定し、0.5% Triton X-100を10分間用いて透過性にし、3回洗浄した後で1%BSAを用いPBS中で遮断した。その後、細胞を抗マウスTfr2抗体（H-140, Santa Cruz）とともに一晚4°Cでインキュベートした。洗浄後、抗マウスオステリックス抗体（sc-393325, Santa Cruz）又はファロイジンを用いて細胞をRTで1時間染色した。その後、細胞を洗浄し、Alexa Fluor 488又はAlexa Fluor 594-標識二次抗体（Life Technologies）とともに1時間インキュベートし、洗浄してDAPIで5分間染色した。再び洗浄した後、ガラススライドをマウンティング培地（Dako）の小滴中に包埋した。Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡（Zeiss EC PlanNeofluar 40 x /1.3油浸）を用いて細胞を調べ、写真を撮影してZen 2009ソフトウェアで処理した。

共免疫沈降

7.5 μ gのpCMV-3XFLAG-BMPR-IA及び7.5 μ gのpcDNA3-TFR2-HA又はpcDNA3-LDLR-HAをヒトヘパトーマ細胞（HuH7）にトランスフェクトした。TransIT(商標)-LT1トランスフェクション試薬（Mirus Bio LLC）を製造業者のプロトコールにしたがって用いた。トランスフェクションから48時間後に、表示がある場合には、細胞を50ng/mLのBMP-2（Peprotech）で1.5時間処理した。細胞溶解物を、予め平衡化させた抗FLAGアフィニティゲル（Sigma Aldrich）とともに4°Cで2時間インキュベートした。続いてサンプルを50 μ Lの溶解緩衝液（300 μ g/mLの3X FLAGペプチド（Sigma Aldrich）を含む）を用いて溶出させた。全溶解物の10%をインプット（In）として用いた。免疫認識は、 α FLAG及び α HA抗体（1:1,000、Sigma Aldrich）を用いて可視化した。

【0088】

次世代シーケンシング及びデータ分析

Tfr2^{-/-}及びWTマウスの7日目分化細胞からTrifastを用いて全RNAを単離した。RNAの質をAgilentバイオアナライザーを用いて評価し、9以上の完全度数を有する全RNAを用いた。1 μ gの全RNAからmRNAを単離した。NEBNextポリ(A)mRNA磁性単離モジュールを製造業者の指示にしたがって用いた。化学的に断片化した後、サンプルを鎖特異的RNA-Seqライブラリー調製（Ultra Directional RNA Library Prep, NEB）に付した。アダプター（オリゴ1: 5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT-3'、オリゴ2: 5'-P-GAT CGG AAG AGC ACA CGT CTG AAC TCC AGT CAC-3'）の連結後、残

留オリゴをビーズ精製 (XP, Beckman Coulter) によって枯渇させた。その後のPCR増幅中に(15サイクル)、ライブラリーにインデックスを付した (プライマー1: オリゴ_Seq AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T、プライマー2: GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC T、プライマー3: CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT NNNNNN GTG ACT GGA G TT)。最後の精製 (XPビーズ) の後で、ライブラリーを定量し (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen)、等モルずつプールし、Illumina HiSeq 2500及びIllumina NextSeq 500の複数のレーンに75bpシングルリードシーケンシングのために分配した。

配列決定後、FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/>)を基本的品質管理のために用いた。続いてリードをマウスゲノム(mm10)上にマッピングした。サポートとして公知のスプライス部位 (Ensembl v75) と一緒にGSNAP (バージョン2014-12-17)を用いた。ライブラリー多様性は、マッピングされたリードの重複性を精査することによって評価した。遺伝子当たりのカウントに関する表は、Ensembl v75の遺伝子注釈を用い、固有マッピングされたリードでfeatureCounts (v1.4.6) を実行することによって入手した。ライブラリーサイズ及びKOとWTとの間の弁別発現の試験に基づく生リードカウントの正規化は、RパッケージDESeq2 (v1.6.3)を用いて実施した。0.05未満の調整 (Benjamini-Hochberg) p-値を有する遺伝子を弁別的発現とみなした。

遺伝子オントロジー分析はCytoscape 3.2.1及びClueGO pluginを用いて実施した。有意 ($p < 0.05$) にアップレギュレート又はダウンレギュレートした遺伝子のみを分析に加えた。Broad Institute GSEAソフトウェア、“GseaPreRanked”ツール (nperm=1000、set_min=5、set_max=500、scoring_scheme=weighted) を用いて遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA) を実施し、Tfr2^{-/-}及びWT条件間で発現にlog2倍変化があることによって等級付けされた18,106の非重複性遺伝子記号のリストを分析した。合計58遺伝子セットが分析に用いられた。このセットには50のホールマーク遺伝子セット、3つの骨芽細胞特異的遺伝子セット (Park et al.及びZaidi et al.) 及び5つの他の遺伝子セット (Sanjuan-Pla et al) が含まれる⁷⁰⁻⁷²。

【0089】

Tfr2細胞外ドメインの発現

マウスTfr2の完全長細胞外ドメイン (ECD、aa 103-798) のコード配列をGenscript (Germany) によって合成した。His-MBP-c3-Tfr2-ECDをSf9昆虫細胞でバキュロウイルス発現系 (pOCC211-Tfr2-ECD) を用いて発現させた。培養上清 (5リットル) を採集し、ろ過し、HisTrapカラムにローディングし、十分にPBSで洗浄した後、250mMイミダゾールとともにPBSを用いてTfr2-ECDタンパク質を溶出させた。1回目のタンパク質生成の収量は40mgであり、2回目は46mgのTfr2-ECDであった。Tfr2の存在は、還元条件下のSDS-PAGEのクマシー染色及びウェスタンブロットを用いて分析した。

商業的に製造されたTfr2-ECD (Cusabio) を用いて実験を繰返した。このフラグメントもまた完全なECD (aa 103-798) を含み、PBSだけで溶解させた。

表面プラズモン共鳴結合及びカイネティクス分析

Tfr2-ECDとホロ-Tf、BMPリガンド (BMP-2、-4、-6、-7、R&D Systems) 及びBMP受容体 (BMPRII、BMPRII、R&D Systems) との相互作用は、Biacore T100装置 (GE Healthcare) を用いて分析した。Tfr2-ECD、BMP-2及びBMP-4をそのアミン基を介して25°Cで、シリーズSセンサーチップC1 (GE Healthcare) に固定した。196mM 1-エチル-3-(3ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド及び50mM N-ヒドロキシスクシンイミドを含む混合物 (流速10µL/分) を用いて、チップ表面のヒドロキシル基を7分間活性化した。次に、5µg/mLのTfr2-ECD (酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で希釈) 又は2µg/mLのBMP-2若しくはBMP-4を5µL/分の流速で、約200RU (Tfr2-ECDの場合) 又は100RU (BMP-2及びBMP-4の場合) の固定化レベルに達するまで注入した。未反応基を1Mのエタノールアミン-HCl (pH7.5) の注入 (7分間、10µL/分) により脱活性化した。参照表面は、Tfr2注入を除いて同じプロトコールにより作製した。

結合分析は30µL/分の流速で37°Cで実施した。各分析物を泳動緩衝液 (50nM FeCl₃

10

20

30

40

50

補充HBS-P (pH7.4)、150mM NaCl) で希釈した。いくつかの実験では、500mMのNaClを用いて潜在的な非特異的結合を減少させた。BMPリガンドは表示の濃度で(0–50nM)で、BMP受容体は2–200nMで、ホロ-Tfは2.5–100μMで、Tfr2-ECDは10–5,000nMで用いた。いくつかの実験では、BMP-2/BMPR-IA及びBMP-2/ホロ-Tfを同じ時に注入した。ホロ-Tfの濃度依存結合は中間の再生無しに実施した。

結合分析のために、Tfr2-ECD上の40秒又は300秒の分析物注入の後に1000sの解離が続いた。結合レベル値は、基線応答に対比して注入終了10秒前の参照シグナルから記録した。続いて、それらに対応する分子量に対して修正した。1000秒の解離後に、チップ表面を5M NaCl、50mM NaOHを用いてHBS-P中で60秒再生し、その後1000秒の安定化時間を置いた。

5つの連続分析物注入を伴う一サイクルカインेटクスを感度増強Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて実施し、ホロ-Tf/Tfr2のK_d値範囲、並びにBMP-2及びBMP-4表面とのTfr2結合の解離速度K_{off} (複合体安定性) を決定した。カインेटクスフィッティングは、1:1ラングミュア結合モデル (A+B=AB) を用いグローバルフィッティングによって実施した。定常状態分析を実施して親和性 (K_d) を決定した。したがって、Tfr2とBMP-2又はBMP-4との1:1相互作用は、測定された平衡結合応答を濃度に対してフィッティングすることによって想定された。プロットの強力な適合及び典型的な曲率を達成するために、広範囲のTfr2濃度を分析した (10–5000M)。結合パラメータ及びカインेटクスパラメータは、Biacore™ T200評価ソフトウェア3.1を用いて評価した。

BMP-2競合ELISA

Duo Set BMP-2 ELISAキット (R&D Systems) を用いた。BMP-2捕捉抗体でプレートを一晩被覆した後、濃度が増加するTfr2-ECD又はBMPR-IA (陽性コントロール、R&D Systems) と一緒に1.5ng/ml BMP-2を添加した。RTで1時間インキュベートし十分に洗浄した後、製造業者のプロトコールにしたがって検出抗体を添加してBMP-2の量を定量した。前記実験を別個に少なくとも3回実施した。

統計分析

データは平均±標準偏差 (SD) として提示する。グラフ及び統計はGraphpad Prism 6.0ソフトウェアを用いて調製した。データの正規性はコルモゴロフ-スミルノフ検定を用いて決定した。データが正規分布である場合、2グループ比較の統計評価は両側スチューデントt-検定を用いて実施した。3つ以上のグループの実験には一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。遺伝子型と治療効果の分析には、ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置ANOVAを用いた。データが正規分ではない場合、マン-ホイットニー検定及びウィルコクソンの符号順位検定を用いてデータを分析した。qBSE-SEMグレースケール画像の微小石灰化密度の頻度分布はコルモゴロフ-スミルノフ検定を用いて比較した⁶⁷。

【0090】

参考文献

10

20

30

40

50

参考文献

- 1 Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W. & Galy, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* **168**, 344-361, doi:10.1016/j.cell.2016.12.034 (2017).
- 2 Imel, E. A. *et al.* Serum fibroblast growth factor 23, serum iron and bone mineral density in premenopausal women. *Bone* **86**, 98-105, doi:10.1016/j.bone.2016.03.005 (2016).
- 3 Guggenbuhl, P. *et al.* Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **16**, 1809-1814, doi:10.1007/s00198-005-1934-0 (2005). 10
- 4 Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090-2093, doi:10.1126/science.1104742 (2004).
- 5 Powell, L. W., Seckington, R. C. & Deugnier, Y. Haemochromatosis. *Lancet* **388**, 706716, doi:10.1016/S0140-6736(15)01315-X (2016). 20
- 6 Camaschella, C. *et al.* The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nature genetics* **25**, 14-15, doi:10.1038/75534 (2000).
- 7 Fleming, R. E. *et al.* Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

30

40

50

- United States of America* **99**, 10653-10658, doi:10.1073/pnas.162360699 (2002).
- 8 Forejtnikova, H. *et al.* Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood* **116**, 5357-5367, doi:10.1182/blood-2010-04-281360 (2010).
- 9 Wallace, D. F., Summerville, L., Lusby, P. E. & Subramaniam, V. N. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut* **54**, 980-986, doi:10.1136/gut.2004.062018 (2005).
- 10 Johnson, M. B. & Enns, C. A. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* **104**, 4287-4293, doi:10.1182/blood-2004-06-2477 (2004).
- 11 Poli, M. *et al.* Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* **95**, 1832-1840, doi:10.3324/haematol.2010.027003 (2010).
- 12 D'Alessio, F., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *Journal of hepatology* **57**, 1052-1060, doi:10.1016/j.jhep.2012.06.015 (2012).
- 13 Wallace, D. F. *et al.* Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology* **50**, 1992-2000, doi:10.1002/hep.23198 (2009).
- 14 Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & development* **10**, 1580-1594 (1996).
- 15 Andriopoulos, B., Jr. *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nature genetics* **41**, 482-487, doi:10.1038/ng.335 (2009).
- 16 Babbitt, J. L. *et al.* Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics* **38**, 531-539, doi:10.1038/ng1777 (2006).
- 17 Mayeur, C., Leyton, P. A., Kolodziej, S. A., Yu, B. & Bloch, K. D. BMP type II receptors have redundant roles in the regulation of hepatic hepcidin gene expression and iron metabolism. *Blood* **124**, 2116-2123, doi:10.1182/blood-2014-04-572644 (2014).
- 18 Steinbicker, A. U. *et al.* Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* **118**, 4224-4230, doi:10.1182/blood-2011-03339952 (2011).
- 19 Wang, R. H. *et al.* A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism* **2**, 399-409, doi:10.1016/j.cmet.2005.10.010 (2005).
- 20 Yu, P. B. *et al.* Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron

10

20

30

40

50

- metabolism. *Nature chemical biology* **4**, 33-41, doi:10.1038/nchembio.2007.54 (2008).
- 21 Shore, E. M. *et al.* A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nature genetics* **38**, 525-527, doi:10.1038/ng1783 (2006).
- 22 Wallace, D. F. *et al.* A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction. *British journal of haematology* **168**, 891-901, doi:10.1111/bjh.13225 (2015).
- 23 Nai, A. *et al.* The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by *Tmprss6* inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. *Haematologica* **99**, 1016-1021, doi:10.3324/haematol.2013.103143 (2014).
- 24 Urist, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899 (1965).
- 25 Roetto, A. *et al.* Comparison of 3 *Tfr2*-deficient murine models suggests distinct functions for *Tfr2*-alpha and *Tfr2*-beta isoforms in different tissues. *Blood* **115**, 3382-3389, doi:10.1182/blood-2009-09-240960 (2010).
- 26 Herrmann, T. *et al.* Iron overload in adult *Hfe*-deficient mice independent of changes in the steady-state expression of the duodenal iron transporters *DMT1* and *Ireg1/ferroportin*. *Journal of molecular medicine* **82**, 39-48, doi:10.1007/s00109-003-0508-x (2004).
- 27 Altamura, S. *et al.* Resistance of ferroportin to hepcidin binding causes exocrine pancreatic failure and fatal iron overload. *Cell metabolism* **20**, 359-367, doi:10.1016/j.cmet.2014.07.007 (2014).
- 28 Tsay, J. *et al.* Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood* **116**, 2582-2589, doi:10.1182/blood-2009-12-260083 (2010).
- 29 Rishi, G., Secondes, E. S., Wallace, D. F. & Subramaniam, V. N. Normal systemic iron homeostasis in mice with macrophage-specific deletion of transferrin receptor 2. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **310**, G171-180, doi:10.1152/ajpgi.00291.2015 (2016).
- 30 Kamiya, N. *et al.* Wnt inhibitors *Dkk1* and *Sost* are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (*BMPRIA*) in osteoblasts. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **25**, 200-210, doi:10.1359/jbmr.090806 (2010).
- 31 Simsek Kiper, P. O. *et al.* Cortical-Bone Fragility--Insights from *sFRP4* Deficiency in Pyle's Disease. *The New England journal of medicine* **374**, 2553-2562, doi:10.1056/NEJMoa1509342 (2016).
- 32 Wosczyzna, M. N., Biswas, A. A., Cogswell, C. A. & Goldhamer, D. J. Multipotent

10

20

30

40

50

- progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **27**, 1004-1017, doi:10.1002/jbmr.1562 (2012).
- 33 Shimono, K. *et al.* Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-gamma agonists. *Nature medicine* **17**, 454-460, doi:10.1038/nm.2334 (2011). 34
- Fransen, M. *et al.* Safety and efficacy of routine postoperative ibuprofen for pain and disability related to ectopic bone formation after hip replacement surgery (HIPAID): randomised controlled trial. *Bmj* **333**, 519, doi:10.1136/bmj.38925.471146.4F (2006). 10
- 35 Shen, G. S. *et al.* Hepcidin1 knockout mice display defects in bone microarchitecture and changes of bone formation markers. *Calcified tissue international* **94**, 632-639, doi:10.1007/s00223-014-9845-8 (2014).
- 36 Guggenbuhl, P. *et al.* Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **22**, 2313-2319, doi:10.1007/s00198-010-1456-2 (2011). 20
- 37 Doyard, M. *et al.* Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. *PloS one* **11**, e0148292, doi:10.1371/journal.pone.0148292 (2016).
- 38 Calzolari, A. *et al.* Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *Journal of cell science* **119**, 4486-4498, doi:10.1242/jcs.03228 (2006).
- 39 Keller, S., Nickel, J., Zhang, J. L., Sebald, W. & Mueller, T. D. Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor 1A. *Nature structural & molecular biology* **11**, 481-488, doi:10.1038/nsmb756 (2004). 30
- 40 Yin, H., Yeh, L. C., Hinck, A. P. & Lee, J. C. Characterization of ligand-binding properties of the human BMP type II receptor extracellular domain. *Journal of molecular biology* **378**, 191203, doi:10.1016/j.jmb.2008.02.031 (2008).
- 41 Canali, S., Wang, C. Y., Zumbrennen-Bullough, K. B., Bayer, A. & Babitt, J. L. Bone morphogenetic protein 2 controls iron homeostasis in mice independent of Bmp6. *American journal of hematology*, doi:10.1002/ajh.24888 (2017).
- 42 Koch, P. S. *et al.* Angiocrine Bmp2 signaling in murine liver controls normal iron homeostasis. *Blood* **129**, 415-419, doi:10.1182/blood-2016-07-729822 (2017). 40

- 43 Ramos, E. *et al.* Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* **53**, 1333-1341, doi:10.1002/hep.24178 (2011). 44
- Li, X. *et al.* Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **23**, 860-869, doi:10.1359/jbmr.080216 (2008).
- 45 MacDonald, B. T. *et al.* Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone* **41**, 331-339, doi:10.1016/j.bone.2007.05.009 (2007). 10
- 46 van Bezooijen, R. L. *et al.* Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* **199**, 805-814, doi:10.1084/jem.20031454 (2004).
- 47 Kamiya, N. *et al.* BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development* **135**, 3801-3811, doi:10.1242/dev.025825 (2008).
- 48 Yu, C. *et al.* Advanced oxidation protein products induce apoptosis, and upregulate sclerostin and RANKL expression, in osteocytic MLO-Y4 cells via JNK/p38 MAPK activation. *Molecular medicine reports* **15**, 543-550, doi:10.3892/mmr.2016.6047 (2017). 20
- 49 Croons, V., Martinet, W., Herman, A. G., Timmermans, J. P. & De Meyer, G. R. The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**, 856-864, doi:10.1124/jpet.108.149948 (2009).
- 50 Kamiya, N., Kaartinen, V. M. & Mishina, Y. Loss-of-function of ACVR1 in osteoblasts increases bone mass and activates canonical Wnt signaling through suppression of Wnt inhibitors SOST and DKK1. *Biochemical and biophysical research communications* **414**, 326330, doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.060 (2011). 30
- 51 Biswas, S. *et al.* BMPRIA is required for osteogenic differentiation and RANKL expression in adult bone marrow mesenchymal stromal cells. *Scientific reports* **8**, 8475, doi:10.1038/s41598-018-26820-8 (2018).
- 52 Witcher, P. C. *et al.* Sclerostin neutralization unleashes the osteoanabolic effects of Dkk1 inhibition. *JCI insight* **3**, doi:10.1172/jci.insight.98673 (2018).
- 53 Lowery, J. W. *et al.* Loss of BMPR2 leads to high bone mass due to increased osteoblast activity. *Journal of cell science* **128**, 1308-1315, doi:10.1242/jcs.156737 (2015). 40

- 54 Bao, Q. *et al.* Disruption of bone morphogenetic protein type IA receptor in osteoblasts impairs bone quality and bone strength in mice. *Cell and tissue research*, doi:10.1007/s00441018-2873-3 (2018).
- 55 Zhang, Y. *et al.* Loss of BMP signaling through BMPR1A in osteoblasts leads to greater collagen cross-link maturation and material-level mechanical properties in mouse femoral trabecular compartments. *Bone* **88**, 74-84, doi:10.1016/j.bone.2016.04.022 (2016).
- 56 Forsberg, J. A. *et al.* Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **91**, 10841091, doi:10.2106/JBJS.H.00792 (2009). 10
- 57 Regis, D., Sandri, A. & Sambugaro, E. Incidence of heterotopic ossification after surface and conventional total hip arthroplasty: a comparative study using anterolateral approach and indomethacin prophylaxis. *BioMed research international* **2013**, 293528, doi:10.1155/2013/293528 (2013).
- 58 Chakkalakal, S. A. *et al.* Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice With the Human ACVR1(R206H) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **31**, 1666-1675, doi:10.1002/jbmr.2820 (2016). 20
- 59 Agarwal, S. *et al.* mTOR inhibition and BMP signaling act synergistically to reduce muscle fibrosis and improve myofiber regeneration. *JCI insight* **1**, e89805, doi:10.1172/jci.insight.89805 (2016).
- 60 Hino, K. *et al.* Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *The Journal of clinical investigation* **127**, 3339-3352, doi:10.1172/JCI93521 (2017).
- 61 Rodda, S. J. & McMahon, A. P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* **133**, 3231-3244, doi:10.1242/dev.02480 (2006). 30
- 62 Nakamura, T. *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* **130**, 811-823, doi:10.1016/j.cell.2007.07.025 (2007). 63
 Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Forster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* **8**, 265277 (1999).
- 64 Rhee, Y. *et al.* PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of*

- the American Society for Bone and Mineral Research **26**, 1035-1046, doi:10.1002/jbmr.304 (2011).
- 65 Liu, X. *et al.* A novel mouse model of trauma induced heterotopic ossification. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **32**, 183-188, doi:10.1002/jor.22500 (2014).
- 66 Norden, D. M. *et al.* Ibuprofen ameliorates fatigue- and depressive-like behavior in tumor-bearing mice. *Life sciences* **143**, 65-70, doi:10.1016/j.lfs.2015.10.020 (2015). 10
- 67 Bassett, J. H. *et al.* Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7604-7609, doi:10.1073/pnas.0911346107 (2010).
- 68 Rauner, M. *et al.* Increased EPO Levels Are Associated With Bone Loss in Mice Lacking PHD2 in EPO-Producing Cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **31**, 1877-1887, doi:10.1002/jbmr.2857 (2016).
- 69 Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nature medicine* **22**, 945-951, doi:10.1038/nm.4146 (2016). 20
- 70 Sanjuan-Pla, A. *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232-236, doi:10.1038/nature12495 (2013).
- 71 Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics* **34**, 267-273, doi:10.1038/ng1180 (2003).
- 72 Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005). 30

他の引用非特許文献

- Shore EM, Kaplan FS (2008) Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva(FOP). *Bone* 43: 427-433.
- Kölbl O, Barthel T, Krödel A, Seegenschmiedt MH (2003) *Prävention von heterotopen Ossifikationen nach Totalendoprothese des Hüftgelenks* [Prevention of heterotopic

ossification following total replacement of the hip joint]. *Deutsches Ärzteblatt* [German medical journal] 45: 2944-2954. Baschant U, Sastre EA, Roetto A, Platzbecker U, Hofbauer LC, Rauner M (2017) P-OCBR-7: The iron-sensing receptor Tfr2 regulates osteoclastogenesis. Abstracts of the ECTS congress 2017. ECTS 2017. 13-16 May 2017, Salzburg, Austria. 44th European Calcified Tissue Society Congress: Page 43.

- Roetto, A. et al. Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues. *Blood* 115, 33823389, doi:10.1182/blood-2009-09-240960 (2010).
- Wosczyzna MW, Biswas AA, Cogswell CA, and Goldhamer DJ (2012) Multipotent Progenitors Resident in the Skeletal Muscle Interstitium Exhibit Robust BMP-Dependent Osteogenic Activity and Mediate Heterotopic Ossification. *J Bone Miner Res* 27: 1004-1017.

10

【 0 0 9 1 】

表 1：引用記号リスト

20

- 1. BMP
- 2. BMP-I
- 3. BMP-II
- 4. Tfr2 α
- 5. タンパク質
- 6. Smadタンパク質
- 7. MAPキナーゼ
- 8. リン酸化
- 9. 骨芽細胞遺伝子
- 10. 骨形成
- 11. 捕捉抗体
- 12. 検出抗体

30

【 0 0 9 2 】

表 2：配列

40

50

配列番号	
1	ヒト Tfr2-ECD アミノ酸配列
2	マウス Tfr2-ECD アミノ酸配列
3	ヒト Tfr2a アミノ酸配列
4	マウス Tfr2a アミノ酸配列
5	ヒト Tfr2 プロテアーゼ会合 (PA) ドメインアミノ酸配列
6	ヒトペプチダーゼ M28 ドメインアミノ酸配列
7	ヒト Tfr-様ダイマー化ドメインアミノ酸配列
8	ヒト Tfr2 ヌクレオチド配列
9	マウス Tfr2 ヌクレオチド配列
10	ヒト Tfr2-his アミノ酸配列
11	ヒト Tfr2-Fc (N-末端融合、すなわち Tfr2-ECD の N-末端側 Fc 融合) アミノ酸配列
12	ヒト Tfr2 (C-末端融合) アミノ酸配列

【0093】

タンパク質配列

ヒトTfr2a (配列番号:3)

MERLWGLFQRAQQLSPRSSQTVYQRVEGPRKGHLEEEEDGEEGAETLAHFCEMELRGP
 EP
 LGSRPRQPNLIPWAAAGRRAPYLVLTAALLIFTGAFLGKYVAFRGSCQACGDSVLVVS
 EDVNYE
 PDLDFHQGRLYWSDLQAMFLQFLGEGRLDTIRQTSRERVAGSAGMAALTQDIRAALS
 RQKL
 DHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQLPLEDPDVYCPYSAIGNVTGELV
 YAHY
 GRPEDLQDLRARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNAQDFGAQGVLITYPEPADFSQDPPK
 PSL
 SSQQAVYGHVHLGTGDPYTPGFPSFNQTQFPPVASSGLPSIPAQPISADIASRLLRKLKGP
 VAP
 QEWQGSLLGSPYHLGPGPRLRLVNNHRTSTPINNIFGCIEGRSEPDHYVVIGAQRDAWG
 PGA
 AKSAVGTAILELVRTFSSMVSNGRPRRSLLFISWDGGDFGSGSTEWLEGYLSVLHLK
 AVVY
 VSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLSLIESVLKQVDSPNHSGQTLYEQVVFTNPSWDAEVIRP
 LPMD
 SSAYSFTAFVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYENLHKVLQGRLPAVAQAVAQLAG
 QLLI
 RLSHDRLLPLDFGRYGDVVLRLHIGNLNEFSGLKARGTLQWVYSARGDYIRAAEKLRQE
 IYSS
 EERDERLTRMYNVRIMRVEFYFLSQYVSPADSPFRHIFMGRGDHTLGALLDHLRLRLSNS
 SGT

PGATSSTGFQESRFRRQLALLTWTLQGAANALSGDVWNIDNNF

ヒトTfr2b=Tfr2-ECD (配列番号:1)

RGSCQACGDSVLVSEDEVNYEPDLDFHQGRLYWSDLQAMFLQFLGEGRLEDTIRQTSR
ERV
AGSAGMAALTQDIRAALSQRKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQL
PLED
PDVYCPYSAIGNVTGELVYAHYGRPEDLQDLRARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNA
QDFG
AQGVLIYPEPADFSQDPPKPSLSSQQAVYGHVHLGTGDPYTPGFPSFNQTQFPPVASSGL
PSI
PAQPISADIASRLLRKLKGPVAPQEWQGSLLGSPYHLGPGPRLRLVVNNHRTSTPINNIFG
CIEG
RSEPDHYVVIGAQRDAWGPGAAKSAVGTAILELVRTFSSMVSNGFRPRRSLLFISWDGG
DFG
SVGSTEWLEGYLSVLHLKAVVYVSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLTSLIESVLKQVDSPNHS
GQTL
YEQVVFTNPSWDAEVIRPLPMDSSAYSFTA FVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYE
NLHK
VLQGRLPABAQAVAQLAGQLLIRLSHDRLPLDFGRYGDVVLRHIGNLNEFSGDLKARGL
TLQ
WVYSARGDYIRAAEKL RQEIYSSEERDERLTRMYNVRIMRVEFYFLSQYVSPADSPFRHIF
MG
RGDHTLGALLDHLRLRLSNSSGTPGATSSTGFQESRFRRQLALLTWTLQGAANALSGDV
WNID NNF

マウスTfr2a (配列番号:4)

MEQRWGLLRVQQWSPRPSQTIYRRVEGPQLEHLEEDREEGAELPAQFCPMELKGPEH
LG
SCPGRSIPIPWAAAGRKAAPYLVLLITLLIFTGAFLG YVAFRGSCQACGDSVLVDEDEVNP
EDSG
RTTLYWSDLQAMFLRFLGEGRMEDTIRLTSLRERVAGSARMATLVQDILDKLSRQKLDH
VWTD
THYVGLQFPDPAHANTLHWVDADGSVQEQLPLEDPEVYCPYSATGNATGKLVYAHYGR
SEDL
QDLKAKGVELAGSLLLVRVGITSFAQKVAVAQDFGAQGVLIYPDPSPDFSQDPHKPGLSSH
QAV
YGHVHLGTGDPYTPGFPSFNQTQFPPVESSGLPSIPAQPISADIADQLLRKLTGPVAPQE
WKG
HLSGSPYRLGPGPDLRLVVNNHRVSTPISNIFACIEGFAEPDHYVVIGAQRDAWGPGA
AK
SAV
GTAILLELVRTFSSMVSNGFRPRRSLLFISWDGGDFGSGATEWLEGYLSVLHLKAVVYV
SLDN
SVLGDGKFHAKTSPLLVS LIENILKQVDSPNHSGQTLYEQVALTHPSWDAEVIQPLPMDS
SAYS
FTAFAGVPAVEFSFMEDDRVYPFLHTKEDTYENLHKMLRGRLPVVQAVAQLAGQLLIR
LSHD
HLLPLDFGRYGDVVL RHIGNLNEFSGDLKERGLTLQWVYSARGDYIRAAEKL RKEIYSSE
RNDE
RLMRMYNVRIMRVEFYFLSQYVSPADSPFRHIFLGQGDHTLGALVDHLRMLRADGSGAA
SSRL
TAGLGFQESRFRRQLALLTWTLQGAANALSGDVWNIDNNF

10

20

30

40

50

マウスTfr2-ECD (配列番号:2)

RGSCQACGDSVLVDEDEVNPEDSGRTTLYWSDLQAMFLRFLGEGRMEDTIRLTSLRERV
AGS
ARMATLVQDILDKLSRQKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHANTLHWVDADGSVQEQLPLE
DPEV
YCPYSATGNATGKLVYAHYGRSEDLQDLKAKGVELAGSLLLVRVGITSFAQKVAVAQDFG
AQG
VLIYPDPSPDFSQDPHKPGLSSHQAVYGHVHLGTGDPYTPGFPSFNQTQFPPVESSGLPSI
PAQ
PISADIADQLLRKLTGPVAPQEWKGHLGSPYRLGPGPDLRLVVNNHRVSTPISNIFACIE
GFAE
PDHYVVIGAQRDAWGPGAASAVGTAILLELVRTFSSMVSNGFRPRRSLLFISWDGGDFG
SVG
ATEWLEGYLSVLHLKAVVYVSLDNSVLGDGKFHAKTSPLLVS LIENILKQVDSPNHSGQT
LYEQ
VALTHPSWDAEVIQPLPMDSSAYSFTAFAGVPAVEFSFMEDDRVYPFLHTKEDTYENLH
KMLR
GRLPAAVVQAVAQLAGQLLIRLSHDHLLPLDFGRYGDVVL RHIGNLNEFSGDLKERGLTLQ
WVY
SARGDYIRAAEKL RKEIYSSERNDERLMRMYNVRIMRVEFYFLSQYVSPADSPFRHIFLGQ
GDH
TLGALVDHLRMLRADGSGAASSRLTAGLGFQESRFRRQLALLTWTLQGAANALSGDVWN
IDNNF

10

20

ヒトTfr2プロテアーゼ会合 (PA) ドメインアミノ酸配列 (配列番号:5)

Tyr Cys Pro Tyr Ser Ala Ile Gly Asn Val Thr Gly Glu Leu Val Tyr
Ala His Tyr Gly Arg Pro Glu Asp Leu Gln Asp Leu Arg Ala Arg Gly
Val Asp Pro Val Gly Arg Leu Leu Leu Val Arg Val Gly Val Ile Ser
Phe Ala Gln Lys Val Thr Asn Ala Gln Asp Phe Gly Ala Gln Gly Val
Leu Ile Tyr Pro Glu Pro Ala Asp Phe Ser Gln Asp Pro Pro Lys Pro
Ser Leu Ser Ser Gln Gln Ala Val Tyr Gly His Val His Leu

30

ヒトペプチダーゼM28ドメインアミノ酸配列 (配列番号:6)

Gly Arg Ser Glu Pro Asp His Tyr Val Val Ile Gly Ala Gln Arg Asp
Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Ala Val Gly Thr Ala Ile Leu
Leu Glu Leu Val Arg Thr Phe Ser Ser Met Val Ser Asn Gly Phe Arg
Pro Arg Arg Ser Leu Leu Phe Ile Ser Trp Asp Gly Gly Asp Phe Gly
Ser Val Gly Ser Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Val Leu His
Leu Lys Ala Val Val Tyr Val Ser Leu Asp Asn Ala Val Leu Gly Asp
Asp Lys Phe His Ala Lys Thr Ser Pro Leu Leu Thr Ser Leu Ile Glu
Ser Val Leu Lys Gln Val Asp Ser Pro Asn His Ser Gly Gln Thr Leu
Tyr Glu Gln Val Val Phe Thr Asn Pro Ser Trp Asp Ala Glu Val Ile
Arg Pro Leu Pro Met Asp Ser Ser Ala Tyr Ser Phe Thr Ala Phe Val
Gly Val Pro Ala Val Glu Phe Ser Phe Met Glu Asp Asp Gln Ala Tyr
Pro Phe Leu His Thr Lys Glu Asp Thr Tyr

40

ヒトTfr-様ダイマー化ドメインアミノ酸配列 (配列番号:7)

Leu Lys Ala Arg Gly Leu Thr Leu Gln Trp Val Tyr Ser Ala Arg Gly
Asp Tyr Ile Arg Ala Ala Glu Lys Leu Arg Gln Glu Ile Tyr Ser Ser
Glu Glu Arg Asp Glu Arg Leu Thr Arg Met Tyr Asn Val Arg Ile Met
Arg Val Glu Phe Tyr Phe Leu Ser Gln Tyr Val Ser Pro Ala Asp Ser
Pro Phe Arg His Ile Phe Met Gly Arg Gly Asp His Thr Leu Gly Ala
Leu Leu Asp His Leu Arg Leu Leu Arg Ser Asn Ser Ser Gly Thr Pro

50

Gly Ala Thr Ser Ser Thr Gly Phe Gln Glu Ser Arg Phe Arg Arg Gln
Leu Ala Leu Leu Thr Trp Thr Leu Gln Gly Ala Ala Asn Ala

ヌクレオチド配列ヒトTfr2 (配列番号:8)

GTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAA
GTTGGCACCAT
GGAGCGGCTTTGGGGTCTATTCCAGAGAGCGCAACAACTGTCCCCAAGATCCTCTCAGA
CCGTCTACCAG
CGTGTGGAAGGCCCGGAAAGGGCACCTGGAGGAGGAAGAGGAAGACGGGGAGGAGG
GGGCGGAGACATTG
GCCCACTTCTGCCCCATGGAGCTGAGGGGGCCCTGAGCCCCTGGGCTCTAGACCCAGGCA
GCCAAACCT
CATTCCCTGGGCGGCAGCAGGACGGAGGGCTGCCCCCTACCTGGTCCTGACGGCCCTGC
TGATCTTCACT
GGGGCCTTCCTACTGGGCTACGTCGCCTTCCGAGGGTCCTGCCAGGCGTGCGGAGACTC
TGTGTTGGTGG
TCAGTGAGGATGTCAACTATGAGCCTGACCTGGATTTCCACCAGGGCAGACTCTACTGG
AGCGACCTCCA
GGCCATGTTTCCTGCAGTTCCTGGGGGAGGGGCGCCTGGAGGACACCATCAGGCAAACCA
GCCTTCGGGAA
CGGGTGGCAGGCTCGGCCGGGATGGCCGCTCTGACTCAGGACATTCGCGCGGCGCTCTC
CCGCCAGAAGC
TGGACCACGTGTGGACCGACACGCACTACGTGGGGCTGCAATTCGCGGATCCGGCTCAC
CCCAACACCCT
GCACTGGGTGCGATGAGGCCGGGAAGGTCTGGAGAGCAGCTGCCGCTGGAGGACCCTGACG
TCTACTGCCCC
TACAGCGCCATCGGCAACGTACGGGAGAGCTGGTGTACGCCCACTACGGGCGGCCCCGA
AGACCTGCAGG
ACCTGCGGGCCAGGGGCGTGGATCCAGTGGGCCGCTGCTGCTGGTGC GCGTGGGGGTG
ATCAGCTTCGC
CCAGAAGGTGACCAATGCTCAGGACTTCGGGGCTCAAGGAGTGCTCATATACCCAGAGC
CAGCGGACTTC
TCCCAGGACCCACCCAAGCCAAGCCTGTCCAGCCAGCAGGCAGTGTATGGACATGTGCA
CCTGGGAACTG
GAGACCCCTACACACCTGGCTTCCCTTCCTTCAATCAAACCCAGTTCCCTCCAGTTGCA
TCATCAGGCCT
TCCCAGCATCCCAGCCCAGCCCATCAGTGCAGACATTGCCTCCCGCCTGCTGAGGAAGC
TCAAAGGCCCT
GTGGCCCCCAAGAATGGCAGGGGAGCCTCCTAGGCTCCCCTTATCACCTGGGCCCCGG
GCCACGACTTC
GGCTAGTGGTCAACAATCACAGGACCTCCACCCCCATCAACAACATCTTCGGCTGCATC
GAAGGCCGCTC
AGAGCCAGATCACTACGTTGTCATCGGGGCCAGAGGGATGCATGGGGCCCAGGAGCAG
CTAAATCCGCT
GTGGGGACGGCTATACTCCTGGAGCTGGTGC GGACCTTTTCTCCATGGTGAGCAACGG
CTTCCGGCCCC
GCAGAAGTCTCCTCTTCATCAGCTGGGACGGTGGTGACTTTGGAAGCGTGGGCTCCACG
GAGTGGCTAGA
GGGCTACCTCAGCGTGCTGCACCTCAAAGCCGTAGTGACGTGAGCCTGGACAACGCAG
TGCTGGGGGAT
GACAAGTTTCATGCCAAGACCAGCCCCCTTCTGACAAGTCTCATTGAGAGTGTCTGAA

10

20

30

40

50

GCAGGTGGATT
CTCCCAACCACAGTGGGCAGACTCTCTATGAACAGGTGGTGTTCACCAATCCCAGCTGG
GATGCTGAGGT
GATCCGGCCCCCTACCCATGGACAGCAGTGCCTATTCCTTCACGGCCTTTGTGGGAGTCC
CTGCCGTCGAG
TTCTCCTTTATGGAGGACGACCAGGCCTACCCATTCTGACACAAAGGAGGACACTTA
TGAGAACCTGC
ATAAGGTGCTGCAAGGCCGCTGCCCGCCGTGGCCCAGGCCGTGGCCCAGCTCGCAGGG
CAGCTCCTCAT
CCGGCTCAGCCACGATCGCCTGCTGCCCCTCGACTTCGGCCGCTACGGGGACGTCGTCC
TCAGGCACATC
GGGAACCTCAACGAGTTCTCTGGGGACCTCAAGGCCCGCGGGCTGACCCTGCAGTGGGT
GTA CTGGCGC
GGGGGGACTACATCCGGGCGGCGGAAAAGCTGCGGCCGGAGATCTACAGCTCGGAGGAG
AGAGACGAGCG
ACTGACACGCATGTACAACGTGCGCATAATGCGGGTGGAGTTCTACTTCCTTTCCAGT
ACGTGTCGCCA
GCCGACTCCCCGTTCCGCCACATCTTCATGGGCCGTGGAGACCACACGCTGGGGCGCCCT
GCTGGACCACC
TGGCGCTGCTGCGCTCCAACAGCTCCGGGACCCCCGGGGCCACCTCCTCCACTGGCTTC
CAGGAGAGCCG
TTTCCGGCGTCAGCTAGCCCTGCTCACCTGGACGCTGCAAGGGGCAGCCAATGCGCTTA
GCGGGGATGTC
TGGAACATTGATAACAACCTTCTTGCCAACCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAA
GCATTGCTTAT
CAATTTGTTGCAACGAAC

マウスTfr2（配列番号:9）

GAGTCTCCTGGGAGCATGGTCCAAGAAACCCAGAGACCTGTTGCTGAGCTGAACTTGGC
TGCTGTGTCTT
CCCACTCAGGACTCGGCTTTGACAGGCACGAGGCAGGGACTGGGGTACTGGTGAGCCCC
TACCTCTCAGA
TCTTTCTGGACCTGGCTGCAGGTCCTGGTGTCTTCGTCGCGGCTTGGATTTCAAACCTGG
AGGAGTTCAGG
AGGGGGCACAAGCATGGAGCAACGTTGGGGTCTACTTCGGAGAGTGCAACAGTGGTCCC
CAAGACCCTCT
CAGACCATCTACAGACGCGTGGAAGGCCCTCAGCTGGAGCACCTGGAGGAGGAAGACAG
GGAGGAAGGGG
CGGAGCTTCCTGCCCAGTTCTGCCCCATGGAACCTCAAAGGCCCTGAGCACTTAGGCTCC
TGTCCCGGGAG
GTCAATTCCCATAACCTGGGCTGCAGCAGGTCGAAAGGCTGCCCCCTATCTGGTCCTGA
TCACCCTGCTA
ATCTTCACTGGGGCCTTCCTCCTAGGCTACGTGGCCTTTTCGAGGGTCCTGCCAGGCGTG
TGGGGACTCCG
TGTTGGTGGTGCATGAAGATGTCAACCCTGAGGACTCCGGCCGGACCACGTTGTACTGG
AGCGACCTCCA
GGCCATGTTTCTCCGGTTCCTTGGGGAGGGGCGCATGGAAGACACCATCAGGCTGACCA
GCCTCCGGGAA
CGCGTGGCTGGCTCAGCCAGAATGGCCACCCTGGTCCAAGATATCCTCGATAAGCTCTC
GCGCCAGAAGC
TGGACCACGTGTGGACTGACACGCACTACGTGGGACTTCAGTTCCCAGATCCGGCTCAC

10

20

30

40

50

GCTAACACCCT
GCACTGGGTGGATGCAGACGGGAGCGTCCAGGAGCAGCTACCGCTGGAGGATCCGGAAG
TCTACTGTCCC
TACAGCGCCACCGGCAACGCCACGGGCAAGCTGGTGTACGCCCACTACGGGCGGTCTGGA
GGACCTACAGG
ACCTAAAAGCCAAGGGCGTGGAGCTGGCCGGCAGCCTCCTGCTAGTGCGAGTTGGAATT
ACTAGCTTCGC
CCAGAAGGTAGCCGTTGCCCAGGACTTTGGGGCTCAAGGAGTGCTGATATACCCTGACC
CATCAGACTTC
TCCCAGGATCCCCACAAGCCAGGCCTGTCTAGCCACCAGGCTGTGTACGGACATGTGCA
CCTGGGAACTG
GAGACCCTTACACACCTGGCTTCCCGTCCTTCAATCAAACCCAGTTCCCTCCAGTAGAA
TCATCAGGCCT
TCCCAGCATCCCCGCCAGCCCATCAGTGCTGACATTGCTGATCAATTGCTCAGGAAAC
TCACAGGCCCC
GTGGCTCCCCAGGAGTGGAAGGTACCTCTCAGGCTCTCCTTATCGGCTGGGACCTGG
GCCCCGACTTAC
GCCTTGTGGTCAACAACCACAGAGTCTCTACCCCCATCAGTAACATCTTTGCGTGCATC
GAGGGCTTTGC
AGAGCCAGATCACTATGTTGTCATTGGGGCCCAGAGGGATGCATGGGGCCCAGGAGCAG
CCAAGTCTGCA
GTGGGGACTGCCATCCTGCTGGAGCTGGTTCGGACCTTCTCTTCCATGGTCAGCAATGG
GTTCAGACCTC
GAAGAAGTCTTTTGTTCATCAGCTGGGACGGAGGTGACTTTGGCAGCGTGGGAGCCACA
GAGTGGTTGGA
GGGCTACCTCAGCGTGCTACACCTCAAAGCTGTTGTGTACGTGAGCCTGGACAACCTCCG
TGTTGGGAGAT
GGCAAATTCCATGCTAAGACCAGCCCCCTTCTCGTCAGCCTCATTGAGAATATCTTGAA
GCAGGTGGACT
CCCCTAACCATAGTGGACAGACCCTCTATGAACAAGTGGCACTCACCCACCCAGCTGG
GATGCTGAAGT
GATTCAGCCCCTGCCCATGGACAGCAGTGCATATTCCTTCACAGCCTTTGCGGGGGTCC
CAGCTGTGGAG
TTCTCCTTCATGGAGGATGATCGGGTGTACCCATTCTGTCACACGAAGGAGGACACATA
TGAGAATCTGC
ACAAGATGCTGCGAGGTCGCCTGCCCGCCGTGGTCCAGGCAGTGGCTCAGCTCGCGGGC
CAGCTCCTCAT
CCGACTGAGCCACGATCACCTACTGCCGCTAGACTTCGGCCGCTATGGAGACGTGGTTTC
TCAGGCACATC
GGCAACCTCAATGAGTTCTCTGGGGACCTCAAGGAGCGCGGGCTGACCCTGCAGTGGGT
GTA CTCTGCAA
GGGGGGACTACATCCGTGCGGCGGAAAAGCTGCGGAAGGAGATTTACAGCTCGGAGCGG
AACGATGAGCG
TCTGATGCGCATGTACAACGTGCGCATCATGAGGGTGGAGTTCTACTTCCTGTCCCAGT
ATGTGTCGCCA
GCCGACTCCCCATTCCGCCACATTTTCTAGGCCAAGGCGACCACACTTTGGGTGCCCT
GGTAGACCACC
TGCGGATGCTGCGCGCCGATGGCTCAGGAGCCGCCTCTTCCCGGTTGACAGCAGGTCTG
GGCTTCCAGGA
GAGTCGCTTCCGGCGCCAGCTGGCGCTGCTCACCTGGACACTGCAGGGGGCAGCCAACG

10

20

30

40

50

CTCTCAGTGGC
GACGTTTGGAACATTGACAATAACTTTTGAAGCCAAAAGCCCTCCATGGGCCCCACGTG
ATTCTCCTTTC
TCCCTCTTTGAGTGGTGCAGGCAAAGGAGGTGCCTGAGATTGTAACCTATTCTTAACAC
CCTTGGTCCTG
CAATGCTGGTGCGCCATATTTTCTCAGTGTGGTTGTCATGCCGTTGCTTACCCAGAAAG
CGGTTTTCTTC
CCATCACAGGCCCTTCTGTCTTCAGGAGCAAAGTTCCCCATATCTAGAGACTATCTAGA
TGCTGGGATCT
GATCAGCTCTCTTAGAGAGTGAGATGGACAGCGTCATTATTTTATGACACATGAGCTAC
GGTATGTGAGC
AGCCCAAGGGGATTAGATGTCAATAAACCAATTGTAACCCCTGTTGTCCATACGCAATT
TAGCTTCCTCT
TCATGCCGTACCCACTCCTCATATCCGCCTTGAGACTAGGGAAGAAGGCACAGAAGGCA
CCTGACAGCAT
GCTTGCAAGATGCTATCCACATGGGAAAAATAACTGTTCTGATGTCTAAGAAAAGTACC
TAAAGATAATG
GATAGGAGGTGGGGCAGTGGGGATAACTCATCAGGAATGGGTGATTGCGGCCAAGCCTG
ATGACCTGAGT
TTAATCCCCAGGACCAACATGGCAAAGGAGAGAACTAGTTCCCACAAGTTTTCTATA
TCCTCCAAATG
TATGCCCATAAAAGCACAAATAGATAAATGTTTTTGCTTTTGTTTTTAAAGTGGCTTT
GTGGTTAAGAG
CACTGGATGCCATTCTAGAAGACACCGGTTGATTCCCAGCACCCACATGGCCGCTTAC
AACTGTCTGTA
ACTCCAGTTGCTGGGGATCAGATGCCCTCTTCTGGTATGGTGTACGACTGCATGCATGT
AGTATACATAC
AAGCAGGCAAATACCCATACATGTAAAATTTTTAAAAAATAGTTTAAATTATAAATTA
ATTTAAAGAAC
AAATAAAAGATTAATGCCTTTAATCCC

10

20

30

ヒトTfr2-his (配列番号:10)

AFRGSCQACGDSVLVSEDEVNYEPDLDFHQGRLYWSDLQAMFLQFLGEGRLEDTIRQTS
LRERVAGSAGMAALTQDI
RAALSQRQKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQLPLEDPDVYCPYSA
IGNVTGELVYAHYGRPEDL
QDLRARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNAQDFGAQGVLIYPEPADFSQDPPKPSLSSQ
QAVYGHVHLGTGDPYTPG FPSFNQTQFPVASSGLPSIPAQPISADIASRLLRKLKGPVA
PQEWQGSLLGSPYHLGPGPRLRLVVNNHRTSTPINNIFG
CIEGRSEPDHYVVIGAQRDAWGPGAAKSAVGTAILLELVRTFSSMVSNNGFRPRRSLLFIS
WDGGDFGSVGSTEWLEGYL
SVLHLKAVVYVSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLTSLIESVLKQVDSPNHSGQTLYEQVVFTN
PSWDAEVIRPLPMDSSAYSF
TAFVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYENLHKVLQGRLPAVAQAVAQLAGQLLIRL
SHDRLLPLDFGRYGDVVL
HIGNLNEFSGDLKARGLTLQWVYSARGDYIRAAEKLRQEIYSSEERDERLTRMYNVVRIMR
VEFYFLSQYVSPADSPFRHIFMGRGDHTLGALLDHLRLRLRSNSSGTPGATSSTGFQESRFR
RQLALLTWTLQGAANALSGDVWNIDGGGGSHHHHHH

40

ヒトTfr2-Fc (N-末端融合) (配列番号:11)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

50

KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGKIEGRR
GSCQACGDSVLVSEDEVNYEPDLDFHQGRLYWSDLQAMFLQFLGEGRLEDTIRQTSRLE
RVAGSAGMAALTQDIRAA
LSRQKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQLPLEDPDVYCPYSAIGN
VTGELVYAHYGRPEDLQDL
RARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNAQDFGAQGVLIIPEPADFSQDPPKPSLSSQQAV
YGHVHLGTGDPYTPGFPS FNQTQFPVASSGLPSIPAQPISADIASRLLRKLKGPVAPQE
WQGSLLGSPYHLGPGPRLRLVNNHRTSTPINNIFGCIE
GRSEPDHYVVIGAQRDAWGPGAAKSAVGTAILELVRTFSSMVSNNGFRPRRSLLFISWDG
GDFGSGVSTEWLEGYLSV
LHLKAVVYVSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLTSLIESVLKQVDSPNHSGQTLYEQVVFTNPS
WDAEVIRPLPMDSSAYSFTA
FVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYENLHKVLQGRLPABAQAVAQLAGQLLIRLSH
DRLLPLDFGRYGDVVLRHIG
NLNEFSGDLKARGTLQWVYSARGDYIRAAEKLRQEIYSSEERDERLTRMYNVRIMRVEF
YFLSQYVSPADSPFRHIFMG RGDHTLGALLDHLRLLRSNSSGTPGATSSTGFQESRFRRQ
LALLTWTLQGAANALSGDVWNIDNNF

10

ヒトTfr2 (C-末端融合) (配列番号:12)

20

RGSCQACGDSVLVSEDEVNYEPDLDFHQGRLYWSDLQAMFLQFLGEGRLEDTIRQTSR
ERVAGSAGMAALTQDIRA
ALSRQKLDHVWTDTHYVGLQFPDPAHPNTLHWVDEAGKVGEQLPLEDPDVYCPYSAIG
NVTGELVYAHYGRPEDLQD
LRARGVDPVGRLLLVRVGVISFAQKVTNAQDFGAQGVLIIPEPADFSQDPPKPSLSSQQA
VYGHVHLGTGDPYTPGFPS
SFNQTQFPVASSGLPSIPAQPISADIASRLLRKLKGPVAPQEWQGSLLGSPYHLGPGPRL
RLVNNHRTSTPINNIFGCI
EGRSEPDHYVVIGAQRDAWGPGAAKSAVGTAILELVRTFSSMVSNNGFRPRRSLLFISWD
GGDFGSGVSTEWLEGYLS
VLHLKAVVYVSLDNAVLGDDKFHAKTSPLLTSLIESVLKQVDSPNHSGQTLYEQVVFTNP
SWDAEVIRPLPMDSSAYSFT AFVGVPAVEFSFMEDDQAYPFLHTKEDTYENLHKVLQGR
LPABAQAVAQLAGQLLIRLSHDLRLPLDFGRYGDVVLRH
GNLNEFSGDLKARGTLQWVYSARGDYIRAAEKLRQEIYSSEERDERLTRMYNVRIMRVE
FYFLSQYVSPADSPFRHIFM
GRGDHTLGALLDHLRLLRSNSSGTPGATSSTGFQESRFRRLALLTWTLQGAANALSGDV
WNIDNNFIEGREPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

【0094】

表3：プライマー配列（実施例3）

50

配列番号	遺伝子	プライマー配列
配列番号:13	β -アクチン	s: ATCTGGCACCACACCTTCT
配列番号:14		as: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
配列番号:15	アキシン 2	s: GCAGTGATGGAGGAAAATGC
配列番号:16		as: ATTCAAGGTGGGAGGTAGC
配列番号:17	Bmp2	s: CGCTCCACAAACGAGAAAAG
配列番号:18		as: CAGTCATTCCACCCACATC
配列番号:19	Bmp4	s: CTCAAGGGAGTGGAGATTGG
配列番号:20		as: CTTCTGCGGGTCAAGGTATG
配列番号:21	Bmp6	s: TAGCAATCTGTGGGTGGTGA
配列番号:22		as: GAAGGGCTGCTTGTCTAAG
配列番号:23	Cd44	s: TCCTTCGATGGACCGTTACC
配列番号:24		as: GTGGAGCCGCTGCTGACATC
配列番号:25	Dkk1	s: GAGGGGAAATTGAGGAAAGC
配列番号:26		as: AGCCTTCTTGTCTTTGGTG
配列番号:27	Dmpl	s: TGTCATTCTCCTTGTGTTCTTTG
配列番号:28		as: AGAGCTTTCAGATTGAGTATGTCGTAT
配列番号:29	Id1	s: CCCACTGGACCGATCCGCCA
配列番号:30		as: TGCTCTCGGTCCCCAGGGG
配列番号:31	Id2	s: TCTGGGGATGCTGGGCACC
配列番号:32		as: GCTTGGGCATCTCCCGGAGC
配列番号:33	Lef1	s: CAAATAAAGTGCCCGTGGTG
配列番号:34		as: TCGTCGCTGTAGGTGATGAG
配列番号:35	Phex	s: GGAAGAAAACCATGCCAATTATT
配列番号:36		as: CGCCTGCTGAGGTTTGA
配列番号:37	Sfrp	s: AAGTCAGGGTGATTGGGGGAATCC
配列番号:38		as: AAACCATCTCCTCGGATAGGGCAC
配列番号:39	Smad6	s: ATTCTCGGCTGTCTCCTCCT
配列番号:40		as: CCCTGAGGTAGGTCTAGAA
配列番号:41	Sost	s: CGTGCCTCATCTGCCTACTT
配列番号:42		as: TGACCTCTGTGGCATCATTC
配列番号:43	Tcf7	s: GGACATCAGCCAGAAGCAAG
配列番号:44		as: GGACAGGGGTAGAGAGGAG
配列番号:45	α -Tfr2	s: GCCATGTTTCTCCCGGTTCTT
配列番号:46		as: TGGCGCGAGAGCTTATCG
配列番号:47	β -Tfr2	s: CCTGGCCCTAGTGTGATTTC
配列番号:48		as: TGGCGCGAGAGCTTATCG
配列番号:49	Tgf- β	s: GACCTCCATAGAAGACACC
配列番号:50		as: AACCCGTTGATGTCCACTTGC

10

20

30

40

【 0 0 9 5 】

50

表 4：本発明の抗体、フラグメント、阻害剤及びタンパク質のための
定常領域

配列番号 :51	ヒト IgG1 定常領域	IGHG1*01	ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*01) ヌクレオチド 配列	gctctaccacgaagggccatcggtcttccccctggcaacctctctccaaagagcaacctctggggggcacagggccct gggctgctgtgtaaggactacttccccgaacccggtagcggtgtgtggaactcaggccctgaccagcggc gtgcacacctcccgctgctctacagtctctcaggacttactccctcagcagcggtgtgacccgtgacctccagc agctgggcacccagacctacatctgcaacgtagaatcacaagccacgaacacaaagggtggacaagaagtt gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccacccgtgccagaccctgaactcctgggggggacccgtcag tcttcttcccccaaaacccaaaggacacccctcagtatctccggaccccttgaggctcagctgctgggtgg acgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactgtgtacgtggacgctggagggtgcataatgccaaga caagcgcgggagtagcagtagcacacagcagcagcgggtgtgtcagcgtctcaccgtgctcaccaggact ggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccacgcccccatcgagaaaccatct ccaaagcccaaggcgagcccgagaaaccacagggtgacacctgcccccatcccggtgagctgaccaaga accaggctacgctgacctgctgtgtcaaaaggctctatctccagcagcagcatcgccgtggagtgagagcaatgg gcagccggagagaacacacaaagaccacgctcccggtgtgtgactcgcagcggctcttctctctacagcaagc tcacctgtgacaagaagcaggtggcagcaggggaaacgtctctcctcagctcgtgtagcatgaggctctgcacaa ccactacagcagagaagacctctccctgtctcgggtaaa
配列番号 :52			ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*01) タンパク質 配列 (P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGP SVFLFPKPKDITLMISRTPETVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

配列番号:53	ヒト IgG1 定常領域	IGHG1*02 又は IGHG1*05	ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*02 又は IGHG1*05) ヌクレオチド配列	gcttcaccaaggcccatcggtcttccctcttgccacccctctccaagagcacctctggaggcacagcggcctt gggctgcctggtcaaggactacttcccgaaacgggtgacgggtgtgtggaaactcagggcgccttgaccagcggc gtgcacacttccgggtgtctacagttctctcaggaacttactctctcagcagcgtgggtgacgtgccccctcagc agcttggggcacccagacttactgtcaacgtggaatcacaaagcccaagcacacaagggtgggacaagaaagt gaagcccaaatcttgtgacaaaactcacatgcccacccgtgcccagcacctggaactcttgggggggagcgtcag tcttcttcccccaaaaccccaaggacacctctatctctccggacccccctgaggtcacatgctgtgtgtgtgg actgtgagccacgaagacccttgaaggtaagttaactgtgtacgtggacggcgtgtggaggggcataatgtccaaga caaaagcgcggggagagcagatacaacagcacgtacccgtgtgtgtggtcagcgtctctaccgctctgacacaggactg gctgaatggcaaggagatacaagtgcaaggcttccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaggcagcccccgagagaccacaggtgtatcaccttgccttgcctccatccggggatgagctgacccaagaa ccaggtcagcctgacctgtctgttcaaaaggcttctatccacagcgacatcgccgtggaggtgggagagcaatgggg cagccggagagaacaactacaagaccgcctccgctgctggagctccgagcggtcttcttctctctacagcaagct caccgtggacaagagcaggtggcagcagggggaacgtcttctatgtctcgttcgtgatgcatgaggtctgtgacaac cactacagcagaagagccttctctctgtctcgggtaaa
配列番号:54			ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*02) タンパク質配列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDSGFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

配列番号:55	ヒトIgG1 定常領域	IGHG1*03	ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*03) ヌクレオチド配列 (Y14737)	gctctaccacgaaggcccatcggctcttcccttggcaccctctcccaagagcaccctctgggggcacagcggccct gggctgcctggtaaggactacttccccgaaccggagcgggtgctgtaacctaggcgccctgaccagcggc gtgcacacctcccgctgtctctacagtcctcaggactctactcctctcagcagcggtggtagccgtgacctccagc agcttggcaccacagactactctgcaacgtgaatcacacgaagccagcaacacccaagggtggacaagagagtt gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccacccgggccagcaccggaacctggaacctgggggggacccgtcag tctctcttcccccaaaacccaaggacacctcagtcctccggacccccctgaggtcacaatgctgggtgg acgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactgacgtgacgtgacggcggtggagggtcataatgccaaaga caaagccgcgaggagcaglacacacagcagtcacgggtggtcagcgtccacgtccctgcacccaggacgtg gctgaatgcgaagggtacaaagtgaagggtctcccaaaaagccctccacgcccccatcgagaaaaaccatctcc aaagccaaaggcgagcccgagaaaccacagggtacacccgtgccccatcccgaggaggagatgaccaagaa ccaggctacgctgacctgctgtgtaaggcttctatccccagcagacatgcgcgtggagtgggagagcaatggg cagccggagaaacactacaagaccacgccctccgctggactccgacggctccttctctatagcaagct caccgtggacaagcagcagggtggcagcagggaacgtctctcgtcctcgtgacgtgaggctctgcacaac cactacacgcagaagagccctctcctgtccccgggtaaa
配列番号:56			ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*03) タンパク質配列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

配列番号:57	ヒトIgG1 定常領域	IGHG1*04	ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*04) ヌクレオチド配列	gctccaccaaggccatcgctctcccccggcaccctctccaaagagcacctctgggggcacagcggccct gggctgcctggtcaaggactactctcccgaaacgggtgacgggtgctggaaactcagcgccctgaccagcggc gtgcacaccttccggctgtctacagtcctcagagacttactccttcagcagcgtgggtgaccgtgacctccagc agcttgggcacccagaccctacatctgtcaacgtgaaatcacaaagccacacacaaaggtggacaagaagatt gagcccaaatctgtgacaaaaactcacacatgcccacogtgcacagcaccctgaactctgggggggaacogtcaag cttctcttcccccaaaacccaaagacacccctcatgtctccggacccctgaggtacatgtggtgtgtgg acgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactgttgcgtggacggcgtggagggtgcaataatgccaaaga caaaagccgcgggaggagcaglacaaacagcacogtgggtgctcagcgtcctcacogctctgcacagagactg gctgaatgcaaggagttacaagtgcgaaggtctccaaacaaagccctccacagcccccatcgagaaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaaccacaggtgtacacccctgcccccatccgggggatgagctgaccaaagaa ccaggtcagcctgacctgctgtgttcaaaaggctcttatccacagcagcatcgccgtggagtgaggagagcaatgggg cagccggagaaacaactacaagaccacgctcccggtgtggtgactccgacggctccttctctctacagcaagct caccgtgacaaagagcaggtggcagcagggggaacatcttctcgtcgtgcatgcatgagggtctgtgcaacaac cactacacgcagaagagcctctccctgtctctcggggtaaa
配列番号:58	ヒトIgG1 定常領域	IGHG1*04	ヒト重鎖定常 領域 (IGHG1*04) タンパク質配列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPTVYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWVYDGVVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNIFSCSVMHREALHNHTYTKSLSLSPGK

【 0 0 9 9 】

【 0 1 0 0 】

配列番号:59	障害ヒト IgG1 重鎖 定常領域	障害ヒト IGHG1*01	障害ヒト IGHG1*01 重鎖定常領域 ヌクレオチド 配列	Gcctcaccaaggcgccatcggtcttcccccctggcacccttccccaagagcaccctctgggggcacagcgccct gggtgctgtgtcaaggactctcccgaaacggtgaacgtgtgtgtgaactcaggcgccctgaccagcggc gtgcacaccttccggcgtgtcclacagctctcaggactctctctccctcagcagcggtgtgacccgtgcccctcagc agctgggcacccagaccctacatctgcaacgtgaatcacaagccccagcaacacaaaggtggacaaagaagtg gagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcccacccgtgcccagcaccgaactcgcgggggcacccgtcag tctctcttcccccaaaaccccaaggacacccctcatctctcccggaacccctgaggtcacatgtcggtgtgtg acgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactgttacgtgacggcggtgaggtgacataatgccaaga caaagccgcgggagagcaglacaaacagcacgtaccgtgtgtcagctctcaccgtctcaccaggtacgtg gctgaatggcaaggaglacaaagtgcaagggtcccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacccatctcc aaagcccaaggcgacggcgagacccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgatgagctgaccaagaa ccaggtcagcctgacctgctgtgtcaaaaggctctctatccacgacatcgccgtgtgagtggtgagagcaatggg cagccggagaaacacacacagacgcctccgtgtgtgagactcgcagcggctctctctctacacagcaagct cacctgtgacaagagagcaggtgtgacaggggaacgtctctctcgtcctcgatgatgaggctctgcacaaac cacacacgcagaagagcctctccctgtcttcgggtaaa
配列番号:60			障害ヒト IGHG1*01 重鎖 定常領域アミノ 酸配列。 野生型配列と 異なる2つの 残基は太字で 識別される	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGA PSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

[illegible]

【 0 1 0 1 】

配列番号:62			ヒト重鎖定常領域 (IGHG2*01) タンパク質配列	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSSVVTVTPSSNFGTQTYTONVDHKPSNTKVDKTVKRCCKVECPFPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRWVSILTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号:63	ヒトIgG2 定常領域	IGHG2*02	ヒト重鎖定常領域 (IGHG2*02) ヌクレオチド配列	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGCTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCT ACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGACCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCCCAAGCACCTT GTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTTCATGATCT CCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCCCGGA GGTCCAGTTCAGTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCATATGCCAAGACAAAGC CAGGGAGGAGCAGTTCACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTTCAACCGTCGTG CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCAC AGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTCAAGCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCAGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC

【 0 1 0 2 】

10

20

30

40

50

40

				caactaagaacacacacccatgctgagctcgaagcgtctcttctctctacagcaagctcacgtggaca agagcagtgccagcaggggaacgtctctcatgctcgcgtagcagaggtctgcacaaaccadacacgca gaagagcctctccctgctccgggtaaa
配列番号:66			ヒト重鎖定常領域 (IGHG2*04) タンパク質配列	ASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKYDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEEQFNST FRVWSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号:67		IGHG2*06	ヒト重鎖定常領域 (IGHG2*06) ヌクレオチド配列	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGCTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGAC GGTGTGCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCT ACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCCGAGCACCACT GTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTCTTCCCGCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCCCGA GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTGCATATGCCAAGACAAAGC CACGGGAGGAGGAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCGTCTGTG CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCT

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

40

50

【 0 1 0 6 】

				gcttgaccigccigtgtcaaggcttctatccccagcgacatcgccgtgagtgaggagcaatgggagccggga gaacaactacaagacccgctccgtgctggactcgagggctcttcttctctacagcaggctaaccgtgg acaagagcaggiggcaggagggggaalgcttctctatgctccgtgagtcagtgaggctctgcacacccactaac acagaagagccctctctctctgtctgtggtaaa
配列番号:70	ヒト重鎖定常領域 (IGHG4*01) タンパク質配列 (P01861)			ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHALHNHYTQKSLSLGLK
配列番号:71	ヒト重鎖定常領域 (IGHG4*02) ヌクレオチド配列	IGHG4*02	ヒトIgG4 定常領域	gcttcaccaagggccatcgcttccccctggcgccctgctccaggagcacctcagagcacagccgccc gggctgcttggtcaaggactactccccgaacgggtgacgggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggc gtgcacaccttccggctgtctctacagtctctcaggactctactcctcctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagc agctgggcacgaagacctacaccigcaacgtagatcacaaagcccagcaccccaaggiggacaagagagitt gagtcctcaaatatgtctccccgtgcccatcgtccccagcacctgagttctcgtgggggaccatcagttctctgttc cccccaaaaccccaaggacactctcatgtatctccccggaccctgaggtcacgtggtggtggagcgtgagcc aggaagacccccgagggtccagttcaacgtgacgtggatggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgc gggaggagcagttcaacagcacgtacgtgtgtgtcagcgtctcaccgtggtgcaccaggtggtgctgaacgg caaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaggccctccgtctctccatcagagaaaccatctccaaagccaa agggcagcccccgaggagccacagggtgtacacccctgcccccatcccccagggagagatgaccaagaaccagggtca

配列番号:74					gaacaactacaagaccacgctcccgctgcggactccgacggcctctctctctctacagaagctcacgctggtg acaagacaggtgtgcaggagggaacgctctctcatgtctccgctgatgcatgaggctctgcacacaccactacac gcagaagagcctctccctgctctc1gg9laaa ASTKGPSVFPLAPCSRRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTITCTCNVDHKPSNTKVDKRYSKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVF LFPKPDKDTLMISRTPETCVWVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLLHODWLNKGEVKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYVYTPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
配列番号:75	ヒト IgG4PE 定常領域	IGHG4-PE	ヒト重鎖定常領域 (IGHG4-PE) ヌクレオチド配列バージョン A		gcctccaccaaggcccatcgcctctcccccctggcccgctctccaggacacctccgagacacggcgccgct gggctgctgtgtcaaggactactcccccgaaccagtagacggtgtctgtggaactcaggcgccctgaccagggc gtgcacacctcccggtgtctctacagctcctcaggactctccctcagcagcgtgtgtacggctgccccacgc agcttgggcaagaaactacacctgcacacgtatgatacacaagccccagcaacacacagggtggacaagagatt gagtccaaatatgttcccccacccatgccccacgagcgctgtaatttgaggggggaccatcagctctccgttctc cccccaaaaccccaaggacactctcatgtatctcccggaacccccctgagggtacacgtgcgtgtgtgtgacgtgagcc aggaaagaccccgagggtccaggtcaactgtgtacgtgtggtatgggtgtgagggtgcataatgtccaagacaaagccgc gggaggagcagctcaacagcagctaccgtgtgtgtcagcgtccctcacacgctccgtgcaccaggactgtgtgaacgg caaggagtacaagtgcaaggtctccaaagaaggcctcccgctcatcgtatcagaaacacatctctccaaaggccaa aggcgagccccgagagccacagggtgtacacctgtccccctccacccaggaggagatgaccagaacccagggtca gccgaccctgtgtcaaggctctacccccagcgacatcgccgtgtgaggtgggagagcaatggggcagcgagcga gaacaactacaagaccacgctcccggtgtgtgactcgcaggaatcctctctctacagcagggttaaacgctgtg

【 0 1 0 8 】

[illegible]

【 0 1 0 9 】

				aggaccctgaggctcagttcaactggtatgtagtgcggtggagggtgcacaaagcacaagacaaagccccggg aagagcagttcaactccacctacagggtggtcagcgtgctgaccgtgctgcatcaggacgtgctgaacggcaa ggagtacaagtgaaggtcagcaataaaggacgtcccgacagcagcatcgagagaaccatctccaagggtctaaag gccagccccgggaacctcagggtgtacacctgacctccagccagccagaggagatgacccaagaacccagggtgagcc tgacctgctgggtgaagggtatctacccttcgacatcgccgtgtaggtgggaggtccaaacggccagcccgagaa caattataagaccacccccctctctgacagcgacggatctcttctgtactccaggtgacctgaggtggataa gtccaggtggcagggaagcaacgtgttcagctgtctcgtgtatgcacgaggccctgcacaatcactacacccag aagtcctgagcctgtccctgggaaag
配列番 号:78			ヒト重鎖定常 領域 (IGHG4-PE) タンパク質配列 (アミノ酸置換 は太字で表示)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFEGGSPSVF LFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVPLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
配列番 号:79	不活化ヒト IgG4 定常領域	不活化 IGHG4	不活化ヒト重鎖 定常領域 (IGHG4) ヌクレオチド配列	gcctccaccaaggcccatcgtcttccccctggcgccctgcctccaggagcacctccgagagcagcgccgcoct gggctgcctgggtcaaggactactccccgaaccagtgacgggtgtgtgtggaactcaggccctgaccagcggc glgcacacctccccgggtgtctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtggtagcgtgccccccagc agctggggcaagcagacctacacctgcaacgtgatcacacagcccgagcaacacccaagggtggacaagagagtt gagtcacaaatattgtcccccatgccccaccatgccccagcgcctccagtgcgggggggagaccatcagctctctgttc cccccaaaacccaaggacactctcatgatctccgggacccccagggtcaggtgcgtggtggtgacgtgagcc

【 0 1 1 0 】

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

				Nucleotide Sequence	aggaaagacccccagggtccagttcaactggtacgtggatggtggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgc gggaggagcagttcaacagcacgtacccgtgtgtcagcagctccaccgtccctgcaccaggtacgtggaacgg caaggaglacaaagtgcaagggtccaaacaaggccctcccgctcatgcatgagagaaaaccatctccaaagccaa agggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgcccccatccacggaggtgagatgaccaagaaccagggtca gcctgacctgcctgtcaaaaggctttctaccccagcgacatcgccgtggtgagtggtgagagcaatgggcagccggga gaacaactacaagaccacgcctcccggtgtggtactccgacggtatccctctctctacagcaggtctaaaccgtgg acaagagcaggtggcaggagggaatgtctctctatgctccgtgtgcatgagggtctgcacaaaccactacac acagaagagccctctccctgtctctgggiaaa
配列番 号 :80				不活化ヒト重鎖 定常領域 (IGHG4) タンパク質配列 (ヒト IgG4 由来 不活化変異は 太字で表示)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSWTVTVPSSSLGKTITCTNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPGPCAPPVAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTYDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

配列番号 :81	ヒト C κ 定常領域	IGKC*01	ヒト C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*01) ヌクレオチド配列	cgtaacgtggccgctccctcgtgtatcattccaccattccgacgagcagctgaagtcggcaccgcctctgtcg tgtgcctgtcgaacaactctacccccgcgagcccaaggctcagtggaaggctgacaacgcccctgcagtcggg caactcccagggaatccgtgaccgagcaggactccaaggacacacactactcctctcctccaccctgacccgtg ccaaggccgactacgagaagcacaagggtgacgctgcggaagtgaccaccaggggcctgtctagccccggtga ccaagctttcaaccggggcgagtggt
配列番号 :82			C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*01) アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 :83	ヒト C κ 定常領域	IGKC*02	C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*02) ヌクレオチド配列	ogaactgtggctgcaccatctgtctatctcccgccatctgaigagcagtgaaaictggaaactgcctctgttg tgtgcctgtcgaataaactctatccagagagggccaaagtacagtggaaggctggaataacgccctccaatcgggt aacctcccaggagagtgctacagagcaggagagcgaaggacagcacctacagccctacagcagcccccgaacgt gagcaaaagcagactacgagaacacaaaagctacgcgcgcggaagtcacccatcaggggcctgagctgcgccgt cacaaagagcttcaacaggggagagtggt

配列番号:84			C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*02) アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ ESKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号:85	ヒトC κ 定常領域	IGKC*03	C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*03) ヌクレオチド配列	cgaaactgtggctgcaccatctgtctatcttccgcgccatctgtagcagctgaaatctggaaactgcctctgttg tgctgctgtgtaataaactctatccagagagggccaaagtagagggataacgcctccaatcggg taactccaggagagtgtagcagagagaggaaggacacacacacagcctcagcagcaccctgacgct gagcaaaagcagactacgagagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgt cacaaagagcttcacacaggggagagtg
配列番号:86			C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*03) アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ ESKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

50

配列番号:87	ヒトCκ 定常領域	IGKC*04	Cκ軽鎖定常 領域 (IGKC*04) ヌクレオチド配列	cgaaactgtggctgcaccatctgtctatcttccgccatctgtaagcagctgaaatcgtgaactgcctctgttg tgtgctgtgtaataacttctatccagagagagccaaagtacagtggaaagtgataacgccttccaatcgggt aacitcccaggagagtgtaacagagcaggacagaagacacacctacagcctcagcagcacccctgaagctg agcaaaagcagactacgagaacaacacaaactctacgccttggaagtcacccatcaggggcctgagctcgcgcgctc acaaagagcttcaacacaggggagaggtgt
配列番号:88			Cκ軽鎖定常 領域 (IGKC*04) アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号:89	ヒトCκ 定常領域	IGKC*05	Cκ軽鎖定常 領域 (IGKC*05) ヌクレオチド配列	cgaactgtggctgcaccatctgtctatcttccgccatctgtaagcagctgaaatcgtgaactgcctctgttg tgtgctgtgtaataacttctatccagagagagccaaagtacagtggaaagtgataacgccttccaatcgggt aacitcccaggagagtgtaacagagcaggacagaagacacacctacagcctcagcagcaacacccctgaagctg agcaaaagcagactacgagaacaacacaaagtctacgccttggaagtcacccatcaggggcctgagctcgcgcgctc acaaagagcttcaacacaggggagaggtgc

【 0 1 1 4 】

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

配列番号:90			C κ 軽鎖定常領域 (IGKC*05) アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSNTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号:91	ヒトC λ 定常領域	IGLC1*01	C λ 軽鎖定常領域 (IGLC1*01) ヌクレオチド配列 (ENST000 00390321.2)	cccaaggcccaaccccccaagggtcactctgttcccgccctctctgtgaggagctccaagccaacaaggccacactagt gigtctgatcagtgacttctaccggggagctgtgacagtggttggaaggcagatggcagcccgicaaggcg ggagtggagacgaccacaaacccctccaaacagagcaacaacagtacgcggccagcagctacctgagcctgac gcccgagcagtggaagtcaccagaagctacagctgccaggtcacgcgtgaaggaggacaccgltggagaaga cagtgcccccctacagaagtcca
配列番号:92			C λ 軽鎖定常領域 (IGLC1*01) アミノ酸配列 (A0A075B6K8)	PKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTTKPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40

30

20

10

【 0 1 1 6 】

配列番号 :93	ヒト C λ 定常領域	IGLC1*02	C λ 軽鎖定常領域 (IGLC1*02) ヌクレオチド配列 バージョン A	ggtcagcccaaggcccaaccccccactgtcactctgttcctccctcctctgaggagctccaagccaacaaggccac actagtgtctgtatcagtgactctacccgggagctgtgacagtgccctggaaggcagatggcagcccgltca aggccggagtgagaccaccaaacccctccaaacagagcaacaacagtcaggccagcagctacccgagc ctgacgcccagagcagtggaagtcaccacagaagctacagctgccaggtcacgcataagggagcacccgtggag aagacagtgcccccctacagaatgtca
配列番号 :94			C λ 軽鎖定常領域 (IGLC1*02) ヌクレオチド配列 バージョン B	ggtcagcccaaggcccaaccccccactgtcactctgttcctccctcctctgaggagctccaagccaacaaggccac actagtgtctgtatcagtgactctacccgggagctgtgacagtgccctggaaggcagatggcagcccgltca aggccggagtgagaccaccaaacccctccaaacagagcaacaacagtcaggccagcagctacccgagc ctgacgcccagagcagtggaagtcaccacagaagctacagctgccaggtcacgcataagggagcacccgtggag aagacagtgcccccctacagaatgtca
配列番号 :95			C λ 軽鎖定常領域 (IGLC1*02) アミノ酸配列	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPS KQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQQVTHEGSTVEKTVAPTECS

配列番号:96	ヒトCλ 定常領域	IGLC2*01	Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC2*01) ヌクレオチド配列 バージョン A	ggccagcciaaggccgctcttctgtgacccctgttcccccatactccaggaacigcaggctaacaaggccac cctcgtgtgccgtgaltcagcgacttctaccctggcgccgigaccgltggccigtgaaggcigtatagctctcctgtgaa ggccggcgtggaaacacaccccttccaagcagtcaccaacaatacgcgcgcctcctctacacgtgtccctga cccttgagcagtggaagtccacacgggtctctacagctgccaaagtgaacccacggggctccaccgltggaaaaaga ccgtggctctctaccgagtgctcc
配列番号:97			Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC2*01) ヌクレオチド配列 バージョン B	ggccagcciaaagctgccccacggtcacccgttttctctccctccagcaggaggtccagggccacaaggcca ccctcgtgtgccgtgaltcctcgactctatctccggcgctgacogltggcttggaaagccgactccagccctgtca aagccggcggtggagaccaccacacccctccaagcagtcaccaacaagtcacgcgcctccagctatctctccct gacccctgagcagtggaagtccacacoggtctctactctcgttcagggtgacccacgagggtccaccgltggaaaaag accgtcgccccaccgagtgctcc
配列番号:98			Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC1*02) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

【 0 1 1 8 】

配列番号:99	ヒトCλ 定常領域	IGLC2*02 又は IGLC2*03	Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC2*02 又は IGLC2*03) ヌクレオチド配列	ggtaagcccaaggcggccctcggcaccicacigcgtccgcctcctctgaggctcaagccaagggccac actgggtgtctcataagtgactctacccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtca aggcgggagtgagaccaccacacccctccaacaagaacacaagctacgcgccagcagctatctgagc ctgacgcccgtgagcagtggaagtcaccacagaagctacagctgccaggctacgcatgaaggaggacccgtggag aagacagtgggccctacagaatgttca
配列番号:100			Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC2*02) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号:101	ヒトCλ 定常領域	IGLC3*01	Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC3*01) ヌクレオチド配列	cccaaggcggccctcggcaccicacigcgtccaccctcctcgtaggagctcaagccaagaagggccacaciggt gtgtctcataagtgactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcg gggggtggagaccaccacacccctccaacaagaacacaagctacggtgacggccagcagctaccgtgagcctgac gacctgagcagtggaagtcaccacaaaagctacagctgccaggctacgcatgaaggaggacccgtggagaaga cagtgccctacgggaatgttca

10

20

30

40

50

配列番号:102			Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC3*01) アミノ酸配列	PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号:103	ヒトCλ 定常領域	IGLC3*02	Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC3*02) ヌクレオチド配列	ggtagcccaaggtagccccctcggtcacctcgttccccccctctctgaggagctcaagccacaaggccac actggtgtgtctataagtgacttaccggggccagtgacagttgcctggaaggcagatagcagccccgtca aggcggggggtggagaccaccacacccctcccaacaagaagcaacaagaagcgcggccagcagctaccctgagc ctgacgcctgagcagtggaagttcccaaaaaagctacagctgcccaggctacgcatgaaggaggaccctgggag aagacagtgccccctacggaatgtca
配列番号:104	配列番号 :102		Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC1*02) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGPVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

配列番号:105	ヒトCλ 定常領域	IGLC3*03	Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC3*03) ヌクレオチド配列	ggtagcccaaggcgccccctcggtcactctgttccaccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccac actggigtgtctcataagtacttctaccgggagccgigacagtgccctggaaaggcagatagcagccccgtca aggcgggagtggagaccaccacaccttccaaacaaagcaacaacaaaglacgcggccagcagctaccctgagc ctgacgcctgagcagtggaagtcaccacaaaagctacagctgcccaggtcacgcaltgaaggaggacaccgltggag aagacagtgggccctacagaatgtca
配列番号:106			Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC3*03) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号:107	ヒトCλ 定常領域	IGLC3*04	Cλ 軽鎖定常 領域 (IGLC3*04) ヌクレオチド配列	ggtagcccaaggcgccccctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccac actggigtgtctcataagtacttctaccgggagccgigacagtgccctggaaaggcagatagcagccccgtca aggcgggagtggagaccaccacaccttccaaacaaagcaacaacaaaglacgcggccagcagctaccctgagc ctgacgcctgagcagtggaagtcaccacagaagctacagctgcccaggtcacgcaltgaaggaggacaccgltggag aagacagtgggccctacagaatgtca

10

20

30

40

50

配列番号:108			Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC3*04) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号:109	ヒトCλ 定常領域	IGLC6*01	Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC6*01) ヌクレオチド配列	ggtcagcccaaggctgccccatcggtcactctgttcccgccctctctctgaggagcttcaagccaacaaggccac actgggtgcccgtgaltcagtgacttctaccgggagctgtgaaagtgccctggaaagcagatggcagccccgttc aacacgggagtgaggaccaccacacccctccaaacacagagcaacaacaagiacgcgcgcccagcagctacctgag cctgacgcctgagcagtggaagtcaccagaaagctacagctgcccaggtcacgcgtatgaaggaggacccgtgg a gaagacagtgggcccccgcagaatgttca
配列番号:110			Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC6*01) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

配列番号:111	ヒト Cλ 定常領域	IGLC7*01 又は IGLC7*02	Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC7*01 又は IGLC7*02) ヌクレオチド配列	ggtcagcccaaggcigcccatgggtcacctctgtccaccctctctgaggagctcaagccacaaggccac actggtgtctctgtaagtgactctaccgggagccgtgacagtgccctggaaggcagatggcagcccccgtca aggtaggagtgagaccaccaaacccctccaaacaaagcaacaacaaagtagcgccagcagctaccctgagc ctgacgcccagcagtggaagtcacacagaagctacagctgcggggicacgcatgaagggagcacccgtggag aagacagtgcccccgcagaaatgctct
配列番号:112			Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC7*01) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTVAWKADGSPVKVGVEITTKPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSRVTHEGSTVEKTVAPAECS
配列番号:113	ヒト Cλ 定常領域	IGLC7*03	Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC7*03) ヌクレオチド配列	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCGTAAGTGACTTCAACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGTGGGAGTGGAGACCACCA AACCCTCCAAACAAGCAACAAGTATCGGCCACAGCTACCTGAGCCTGACG CCCGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGTCCCGGGTCACGCATGAAGGGA GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAAATGCTCT

配列番号:114			Cλ 軽鎖定常領域 (IGLC7*03) アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFNIPGAVTVAWKADGSPVKVGVEITTKPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS
----------	--	--	-----------------------------------	--

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

50

表 5：遺伝子セット濃縮分析から得られた結果の要旨（実施例 3）

ホールマーク経路	サイズ	NES	P 値	FDRq- 値
ダウンレギュレート				
筋形成	192	-1.499	0.0036	0.0891
非折畳みタンパク質応答	105	-1.610	0.0040	0.1081
上皮間葉移行	189	-1.374	0.0245	0.1675
骨芽細胞分化*	12	-1.573	0.0296	0.0822
骨芽細胞転写因子**	14	-1.525	0.0450	0.0909
MTORC1 シグナリング	182	-1.328	0.0450	0.2176
解糖	188	-1.299	0.0489	0.2437
Wnt β カテニンシグナリング	39	-1.458	0.0492	0.1018
アップレギュレート				
G2M チェックポイント	189	2.185	0.0000	0.0000
E2F 標的	189	2.171	0.0000	0.0000
インターフェロン α 応答	87	2.164	0.0000	0.0000
有糸分裂紡錘体	194	2.112	0.0000	0.0000
インターフェロン γ 応答	183	1.959	0.0000	0.0000
炎症応答	190	1.860	0.0000	0.0035
NFkB 経路 TNFA シグナリング	193	1.624	0.0000	0.0192
同種移植拒絶	175	1.576	0.0000	0.0265
補体	178	1.370	0.0056	0.1166
アポトーシス	156	1.373	0.0207	0.1266

P 値：ボンフェローニ事後検定により修正；NES：正規化濃縮スコア；FDR：真の帰無仮説率。*Park らのデータセット；**Zaidi らのデータセット。

【 0 1 2 4 】

表 6：全身的に Tfr2-ECD で処置された野生型マウスの鉄、血液及び骨パラメータ

	PBS (n = 9)	Tfr2-ECD (n = 8)	P 値
<u>鉄の状況</u>			
血漿中の鉄 [$\mu\text{mol/L}$]	31.1 $\pm$ 4.5	30.1 $\pm$ 3.3	0.608
肝臓中の鉄 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥組織]	600.4 $\pm$ 333	578.3 $\pm$ 273	0.889
脾臓中の鉄 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥組織]	692.0 $\pm$ 157	620.2 $\pm$ 113	0.301
腎臓中の鉄 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥組織]	112.2 $\pm$ 14.4	112.6 $\pm$ 15.0	0.961
心臓中の鉄 [$\mu\text{g/g}$ 乾燥組織]	189.8 $\pm$ 54.3	207.8 $\pm$ 54.1	0.727
<u>血液計測</u>			
RBC [$10^{12}/\text{L}$]	9.18 $\pm$ 1.39	10.1 $\pm$ 0.40	0.129
ヘモグロビン [mmol/L]	8.91 $\pm$ 1.25	9.77 $\pm$ 0.41	0.105
HCT	0.47 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.02	0.189
血小板 [$10^9/\text{L}$]	414 $\pm$ 99.5	385 $\pm$ 69.5	0.525
網状赤血球 [$10^9/\text{L}$]	191 $\pm$ 69.6	197 $\pm$ 24.2	0.840
WBC [$10^9/\text{L}$]	9.23 $\pm$ 4.11	11.0 $\pm$ 3.09	0.369
分化度計測、%完全形			
好中球	9.52 $\pm$ 2.23	7.33 $\pm$ 2.82	0.104
リンパ球	88.6 $\pm$ 3.37	90.1 $\pm$ 4.35	0.428
単球	1.63 $\pm$ 1.47	2.17 $\pm$ 2.55	0.603
<u>μCT</u>			
BV/TV [%] 大腿骨	9.40 $\pm$ 2.62	10.7 $\pm$ 3.09	0.346
BV/TV [%] 脊椎	25.1 $\pm$ 4.52	24.1 $\pm$ 3.36	0.612

データは平均 $\pm$ SD であり、スチューデントt検定によって分析された。RBC、赤血球；HCT、ヘマトクリット；WBC、白血球；BV/TV、骨体積 / 総体積

【 0 1 2 5 】

表 7：抗体重鎖可変領域遺伝子セグメント

10

20

30

40

50

遺伝子セグメント	対立遺伝子例	遺伝子セグメント	対立遺伝子例	遺伝子セグメント	対立遺伝子例	遺伝子セグメント	対立遺伝子例
JH6	02	D1-14	01	VH2-5	10	VH3-43	01
JH5	02	D6-13	01	VH3-7	01	VH1-45	02
JH4	02	D5-12	01	VH1-8	01	VH1-46	01
JH3	02	D4-11	01	VH3-9	01	VH3-48	01
JH2	01	D3-10	01	VH3-11	01	VH3-49	05
JH1	01	D3-9	01	VH3-13	01	VH5-51	01
D7-27	02	D2-8	01	VH3-15	01	VH3-53	01
D1-26	01	D1-7	01	VH1-18	01	VH1-58	01
D6-25	01	D6-6	01	VH3-20	01	VH4-59	01
D5-24	01	D5-5	01	VH3-21	03	VH4-61	01
D4-23	01	D4-4	01	VH3-23	04	VH3-64	02
D3-22	01	D3-3	01	VH1-24	01	VH3-66	03
D2-21	02	D2-2	02	VH2-26	01	VH1-69	12
D1-20	01	D1-1	01	VH4-28	05	VH2-70	04
D6-19	01	VH6-1	01	VH3-30	18	VH3-72	01
D5-18	01	VH1-2	02	VH4-31	03	VH3-73	02
D4-17	01	VH1-3	01	VH3-33	01	VH3-74	01
D3-16	02	VH4-4	02	VH4-34	01		
D2-15	01	VH7-4	01	VH4-39	01		

10

20

【0126】

表8：抗体軽鎖可変領域遺伝子セグメント

遺伝子セグメント	対立遺伝子例	遺伝子セグメント	対立遺伝子例	遺伝子セグメント	対立遺伝子例
Jκ5		Vκ3-15	01	Vκ1-8	01
Jκ4		Vκ1-16	02	Vκ1-43	01
Jκ3		Vκ1-17	01	Vκ3-11	01
Jκ2		Vκ3-20	01	Vκ1-12	02
Jκ1		Vκ6-21	01	Vκ1-13	01
Vκ4-1		Vκ2-24	01	Vκ3-15	01
Vκ5-2		Vκ1-27	01	Vκ1-16	01
Vκ1-5		Vκ2-28	01	Vκ1-17	01
Vκ1-6	01	Vκ2-29	01	Vκ3-20	01
Vκ1-8	01	Vκ2-30	01	Vκ2-26	02
Vκ1-9	01	Vκ1-33	01	Vκ2-28	01
Vκ3-11	01	Vκ1-39	01	Vκ2-29	01
Vκ1-12	01	Vκ2-40	01	Vκ2-30	01
Vκ1-13	01	Vκ3-7	01	Vκ1-33	01

30

40

本発明のさらなる例示的態様のいくつかを以下に列挙する。

〔1〕対象ヒト若しくは対象動物の骨疾患又は症状を治療若しくは予防する方法で使用されるトランスフェリン受容体2（Tfr2）アンタゴニスト又はアゴニストであって、当該方法が、当該アンタゴニスト又はアゴニストを対象動物に投与して当該対象動物においてTfr2と拮抗させる工程を含む、前記アンタゴニスト又はアゴニスト。

〔2〕方法が、

50

(i) 骨細胞のTfr2と拮抗させることによって、当該細胞においてp38 MAPキナーゼ経路シグナリングを阻害する工程；

(ii) 対象動物においてTfr2と拮抗させることによって、骨細胞においてWnt発現をアップレギュレートする工程；

(iii) 骨細胞のTfr2と拮抗させることによって、当該細胞においてスクレロスチン、Dkk1及び/又はアクチビンA活性又は発現を阻害する工程；又は

(iv) 骨細胞のTfr2と拮抗させることによって、当該細胞においてPhex、Dmp1、Dkk1及び/又はSostの発現を阻害する工程、

を含む、前記〔1〕に記載のアンタゴニスト。

〔3〕方法が、対象動物においてTfr2のBMPとの結合を阻害する工程を含む、前記〔1〕又は〔2〕のいずれかに記載のアンタゴニスト。

〔4〕前記〔1〕から〔3〕のいずれかに記載のアンタゴニストであって、

(i) 疾患又は症状が骨粗しょう症であるか；

(ii) 方法が、(a) 骨体積の増加、(b) 骨密度の増加、(c) 小柱数 (Tb.N) の増加、(d) 小柱の太さ (Tb.Th) の増加、(e) 小柱間隔 (Tb.Sp) の減少、(f) 骨無機質密度の増加、(g) 骨微細石灰化密度の増加、(h) 骨質量の増加、及び (i) 骨強度の増加、の1つ以上を生じるか；

(iii) 方法が対象動物において骨形成を増加させるための方法であるか；

(iv) 方法が対象動物において骨再吸収を減少させるための方法であるか；

(v) 方法が対象動物において骨芽細胞（又はその骨形成活性）を増加させるための方法であるか；

(vi) 方法が対象動物において破骨細胞（又はその骨再吸収活性）を減少させるための方法であるか；

(vii) 方法が対象動物において骨代謝回転を増加させるための方法であるか；

(viii) 方法が対象動物においてプロコラーゲンI型N-末端ペプチド (P1NP) を増加させるための方法であるか；

(ix) 方法が対象動物においてI型コラーゲンのC-末端テロペプチド (CTX) を増加させるための方法であるか；又は

(x) 方法が対象動物において骨細胞を増加させるための方法である、前記アンタゴニスト。

〔5〕方法が、スクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAアンタゴニストを対象動物に投与する工程を含む、前記〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のアンタゴニスト。

〔6〕方法が、(i) 骨細胞のTfr2をアゴナイズすることによって、当該細胞でp38 MAPキナーゼ経路シグナリングを刺激する工程；(ii) 骨細胞のTfr2をアゴナイズすることによって、当該細胞でWnt発現ダウンレギュレートする工程；又は (iii) 骨細胞のTfr2をアゴナイズすることによって、当該細胞でスクレロスチン活性又は発現を刺激する工程、を含む、前記〔1〕に記載のアゴニスト。

〔7〕方法がTfr2のBMP結合を促進する工程を含む、前記〔1〕又は〔6〕に記載のアゴニスト。

〔8〕BMPがBMP2、4、6及び7の1つ以上である、前記〔7〕に記載のアゴニスト。

〔9〕方法が、スクレロスチン、Dkk1又はアクチビンAアゴニストを対象動物に投与する工程を含む、前記〔1〕及び〔6〕から〔8〕のいずれか1項に記載のアゴニスト。

〔10〕対象ヒト若しくは対象動物の疾患又は症状を治療若しくは予防する方法で使用される骨形成タンパク質 (BMP) 結合因子であって、前記方法が対象動物にBMP結合因子を投与する工程を含み、当該因子がBMPとの結合について可溶性Tfr2-ECDと競合し、当該疾患又は症状が前記BMPによって媒介される、前記骨形成タンパク質結合因子。

〔11〕因子がBMP捕捉因子である、前記〔10〕に記載の因子。

〔12〕BMPがBMP2、4、6又は7である、前記〔10〕又は〔11〕に記載の因子。

〔13〕因子が、ホロ-トランフェリン及び/又はBMPRの、BMP2、4、6及び7の1つ、2つ以上又は全てとの結合よりも強く前記BMPと結合する、前記〔10〕から〔12〕のいず

10

20

30

40

50

れか1項に記載の因子。

〔14〕因子がTfr2細胞外ドメイン (Tfr2-ECD) を含み、場合によって当該因子が第二の部分を含む融合タンパク質に含まれる、前記〔10〕から〔13〕のいずれか1項に記載の因子。

〔15〕第二の部分捕捉因子の半減期を対象動物において増強するための半減期延長部分であり、場合によって当該第二の部分が、抗体Fc領域、ポリエチレングリコール (PEG) 部分、血清アルブミン、及び抗血清アルブミン結合部分から選択される、前記〔14〕に記載の因子。

〔16〕疾患又は症状が骨疾患又は症状である、前記〔10〕から〔15〕のいずれか1項に記載の因子。

〔17〕疾患又は症状が、(a) 硬化性疾患若しくは症状、(b) 病理学的骨形成を含む疾患若しくは症状、又は(c) 骨化疾患若しくは症状、場合によってヘテロ型骨化 (HO) 疾患若しくは症状、又は進行性骨化性線維形成異常 (FOP) 疾患若しくは症状である、前記〔1〕から〔16〕のいずれかに記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔18〕疾患又は症状が、筋肉のHO、ファン・ブーム病及び硬結性骨化症から選択される、前記〔17〕に記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔19〕方法が、レチノイン酸受容体ガンマ (RAR- γ) アゴニスト (場合によってパロパロテン) をTfr2アゴニスト又は捕捉因子と同時に若しくは逐次的に対象動物に投与する工程を含む、前記〔1〕及び〔10〕から〔18〕のいずれか1項に記載のアゴニスト又は因子。

〔20〕方法が、BMPシグナリングアンタゴニストをTfr2アゴニスト又は捕捉因子と同時に若しくは逐次的に対象動物に投与する工程を含む、前記〔1〕及び〔10〕から〔19〕のいずれか1項に記載のアゴニスト又は因子。

〔21〕方法が対象動物において軟骨形成を阻害する、前記〔10〕から〔20〕のいずれか1項に記載の因子。

〔22〕方法が対象動物において軟骨細胞形成を阻害する、前記〔10〕から〔21〕のいずれか1項に記載の因子。

〔23〕疾患又は症状が、BMP-2誘発HO、BMP-4誘発HO、BMP-6誘発HO又はBMP-7誘発HOである、前記〔10〕から〔22〕のいずれか1項に記載の因子。

〔24〕アンタゴニスト又はアゴニストが、(i) 抗Tfr2抗体若しくはTfr2と特異的に結合する抗体フラグメント、(ii) Tfr2-ECDモノマー、又は(iii) Tfr2-ECDダイマーである、前記〔1〕から〔23〕のいずれかに記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔25〕抗体又はフラグメントが、表面プラズモン共鳴によって決定されるTfr2との結合について、1B1 (MyBioSource, MBS833691)、3C5 (Abnova, H00007036-M01)、CY-TFR (Abnova, MAB6780) 及びB-6 (Santa Cruz Biorechnology, sc376278)、353816 (R&D Systems, MAB3120) 及び9F8 1C11 (Santa Cruz Biotechnology, sc32271) から選択される抗体と競合する、前記〔24〕に記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔26〕Tfr2-ECDモノマーがTfr2-ECD-Fcモノマーであり、Tfr2-ECDダイマーがTfr2-ECD-Fcダイマーであり、さらにECD及びFcがヒトTfr2 ECD及びヒトFcである、前記〔24〕に記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔27〕Tfr2-ECDがTfr2 α -ECD又はTfr2 β -ECDである、前記〔24〕又は〔26〕に記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子。

〔28〕前記〔1〕から〔27〕のいずれかに記載のアンタゴニスト、アゴニスト又は因子及び医薬的に許容できる希釈剤、賦形剤又は担体を含む医薬組成物。

〔29〕さらにまた抗スクレロスチン抗体 (場合によってロモソズマブ)、抗Dkk1抗体又は抗アクチビンA抗体、又は前記のフラグメントを含む、前記〔28〕に記載の組成物。

〔30〕前記〔24〕から〔27〕のいずれか1項に列挙された抗体、フラグメント、ダイマー又はモノマー及び医薬的に許容できる希釈剤、賦形剤又は担体を含む医薬組成物。

〔31〕前記〔10〕に従属するとき、さらにまたレチノイン酸受容体ガンマ (RAR- γ)

10

20

30

40

50

アゴニスト（場合によってパロバロテン）及び/又はBMPアンタゴニストを含む、前記〔30〕に記載の組成物。

【図面】

【図 1】

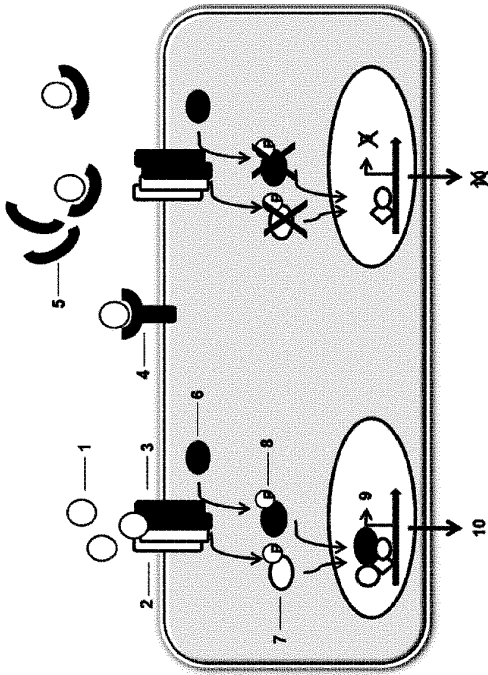


Figure 1

【図 2 a】

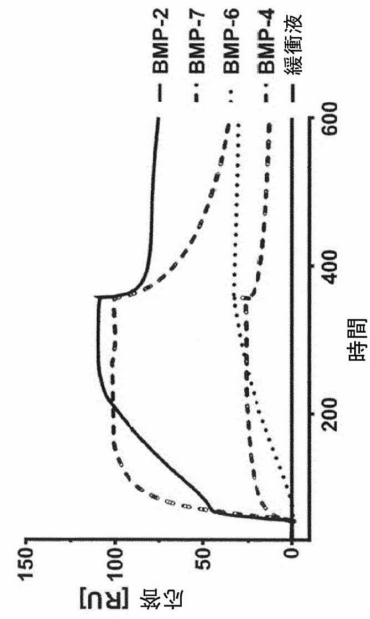


Figure 2a

10

20

30

40

50

【図 2 b】

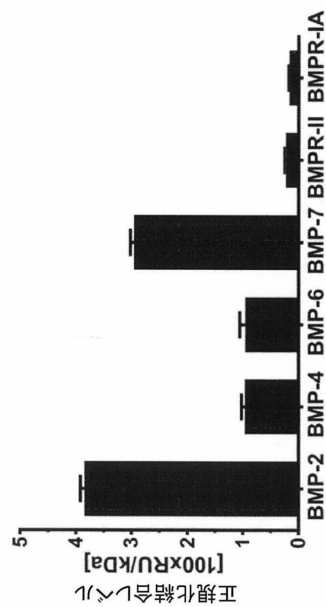


Figure 2b

【図 3 a】

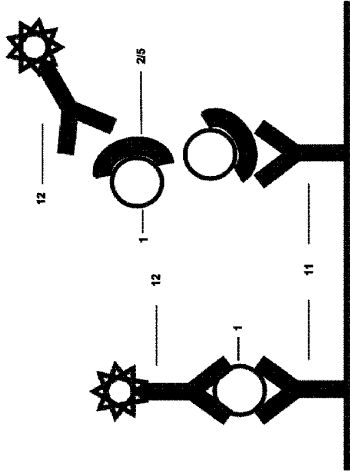


Figure 3a

【図 3 b】

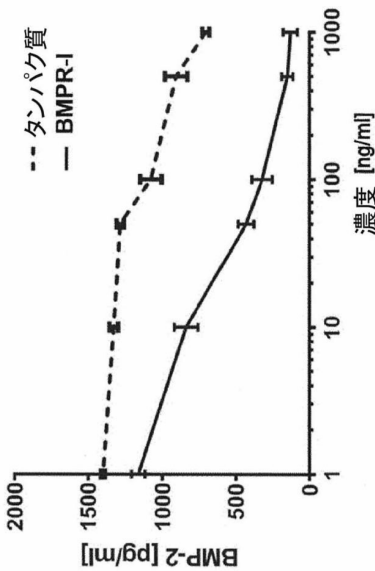


Figure 3b

【図 4 a】

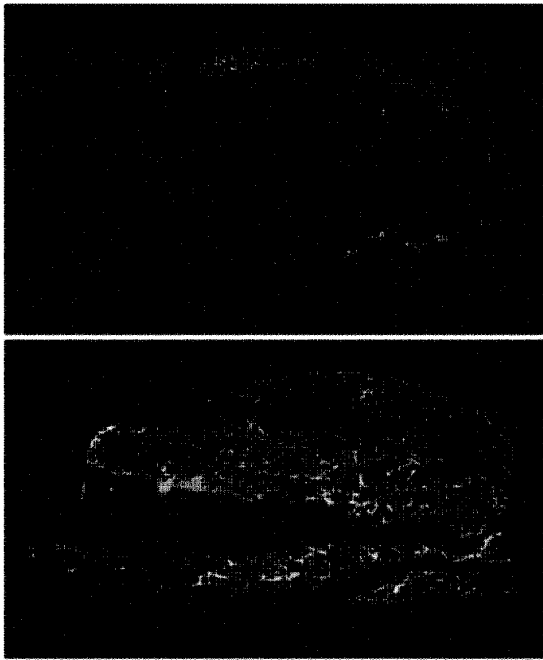


Figure 4a

10

20

30

40

50

【図 4 b】

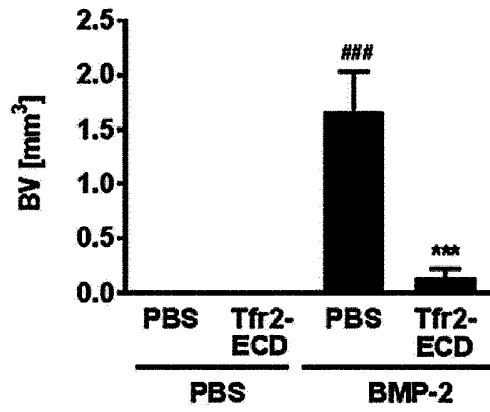


Figure 4b

【図 5】

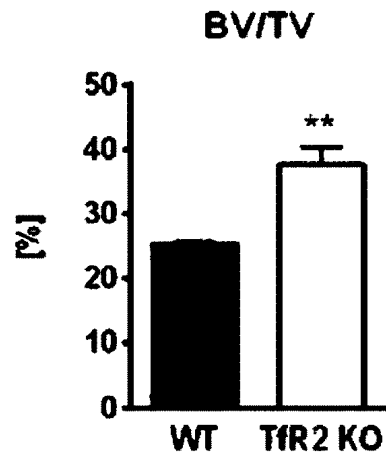


Figure 5

【図 6】

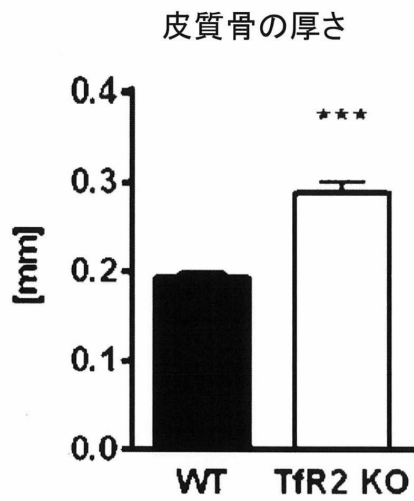


Figure 6

【図 7】

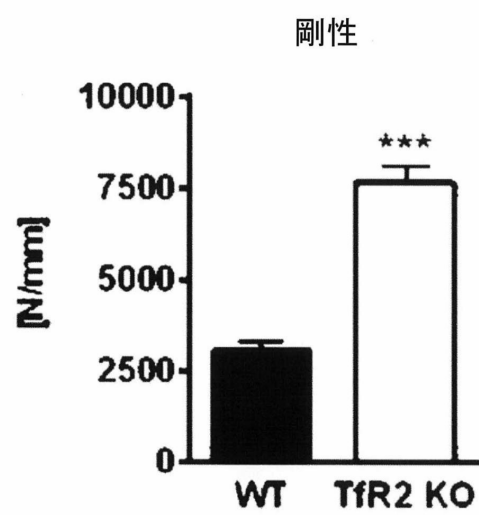


Figure 7

10

20

30

40

50

【図 8】

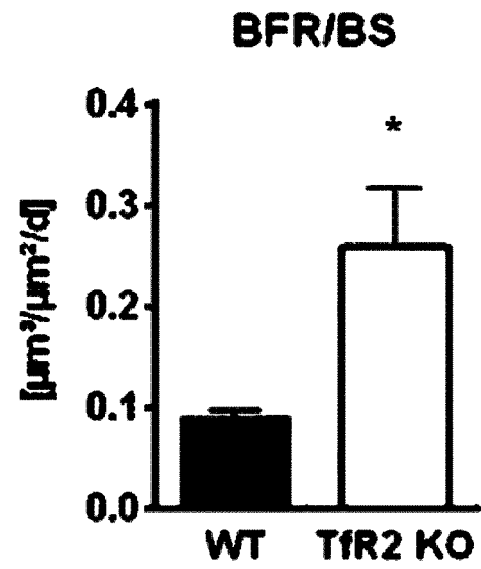


Figure 8

【図 9】

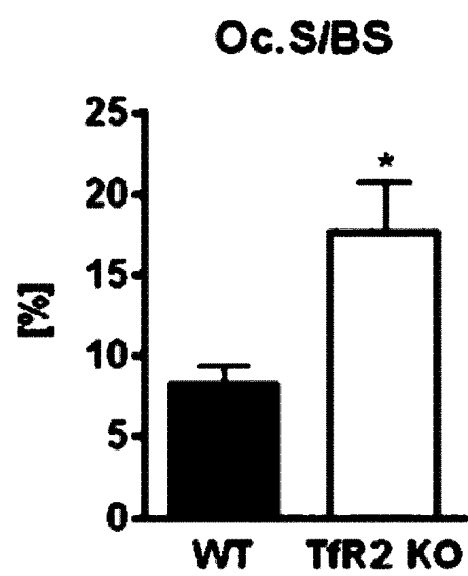


Figure 9

【図 10 a】

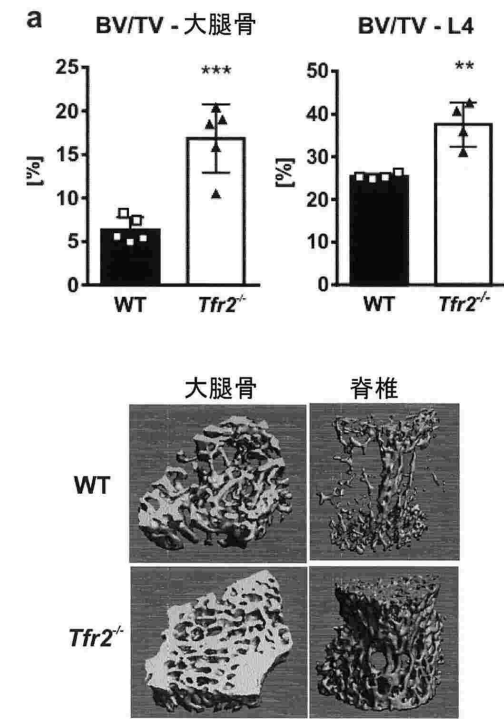


Figure 10a

【図 10 b - d】

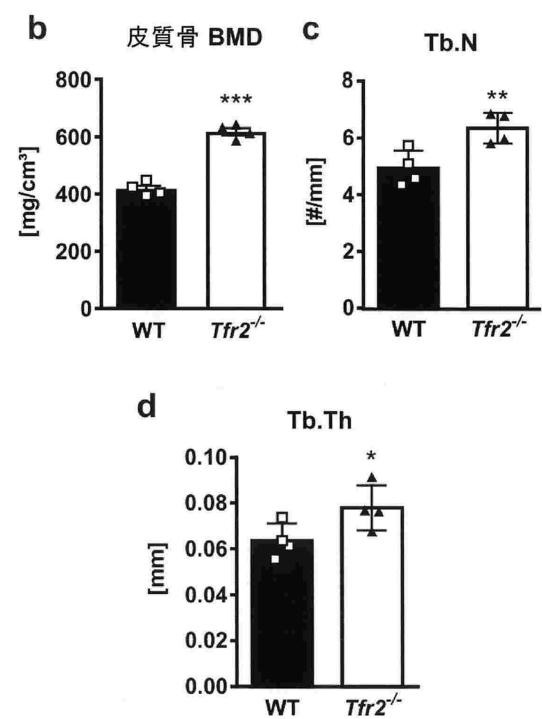


Figure 10b - d

【図 10 e - g】

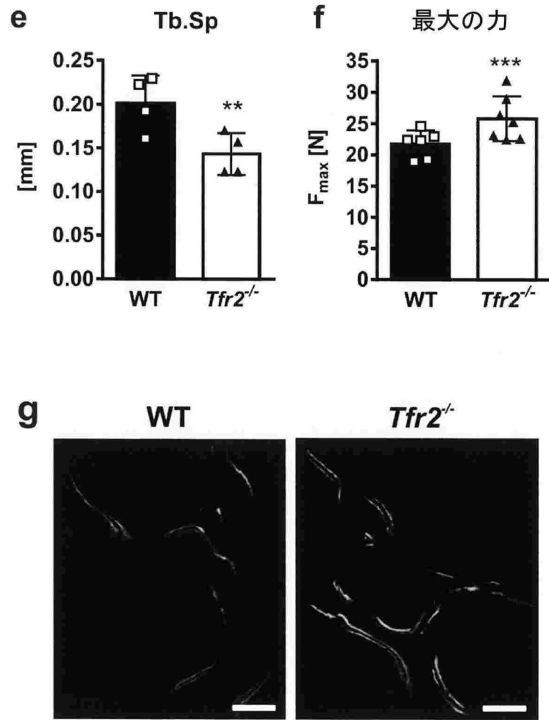


Figure 10e - g

【図 10 h - j】

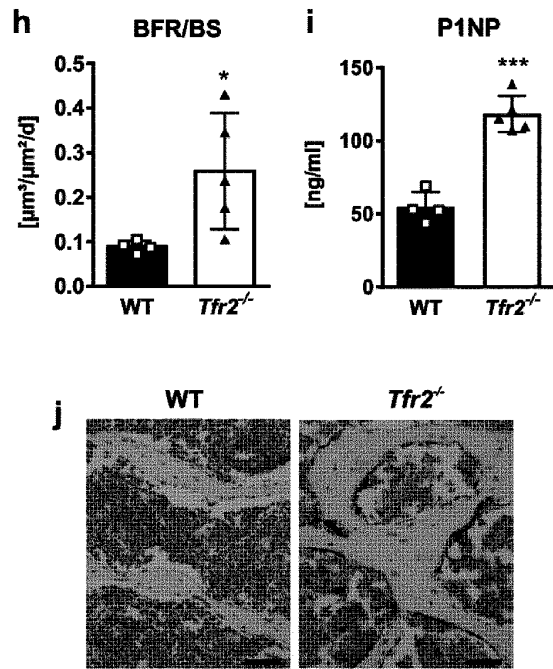


Figure 10h - j

【図 10 k - m】

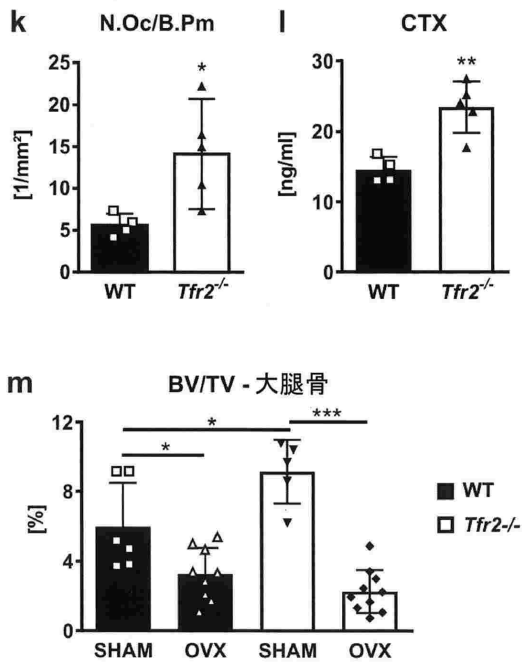


Figure 10k - m

【図 11 a - d】

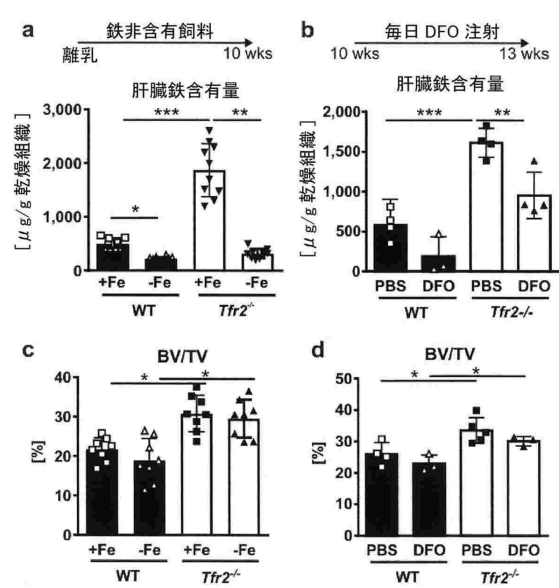


Figure 11a - d

10

20

30

40

50

【図 1 1 e】

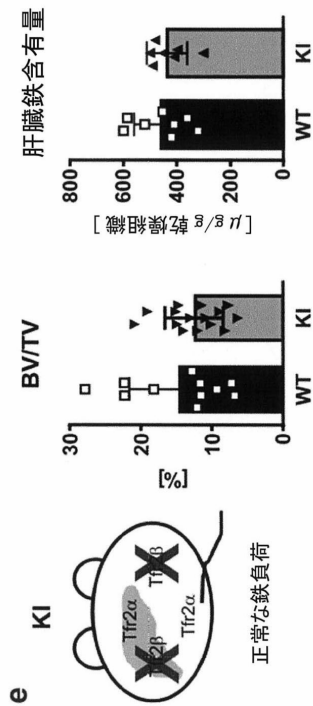


Figure 11e

【図 1 1 f】

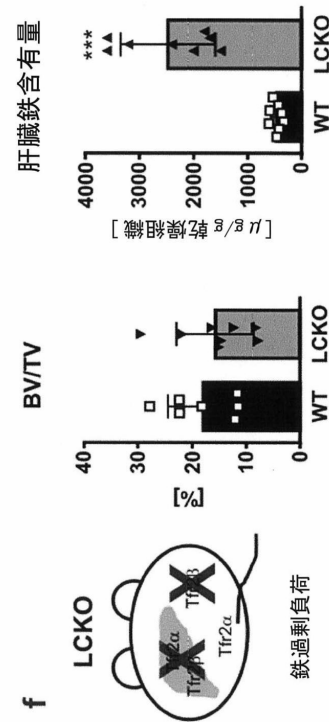


Figure 11f

【図 1 2 a - b】

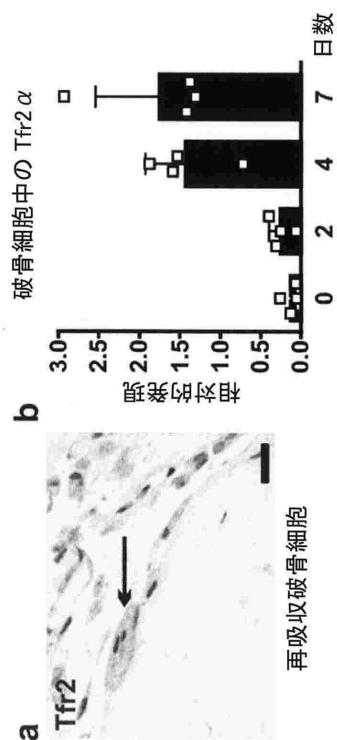


Figure 12a - b

【図 1 2 c - d】

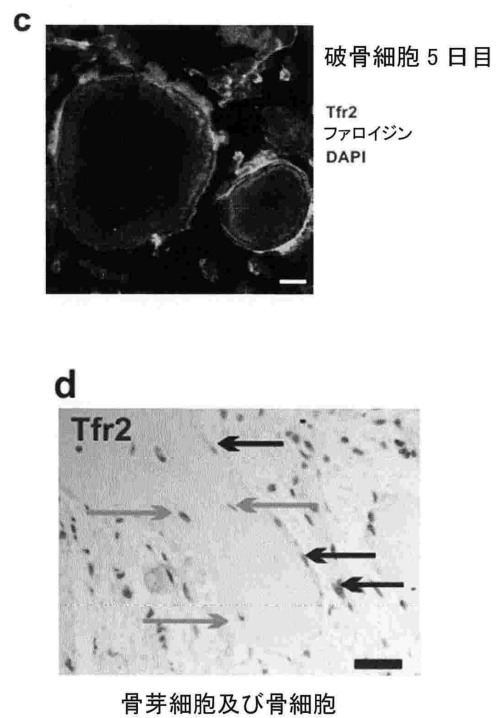


Figure 12c - d

10

20

30

40

50

【図 1 2 e - g】

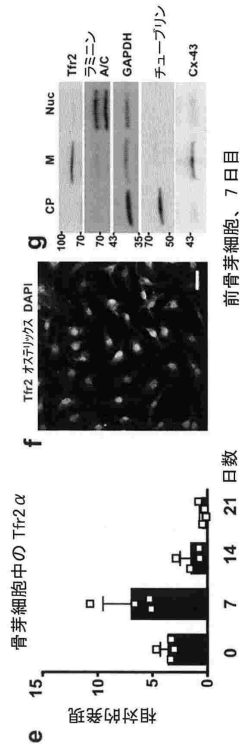


Figure 12e - g

【図 1 2 h - i】

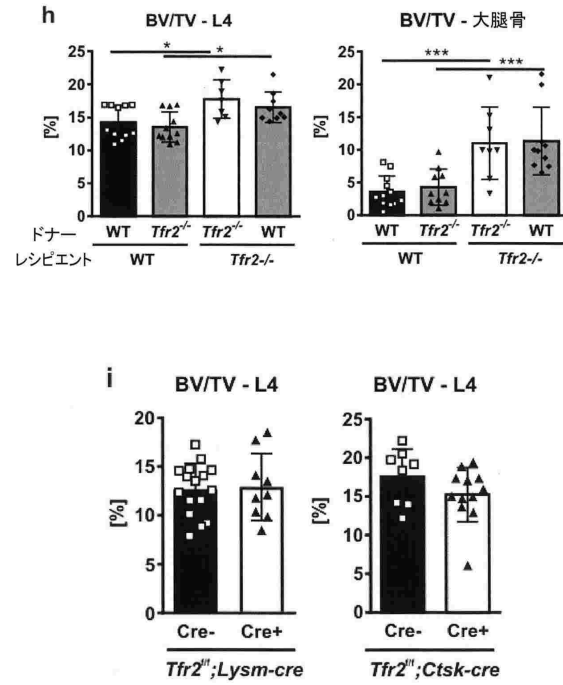


Figure 12h - i

【図 1 2 j】

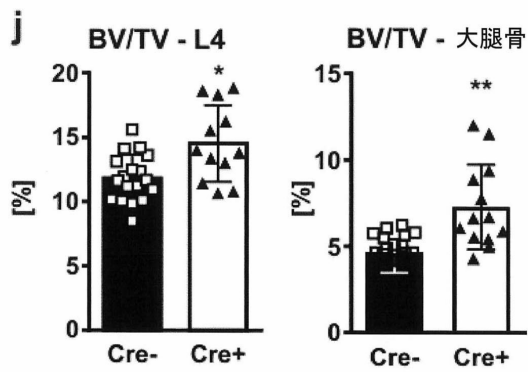


Figure 12j

【図 1 2 k - l】

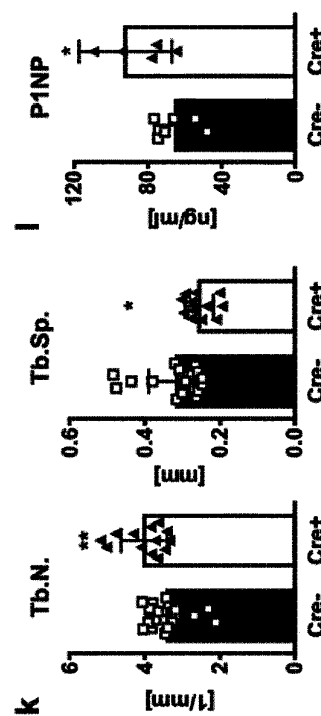


Figure 12k - l

10

20

30

40

50

【図 1 2 m - o】

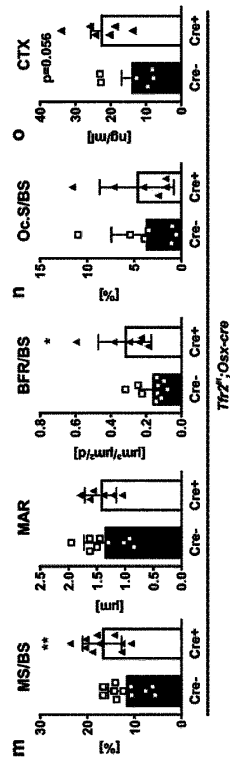


Figure 12m - o

【図 1 3 a】

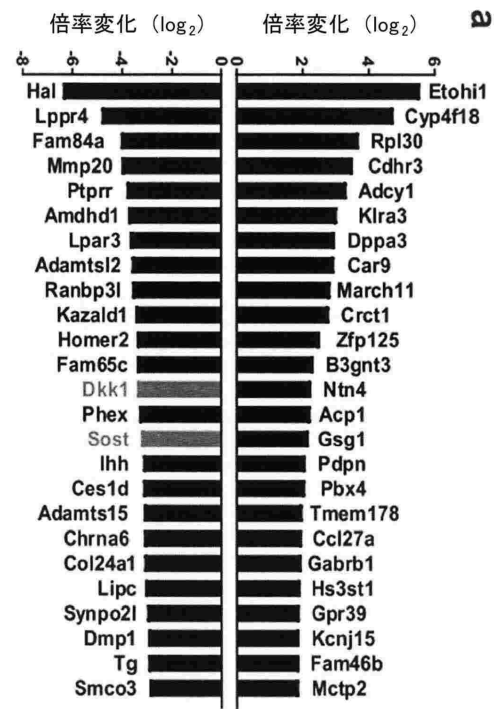


Figure 13a

【図 1 3 b - d】

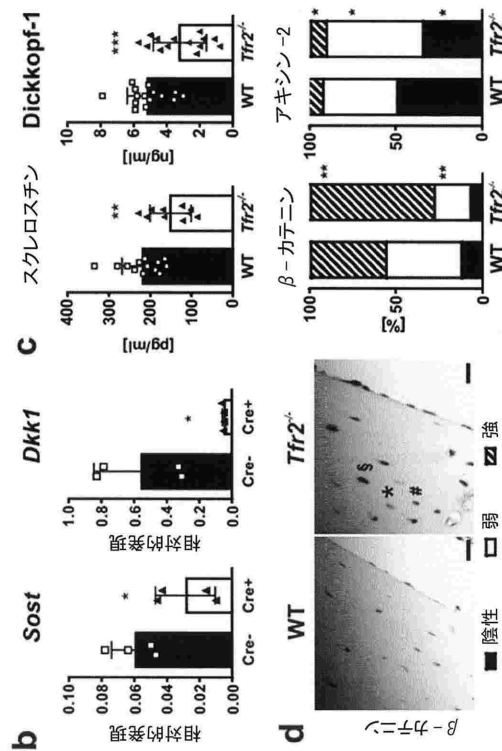


Figure 13b - d

【図 1 3 e】

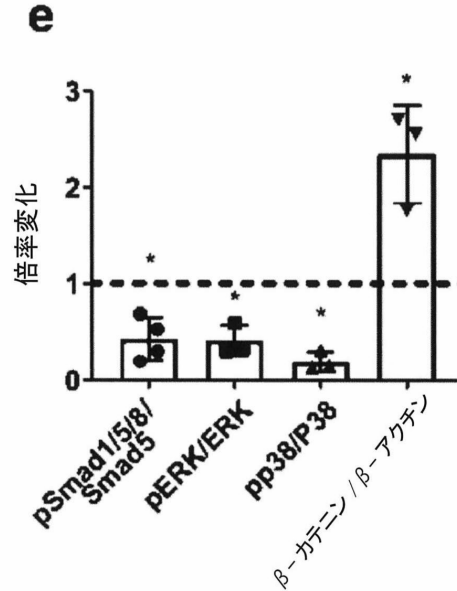


Figure 13e

10

20

30

40

50

【図 1 3 f】

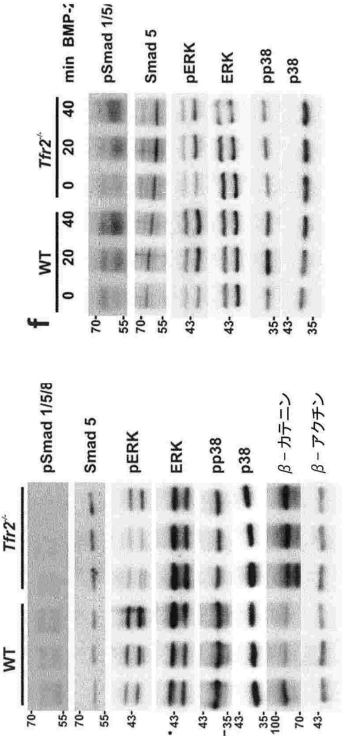


Figure 13f

【図 1 3 g】

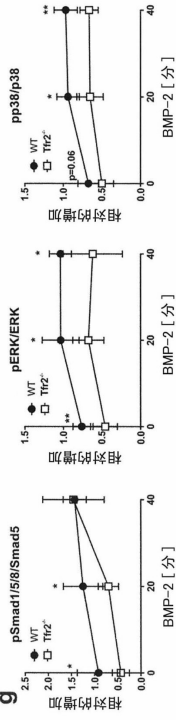


Figure 13g

【図 1 3 h】

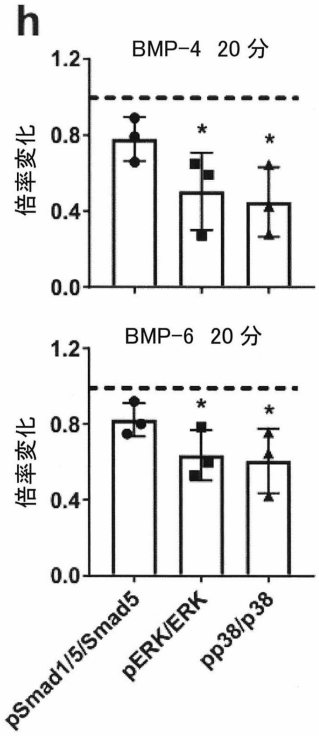


Figure 13h

【図 1 4 a - b】

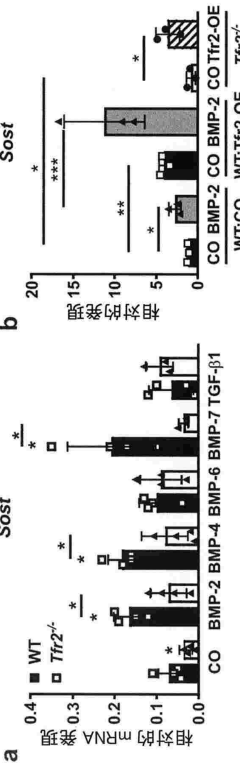


Figure 14a - b

10

20

30

40

50

【図 14 c - e】

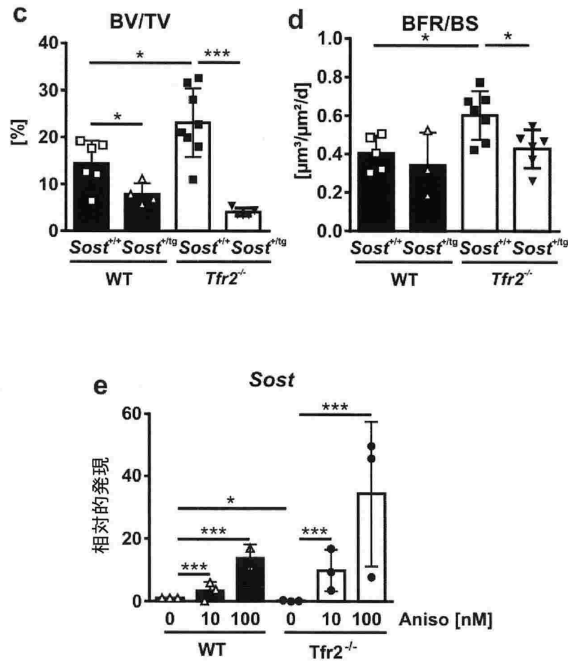


Figure 14c - e

【図 14 f - h】

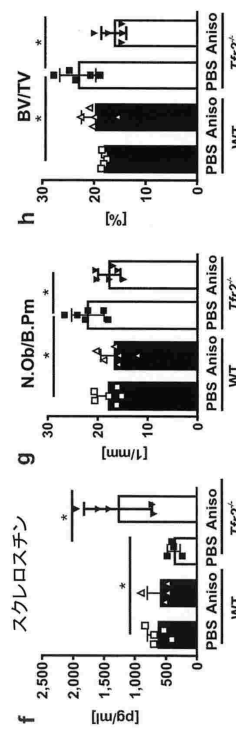


Figure 14f - h

【図 14 i - j】

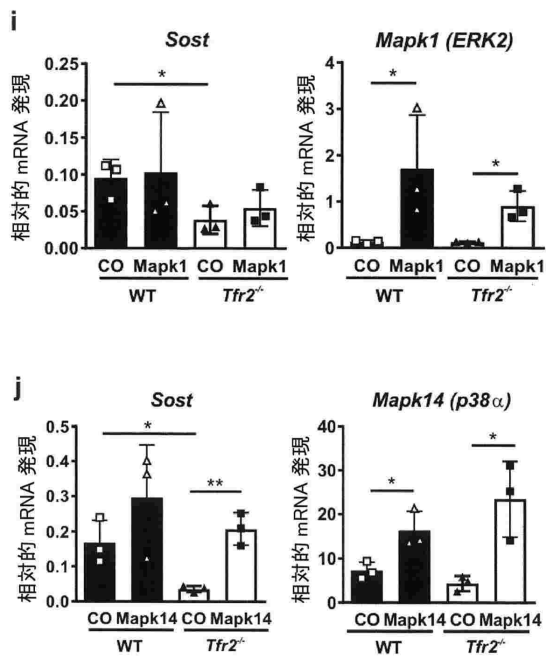


Figure 14i - j

【図 14 k】

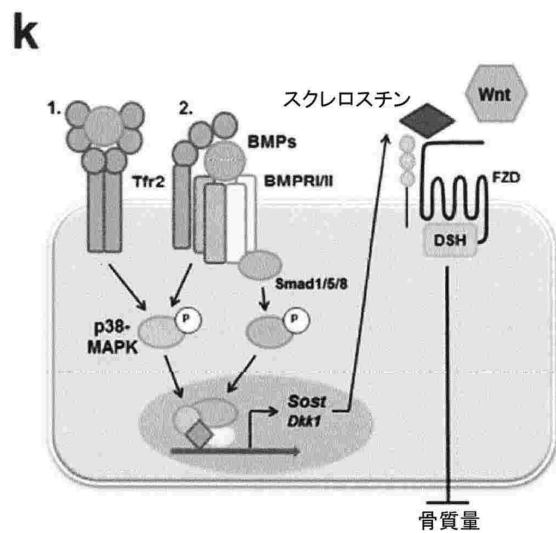


Figure 14k

10

20

30

40

50

【図 15 a - b】

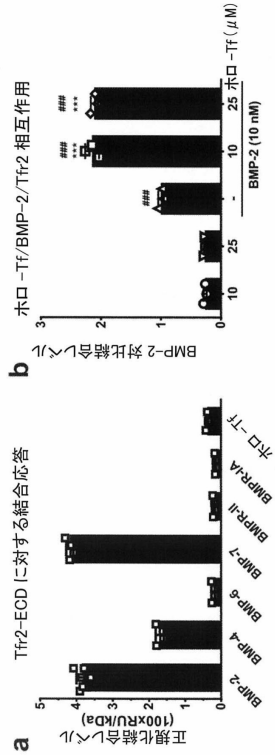


Figure 15a - b

【図 15 d】

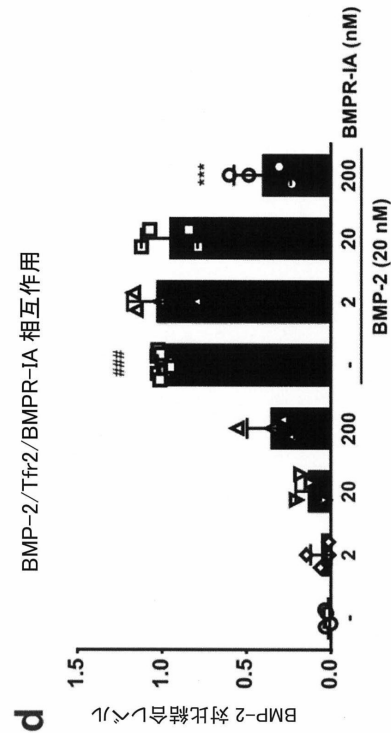


Figure 15d

【図 15 c】

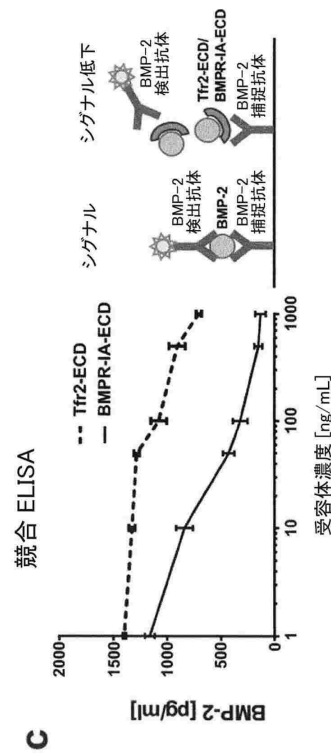


Figure 15c

【図 15 e】

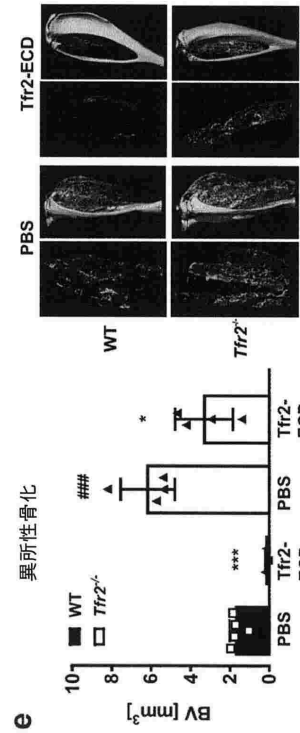


Figure 15e

10

20

30

40

50

【図 15 f】

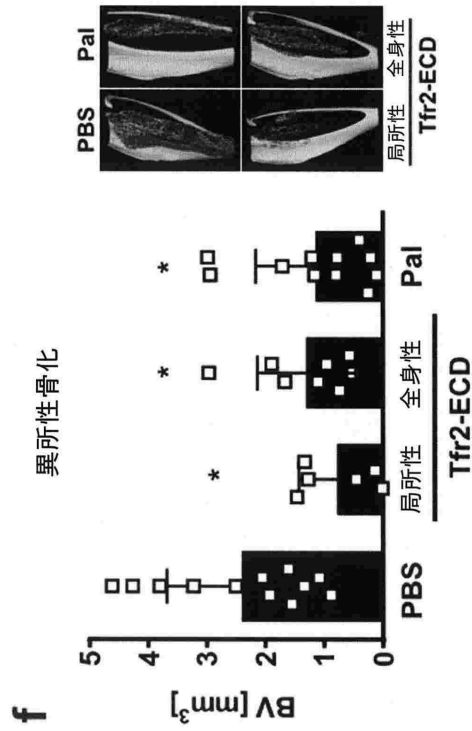


Figure 15f

【図 15 g】

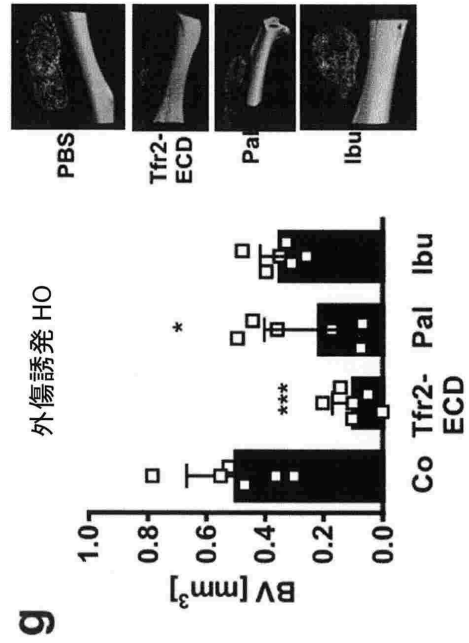


Figure 15g

【図 15 h】

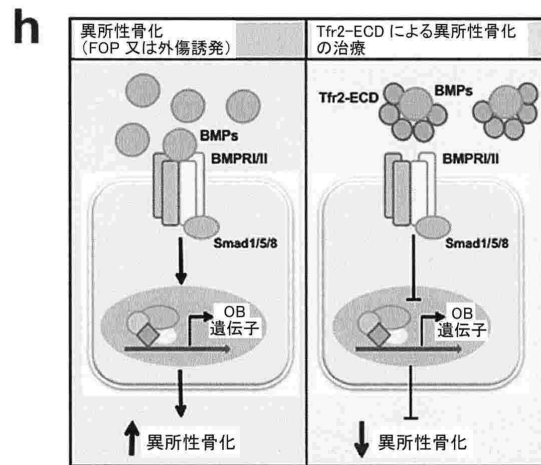


Figure 15h

【図 16 a - c】

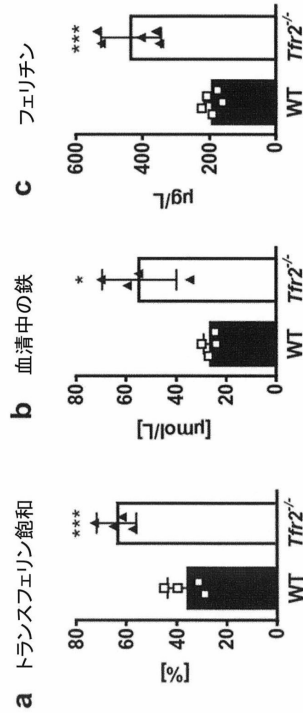


Figure 16a - c

10

20

30

40

50

【図 16 d - e】

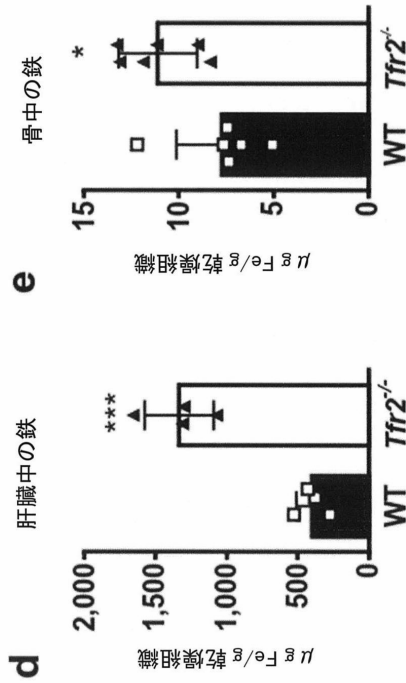


Figure 16d - e

【図 17 a - c】

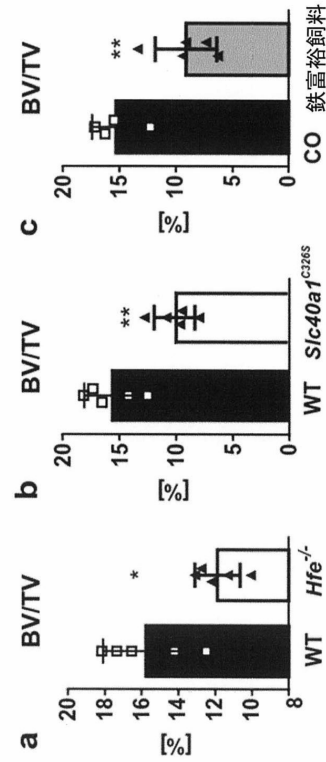


Figure 17a - c

【図 18 a - b】

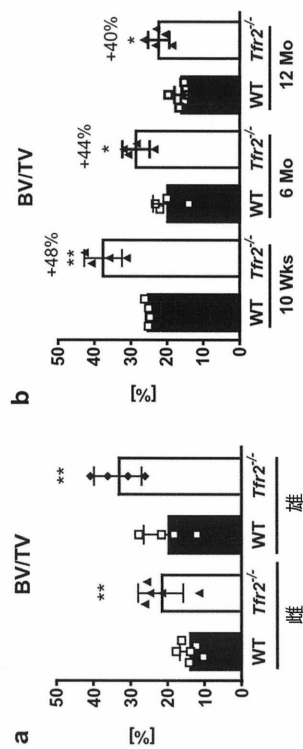


Figure 18a - b

【図 18 c】

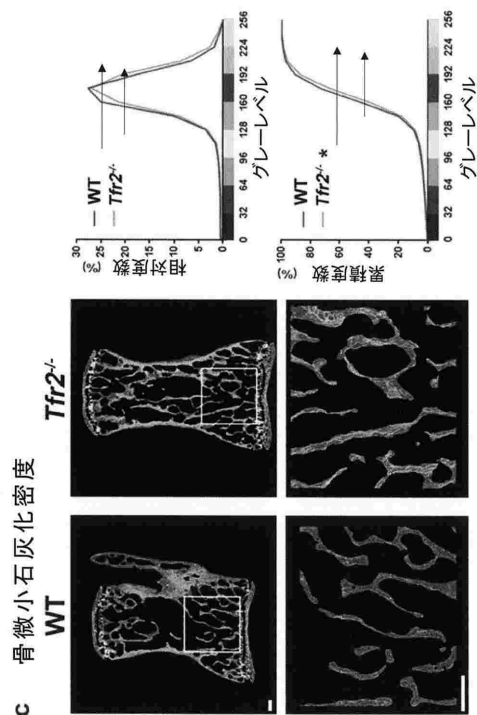


Figure 18c

10

20

30

40

50

【図 18 d - e】

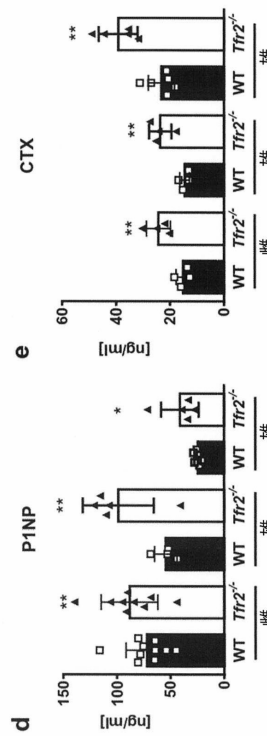


Figure 18d - e

【図 19 a - c】

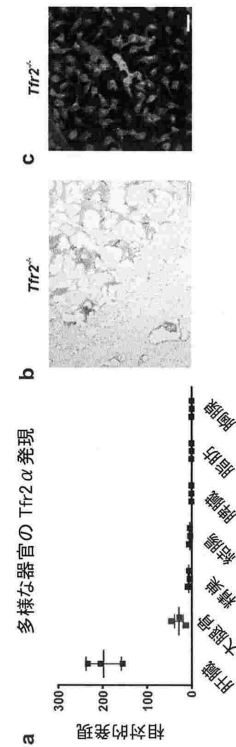


Figure 19a-c

【図 20 a - c】

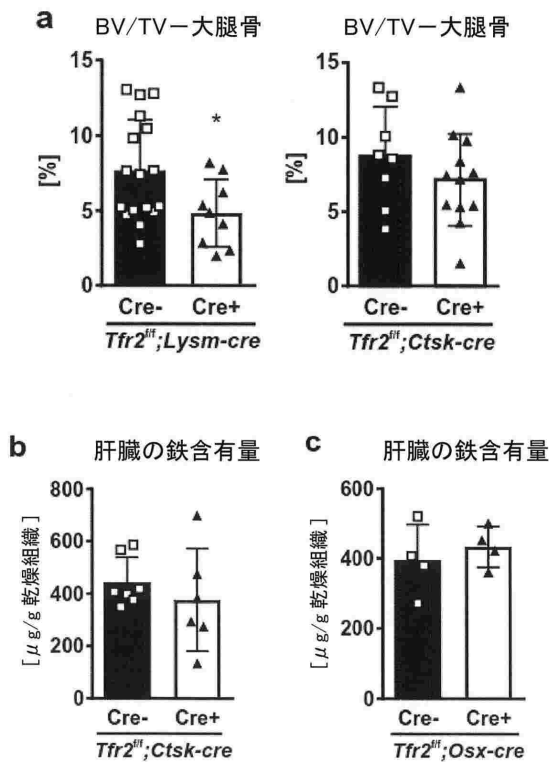


Figure 20a - c

【図 21 a】

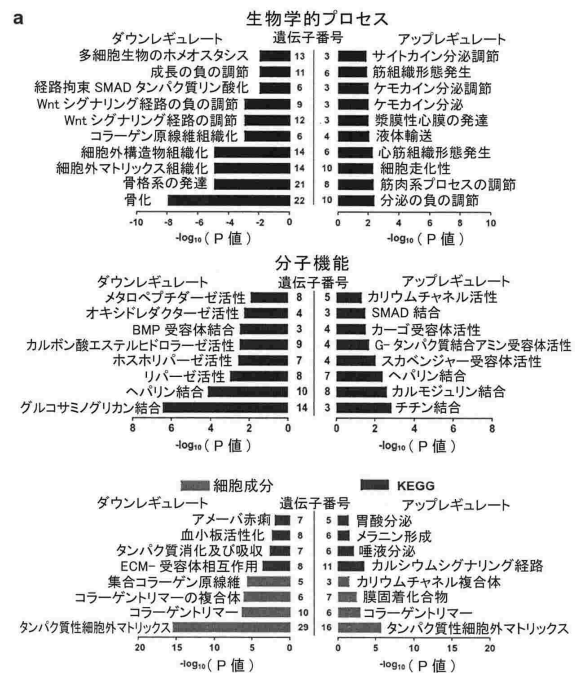


Figure 21a

10

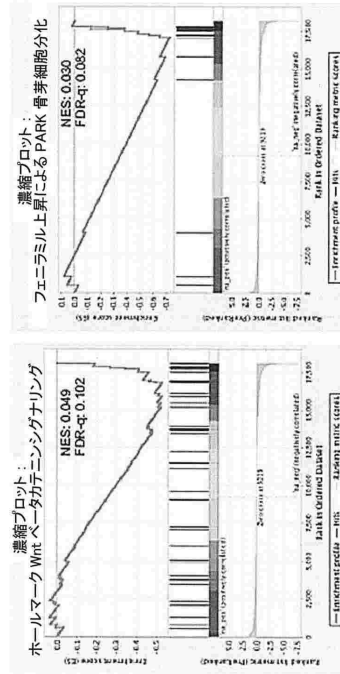
20

30

40

50

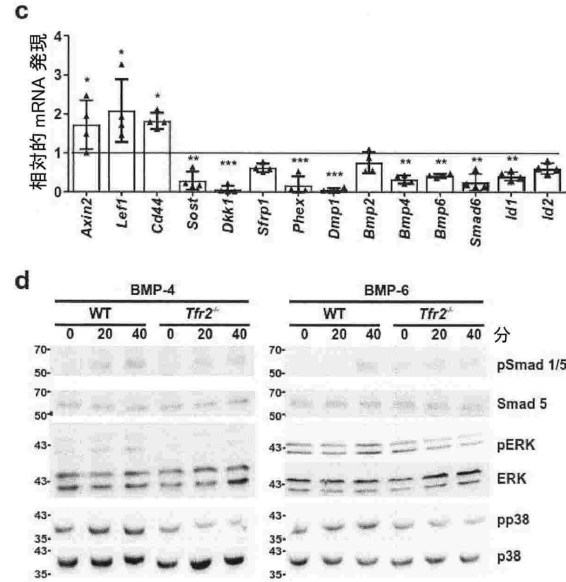
【図 2 1 b】



b

Figure 21c - d

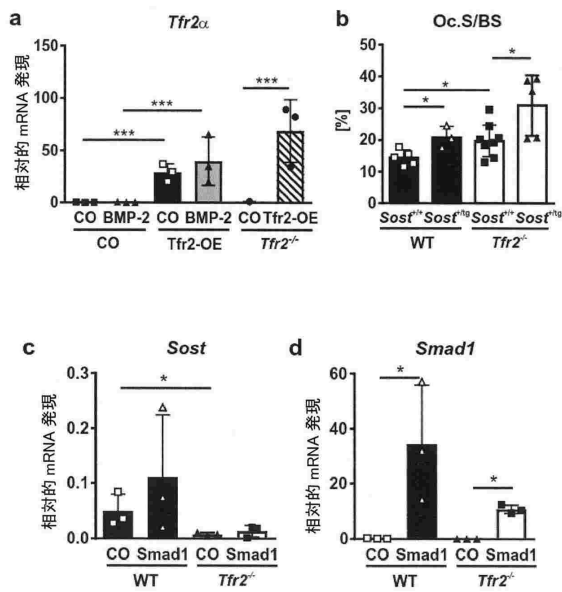
【図 2 1 c - d】



d

Figure 21c - d

【図 2 2 a - d】

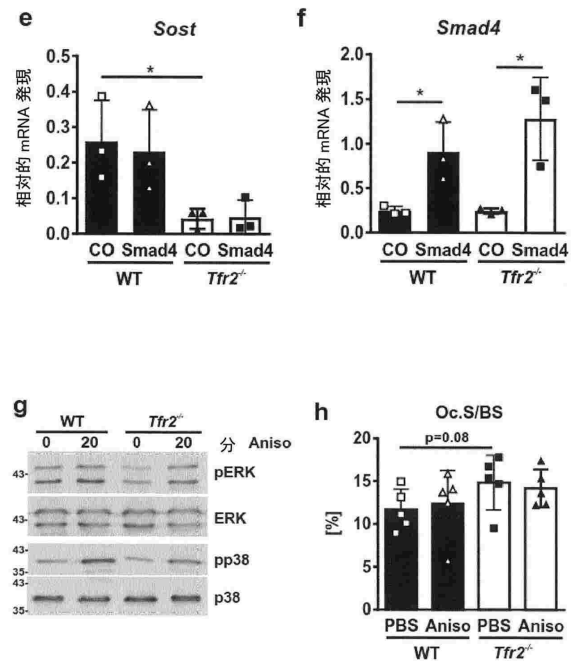


c

d

Figure 22a - d

【図 2 2 e - h】



g

h

Figure 22e - h

10

20

30

40

50

【図 2 3 a - c】

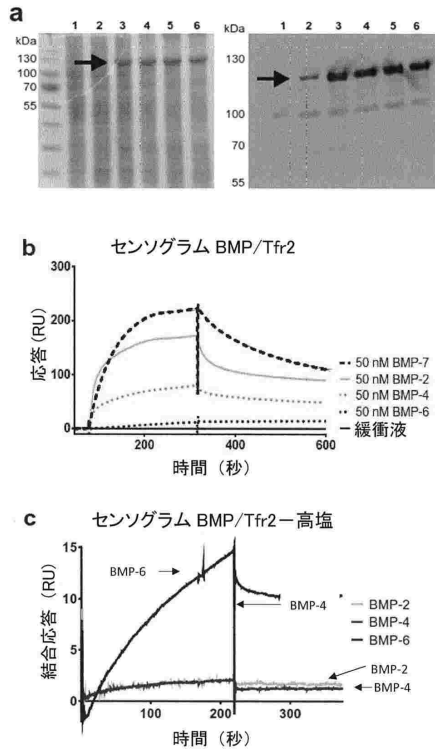


Figure 23a - c

【図 2 3 d - e】

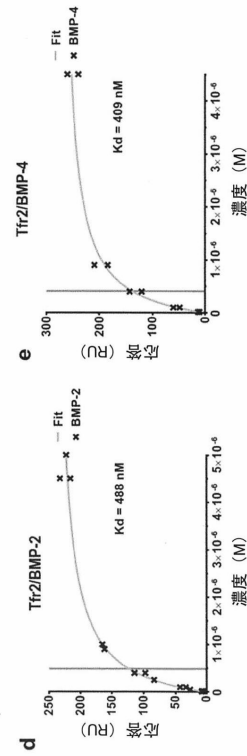


Figure 23d - e

【図 2 3 f】

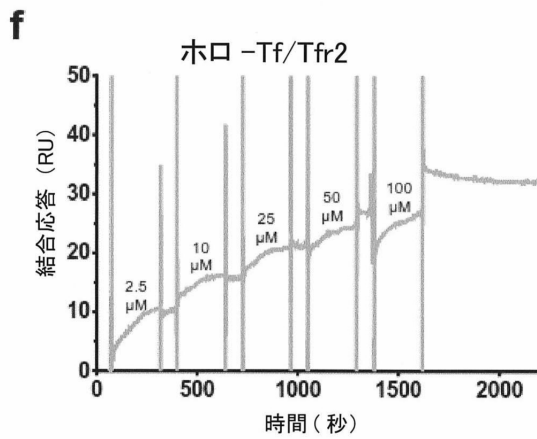


Figure 23f

【図 2 3 g - h】

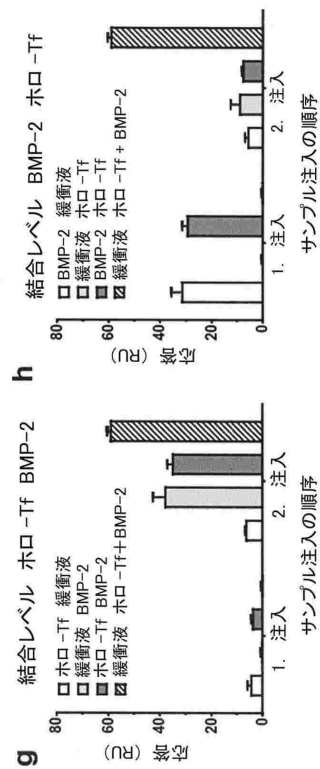


Figure 23g - h

10

20

30

40

50

【図 2 3 i - j】

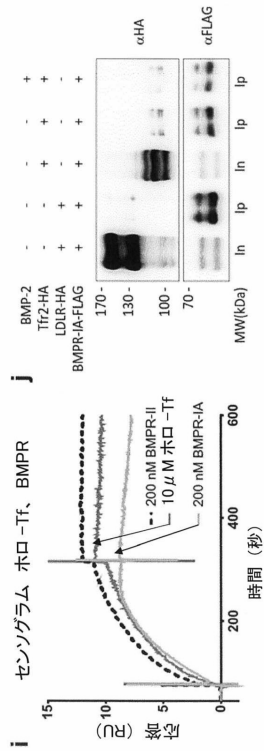


Figure 23i - j

【図 2 4 a】

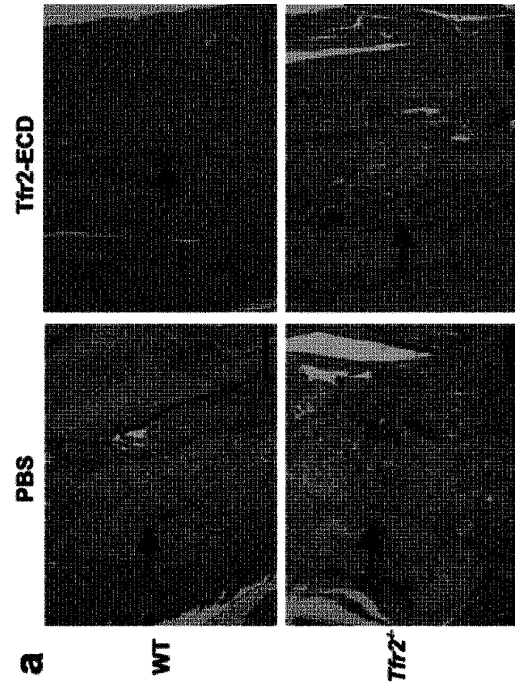


Figure 24a

【図 2 4 b】

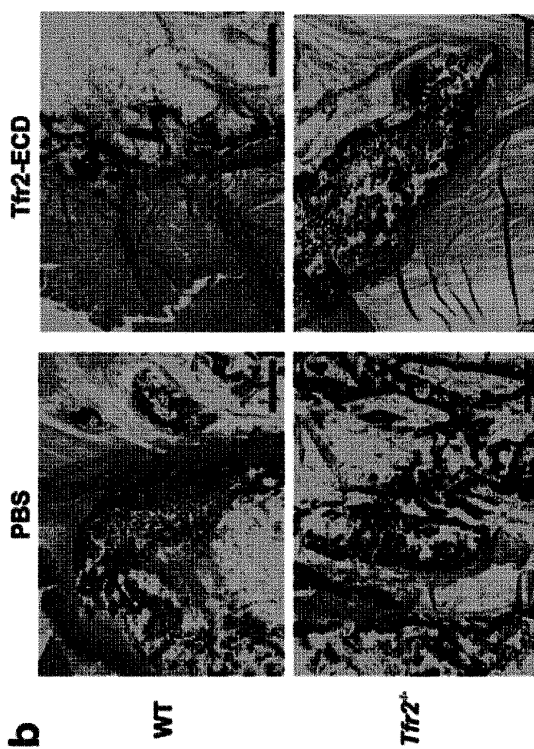


Figure 24b

【図 2 4 c】

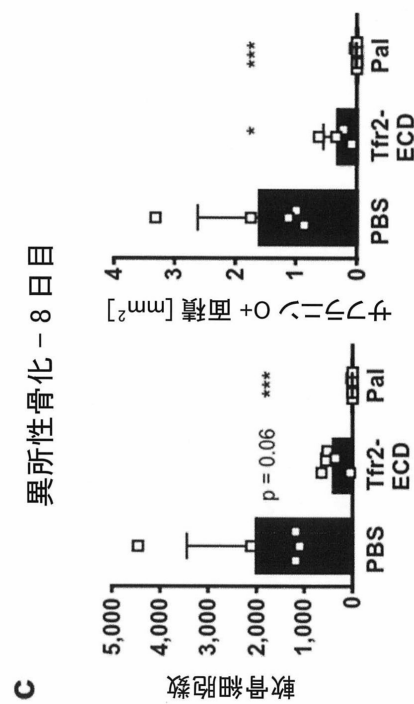


Figure 24c

10

20

30

40

50

【図 2 4 d】

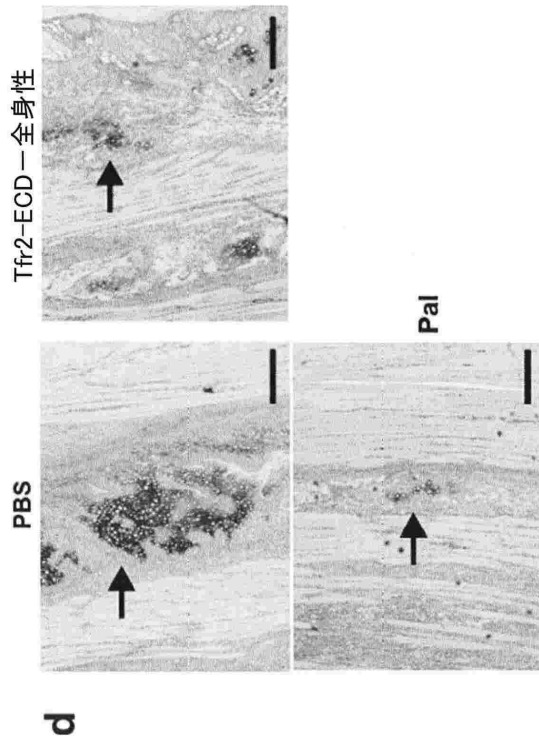


Figure 24d

【配列表】

0007520726000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 47/62 (2017.01)
A 6 1 K 47/60 (2017.01)
A 6 1 K 31/415 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 47/62
A 6 1 K 47/60
A 6 1 K 31/415
A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 45/00 Z N A
C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 14/705

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ラウナー マルティナ

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

(72)発明者 ホフバウワー ローレンツ

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

(72)発明者 ブラッツベッカー ウーウェ

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

(72)発明者 バシャント ウルリケ

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

(72)発明者 テアール イゴール

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

(72)発明者 ゲルマシェフスキー フォルカー

イギリス シービー２２ ３エーティー バブラハム バブラハム リサーチ キャンパス ザ ベネッ
ト ビルディング ビー９３０ カイマブ リミテッド内

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 OSTEOLOGIE 2018 Dresden, 2018年02月, Vol.27, p.A43

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C 0 7 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)