

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4534092号  
(P4534092)

(45) 発行日 平成22年9月1日(2010.9.1)

(24) 登録日 平成22年6月25日(2010.6.25)

(51) Int.Cl. F I  
**A 6 1 K 48/00 (2006.01)** A 6 1 K 48/00 Z N A  
**A 6 1 P 9/04 (2006.01)** A 6 1 P 9/04

請求項の数 2 (全 56 頁)

(21) 出願番号	特願2002-524538 (P2002-524538)	(73) 特許権者	307010166
(86) (22) 出願日	平成13年9月7日(2001.9.7)		第一三共株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/007787		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(87) 国際公開番号	W02002/020055	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成14年3月14日(2002.3.14)		弁理士 社本 一夫
審査請求日	平成19年3月19日(2007.3.19)	(74) 代理人	100146581
(31) 優先権主張番号	特願2000-273644 (P2000-273644)		弁理士 石橋 公樹
(32) 優先日	平成12年9月8日(2000.9.8)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心不全治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

OSF-2遺伝子の発現又はOSF-2タンパク質の産生を抑制する物質を有効成分とする心不全の予防又は治療剤であって、前記有効物質がアンチセンスヌクレオチドであり、配列番号5、19、20又は21に記載の塩基配列において連続した12個以上の塩基配列と相補的なヌクレオチドを含むものである、前記予防又は治療剤。

【請求項2】

アンチセンスヌクレオチドが、配列番号12乃至16からなる群から選択された少なくともひとつの配列を含むものである、請求項1記載の予防又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、心不全の予防又は治療剤、当該予防又は治療剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、心不全診断剤もしくは診断キット及び非ヒト形質転換動物等に関する。

背景技術

慢性心不全は、心筋収縮力の低下により、心臓が各臓器へ十分量の血液を拍出できない状態に陥る疾患であり、その治療には従来心筋収縮力を増加させるジギタリス製剤やキサンチン製剤等の強心剤が使用されてきた。しかし、これらの薬剤は心筋エネルギーの過剰消費により、長期投与においては生命予後を悪化させることが明らかにされている。最近では、心不全状態で亢進している交感神経系やレニンアンジオテンシン系による心臓への過剰な負荷を軽減させる 遮断薬やACE阻害薬による治療が主流になってきている。しか

し、依然として心不全患者の長期生命予後は不良であり、新しいメカニズムに基づく心不全治療薬の開発が望まれている。

従って、本発明における課題は、既存のメカニズムとは異なる新たな心不全の予防剤又は治療剤等の提供に関するものである。更に詳しくは、本発明は、OSF-2 遺伝子又はタンパク質に起因する心不全の増悪化を抑制することによる心不全の予防剤又は治療剤、当該薬剤の有効成分に係る物質のスクリーニング方法、OSF-2 遺伝子の発現や変異又はOSF-2 タンパク質の産生をモニターすることからなる心不全の有用な診断方法及び心不全診断に用いる診断剤もしくは診断キット及びOSF-2 遺伝子を強制的に発現しうる非ヒト形質転換動物等の提供を目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、心不全病態の進行に伴って、心臓における各種の遺伝子発現やタンパク質の発現変化がおこり、これらの変化が心不全病態と密接に関連しているとの予想のもと、適当な心不全モデルを用いて、心不全病態の進行とともに発現量の変化する遺伝子を検索した。その結果、骨芽細胞で特異的に発現する遺伝子として知られているOSF-2 遺伝子が、心不全の進行とともに発現上昇することを見出した。そして、更なる検討の結果、当該遺伝子またはタンパク質が心不全の増悪化に影響を与えることを見出し、その発現や機能を抑制する薬剤が新たな心不全治療剤になることから本発明を完成するに至った。

心不全治療薬の開発においては、各種の病態モデルが使われているが、特に、初期スクリーニングにおいては、モデル作製の簡便さ、解析のしやすさなどからラットのモデルが使用されることが多い。逆に、ラットモデルは、それぞれの制限はあるものの、ヒトの病態を反映するモデルとして認知されている。

心不全病態モデルラットとしては大動脈狭窄ラット、動静脈シャントラット、冠動脈結紮ラット、自然発症高血圧ラット(SHR)、ダール食塩感受性ラット等が知られている。ダールラットはSpague-Dawley系ラットにおいて、8%の高食塩含有食を負荷し、継代交配を行うことにより、3代で高血圧易発性の食塩感受性ラット(Dahl-S)と、高血圧を生じない食塩抵抗性ラット(Dahl-R)とに分離されたものである。Dahl-Sラットについては京都大学の木原らの研究により、6週齢より8%の高食塩含有食を負荷することにより、代償性左室肥大を呈した後、収縮不全を伴う左室拡大、すなわち非代償性心不全へと移行し、肺鬱血により死亡することが示されている(Am. J. Physiol., 267, H2471-2482(1994))。本発明者等はモデルの作製に特殊な手法を必要とせず、短期間で心不全を発症させることができ、また、一個体において代償肥大期と非代償心不全期に明瞭に区分でき、ヒトの高血圧性心不全と発症過程が類似していることから、心不全病態モデルとしてダール食塩感受性ラットを選択した。

ある病態において発現が変化している遺伝子を検出する方法としては、サブトラクション法、ディフアレンシャル・ディスプレイ法、ドットプロット法、マイクロアレイ法などが知られている。本発明においてはサブトラクション法を用いて、心肥大期から心不全期に移行する過程で発現が変化する遺伝子を検出することに成功した。その一つは、骨芽細胞特異的因子として報告されているマウスOSF-2 遺伝子と高い相同性を有することが明らかとなった新規なラットOSF-2 遺伝子であった。

OSF-2 遺伝子は、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞に特異的に発現している遺伝子として分離同定された遺伝子であり(Biochem. J. 294, 271-278, 1993、特開平5-268982)、骨芽細胞において、接着促進活性が報告されている(J. Bone Miner. Res. 14, 1239-1249, 1999)。また、ウサギ腹部大動脈傷害モデルにおけるディフアレンシャル・ディスプレイ法による解析においてOSF-2 遺伝子の発現が増加していることが報告されている(J. Hum. Genet. 43, 9-13, 1998)。さらに、最近、マウスを用いた実験において心肥大時にOSF-2 を含む30以上の遺伝子の発現が変化していること(J. Mol. Cell. Cardiol., 32, 805-815, 2000)、また、ラット心筋

10

20

30

40

50

梗塞モデルにおいてOSF-2を含む200以上の遺伝子の発現が変化していること(Circ. Res., 86, 939-945, 2000)が報告された。

しかしながら、心肥大又は心筋梗塞後、心不全病態への進行とともにさらなる発現誘導が起こることは、これまで知られておらず、特にOSF-2遺伝子又はOSF-2タンパク質が心不全病態の進行と共に病態の進行を促進する因子として働くのか又は病態の進行を抑制する因子として働くのかは全く知られていなかった。

そこで、心臓におけるこの遺伝子の発現と心不全病態の関わりを知ることにより新たな心不全治療剤の開発が可能になると考え、更なる検討を加えることにより本発明を完成させた。

まず、OSF-2遺伝子の変化がダール心不全モデルラット特有の現象でないことを確認するため、大動脈狭窄ラット、動静脈シャントラット、自然発症高血圧ラット(SHR)を用いて心不全病態の進行に伴うOSF-2遺伝子の発現を検討した。その結果、検討したすべてのモデルで同様の遺伝子発現の亢進が見られ、心不全病態における普遍的現象である可能性が強く示唆された。

次に、OSF-2遺伝子が心臓に対してどのような作用を示すのかを検討するため、ラット心臓への遺伝子導入を行った。まず、ラットOSF-2遺伝子はこれまで知られていないので、新たに全長遺伝子を単離し、適当な発現ベクターを構築した後、OSF-2遺伝子をラット心臓へ導入した。心エコーの測定および血行動態の測定を行った結果、OSF-2遺伝子導入ラットでは左室壁の非薄化、左室内腔の拡大および心機能の低下が観察され、拡張型心筋症様の病態が誘導されることが判り、OSF-2遺伝子又はOSF-2タンパク質が心不全の増悪化因子であることが明らかとなった。このような解析は、ラット以外の動物では難しく、ラット遺伝子を単離した意義は大きい。さらに、OSF-2遺伝子の発現を抑制するアンチセンスヌクレオチドを心不全モデルであるダールラット心臓へ導入することにより、心不全による死亡を遅延させることが判明した。此に抛り、心不全病態の進行とともに起こるOSF-2遺伝子の発現又はOSF-2タンパク質の産生が心不全を増悪化していることが判明し、OSF-2遺伝子の発現抑制又はOSF-2タンパク質の産生抑制若しくは機能抑制の作用を有する物質を有効成分とする薬剤が心不全の増悪化を抑制することが十分に示唆され本発明に至った。

即ち、本発明としては以下の事項を挙げることができる。

(1) OSF-2遺伝子の発現、OSF-2タンパク質の産生、OSF-2タンパク質の機能又はOSF-2タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質を有効成分とする心不全の予防剤又は治療剤。

(2) OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質を有効成分とする心不全の予防剤又は治療剤。

(3) OSF-2タンパク質の産生を抑制する物質を有効成分とする心不全の予防剤又は治療剤。

(4) OSF-2遺伝子の発現又はOSF-2タンパク質の産生を抑制する物質がアンチセンスヌクレオチドである上記(1)乃至(3)記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(5) アンチセンスヌクレオチドが、配列番号5、19、20又は21に記載の塩基配列において連続した12個以上の塩基配列と相補的なヌクレオチドを含むものである上記(4)記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(6) アンチセンスヌクレオチドが、配列番号12乃至16からなる群から選択された少なくともひとつの配列を含むものである上記(5)記載の心不全の予防剤又は治療剤。

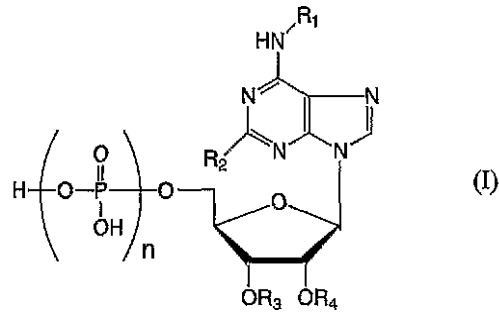
(7) OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質が、以下の一般式(I)で表わされる化合物又はその生物学的に許容される塩である上記(1)又は(2)記載の心不全の予防剤又は治療剤。

10

20

30

40



(式中、 $R_1$  は水素原子、分岐していても良いアルキル基またはアルキル部分が分岐していても良いアラルキル基を示し、 $R_2$  は水素原子、ハロゲン原子又はアミノ基を示し、 $R_3$ 、 $R_4$  は独立して水素原子またはアシル基を示すか、あるいは $R_3$ 、 $R_4$  が一緒になってイソプロピリデン基を示し、 $n$  は 0、1、2 または 3 の整数を示す。)

(8) OSF - 2 遺伝子の発現を抑制する物質が、上記一般式 (I) において、 $R_3$  及び  $R_4$  がともに水素原子である化合物である上記 (7) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(9) OSF - 2 遺伝子の発現を抑制する物質が、上記一般式 (I) において、 $R_1$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  が水素原子、 $R_2$  が塩素原子、 $n$  が 3 である化合物である上記 (7) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(10) OSF - 2 遺伝子の発現を抑制する物質が、上記一般式 (I) において、 $R_1$  が (2 - メチルフェニル) メチル基、 $R_3$  及び  $R_4$  が水素原子、 $n$  が 0 である化合物である上記 (7) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(11) OSF - 2 タンパク質の機能を抑制する物質を有効成分とする上記 (1) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(12) OSF - 2 タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質を有効成分とする上記 (1) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(13) OSF - 2 タンパク質の機能又は OSF - 2 タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質が、OSF - 2 タンパク質又は OSF - 2 タンパク質の標的分子に対する抗体である上記 (11) 又は (12) 記載の心不全の予防剤又は治療剤。

(14) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、(1) OSF - 2 遺伝子の発現制御領域及び OSF - 2 遺伝子若しくはレポーター遺伝子を有する細胞若しくは試験管内発現系、又は (2) OSF - 2 タンパク質若しくは OSF - 2 タンパク質の標的分子、と接触させ、OSF - 2 遺伝子若しくはレポーター遺伝子の発現量又は OSF - 2 タンパク質若しくは OSF - 2 タンパク質の標的分子の量を検出することを含み、心不全の予防又は治療効果を有する物質のスクリーニング方法。

(15) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を、OSF - 2 遺伝子の発現制御領域及び OSF - 2 遺伝子を有する細胞と接触させ、OSF - 2 遺伝子の発現量を検出する、ことを含む上記 (14) 記載の方法。

(16) OSF - 2 遺伝子の発現制御領域をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流及び / 又は下流に連結した発現ベクターを構築後、適当な宿主細胞に導入して培養し、当該培養細胞に合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を添加し、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量又はレポータータンパク質の量を検出する、ことを含む上記 (14) 記載の方法。

(17) 合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である物質を OSF - 2 タンパク質又は OSF - 2 タンパク質の標的分子と接触させ、結合した又は結合しなかった OSF - 2 タンパク質の標的分子又は OSF - 2 タンパク質の量を検出する、ことを含む上記 (14) 記載の物質のスクリーニング方法。

(18) OSF - 2 タンパク質又は OSF - 2 タンパク質の標的分子を支持体に固定化し、当該固定化した OSF - 2 タンパク質又は OSF - 2 タンパク質の標的分子に、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた物質、天然由来の物質又はそれらの誘導体である

10

20

30

40

50

物質とOSF-2タンパク質の標的分子又はOSF-2タンパク質を添加し、結合した又は結合しなかったOSF-2タンパク質の標的分子又はOSF-2タンパク質の量を検出する、ことを含む上記(17)記載の方法。

(19) 生体組織及び/又は体液を採取し、当該組織中のOSF-2遺伝子の発現量を測定すること、又はOSF-2遺伝子若しくは当該制御領域に係る変異を測定することを含む心不全の診断方法。

(20) 生体組織及び/又は体液を採取し、当該体液中のOSF-2タンパク質又は当該断片を測定することを含む心不全の診断方法。

(21) OSF-2遺伝子の発現量又はOSF-2タンパク質の産生量を測定する手段を含む心不全の診断剤又は診断キット。

(22) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子：

(a) 配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号6のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつOSF-2タンパク質活性を有するタンパク質。

(23) 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子：

(a) 配列番号5の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号5の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつOSF-2タンパク質活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(24) 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質：

(a) 配列番号6のアミノ酸配列からなるタンパク質；

(b) 配列番号6のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつOSF-2タンパク質活性を有するタンパク質。

(25) OSF-2遺伝子を過剰発現し、心不全病態モデルとして使用できる非ヒト形質転換動物。

(26) 上記(25)記載の非ヒト形質転換動物を用いた心不全の予防剤又は治療剤の有効成分となりうる物質の評価方法又はスクリーニング方法。

(27) 上記(14)乃至(18)又は(26)記載の方法により得られうる物質。

(28) 上記(27)記載の物質を有効成分とする心不全の予防剤又は治療剤。

(29) 上記(1)乃至(13)又は(27)記載の物質を投与することを含む心不全の治療方法。

(30) OSF-2遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを直接導入すること又は遺伝子治療に適したベクター(例えば、アデノウイルス由来ベクター)もしくはリポソームに組み込んで導入することを含む上記(29)記載の心不全の治療方法。

(31) 心不全の予防剤又は治療剤の製造のための上記(1)乃至(13)又は(27)記載の物質の使用。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明で心不全の予防剤又は治療剤の有効成分として使用できる物質には以下の(1)~(3)に挙げるものを使用できる。

(1) OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質

OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばOSF-2遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域に作用しOSF-2遺伝子のmRNAへの転写を抑制する作用を持つ物質(例えば、アンチセンスヌクレオチド(DNA、RNA、ホスホロチオエート型等の修飾ヌクレオチド及びPNA(protein nucleic acid)等を含む))、又は細胞中の何らかの因子(転写因子等)を介して同様の作用を示す物質(例えば、転写因子やco-activatorに結合し、DNAや他の転写因子、co-activatorへの結合を阻害する物質等)が挙げられる。

10

20

30

40

50

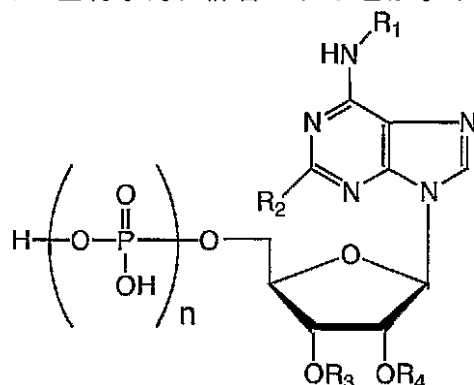
ここでアンチセンスヌクレオチドというときの「ヌクレオチド」の語は、天然に存在する塩基および本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分から生成されたヌクレオチドおよびその類似体を意味する。したがって、この用語が含む第1の群は、天然に存在する種または天然に存在するサブユニットまたはそれらの同族体から生成された合成種である。また、サブユニットとは隣接するサブユニットに対してホスホジエステル結合または他の結合によって結合した塩基-糖の組み合わせをいう。またヌクレオチドの第2の群はその類似体であり、これはヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在していない部分を有する残基を意味する。これらには、安定性を増加するためにリン酸基、糖部分、3', 5' 末端に化学修飾を施したヌクレオチドを含む。例えば、ヌクレオチド間のホスホジエステル基の酸素原子の1つを硫黄に置換したホスホロチオエート、-CH<sub>3</sub>に置換したメチルホスホネートなどが挙げられる。さらに、ヌクレオチド類似体としては、修飾された塩基形態、すなわち天然に通常見いだされるもの以外のプリンおよびピリミジンを含む種を用いてもよい。

10

本発明で使用する好ましいアンチセンスヌクレオチドは、配列番号5、19、20又は21に記載の塩基配列において連続した12個以上の塩基配列と相補的なヌクレオチド、好ましくは連続した16個以上の塩基配列と相補的なヌクレオチド、より好ましくは連続した18個以上の塩基配列と相補的なヌクレオチド、を含むものである。特に好ましいアンチセンスヌクレオチドは、配列番号12乃至16からなる群から選択された少なくともひとつの配列を有する。

さらに、本発明においてはアンチセンスヌクレオチドに代えて、ペプチド核酸 (Bioconj. Chem., 4, 373-378, 1994) を用いることもできる。また、OSF-2 遺伝子の発現を抑制する化合物の具体例としては、以下の一般式 (I) で表わされる化合物又はその生物学的に許容される塩が挙げられる。

20



30

上記式中、R<sub>1</sub> は水素原子、分岐していても良いアルキル基またはアルキル部分が分岐していても良いアラルキル基を示す。分岐していても良いアルキル基の例として、メチル基、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、tert-ブチル基等が挙げられる。また、アルキル部分が分岐していても良いアラルキル基の場合は、アリール基部分はメチル基、エチル基、プロピル基などの低級アルキル基、メトキシ基、エトキシ基などの低級アルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基などで置換されていてもよく、代表的な例として、ベンジル基、(2-メチルフェニル)メチル基、(3-メチルフェニル)メチル基、(4-メチルフェニル)メチル基、(2-クロロフェニル)メチル基、(2-エチルフェニル)メチル基、(2-メトキシフェニル)メチル基、(2-メトキシカルボニルフェニル)メチル基、2-フェネチル基、(1-ナフチル)メチル基、(2-ナフチル)メチル基、2-(2-ナフチル)エチル基などが挙げられる。これらの中で、R<sub>1</sub> の好ましいものとして、水素原子、アルキル部分が分岐していても良いアラルキル基が挙げられ、その中でも、水素原子、(2-メチルフェニル)メチル基が特に好ましい。

40

R<sub>2</sub> は水素原子、ハロゲン原子又はアミノ基を示す。R<sub>2</sub> の好ましい例として、水素原子、塩素原子が挙げられる。

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> は独立して水素原子またはアシル基を示すか、あるいはR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> が一緒にな

50

ってイソプロピリデン基を示す。アシル基としては、アセチル基、プロピオニル基などの低級アルカノイル基が例示される。

nは、0, 1, 2, 3を示し、0及び3が特に好ましい。尚、nが1, 2, 3の場合、リン酸性の水素原子の1以上がナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ金属またはアルカリ土類金属もしくは有機アミン類と塩を形成していても良い。

#### (2) OSF-2タンパク質の産生を抑制する物質

OSF-2タンパク質の産生を抑制する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばOSF-2遺伝子のアンチセンスヌクレオチドによりOSF-2 mRNAのOSF-2タンパク質への翻訳を阻害する作用を持つ物質が挙げられる。ここでアンチセンスヌクレオチドというときの「ヌクレオチド」の語は、上記(1)に記載された「ヌクレオチド」と同意である。アンチセンスヌクレオチドとしては、RNA、DNA、ホスホロチオエート型等の修飾ヌクレオチド又はPNA (protein nucleic acid) 等が挙げられ、OSF-2遺伝子の構造遺伝子領域、3'-非翻訳領域、5'-非翻訳領域又はイントロン/エキソン結合部位のいずれをも標的として設計することができる。また、アンチセンス鎖の標的組織への導入方法は直接導入する方法、アンチセンスRNAに転写されるように設計されたベクターを標的組織に導入する方法のどちらでも行うことができる。

また、OSF-2 mRNAの特定の構造を認識して切断するリボザイムも用いることができる。リボザイムとは、他のRNA分子を標的塩基配列特異の様式で切断しうる酵素活性を有する核酸分子であり、例えばハンマーヘッドまたはヘアピンのモチーフで形成することができる (Nature, 324, 429, 1986; Ann. Rep. Med. Chem., 30, 285-294, 1995; J. Med. Chem., 38, 2023-2037, 1995)。リボザイムは、標的組織中に直接導入してもよく、脂質との複合体またはリポソームの形で導入してもよい。あるいは、リボザイムを発現するDNA又はRNAベクターを標的組織に導入することができる。

#### (3) OSF-2タンパク質の機能を抑制する物質、OSF-2タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質

本発明では、OSF-2タンパク質の機能を抑制する物質、又はOSF-2タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質を心不全の予防剤又は治療剤に用いることができる。OSF-2タンパク質の標的分子とは、OSF-2タンパク質によって、その構造もしくは活性が影響を受ける分子をいい、例えば、基質、結合相手、受容体などを含むが、これに限定されない。

OSF-2タンパク質の機能を抑制する物質又はOSF-2タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよいが、そのような物質としては、例えばOSF-2タンパク質とOSF-2タンパク質が作用するOSF-2タンパク質の標的分子(例えば、受容体)の結合や細胞内でのシグナル伝達を阻害し、OSF-2タンパク質のもつ活性を阻害する物質が挙げられる。例えば、OSF-2タンパク質に対する抗体又はOSF-2タンパク質の標的分子に対する抗体などが挙げられる。抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。これらの抗体の作製方法としては、例えば、これらのタンパク質を発現細胞または組換え体の培養液などから精製し、これを適当なアジュバントとともにウサギ等に免疫し、その血清より定法に従って抗体画分を得ることができる。あるいは、マウス、ラット等を用いたモノクローナル抗体の作製、遺伝子組換え技術、遺伝子組換え動物等を用いたヒト型抗体や1本鎖抗体の作製なども用いることができるが、これらの記載の方法に限られるものではない。また、OSF-2タンパク質やOSF-2タンパク質の標的分子を特異的に分解するプロテアーゼ、活性の無いOSF-2タンパク質(変異体を含む)やOSF-2標的分子のデコイ、可溶性受容体分子等も挙げられる。

上記(1)乃至(3)に係る物質がペプチドである場合、本願発明に係る薬剤を投与対象

10

20

30

40

50

者に投与した後にその生体内においてペプチダーゼやプロテアーゼによる分解を受けない又は受けにくくするために、酵素の作用部位が修飾されたペプチド類似体も含まれる。例えば、当該類似体として、酵素の作用部位に係る一つ又はそれ以上のペプチド結合を他の共有結合の型で置き換えられたペプチド類似体や酵素の作用部位に係る一つ又はそれ以上のアミノ酸がD体アミノ酸であるペプチド類似体等が挙げられる。

#### (4) 製剤

上記のような物質を有効成分として含有する製剤は、通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

本発明に係る医薬組成物の有効成分は、遊離型であっても、その医薬的に許容し得る塩であってもよい。無機酸との塩としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸との塩が挙げられ、あるいは有機酸との塩としては、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等との酸付加塩として用いることができる。塩は、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態であってもよい。

有効成分は、公知の薬理的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法、例えば、経口投与方法、又は静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤、希釈剤、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等と、適宜混和することにより製造することができ、錠剤、散剤、顆粒剤、溶液剤等としてもちいることができる。錠剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチンのような結合剤、コーンスターチのような潤滑剤等を用いることができ、また糖衣又は医溶性若しくは腸溶性物質のフィルムにより被膜してもよい。カプセルの剤型である場合には、前記の組成物に更に液状担体を含有させることができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を用いて製造することができる。注射用の水性液としてはブドウ糖などを含む等張液などがあげられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤などと配合してもよい。経口投与において、消化管内で有効成分が分解を受け易い場合、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分をリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は座剤、点鼻スプレー、舌下錠といった形態で投与することができる。

また、遺伝子治療に用いる場合はアデノウイルス等公知の遺伝子治療に適したベクターにアンチセンスヌクレオチド等を組み込んで用いることもできる。

本発明の医薬組成物の投与量は、治療に用いられる場合、治療に有効な投与量が決められるが、当該投与量は投与対象者の年齢、体重、症状の程度及び投与経路等によって異なり、個々の場合に応じて決められる。通常、経口投与による場合、成人一日当たりの投与量は0.1~1000mg程度であり、これを1ないし数回に分けて投与すればよい。持続静脈内投与においては0.01 $\mu$ g/kg/min~1.0 $\mu$ g/kg/minの範囲で投与することができ、0.025 $\mu$ g/kg/min~0.1 $\mu$ g/kg/minで投与するのが好ましい。

#### (5) スクリーニング方法

本願発明に係る予防剤又は治療剤の有効成分として用いられる物質のスクリーニング法としては、例えば以下のような方法が考えられる。

OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質又はOSF-2タンパク質の産生を抑制する物質のスクリーニングに用いるOSF-2遺伝子若しくはOSF-2タンパク質又はその誘導体は、何れの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、モルモットなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。即ち、今回新たに見出されたラット由来の遺伝子(配列番号5)又はタンパク質(配列番号6)の他に公知の遺伝子又はタンパク質を挙げることができる。また、OSF-2遺伝子には各種のサブライソバリエーションが知られているので、本発明に係るOSF-2遺伝子及びOSF-2タンパク質はこれらのサブライソバリエーション及びそこから翻訳されるタンパク質を含む。例え

10

20

30

40

50

ば、マウス由来のOSF-2遺伝子及びOSF-2タンパク質としては配列番号19に示すものが挙げられ、ヒト由来のOSF-2遺伝子及びOSF-2タンパク質としては配列番号20(胎盤由来)および21(原発性腫瘍由来)に各々示すものを挙げる事ができる。さらに、OSF-2遺伝子の部分配列を単独で、又は他の遺伝子とのキメラ遺伝子として用いることもできる。同様にOSF-2タンパク質の部分配列を単独で、又は他のペプチドと融合させて用いることもできる。

これらのうち、ヒトに対する予防又は治療剤の研究・開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。また、動物モデル、即ち、OSF-2遺伝子を強制的に発現し心不全症状を有する非ヒト形質転換動物を用いた研究・開発の必要性からは、マウス、ラットなどの動物由来のものを用いることが好ましい。

OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質又はOSF-2タンパク質の産生を抑制する物質のスクリーニングにおいては、レポーター遺伝子を利用した方法が一般に利用されている。レポーター遺伝子としては例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal)、ルシフェラーゼなどが利用できる。

OSF-2遺伝子の発現を抑制する物質は、例えば、OSF-2遺伝子の発現制御領域(プロモーター、エンハンサー領域等)をレポーター遺伝子の翻訳領域の上流及び/又は下流に連結した発現ベクターを構築し、適当な培養細胞等に導入し、その培養細胞に試料である物質(当該物質は、合成若しくは遺伝子組換え技術により得られた化合物又は天然由来の化合物並びにそれらの誘導体のいずれでもよい)を添加して、一定時間後にレポーター遺伝子の発現量、またはレポータータンパク質の量を測定することによりスクリーニングすることができる。OSF-2遺伝子の発現制御領域(プロモーター、エンハンサー領域等)は市販の遺伝子(genomic)ライブラリーから、OSF-2 cDNAの断片をプローブとしてプライクハイブリダイゼーションを行うことなどにより得ることができる。例えば、本発明の実施例においてはCOS-1細胞にOSF-2遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流につないだレポーターベクターを導入し、化合物を添加後ルシフェラーゼ活性を測定することにより、OSF-2遺伝子の発現を抑制する化合物を見出した。本願発明に係る物質にはOSF-2遺伝子に作用する転写因子に対するおとり型核酸医薬であるデコイ(Science, 250, 997-1000, 1990)等も含まれる。レポータータンパク質の量は酵素活性として測定することもできるし、タンパク質の発現量として抗体などを用いて測定することもできる。

また、OSF-2タンパク質の産生を抑制するアンチセンスヌクレオチド又はリボザイム等は、OSF-2タンパク質を発現している培養細胞にアンチセンスヌクレオチド又はリボザイム等を、例えばエレクトロポレーション法やリボソーム法などによって導入し、OSF-2タンパク質の発現量を測定することによりスクリーニングすることができる。例えば、本発明の実施例においては、OSF-2タンパク質を過剰発現させたCOS-1細胞においてOSF-2の翻訳開始コドンに標的とした一連のアンチセンスヌクレオチドを導入し、OSF-2タンパク質の発現を抑制するアンチセンスヌクレオチドを見出したが、このような作用を持つアンチセンスヌクレオチドであれば、どのようなものでもよい。例えば、転写の抑制、pre-mRNAのスプライシングを抑制、mRNAの核膜通過を抑制する物質等も挙げられる。また、同様の手法はリボザイムのスクリーニングにも利用できる。用いる培養細胞としては、上記のごとく、OSF-2遺伝子を導入した細胞を用いることもできるし、もともとOSF-2遺伝子が発現しているどのような細胞、たとえば、MC3T3-E1細胞(Biochem. J. 294, 271-278, 1993)等であっても構わない。

OSF-2タンパク質の機能を抑制する物質又はOSF-2タンパク質の標的分子の機能を抑制する物質のスクリーニング法としては、例えば、OSF-2タンパク質の標的分子あるいはOSF-2タンパク質のいずれかをプレートなどに固定化した後に、試料である物質(当該物質は、合成化合物又は天然物由来の化合物若しくはそれらの誘導体のいずれでもよい)とOSF-2タンパク質又はその標的分子を添加し、結合した又は結合しなかったOSF-2タンパク質又はOSF-2タンパク質の標的分子の量をELISA, RI

10

20

30

40

50

A、蛍光標識などにより検出することで行うことができる。また、OSF-2の標的分子を発現している細胞を用いて、標識したOSF-2と薬剤とを共存させ、一定時間後に適当な洗浄処理を行った後、FACS、吸光度、発色法等により標識細胞数、標識の程度を測定することによっても、可能である。あるいは、OSF-2の示す作用（例えば接着活性など）を指標に、培養細胞等の培養液中に、試料である物質（当該物質は、合成化合物又は天然物由来の化合物若しくはそれらの誘導体のいずれでもよい）を添加し、OSF-2の示す作用の強さを測定することによりスクリーニングすることができる。

#### (6) 診断方法、診断剤及び診断キット

OSF-2遺伝子は、その発現量が心不全の悪化とともに上昇することが本発明者らにより明らかにされた。心不全患者のバイオプシーサンプルを用いて、OSF-2遺伝子の発現量を測定することにより、心不全の増悪化の程度を知ることができる。例えば、患者のバイオプシーサンプルからISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて総RNAを抽出し、DNase処理を行った後に、cDNA合成を行い、適当なプライマーを用いて、PCR反応によりOSF-2遺伝子を増幅し、ゲル電気泳動によってOSF-2に相当するバンドの濃さを判定するなどの方法により、OSF-2遺伝子の発現量を測定することができる。OSF-2遺伝子発現の定量は、この方法に限らず、例えば実施例3に記載の方法やノーザンハイブリダイゼーション法、cDNAアレイ法などをはじめRNA、DNAの定量法であればどのような方法も利用できる。

また、本発明によりOSF-2遺伝子が心不全の増悪化因子であることが示されたことにより、OSF-2遺伝子及びその制御領域に何らかの変異が存在することによりOSF-2タンパク質の機能が亢進したり、遺伝子発現量が増加したりする場合には、その変異を持っている個体は、心不全になり易い、あるいは、増悪化しやすい傾向を持つことが容易に考えられる。そこで、これらの遺伝子上の変異を試験することで、リスクファクターの診断が可能となる。遺伝子上の変異を知る方法としては、例えば、患者の血液サンプルから定法に従ってDNAを分離し、実施例1-5に記載の方法により、その塩基配列を決定し、正常な配列と比較することにより行うことができる。また、一旦変異と心不全の関係が明確になれば、その変異のみを検出するDNAチップ法、SSCP法などが利用できる。

また、OSF-2は分泌蛋白であることが知られているので、遺伝子発現の上昇は心臓及び血中のOSF-2タンパク質の濃度の上昇を伴うことが容易に予想される。そこで、血液中のOSF-2タンパク質の濃度を測定することにより、心不全の増悪化の程度を知ることができる。測定方法としては、例えば、OSF-2に対する抗体を利用したELISAまたはRIA法、HPLCやマススペクトロメトリーによる定量法などが利用できる。この際、OSF-2タンパク質は完全な形である必要はなく、測定可能であれば断片化したものでも良い。

更に、本発明は上記の測定手段等を用いたOSF-2遺伝子の発現量又はOSF-2タンパク質の産生量を測定する手段を含む心不全の診断剤又は診断キットを包含する。

#### (7) OSF-2遺伝子導入非ヒト形質転換動物

本発明において、OSF-2遺伝子を強制的に過剰発現し心不全症状を有する非ヒト形質転換動物の宿主動物たる非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギなどの小動物のほか、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシなどの大動物も対象となり、OSF-2遺伝子を発現し、OSF-2蛋白質の機能や生理作用を確認しうる動物であればどのような動物でも使用することができる。また、OSF-2遺伝子を発現するプロモーターとしては、構成的に発現するプロモーター（CMVプロモーター、SV40初期プロモーター等）のほか、組織特異的に発現するプロモーター（MHCプロモーター、アクチンプロモーター、等）、誘導発現型プロモーター（Cre-loxPシステム、テトラサイクリン誘導システム、エクダイソン誘導システム等）などを用いることができるが、遺伝子の発現を惹起するシステムであればどのようなシステムを用いても良い。

本発明では、誘導的かつ心臓組織特異的にOSF-2遺伝子を発現するトランスジェニック動物を提供する。誘導発現系としては、例えばエクダイソン誘導システムを用いること

10

20

30

40

50

ができる (Proc Natl. Acad. Ci. U, S. A., 93, 3346-3351, 1996; Nature, 366, 476-479, 1993; Cell, 71, 63-72, 1992)。この誘導発現系は、エクダイソン受容体とレチノイドX受容体 (RXR受容体) を構成的に発現させ、この両者からなる受容体ヘテロダイマーが、エクダイソン存在下でエクダイソン応答領域と結合し、その下流にある目的の遺伝子の発現を誘導するようになっている。例えば、エクダイソン受容体とRXR受容体を発現する誘導用トランスジェニック動物とエクダイソン応答領域と目的の遺伝子を発現する発現用トランスジェニック動物を別々に作製し、両者の交配によりダブルトランスジェニック動物を作製する。このダブルトランスジェニック動物に、エクダイソンを投与することで目的の遺伝子を誘導することができる。

10

常法により、まず、エクダイソン応答領域の下流にOSF-2遺伝子を連結して得られるトランスジェニック動物製造用組換え遺伝子を導入した全能性細胞を、個体発生させて得られる動物 (発現用トランスジェニック動物) 及びその子孫であって、誘導的にOSF-2蛋白質を発現することを特徴とするトランスジェニック動物を作製する。

一方、心臓組織特異的に発現するプロモーターの下流にエクダイソン受容体遺伝子を連結した発現ユニットと、組織非特異的なプロモーターの下流にRXR遺伝子を連結させた発現ユニットの両方を持つトランスジェニック動物製造用組換え遺伝子を導入した全能性細胞を、個体発生させて得られる動物及びその子孫 (誘導用トランスジェニック動物) であって、心臓組織特異的にエクダイソン受容体蛋白質と全身にOR蛋白質を発現することを特徴とするトランスジェニック動物を作製する。

20

ここで全能性細胞とは、潜在的に全ての細胞に分化する能力を有する細胞をいう。全能性細胞としては、たとえばマウスの場合、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有するES細胞のような培養細胞を対象とすることができる。培養細胞へのDNA断片の導入法としては、静電バルス法、リポソーム法、リン酸カルシウム法などが利用できる。特に受精卵へのDNA溶液の物理的注入 (マイクロインジェクション) 法が好ましい。

本発明に係わるトランスジェニック動物の作製方法に用いる組換え遺伝子は胚発生期に挿入することが望ましい。DNAを注入した細胞を仮親動物に移植し、当該仮親動物を飼育出産させて所望の遺伝子が導入された仔動物である目的のトランスジェニック動物 (始祖トランスジェニック動物) を得ることができる。導入遺伝子の存在は、当該動物の体の一部 (例えば尾部先端) を切断し、体細胞のDNAを抽出して、PCR法やサザンブロット法などにより確認することができる。

30

更に、各始祖トランスジェニック動物と正常動物とを交配させてF1動物 (子孫動物) を得て、当該F1動物のうち形質が発現されたトランスジェニック動物同士、または正常動物と交配させて同型または異型接合体F2動物 (子孫動物) を得る工程を更に含むことにより、本発明に係わるトランスジェニック動物の子孫動物を作製することができ、本発明者らも当該各トランスジェニック動物を作製することに成功している。

発現用トランスジェニック動物と誘導用トランスジェニック動物を交配させて、その両方の遺伝子の存在を確認することにより、ダブルトランスジェニック動物を得ることができ、このダブルトランスジェニック動物にエクダイソンを投与することで、誘導的かつ心臓組織特異的にOSF-2遺伝子を発現させるトランスジェニック動物を得ることができる。

40

本発明のトランスジェニック動物は、OSF-2遺伝子が関与する疾患モデル (例えば心不全モデル) として、病態研究や薬物スクリーニング等に用いることができる。

また、本発明のトランスジェニック動物に候補物質を投与し、OSF-2遺伝子の発現量、OSF-2タンパク質の産生又は心機能の変化などを測定することにより、OSF-2遺伝子が関与する疾患 (例えば心不全) の予防剤又は治療剤の有効成分となりうる物質の評価又はスクリーニングを行うことができる。すなわち、本発明のトランスジェニック動物を用いたOSF-2遺伝子が関与する疾患の予防剤又は治療剤の有効成分となりうる物質の評価方法又はスクリーニング方法も本発明に含まれる。

産業上の利用可能性

50

本発明によって提供される心不全治療剤は、作用点が明確であり、OSF-2遺伝子、タンパク質が関与する軽度～重度の心不全に、従来とは違ったメカニズムに基づく有効性を発揮する。また、本発明のスクリーニング方法は、OSF-2遺伝子またはタンパク質が関与する心不全をはじめとする、あらゆる疾患の治療薬の開発を可能とする。また、本発明の診断法によれば、心不全の増悪化の程度や発症リスクを予想することが可能となり、生活習慣や治療に生かすことができる。さらに、本発明に記載のトランスジェニック動物は、OSF-2遺伝子が関与する疾患モデルとして、病態研究や薬物スクリーニング等に用いることができる。

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

10

#### 実施例

##### 実施例1：サブトラクション法によるOSF-2の検索

###### 1-1 心不全病態モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

雄性ダール食塩感受性ラット(Dahl-S)(清水実験材料)を6週齢より8%高食塩含有食で飼育し、心肥大期(11週齢)および心不全期(14週齢)に各3匹の左心室を採取した。

###### 1-2 mRNAの調製

総RNAは上記左心室約500mgからISOGEN(ニッポンジーン社)を用いて説明書に記載の方法にしたがって調製した。次に心肥大期、心不全期それぞれ3匹分を合わせた総RNA約400μgよりFast Track 2.0 Kit(インビトロジェン社)を用いて説明書に記載の方法にしたがってmRNAを精製し、それぞれ約3μgのmRNAを回収した。

20

###### 1-3 cDNAサブトラクション

cDNAサブトラクションはPCR-Select cDNA subtraction kit(クローンテック社)により、説明書に記載の方法にしたがって行った。すなわち、上記1-2で得られたmRNAそれぞれ2μgよりcDNAを合成し、制限酵素RsaIで消化した。次に、14週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、11週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとし、テスターcDNAにkit添付の2種類のアダプターを別々に連結させた後、サブトラクトハイブリダイゼーションを行った。次に、アダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行い、発現量に違いのあるcDNA断片を特異的に増幅させ、増幅産物1を得た。

30

また、同様のサブトラクションを11週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、14週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとして行い、得られた増幅産物を増幅産物2とした。

###### 1-4 ドットプロットスクリーニング

###### A. ドットプロットの作製

増幅産物1をPCR IIベクター(インビトロジェン社)にTAクローニングし、挿入断片の入ったクローンを選択した。各クローンの挿入断片を増幅したPCR反応液、それぞれ1μlを熱処理後、2枚のナイロンメンブレンフィルター(ベーリンガー社)にドットプロットし、UVクロスリンカー(ストラタジーン社)により固定した。

40

###### B. cDNAプローブの作製

増幅産物1を制限酵素RsaI及びEaeI, SmaIで消化し、アダプターを除去し、DIGハイプライムDNAラベリング/検出キットII(ベーリンガー社)を用いて説明書に記載の方法に従ってDIG-dUTPでランダムプライム標識を行い、cDNAプローブ1を作製した。増幅産物2より同様にして、cDNAプローブ2を作製した。

###### C. スクリーニング

上記Aで作製したドットプロットメンブレンの一枚をcDNAプローブ1、他の一枚をcDNAプローブ2とハイブリダイゼーションを行い(ベーリンガー社のDIGハイプライムDNAラベリング/検出キットIIの説明書に記載の方法にしたがい、DIG

50

イーザーハイブ液中42 で一晩ハイブリダイゼーションを行い、2 x S S C , 0 . 1 % S D S で室温にて5分間2回、0 . 1 x S S C , 0 . 1 % S D S で68 にて15分間2回洗浄)、キットに添付のブロッキングバッファー中でアルカリホスファターゼ標識DIG抗体と反応後、C S P D r e a d y - t o u s eを加えて化学発光を進行させ、X線フィルムを露光させた。c D N Aプローブ 1 でのシグナルがc D N Aプローブ 2 でのシグナルより強いクローンをポジティブクローンとして選択し、塩基配列の決定を行った。

#### 1 - 5 塩基配列の決定

塩基配列は、T H E R M O S e q u e n a s e <sup>T M</sup> I I d y e t e r m i n a t o r c y c l e s e q u e n c i n g k i t (アマシャムファルマシア社)を用いて自動DNA配列読み取り装置モデル373A (P E A p p l i e d B i o s y s t e m s 社)で解析することにより決定した。得られた遺伝子配列をGenBankのデータベースに照会した結果、クローンの一つ(SF014)がマウスOSF-2 (Genbank Accession No. D13664)と86%ホモロジーのある遺伝子であることが判明した。

#### 実施例2：ラットOSF-2 cDNAのクローニング

ラットOSF-2 cDNAの単離はgt11ベクターに挿入されたrat aorta cDNA library (クローンテック社)より作製した約4000クローンのファージサブプール10個(計約4万クローン)をSF014の塩基配列を基に設計したプライマー(1)5' - G T T C A T T G A A G G T G G C G A T G G T C - 3' (配列番号1)と(2)5' - G A G A T A A A A T C C C T G C A T G G T C C T - 3' (配列番号2)を用いてPCRスクリーニングを行い、3個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅された断片をAlk Phos Direct <sup>T M</sup> (アマシャムファルマシア社)を用いてアルカリホスファターゼ標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い、1個のポジティブクローンrat OSF-2 #1を得た。その挿入断片をpBluescript II (ストラタジーン社)のEcoRI部位に組み込み、実施例1-5の方法にしたがって全塩基配列を決定した。

得られたクローンの長さは約3kbであり、マウスOSF-2 (Genbank Accession No. D13664)の292番から3' - 末端までに相当するものであり、5' - 末端が欠けたクローンであることが示唆された。そこで、SMART <sup>T M</sup> RACE cDNA Amplification Kit (クローンテック社)を用いて説明書に記載の方法にしたがって、rat aorta cDNAを鋳型として、上記プライマー(2)5' - G A G A T A A A A T C C C T G C A T G G T C C T - 3' (配列番号2)とrat OSF-2 #1の塩基配列を基に設計したプライマー(3)5' - C A C G G T C G A T G A C A T G G A C A A C A C C - 3' (配列番号3)を用いて5' - RACE反応を行った。得られたPCR産物をインビトロジェン社のPCR IIベクターにTAクローニングし、rat OSF-2 5 RACE #1と命名した。塩基配列を実施例1-5の方法にしたがって決定した。

その結果、rat OSF-2 5 RACE #1は最初に得られたrat OSF-2 #1より5' 方向に約300bp長いクローンであり、5' - 末端はマウスOSF-2 (Genbank Accession No. D13664)の5' - 末端より15bp長いクローンであった。さらにrat OSF-2 5 RACE #1の塩基配列を基に設計したプライマー(4)5' - A C G G A G C T C A G G G C T G A A G A T G - 3' (配列番号4)と上記プライマー(3)5' - C A C G G T C G A T G A C A T G G A C A A C A C C - 3' (配列番号3)を用いて上記rat aorta cDNA libraryより作製した約4万クローンのファージサブプール10個(計約40万クローン)をPCRスクリーニングすることにより2個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅される断片をプローブとしてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い1個のポジティブクローンを得、rat OSF

10

20

30

40

50

- 2 # 2 と命名した。挿入断片を p B l u e s c r i p t I I ( ストラタジーン社 ) の E c o R I 部位に組み込み、塩基配列を実施例 1 - 5 の方法にしたがって決定した。得られたクローンの長さは約 2 . 6 k b であり、5 ' - 末端は 5 ' - R A C E で得られたクローンと同一であったが、3 ' - 末端はマウス O S F - 2 ( G e n b a n k A c c e s s i o n N o . D 1 3 6 6 4 ) の 2 4 1 0 番までに相当するクローンであった。また、先に得られた r a t O S F - 2 5 R A C E # 1 の塩基配列と r a t O S F - 2 # 2 の相当する領域の塩基配列は全く同一であった。r a t O S F - 2 # 1 と r a t O S F - 2 # 2 より r a t O S F - 2 c D N A の完全長を完成させた。この完全長 c D N A の塩基配列とこの塩基配列より翻訳されるアミノ酸配列を配列番号 5 及び 6 に示す。

10

実施例 3 : 各種心不全モデルラットにおける O S F - 2 遺伝子発現の解析

O S F - 2 遺伝子は、ダールラットで心不全期に発現上昇する遺伝子として、サブトラクションにより選択された。この遺伝子が、実際にどの程度の発現変化を示すのか、また、ダールラット以外の各種の心不全モデルでも同様の変化を示すかを検証した。

### 3 - 1 モデルラットの作製及びサンプル採取

#### A . ダール心不全モデルラット

雄性ダール食塩感受性ラット ( D a h l - S ) ( 清水実験材料 ) を 6 週齢より 8 % 高食塩含有食で飼育し、心肥大期 ( 1 1 週齢 ) および心不全期 ( 1 4 週齢 ) に左心室を採取した。コントロールとしては、1 0 週齢の普通食の D a h l - S ラットを用いた。

#### B . 腹部大動脈狭窄ラット ( 圧負荷モデル )

##### B - 1 . 圧負荷によるラット心肥大モデルの作製方法

実験には S p r a g u e - D a w l e y 系の 9 週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム ( 4 0 m g / k g ) の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動脈を露出させ、左右の腎動脈間の部分を剥離した。2 1 G 注射針を大動脈に沿わせ、左右の腎動脈間で大動脈とともに絹糸で結紮し、その後注射針を引き抜くことにより、大動脈狭窄を行った。本モデルにおいてはこのような腹部大動脈狭窄により収縮期血圧が上昇し、心臓の後負荷が増大して、左心室の肥大が生じる。

##### B - 2 . サンプルの採取

動脈の狭窄により収縮期血圧は手術後 3 ヶ月目、1 7 ヶ月目においてそれぞれ 2 3 2 m m H g , 1 8 8 m H g と通常より高い値を示した。3 ヶ月目で、心重量 / 体重比の有意な上昇を認め、さらに、1 7 ヶ月目のラットは 3 ヶ月目に比べ心機能の指標である F r a c t i o n a l S h o r t e n i n g ( F S ) が 5 2 % から 2 6 % に低下した。よって狭窄手術後 3 ヶ月目を代償性肥大期、1 7 ヶ月目を非代償心不全期とし、それぞれの左心室を採取した。コントロールとしては、1 0 週齢のラットを用いた。

20

30

#### C . 腹部動静脈シャントラット ( 容量負荷モデル )

##### C - 1 . 容量負荷によるラット心肥大モデルの作製方法

実験には S p r a g u e - D a w l e y 系の 9 週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム ( 4 0 m g / k g ) の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定して開腹後、腹部大動静脈を露出させ、大動脈の腎動脈分岐部及び大腿動脈分岐部において、それぞれクランプで血流を停止した。止血した部位で大動脈内に 1 8 G 注射針を挿入し、大静脈へと貫通させ、動静脈シャントを作製した。注射針を引き抜き、動脈部の傷口を手術用接着剤で塞ぎ、クランプをはずした。シャント部で静脈内に動脈血が流入するのを確認した後、閉腹した。本モデルにおいてはこのような腹部大動静脈シャントの形成により、静脈圧が上昇し、心臓の前負荷が増大して、右心房、右心室、左心房、左心室の順に負荷が加わり肥大が生じる。さらに、静脈系のコンプライアンスが低いいため血液が貯流し、肺うっ血を呈する。

40

##### C - 2 . サンプル採取

術後、3 ヶ月、1 1 ヶ月において、心エコーによる心機能測定を行った後、解剖、心重量ならびに解剖所見を確認した。手術後 3 ヶ月目にくらべ 1 1 ヶ月目のラットではヘマトクリット値が低下すると共に全例で肺水腫が生じており、容量負荷が進行したものと思われる

50

た。また右心系の心重量/体重比や肺重量/体重比が増加し、右心室から肺にかけての鬱血が示唆された。FSは57%から31%に低下した。したがってシャント手術後3ヶ月目を代償期、11ヶ月目を非代償心不全期と判断し、それぞれの左心室を採取した。コントロールとしては、10週齢のラットを用いた。

#### D. 自然発症高血圧ラット(圧負荷モデル)

自然発症高血圧ラットとして知られているSHRラットを飼育し、経時的に血圧、心エコー測定を行った。3ヶ月齢のSHRは血圧および心重量/体重比が通常より高く、高血圧による心肥大を呈していた。19ヶ月齢では、立毛、うずくまりなどの外見に加え、FSは56%から32%に低下、収縮期血圧も低下し心不全を呈した。さらに、胸水、浮腫などの症状が見られた。それぞれ解剖によって左心室を採取した。

10

#### 3-2 遺伝子の発現解析

遺伝子の発現解析はABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems社)を用いたリアルタイムPCR定量システムにより定量した。

総RNAは各左心室よりISOGEN(ニッポンジーン社)を用いて説明書に記載の方法に従って調製し、DNase処理を行った。DNase処理した総RNAそれぞれ1μgより反応液50μlでTaqMan登録商標 Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems社)を用いてcDNAを合成した。OSF-2検出用のプライマーおよびTaqManプローブはプライマーデザインソフトウェアABI PRISM Primer Expressを用いて rat OSF-2 cDNAの塩基配列を基に設計した(5) 5'-TGCAAAAAGAGGTCTCCAAGGT-3'(配列番号7)、(6) 5'-AGGTGTGTC TCCCTGAAGCAGT-3'(配列番号8)、(7) 5'-FAM ACAAGTTCATTGAAGGTGGCGATGGTC TAMRA-3'(配列番号9)を使用した。内部標準として用いたGAPDHの検出はTaqMan登録商標 Rodent GAPDH Control Reagent (PE Applied Biosystems社)を使用した。OSF-2の検量線は実施例1記載のSF014をコントロールプラスミドとし、GAPDHの検量線はrat GAPDHの部分配列をPCRにより増幅し、増幅産物をPCR IIベクター(インビトロジェン社)にTAKローニングして塩基配列を確認したものをコントロールプラスミドとし、それぞれ段階的に希釈することにより作製した。

20

30

リアルタイムPCR定量反応は上記cDNA 0.4~0.8μlを鋳型として反応液40μlでTaqMan登録商標 Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems社)を用いて説明書に記載の方法に従って行った。解析結果は内部標準であるGAPDHの量で標準化し図1に示した。その結果すべてのモデルにおいて心不全病態の進行に伴いOSF-2遺伝子の発現亢進が見られた。

実施例4: Myc-His-rOSF-2融合タンパク質発現ベクターの構築

実施例2で得られたrat OSF-2遺伝子のコード領域から翻訳されるタンパク質のカルボキシル末端にMycエピトープと6個のヒスチジンタグを有し、CMVプロモーターを有する発現ベクターを作製した。

まず、pTracer-CMV2ベクター(インビトロジェン社)を制限酵素EcoRIとEcoRVで消化したベクター断片に、実施例2で得られたrat OSF-2 5RACE #1を制限酵素EcoRIとHindIIIで消化して得られた約500bpの断片と実施例2で得られたrat OSF-2 #1を制限酵素HindIIIとHpaIで消化して得られた約2780bpの断片をライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、得られたプラスミドをpTracer-CMV2/rOSF-2と命名した。このようにして作製したpTracer-CMV2/rOSF-2を制限酵素EcoRIとSmaIで消化し、rat OSF-2遺伝子のコード領域を含む約2330bpの断片を得、実施例2で得られたrat OSF-2 #1を鋳型としてその配列を基に設計したプライマー(8) 5'-GACCCGGGAAGAACGCATCATC-3'(配列番号10)とrat OSF-2の終止コドンの直前にBstEIIサイトが挿入され

40

50

るように設計したプライマー(9) 5' - TGGGTGACCCCTGAGAACGGCC  
TTCTCTTGATC - 3' (配列番号11)を用いてPCRを行い、精製後、制限酵  
素SmaIとBstEIIで消化して約270bpの断片を得た。以上の2つの断片を発  
現ベクター構築用のプラスミドpcDNA4/Myc-His/type C(インビト  
ロジェン社)を制限酵素EcoRIとBstEIIで消化したベクター断片にライゲー  
ションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、得られたプラスミドをpcDNA4/Myc  
-His/rOSF-2と命名した。挿入部分の全塩基配列は実施例1-5記載の方法  
により確認した。

#### 実施例5: rOSF-2タンパク質発現ベクターの構築

実施例2で得られたrat OSF-2遺伝子の全コード領域を含みCMVプロモーター  
を有する発現ベクターを作製した。実施例4で得られたpTracer-CMV2/rO  
SF-2を制限酵素EcoRIとPmeIで消化し、rat OSF-2遺伝子のコード  
領域を含む約3300bpの断片を得、この断片を前記pcDNA4/Myc-His/  
type C(インビトロジェン社)を制限酵素EcoRIとPmeIで消化して得られ  
たベクター断片にライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、pcDNA4  
/rOSF-2と命名した。挿入部分の全塩基配列は実施例1-5記載の方法により確認  
した。

10

#### 実施例6: ラット心臓へのOSF-2遺伝子導入による機能解析

##### 6-1 発現プラスミドの大量調製

実施例5で作製した発現プラスミド(pcDNA4/rOSF-2)を大腸菌DH5株  
に導入して増幅し、EndoFree<sup>TM</sup> Plasmid Giga kit(QIAG  
EN社)を用いて精製後、生理食塩水に溶解した。

20

##### 6-2 HVJ-liposomeの調製

先のプラスミド溶液200µgにHMG-1, -2mixture(1mg/ml、和光  
純薬(株))を50µl加え室温で1時間放置後BSS溶液を総量200µlになるよう  
加えた。その混合溶液を-20℃保存してある混合脂質(Avanti Polar L  
ipid Inc.、シグマ(株)、Hum. Gene Ther. 8(17), 213  
3-2141(1997), Cell biology, a laboratory h  
andbook, 2nd edition, vol. 4, 122-123(1998))  
の入ったガラス管に加えボルテックスミキサーにて30秒激しく振盪し37℃  
の恒温槽に30秒間静置した。これを8回繰り返した後、水を張った超音波発生装置にガラス管を入  
れ6秒間超音波処理を行い、再度30秒間ボルテックスミキサーにて振盪(120回/分  
)した。次に、精製したHVJ 1ml(20000HAU以上)(金田安史: HVJ-  
liposome法(遺伝子導入&発現解析実験法; 羊土社)70-79(1997)、  
佐伯嘉修, 金田安史: HVJ-リポソームベクター(遺伝子治療 開発研究ハンドブック  
: 日本遺伝子治療学会編)429-438(1999)、Hum. Gene Ther.  
8(17), 2133-2141(1997), Cell biology, a lab  
oratory handbook, 2nd edition, vol. 4, 122-1  
23(1998))を直径30mmのプラスチックシャーレに分取しUVクロスリカー  
に入れて蓋を取り1980mJ/cm<sup>2</sup>の紫外線を照射して不活化させた。この不活化HV  
Jをガラス管に加え氷上で10分間置いた後BSSを1.3ml加えて37℃の振盪型  
恒温槽にて1時間振盪した。次に、10mlの超遠心チューブに30%ショ糖溶液を7.  
5ml入れHVJ-liposome液(ガラス管内の溶液)全量を静かに重層しスイ  
ングローターにて62, 800×gで4、1.5時間超遠心した。HVJ-liposo  
meはショ糖溶液上に白色の粒子として集積され、これをパストゥールピペットで回収しB  
SSにて総量3mlに調整後4℃保存した。

30

40

##### 6-3 ラットへの遺伝子導入

12週齢のSprague-Dawleyラット(雄)の心臓左室(心尖および側尖部位  
)にHVJ-liposome/DNA溶液(濃度6.7µg/ml)を100µlずつ  
3ヶ所(総量300µl)に30ゲージ注射針にて打ち込んだ(rOSF-2群)。また

50

、コントロールとしてp c D N A 4 / H i s - M y c ベクターを同様にして注入した（コントロール群）。

#### 6 - 4 心エコー測定

導入後6週間目においてケタミン（50 mg / ml）、キシラジン（10 mg / ml）にて麻酔後、Core Vision Pro SSA 350A（プローブ：7 MHz、東芝（株））を用いて心エコー測定を行った。結果は表1に示した通りでありコントロール群に比しr O S F - 2群ではL V I D D（左室拡張末期内径）及びL V I D S（左室収縮末期内径）において有意な差が見られ心拡大を引き起こすことが明らかとなった。

【表1】

表1. 心エコー測定結果（6週間後）

評価項目	コントロール	rat OSF-2
n	11	10
IVSTD (mm)	2.06±0.08	1.69±0.06 #
LVIDD (mm)	5.78±0.16	7.68±0.20 #
LVPWD (mm)	2.34±0.09	1.98±0.05 #
IVSTS (mm)	2.56±0.13	2.44±0.08
LVIDS (mm)	2.54±0.18	3.81±0.28 #
LVPWS (mm)	2.90±0.12	2.87±0.07
EDV (μl)	166.8±10.6	316.9±17.1#
ESV (μl)	25.1±4.4	67.1±11.5#
FS (%)	56.3±2.5	50.8±2.7

# P< 0.01 vs コントロール

略号)

IVSTD; 拡張末期心室中隔壁厚

LVIDD; 左室拡張末期内径

LVPWD; 拡張末期左室後壁厚

IVSTS; 収縮末期心室中隔壁厚

LVIDS; 左室収縮末期内径

LVPWS; 収縮末期左室後壁厚

EDV; 拡張末期容積

ESV; 収縮末期容積

FS; 左室内径短縮率

#### 6 - 5 血行動態の測定

導入後6週間目においてペントバルビタール塩酸塩（50 mg / ml）にて麻酔後心内圧および血圧の測定を行った。結果を表2に示す。コントロール群に比しr O S F - 2群ではL V P（左心室圧）、L V E D P（左室拡張末期圧）、+ L V d P / d T及び- L V d P / d Tに有意な差が得られ心機能の低下が示唆された。

【表2】

表2 血行動態測定 (6週間後)

評価項目	コントロール	rat OSF-2
n	10	10
BW (g)	411.8±6.9	415.6±12.3
HW (g/kg)	2.63±0.08	2.67±0.12
LVW (g/kg)	1.97±0.04	1.99±0.04
HR (beats per minute)	444±8	417±12
MBP (mmHg)	128.7±4.7	119.7±5.4
LVP (mmHg)	171.1±7.1	143.5±8.7 #
LVEDP (mmHg)	0.16±0.07	1.00±0.30 #
+ LVdP/dt (mmHg/sec)	8511±468	6120±466 #
- LVdP/dt (mmHg/sec)	7356±226	5580±470 #

# P< 0.01 vs コントロール  
略号)

BW; 体重、 HW; 心重量、 LVW; 左心室重量、  
HR; 心拍数、 MBP; 平均血圧、  
LVEDP; 左室拡張末期圧  
LVP; 左心室圧  
LVdP/dT; 最大左室圧一次微分

10

20

実施例7: OSF-2 遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計と選択

#### 7-1 アンチセンスヌクレオチドの設計

アンチセンスヌクレオチドは翻訳開始点のAUGを含み且つ3つの連続したグアニン(トリプレットG)を含まず且つヘアピン構造やセルフアニールしない領域を選び、配列番号12乃至16に記す5種類を設計し、外部にて受託合成した。全てのアンチセンスヌクレオチドはホスホロチオエート型である。

#### 7-2 アンチセンスヌクレオチドの選択

実施例5に記載したMyc-His-rOSF-2融合タンパク質発現ベクターpcDNA4/Myc-His/rOSF-2をCOS-1細胞に導入し、上記1で作製したアンチセンスヌクレオチドを導入してMyc-His-rOSF-2融合タンパク質の発現を阻害するアンチセンスヌクレオチドをスクリーニングした。Myc-His-rOSF-2融合タンパク質の発現量はMyc特異的モノクローナル抗体(インビトロジェン社)を用いたELISA(酵素結合免疫吸着検定法)で定量した。具体的にはCOS-1細胞を $2 \times 10^4$ 細胞/ウェルになるように96ウェルプレートに播種し、16~24時間後に320ngのDNA(pcDNA4/Myc-His/rOSF-2)をOPTI-MEM I培地(GIBCO社)に溶解し、1 $\mu$ lのLipofect AMINE 2000試薬(GIBCO社)を含む同量のOPTI-MEM I培地と混合し、室温で20分間処理後、COS-1細胞へ添加し、37°Cにおいてインキュベートすることによりトランスフェクションを行った。次にDNA添加1~4時間後に生理食塩水に溶解した一連のアンチセンスヌクレオチドを最終濃度100nMになるように各ウェルに添加し、さらに3日間37°Cにおいてインキュベートした。

培養上清50 $\mu$ lをEIA/RIAプレート(コースター社)に添加し、37°Cで1~2時間放置することにより固定化し、200 $\mu$ lの0.1%Tweenを含むダルベッコリン酸緩衝化食塩水(PBST)で2回洗浄した。非特異的吸着を遮断するために遮断用溶液(1%ウシ血清アルブミンを含むPBST)で37°C1時間処理し、200 $\mu$ lのPBSTで3回洗浄した。次に50 $\mu$ lの遮断用溶液で1:4000に希釈したホースラディッシュパーオキシダーゼ標識された抗Mycモノクローナル抗体(インビトロジェン社

30

40

50

)を添加し、室温1時間放置することにより結合させ、200 $\mu$ lのPBSTで3回、PBSで1回洗浄した。50 $\mu$ lのTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)試薬(KPL社)を添加し、室温にて30分放置した後、50 $\mu$ lの0.1N硫酸を添加することにより反応を停止し、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。

その結果、図2に示すように翻訳開始コドンを標的とした一連のアンチセンスヌクレオチドはいずれもOSF-2タンパク産生阻害活性を有したが、配列番号12のアンチセンスヌクレオチドが最も強く発現を阻害した。

次に配列番号12に対応するセンス鎖であるセンスヌクレオチド(配列番号17)及び配列番号12の5',3'の向きを逆にしたスクランブルヌクレオチド(配列番号18)を作製し、各ヌクレオチドの最終濃度10nMにて上記と同様の実験を行った。その結果、図3に示すようにアンチセンスヌクレオチドはセンスヌクレオチド、スクランブルヌクレオチドよりも強いOSF-2タンパク産生阻害活性を有していることが判明した。

実施例8:アンチセンスヌクレオチドによるOSF-2遺伝子の発現抑制

#### 8-1 HVJ-liposomeの調製

実施例6.1で調製したプラスミド溶液200 $\mu$ gと実施例7にて選別したアンチセンスヌクレオチド溶液1.4mgにHMG-1,-2mixture(1mg/ml、和光純薬(株))を50 $\mu$ l加え、以下実施例6に従ってHVJ-liposomeを調製した。また、センスヌクレオチド、スクランブルヌクレオチドも同様に調製した。

#### 8-2 ラットへの遺伝子導入

13週齢のSprague-Dawleyラット(雄)の心臓左室(心尖および側尖部位)にHVJ-liposome/DNA溶液を100 $\mu$ lずつ3ヶ所(総量300 $\mu$ l)に30ゲージ注射針にて打ち込んだ(rOSF-2/アンチセンス群、rOSF-2/センス群、rOSF-2/スクランブル群)。また、ポジティブコントロール群としてpcDNA4/rOSF-2をネガティブコントロール群としてpcDNA4/His-Mycベクターを同様にして注入した。

#### 8-3 心エコー測定

導入後3週間目においてケタミン(50mg/ml)、キシラジン(10mg/ml)にて麻酔後、Core Vision Pro SSA 350A(プローブ:7MHz、東芝(株))を用いて心エコー測定を行った。結果を表3に示す。ポジティブコントロール群(rOSF-2)あるいはrOSF-2/センス群、rOSF-2/スクランブル群に比しrOSF-2/アンチセンス群ではネガティブコントロール群(コントロール)と同様LVIDD(左室拡張末期内径)及びLVIDS(左室収縮末期内径)が有意に小さく心拡大を抑制することが明らかとなった。

【表3】

10

20

30

表3. 心エコー測定結果

評価項目	コントロール	rat OSP-2	artisansense	sense	scramble
n	6	6	6	7	5
IVSTD (mm)	1.80±0.11	1.30±0.17*	1.68±0.12	1.26±0.07*	1.26±0.12*
LVIDD (mm)	6.18±0.23	7.90±0.29*	6.42±0.09#	7.93±0.18*	7.60±0.11*
LVPWD (mm)	2.22±0.11	1.45±0.15*	2.20±0.13#	1.46±0.11*	1.68±0.07*
IVSTS (mm)	3.15±0.13	2.60±0.17*	3.07±0.16	2.50±0.07*	2.60±0.15*
LVIDS (mm)	3.07±0.16	3.95±0.24*	3.25±0.15#	4.24±0.22*	4.06±0.18*
LVPWS (mm)	2.92±0.10	2.42±0.16*	2.80±0.17	2.30±0.15	2.66±0.07*
EDV (μl)	194.7±16.8	338.0±26.8*	210.0±6.8#	339.2±17.9*	307.6±10.4*
ESV (μl)	37.8±4.9	69.8±9.8*	43.3±5.1#	82.4±10.2*	73.4±7.5*
FS (%)	50.5±1.1	50.1±1.8	49.5±1.7	46.7±1.6	46.7±1.6

\*: P < 0.05 vs コントロール  
#: P < 0.05 vs rat OSP-2

略号)

- IVSTD; 拡張末期心室中隔壁厚
- LVIDD; 左室拡張末期内径
- LVPWD; 拡張末期左室後壁厚
- IVSTS; 収縮末期心室中隔壁厚
- LVIDS; 左室収縮末期内径
- LVPWS; 収縮末期左室後壁厚
- EDV; 拡張末期容積
- ESV; 収縮末期容積
- FS; 左室内径短縮率

実施例 9 : アンチセンスヌクレオチドによる心不全発症の抑制

9 - 1 HVJ - liposome の調製

実施例 7 にて選別したアンチセンスヌクレオチドを BSS 緩衝液にて溶かし、そのうちの 1.4 mg に HMG - 1, - 2 mixture (1 mg / ml、和光純薬 (株)) を 50 μl 加え、以下実施例 6.2 に従って HVJ - liposome を調製した。また、センスヌクレオチドも同様に調製した。

9 - 2 ラットへの遺伝子導入

8 週齢から 8% 食塩負荷飼料にて飼育した 13 週齢の Dahl - S ラット (DIS / Eis, エーザイ、雄) の心臓左室 (心尖および側尖部位) に HVJ - liposome / ヌクレオチド溶液を 75 μl ずつ 4ヶ所 (総量 300 μl) に 30 ゲージ注射針にて打ち込

10

20

30

40

50

んだ(アンチセンス群13匹、センス群13匹)。導入後、引き続き8%食塩負荷飼料にて飼育し、その生存率を調べた結果、遺伝子導入後30週後の生存率は、センス群(61.5%)、アンチセンス群(100%)で、アンチセンス群で生存率の改善が見られた。

実施例10: ヒトOSF-2レポータープラスミドの作製

#### 10-1 ヒトOSF-2遺伝子上流領域のクローニング

EMBL-3ベクターに挿入されたhuman genomic library(クローンテック社)より作製した約25,000クローンのファージサブプール10個(計約25万クローン)をヒトOSF-2遺伝子上流領域を含むドラフト配列(Genbank Accession No. AL138679)の塩基配列を基に設計したプライマー(10)5'-AAGAATATTAAGTTATTTGTGGGCAGGAGACAGATG-3'(配列番号22)と(11)5'-CATTTAAAGCCTATCAAGTGTCAAGTCCACTCTC-3'(配列番号23)を用いてPCRスクリーニングすることにより、2個のポジティブなサブプールを同定し、このサブプールを上記PCRによって増幅された断片をAlk Phos Direct<sup>TM</sup>(アマシャムファルマシア社)を用いてアルカリフォスファターゼ標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い、2個のポジティブクローンhuman OSF-2 gene #1, 2を得た。human OSF-2 gene #2の挿入断片をpBluescript II(ストラタジーン社)のXhoI認識部位に組み込み、pB-hOSFg #2を得、実施例1-5の方法にしたがって部分塩基配列を決定した。得られたクローンの長さは約13.5kbであり、ヒトドラフト配列(Genbank Accession No. AL138679 version 11)の16397番から30002番までに相当するものであり、ヒトOSF-2遺伝子のイントロン2から上流領域が含まれていることがわかった。また、開始コドン(ATG)から上流約2kbに存在するSpeI認識部位から開始コドンまでについては全塩基配列を決定した。この約2kbの塩基配列を配列番号24に示す。この約2kbの塩基配列は、Genbank Accession No. AL138679 version 11の配列に対して4塩基において変異が存在し、各々、SpeI認識部位を1番として、764番G(T)、936番T(C)、1099番C(T)及び2106番G(C)であった(括弧内はAL138679 version 11の塩基配列)。

#### 10-2 ヒトOSF-2レポータープラスミドの作製

実施例10-1で得たhuman OSF-2 gene #2を鋳型として、開始コドンの約2kb上流から開始コドンの直前までをプライマー(12)5'-TGAGCATATATCATGCTTTC-3'(配列番号25)と(13)5'-AATCATCTCGAGTCTCTCCGTTGCAGTTAGTCCCC-3'(配列番号26)を用いたPCR法により増幅した。なお、プライマー(13)は5'-末端に制限酵素XhoI認識部位を挿入するように設計されており、この増幅断片を制限酵素SpeI及びXhoIで消化して得られる約2kbの断片を、pGL3-enhancer(プロメガ社)のルシフェラーゼ遺伝子上流にある制限酵素NheI及びXhoIで切断したベクター断片にライゲーションキット(宝酒造(株))を用いて連結し、pGL3-hOSFgEを得た。挿入部分の塩基配列を実施例1-5の方法にしたがって決定し、実施例10-1で決定した塩基配列と同一であることを確認した。

実施例11: ヒトOSF-2遺伝子の発現に影響を与える化合物のスクリーニング

#### 11-1 COS-1細胞を用いたレポーターアッセイ

COS-1細胞を $3 \times 10^4$ 細胞/ウェルになるように96ウェルプレートに播種し、16~24時間37°Cで培養後、実施例10で示したOSF-2レポータープラスミドpGL3-hOSFgEをリポフェクトアミン2000試薬(GIBCO社)を用いて一過性に導入し、24時間37°Cで培養後、培地交換を行い、24時間後に候補化合物を添加し、その24時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定はルシフェラーゼアッセイシステム(プロメガ社)のプロトコールに従って行い、検出は1420マルチラベルカウンター(Wallac社)を用いた。コントロールとしてSV40プロ

10

20

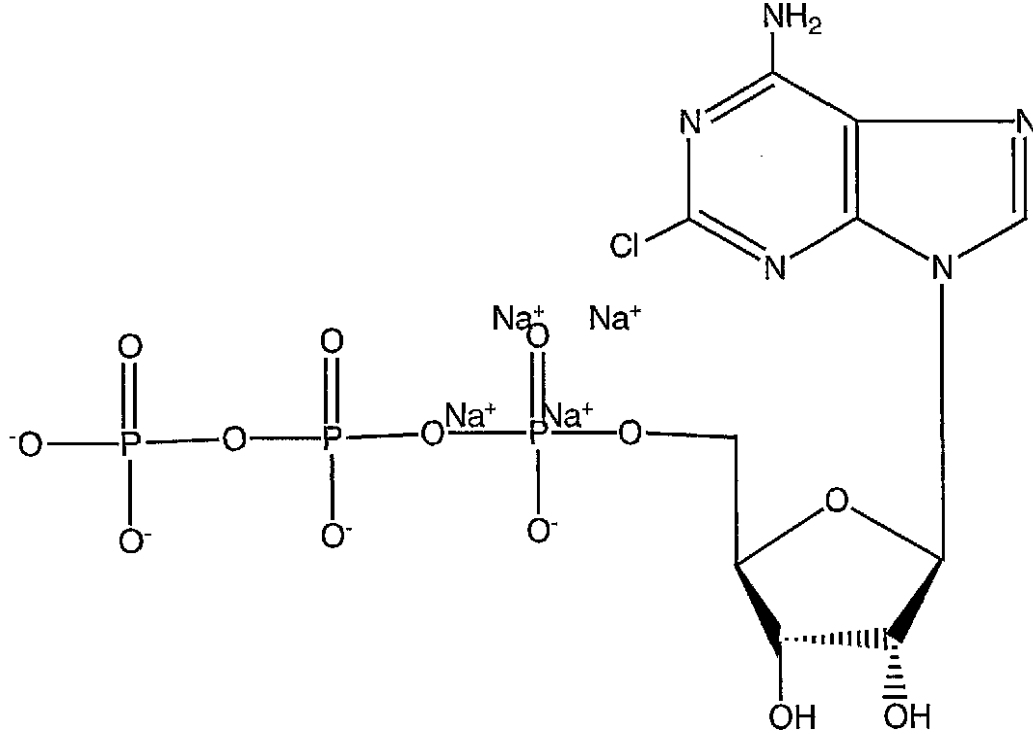
30

40

50

モーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子が連結された pGL3-control (プロメガ社) を用いて同様の実験を行った。この方法により多数の化合物をスクリーニングした結果、2-クロロ-アデノシントリフォスフェート四ナトリウム (2-Chloroadenosine 5'-triphosphate tetrasodium)、メトリフジル (N-[(2-Methylphenyl)methyl]-adenosine) が OSF-2 プロモーター特異的にルシフェラーゼ活性を抑制することが明らかになった。なお、これらの化合物は以下の化学構造式を有する。

2-クロロ-アデノシントリフォスフェート四ナトリウム (2-Chloroadenosine 5'-triphosphate tetrasodium) :

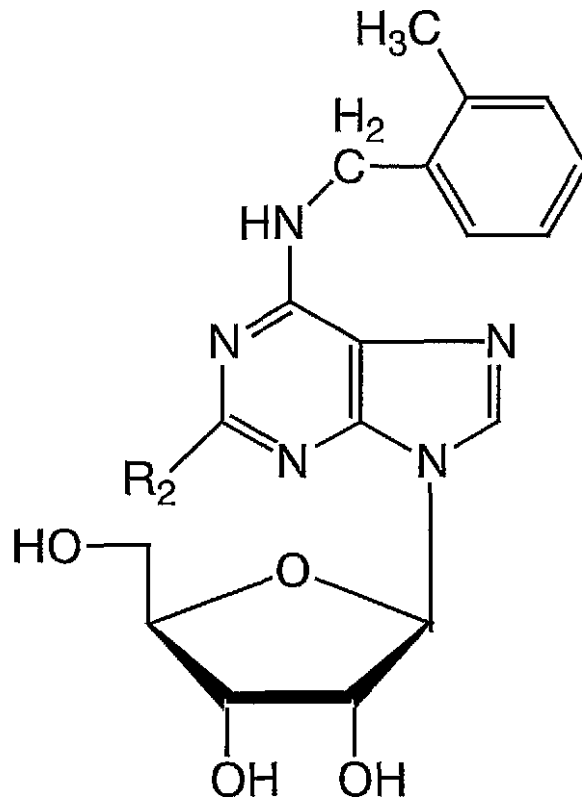


メトリフジル (N-[(2-Methylphenyl)methyl]-adenosine) :

10

20

30



10

20

#### 1 1 - 2 M C 3 T 3 - E 1 細胞を用いた発現解析

本来 O S F - 2 を発現しているマウス骨芽細胞様細胞 M C 3 T 3 - E 1 ( 理研細胞開発銀行より購入 ) を  $5 \times 10^5$  細胞 / ウェルになるように 6 ウェルプレートに播種し、24 時間 37 ° で培養後に培地交換を行い、24 時間後に上記化合物を  $30 \mu\text{M}$  の濃度で添加し、その 24 時間後に細胞を回収し、細胞より R N e a s y 登録商標 M i n i ( キアゲン社 ) を用いて総 R N A 調製し、実施例 3 - 2 の方法にしたがって、O S F - 2 m R N A および内部標準 G A P D H m R N A の発現量を P C R 定量システムにより定量した ( O S F - 2 m R N A 発現量は内部標準である G A P D H m R N A の発現量で標準化した ) 。その結果、2 - クロロ - アデノシントリホスフェート四ナトリウム、メトリフジル

30

は O S F - 2 m R N A の発現を抑制することを確認した。

このように、本発明で示したスクリーニング系を用いることにより、O S F - 2 遺伝子の発現に影響を与える化合物を見出すことができることが示された。

【配列表】

- <110> サントリー株式会社  
株式会社サントリー生物医学研究所
- <120> 心不全治療剤
- <130> YCT-652
- <160> 26
- <210> 1 10
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <400> 1  
gttcattgaa ggtggcgatg gtc
- <210> 2 20
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <400> 2  
gagataaaat ccctgcatgg tcct
- <210> 3 30
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <400> 3  
cacggtcgat gacatggaca acacc
- <210> 4 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

acggagcica gggctgaaga tg

<210> 5

10

<211> 3295

<212> DNA

<213> rat

<400> 5

gaattccggg gatctcttcc tggacggagc tcagggctga agatggttcc tctcctgccc 60

tlatctgctc tgctgctgct gttcctgtgt gacgttgacc ccgcaaatgc caacagttac 120

20

taigacaagg tectagcica cagccgcac aggggtcggg atcagggccc aaatgtctgt 180

gcccctccagc agattciggg caccaaaaag aaatacttca gctcctgtaa gaacigtgat 240

caaggtgcta tctgcgggaa gaaaaccact glgctatatg aatgctgccc cggctalaig 300

agaatggaag ggatgaaagg ctgcccagca gtagatccca ttgaccatgt tlatggcacg 360

ctgggcatcg tgggagccac gaccactcaa cactattcig atgtctcgaa gctcagggaa 420

gagattgaag gaaaagggtc ctacacatac ttccgcgccg gtaacgaagc ttgggacaac 480

ctggattccg acatccgcag aggactagag aacaalgta atgttgagtt actgaacgct 540

30

ttacacagcc acatggttaa taagagaatg ctaaccaagg acctgaaaca cggcatggtt 600

attccttcaa tgtacaacaa tctggggctt ttatcaatc attatcccaa tggggttgtc 660

actgtgaact gigtctgagt aatccacggg aaccagattg ccacaaatgg tgttgtccat 720

gicategacc gtgtcctgac acaaattggc acctccatcc aagacttcat tgaagcagaa 780

gatgagcitt catcattcag agcggctgcc atcacttctg accittttgga gtcctttgga 840

agagacggtc acttcaact cttigtctcc accaatgagg ctttcgagaa actcccacga 900

40

ggagtccctag aaaggatcat gggagacaaa gtggcttctg aagcttctat gaagtaccac 960

atcctgaata ccctccagtg ctctgaggct atcacaggag gagcgggtgt ttagaccaig 1020

gaaggaaaca ctattgaaat aggggtgtgag ggagacagca tctccattaa cggaatcaag 1080

atggigaaca agaaagacat tgtgacgaag aatgggtgtca tccacctgat tgatgaagtc 1140  
ctcattccctg attctgctaa acaagttatt gagctggctg gaaaacagca aaccactttc 1200  
acggacctgg tagcccagtt agggttggcg tcttctctga agccggatgg agagtacacg 1260  
ctgtagcgc ctgigaacaa tgcgttctct gatgacactc tgagcatgga ccagcgcctt 1320  
cttaagctaa ttctgcaaaa tcacatattg aaagtaaaag tcggccttag tgatctctac 1380  
aatggacaga ttctggagac cattggaggc aaacaactcc gtgtcttcgt giatcggacg 1440  
gctatctgca tagaaaactc atgcatgggt agaggaagca agcaggggag gaacggtgcc 1500  
attcacalat tccgagagat catccaaccg gcggagaagt cctgcacga aaaactgcgc 1560  
caagataagc gcttcagcat ctctctcagc ctctctgaag ctgcagatct gaaagatctt 1620  
ctgacacagc ccggagattg gaccttgitt gcaccaacca atgatgcctt caagggaatg 1680  
actaatgaag aaagggagat tctgattggg gataaaaatg ctctccaaa catcattctt 1740  
taccacctga ccccaggggt ttatattgga aagggtttg aaccggagt caccaacatc 1800  
ctgaagacca cacaggaag caaatctat gtgaaaggag tcaatgagac gcttttgggt 1860  
aatgagttga agtccaaaga atctgacatc atgacaacaa acggcgtcat tcacgttgtg 1920  
gacaaaactcc tctatccagc agacattccg gtggaaatg atcagctctt ggaattactg 1980  
aacaactga taaaatacat ccaaattaag ttcttctgtg gcagcactt caaagaaatc 2040  
cccatgactg tctatacaac taaaattata accaaactcg tggaaacaaa aattaaagtc 2100  
attcaaggca gtcttcagcc tattatcaaa acagaaggac ctgcaatgac gaagatccac 2160  
atigaaggcg agcctgactt caggctgatt aaagaagggt aacagtgac agaagtgatc 2220  
cacggagAAC cagtcatiaa aaagtacacc aaatcatag acggggttcc tgttgaata 2280  
actgaaaaag agaccggga agaacgcac atcacaggtc ctgagataaa atacactagg 2340  
attccacag gaggtgggga aacagaagag acctgcaga aattcttgca aaaagaggtc 2400  
tccaaggica caaagttcat tgaaggtggc gatggtcact tatttgaaga tgaggcgatt 2460  
aaaagactgc ttcagggaga cacactgca aagaagatac aagccaacaa aagggttcaa 2520  
gggtctagaa ggcgatcaag agaaggccgt tctcagtga aattcaaagg ccagacaaca 2580  
gagtttatat aatcctaaat caacaatctg atttitaagg gaaattataa gagccccatt 2640  
gacttcggaa tctgaaatgg caacaaacag aagctaattg tcaagcaaat ctgaacgcag 2700  
agttaatttg ttctgaaatg agaacatag gaaaatgata gtctctctgt gggttagaac 2760  
igaaggaaat ataggacat gcagggattt tatctcaatg agagaagtic tgattatatt 2820

10

20

30

40

aggaatccac caaagaccaa catigtgact ggatccacac agctaagict ttgctcagtg 2880  
 aacatggtea agaagaggct ggaaaaaccc aaagcacaca gitaccttc catgggaggc 2940  
 taagctatca aaagcgggtg tcagttatac aacaagcaag ccaagccacc aaattacaaa 3000  
 cagigggtgt acataattct cgtgcaatgt gggtttcctg ctaaattttg ttgtttttac 3060  
 acttgattta tatccctcgag atgattgca taigcttttt gcagtacaaa igtttctctc 3120  
 aaacatttca ataaaaacat tcttcaggta taaagagaat tacttcagac ttggtaattc 3180  
 agaaaactca aggtttaagt taaaagtgag tttagacttt ggaataggac ttcatacctt 3240  
 tttttattgt taacaagtac tcaataaagg aatcigaata aaaaaaacgg aattc 3295

10

<210> 6

<211> 838

<212> PRT

<213> rat

20

<400> 6

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

30

40



Ile Val Thr Lys Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile	
355	360 365
Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr	
370	375 380
Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys	
385	390 395 400
Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser	10
405	410 415
Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln	
420	425 430
Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly	
435	440 445
Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr	20
450	455 460
Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys	
465	470 475 480
Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro	
485	490 495
Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Arg Gln Asp Lys Arg Phe Ser	30
500	505 510
Ile Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Asp Leu Leu Thr	
515	520 525
Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys	
530	535 540
Gly Met Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ile Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala	
545	550 555 560
Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Tyr Ile Gly	40
565	570 575
Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly	



Lys Lys Ile Gln Ala Asn Lys Arg Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Ser

820

825

830

Arg Glu Gly Arg Ser Gln

835

<210> 7

<211> 22

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tgcaaaaaga ggctccaag gt

<210> 8

20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

aggtgtgtct cctgaagca gt

<210> 9

30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> 蛍光色素 FAM 及び TAMRA をそれぞれ 5' 末端及び 3' 末端に有する

<400> 9

acaaagtca ttgaaggtag cgatggc

40

<210> 10

<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 10  
gaccgaggaa gaacgcatca tc

<210> 11  
<211> 32 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 11  
tgggtgacc tgagaacggc cttctcttga tc

<210> 12 20  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 12  
aggaaccatc ttcagccctg

<210> 13 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 13  
gagaggaacc atcttcagcc

<210> 14 40  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

aggagaggaa ccatcttcag

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<400> 15

gcaggagagg aaccatcttc

<210> 16

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

agggcaggag aggaaccatc

<210> 17

<211> 20

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

cagggctgaa gatggttcct

<210> 18

40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;400&gt; 18

gtcccgactt ctaccaagga

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 3215

&lt;212&gt; cDNA to mRNA

<213> mouse (*Mus musculus*)

10

&lt;400&gt; 19

GAATTCGCG CCGCCGGAGC TCAGGGCTGA AG ATG GTT CCT CTC CTG CCC TTA 53

Met Val Pro Leu Leu Pro Leu

-20

TAT GCT CTG CTG CTG CTG TTC CTG TGT GAT ATT AAC CCT GCA AAT GCC 101

Tyr Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys Asp Ile Asn Pro Ala Asn Ala

20

-15

-10

-5

AAC AGT TAC TAT GAC AAG GTC CTG GCT CAC AGC CGC ATC AGG GGT CGG 149

Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala His Ser Arg Ile Arg Gly Arg

1

5

10

15

GAT CAG GGC CCA AAC GTC TGT GCC CTC CAG CAA ATT CTG GGC ACC AAA 197

Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys

20

25

30

30

AAG AAA TAC TTC AGC TCC TGT AAG AAC TGG TAT CAA GGT GCT ATC TGC 245

Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys

35

40

45

GGG AAG AAA ACC ACT GTG CTA TAT GAA TGC TGC CCT GGC TAT ATG AGA 293

Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg

50

55

60

40

ATG GAA GGG ATG AAA GGC TGC CCC GCA GTG ATG CCT ATT GAC CAT GTT 341

Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Met Pro Ile Asp His Val

65

70

75

80



225	230	235	240	
TCC CTT GGA AGA GAT GGT CAC TTC ACG CTC TTT GCT CCC ACC AAT GAA	869			
Ser Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu				
	245	250	255	
GCT TTC GAG AAA CTG CCA CGA GGT GTC CTA GAA AGG ATC ATG GGA GAC	917			
Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu Arg Ile Met Gly Asp				
	260	265	270	10
AAA GTG GCT TCT GAA GCT CTC ATG AAG TAC CAC ATC CTA AAT ACC CTC	965			
Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu				
	275	280	285	
CAG TGC TCT GAG GCC ATC ACT GGA GGA GCC GTG TTT GAG ACC ATG GAA	1013			
Gln Cys Ser Glu Ala Ile Thr Gly Gly Ala Val Phe Glu Thr Met Glu				
	290	295	300	20
GGA AAC ACT ATT GAG ATA GGG TGC GAA GGG GAC AGT ATC TCC ATT AAC	1061			
Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Glu Gly Asp Ser Ile Ser Ile Asn				
	305	310	315	
GGA ATC AAG ATG GTG AAC AAG AAA GAC ATT GTG ACT AAG AAT GGT GTC	1109			
Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val Thr Lys Asn Gly Val				
	325	330	335	
ATC CAC CTG ATT GAT GAA GTC CTC ATT CCT GAT TCT GCC AAA CAA GTT	1157			
Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val				
	340	345	350	30
ATT GAG CTG GCT GGA AAA CAG CAA ACC ACT TTC ACC GAC CTG GTA GCC	1205			
Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala				
	355	360	365	
CAA TTA GGC TTG GCA TCC TCT CTG AAG CCA GAT GGA GAG TAC ACC TTA	1253			
Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu				
	370	375	380	40
TTA GCA CCT GTG AAC AAT GCG TTC TCT GAT GAC ACT CTG AGC ATG GAC	1301			

Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp  
 385 390 395 400  
 CAA CGC CTT CTT AAG CTA ATT CTG CAA AAT CAC ATA TTG AAA GTA AAA 1349  
 Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His Ile Leu Lys Val Lys  
 405 410 415  
 GTT GGC CTT AGC GAC CTC TAC AAT GGA CAG ATA CTG GAA ACC ATT GGA 1397  
 Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly 10  
 420 425 430  
 GGC AAA CAA CTC CGA GTC TTT GTG TAT CGG ACG GCT ATC TGC ATA GAA 1445  
 Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu  
 435 440 445  
 AAC TCA TGC ATG GTG AGA GGA AGC AAG CAG GGA AGG AAT GGT GCC ATT 1493  
 Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile 20  
 450 455 460  
 CAC ATA TTC CGA GAA ATC ATC CAA CCA GCA GAG AAA TCC CTG CAC GAC 1541  
 His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro Ala Glu Lys Ser Leu His Asp  
 465 470 475 480  
 AAG CTG CGG CAA GAC AAG CGC TTT AGC ATC TTC CTC AGC CTC CTT GAA 1589  
 Lys Leu Arg Gln Asp Lys Arg Phe Ser Ile Phe Leu Ser Leu Leu Glu 30  
 485 490 495  
 GCT GCA GAT TTG AAA GAT CTC CTG ACA CAG CCC GGA GAT TGG ACC TTG 1637  
 Ala Ala Asp Leu Lys Asp Leu Leu Thr Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu  
 500 505 510  
 TTT GCA CCA ACC AAT GAT GCC TTC AAG GGA ATG ACT AGC GAA GAA AGG 1685  
 Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met Thr Ser Glu Glu Arg  
 515 520 525 40  
 GAG CTT CTG ATT GGG GAT AAA AAT GCT CTC CAA AAC ATC ATT CTT TAT 1733  
 Glu Leu Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr  
 530 535 540



690	695	700	
CGA ATC ATT ACA GGT CCT GAG ATA AAA TAT ACC AGG ATT TCC ACA GGA 2261			
Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly			
705	710	715	720
GGT GGA GAA ACA GGA GAG ACC TTG CAG AAA TTC TTG CAA AAA GAG GTC 2309			
Gly Gly Glu Thr Gly Glu Thr Leu Gln Lys Phe Leu Gln Lys Glu Val			
	725	730	735
TCC AAG GTC ACA AAG TTC ATT GAA GGT GGC GAT GGT CAC TTA TTT GAA 2357			
Ser Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu Phe Glu			
	740	745	750
GAT GAG GAG ATT AAA AGA CTG CTT CAG GGA GAC ACA CCT GCA AAG AAG 2405			
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly Asp Thr Pro Ala Lys Lys			
	755	760	765
ATA CCA GCC AAC AAA AGG GTT CAA GGG CCT AGA AGA CGA TCA AGA GAA 2453			
Ile Pro Ala Asn Lys Arg Val Gln Gly Pro Arg Arg Arg Ser Arg Glu			
	770	775	780
GGC CGT TCT CAG TGA AAACCCAGAG GCCAGACCAC AGAGTTTATA TAATCCTAAA 2508			
Gly Arg Ser Gln ***			
785			
TCAACGATCT GATTTTAAGG GAAATTGTAA GAGCCACCAC ACTGACTTCA GAATCTGAAA 2568			
TGACAACCAA CAGAAGCCAA TCTTCAAGCA AGTCCAAACA CAGAGTTCAT GTCTTTGTTT 2628			
CTGCATGAGA AATATAAGAA AATGATAGCT AGTCTCCTGT GGGGTAGGAA CTGAGGAAAT 2688			
ATAGGACCAT GCAGGGATTT TATCTCAATG AGAAACTTC TGATTAAAGT AGAATCCACC 2748			
AAAGAACATC ATTGTGACTG GGTCCATACA GCTAAGTCTT TGCACAGTAA AAACCTTCCG 2808			
CCTCAGGAAG AGGCTGGAAA AACCCAAAGC ACACAGTTAC CTTTCCAGGG GAGGCTAAGG 2868			
TATCAAAAGG GGTGTTTCACT TATACAACAT GCAAACAAAC CTACCAAATT ACGAACAGTG 2928			
GTGTTACATA TTTCTCATGC AATGTGGGTT TCCTGCTAAA TTTTGTATT TTTACACTTG 2988			
ATTTATATCC TCGAGATGAT TGTGATAAGC TTCTTGCAAT ACAAATGTTT TCTCTCAAAC 3048			
ATTTCAATAA AACCATTCTT CAGGTATAAA GAGAATTACT GCAGAGTTGG TAATTCAGAA 3108			

AACTCAAGGT TTAAGTTAAA AGTGAGTTTA GACTTTGGAA TAGGACTTCA TACCTTTTTT 3168  
 TATTGTAAAC AAGTACTCAA TAAAGTAAAC TGAGCGGCCG CGAATTC 3215

<210> 20

<211> 3092

<212> cDNA to mRNA

<213> human (Homo sapiens)

10

<400> 20

GAATTCGGGG AACAGAACTG CAACGGAGAG ACTCAAG ATG ATT CCC TTT TTA CCC 55  
 Met Ile Pro Phe Leu Pro

-20

ATG TTT TCT CTA CTA TTG CTG CTT ATT GTT AAC CCT ATA AAC GCC AAC 103  
 Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val Asn Pro Ile Asn Ala Asn

20

-15                      -10                      -5                      1

AAT CAT TAT GAC AAG ATC TTG GCT CAT AGT CGT ATC AGG GGT CGG GAC 151  
 Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp

5

10

15

CAA GGC CCA AAT GTC TGT GCC CTT CAA CAG ATT TTG GGC ACC AAA AAG 199  
 Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys

30

20

25

30

AAA TAC TTC AGC ACT TGT AAG AAC TGG TAT AAA AAG TCC ATC TGT GGA 247  
 Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr Lys Lys Ser Ile Cys Gly

35

40

45

CAG AAA ACG ACT GTT TTA TAT GAA TGT TGC CCT GGT TAT ATG AGA ATG 295  
 Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met

50

55

60

65

40

GAA GGA ATG AAA GGC TGC CCA GCA GTT TTG CCC ATT GAC CAT GTT TAT 343  
 Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu Pro Ile Asp His Val Tyr

70

75

80

GGC ACT CTG GGC ATC GTG GGA GCC ACC ACA ACG CAG CGC TAT TCT GAC 391  
 Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr Thr Gln Arg Tyr Ser Asp  
                   85                                  90                                  95  
 GCC TCA AAA CTG AGG GAG GAG ATC GAG GGA AAG GGA TCC TTC ACT TAC 439  
 Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly Lys Gly Ser Phe Thr Tyr  
                   100                                  105                                  110  
 TTT GCA CCG AGT AAT GAG GCT TGG GAC AAC TTG GAT TCT GAT ATC CGT 487  
 Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg  
                   115                                  120                                  125  
 AGA GGT TTG GAG AGC AAC GTG AAT GTT GAA TTA CTG AAT GCT TTA CAT 535  
 Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His  
 130                                  135                                  140                                  145  
 AGT CAC ATG ATT AAT AAG AGA ATG TTG ACC AAG GAC TTA AAA AAT GGC 583  
 Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr Lys Asp Leu Lys Asn Gly  
                                   150                                  155                                  160  
 ATG ATT ATT CCT TCA ATG TAT AAC AAT TTG GGG CTT TTC ATT AAC CAT 631  
 Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His  
                                   165                                  170                                  175  
 TAT CCT AAT GGG GTT GTC ACT GTT AAT TGT GCT CGA ATC ATC CAT GGG 679  
 Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Ile Ile His Gly  
                   180                                  185                                  190  
 AAC CAG ATT GCA ACA AAT GGT GTT GTC CAT GTC ATT GAC CGT GTG CTT 727  
 Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Asp Arg Val Leu  
                   195                                  200                                  205  
 ACA CAA ATT GGT ACC TCA ATT CAA GAC TTC ATT GAA GCA GAA GAT GAC 775  
 Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe Ile Glu Ala Glu Asp Asp  
 210                                  215                                  220                                  225  
 CTT TCA TCT TTT AGA GCA GCT GCC ATC ACA TCG GAC ATA TTG GAG GCC 823  
 Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr Ser Asp Ile Leu Glu Ala

10

20

30

40

230	235	240	
CTT GGA AGA GAC GGT CAC TTC ACA CTC TTT GCT CCC ACC AAT GAG GCT 871			
Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala			
245	250	255	
TTT GAG AAA CTT CCA CGA GGT GTC CTA GAA AGG TTC ATG GGA GAC AAA 919			
Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu Arg Phe Met Gly Asp Lys			
260	265	270	10
GTG GCT TCC GAA GCT CTT ATG AAG TAC CAC ATC TTA AAT ACT CTC CAG 967			
Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln			
275	280	285	
TGT TCT GAG TCT ATT ATG GGA GGA GCA GTC TTT GAG ACG CTG GAA GGA 1015			
Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val Phe Glu Thr Leu Glu Gly			
290	295	300	20
AAT ACA ATT GAG ATA GGA TGT GAC GGT GAC AGT ATA ACA GTA AAT GGA 1063			
Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp Ser Ile Thr Val Asn Gly			
310	315	320	
ATC AAA ATG GTG AAC AAA AAG GAT ATT GTG ACA AAT AAT GGT GTG ATC 1111			
Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val Thr Asn Asn Gly Val Ile			
325	330	335	
CAT TTG ATT GAT CAG GTC CTA ATT CCT GAT TCT GCC AAA CAA GTT ATT 1159			30
His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile			
340	345	350	
GAG CTG GCT GGA AAA CAG CAA ACC ACC TTC ACG GAT CTT GTG GCC CAA 1207			
Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln			
355	360	365	
TTA GGC TTG GCA TCT GCT CTG AGG CCA GAT GGA GAA TAC ACT TTG CTG 1255			40
Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu			
370	375	380	
GCA CCT GTG AAT AAT GCA TTT TCT GAT GAT ACT CTC AGC ATG GTT CAG 1303			

Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp Thr Leu Ser Met Val Gln	
390	395
CGC CTC CTT AAA TTA ATT CTG CAG AAT CAC ATA TTG AAA GTA AAA GTT 1351	
Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val	
405	410
GGC CTT AAT GAG CTT TAC AAC GGG CAA ATA CTG GAA ACC ATC GGA GGC 1399	
Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly	10
420	425
AAA CAG CTC AGA GTC TTC GTA TAT CGT ACA GCT GTC TGC ATT GAA AAT 1447	
Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr Ala Val Cys Ile Glu Asn	
435	440
TCA TGC ATG GAG AAA GGG AGT AAG CAA GGG AGA AAC GGT GCG ATT CAC 1495	
Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His	20
450	455
ATA TTC CGC GAG ATC ATC AAG CCA GCA GAG AAA TCC CTC CAT GAA AAG 1543	
Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys	
470	475
TTA AAA CAA GAT AAG CGC TTT AGC ACC TTC CTC AGC CTA CTT GAA GCT 1591	
Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala	30
485	490
GCA GAC TTG AAA GAG CTC CTG ACA CAA CCT GGA GAC TGG ACA TTA TTT 1639	
Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe	
500	505
GTG CCA ACC AAT GAT GCT TTT AAG GGA ATG ACT AGT GAA GAA AAA GAA 1687	
Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met Thr Ser Glu Glu Lys Glu	
515	520
ATT CTG ATA CGG GAC AAA AAT GCT CTT CAA AAC ATC ATT CTT TAT CAC 1735	
Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His	40
530	535
	540
	545

CTG ACA CCA GGA GTT TTC ATT GGA AAA GGA TTT GAA CCT GGT GTT ACT	1783	
Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr		
550	555	560
AAC ATT TTA AAG ACC ACA CAA GGA AGC AAA ATC TTT CTG AAA GAA GTA	1831	
Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys Ile Phe Leu Lys Glu Val		
565	570	575
AAT GAT ACA CTT CTG GTG AAT GAA TTG AAA TCA AAA GAA TCT GAC ATC	1879	10
Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile		
580	585	590
ATG ACA ACA AAT GGT GTA ATT CAT GTT GTA GAT AAA CTC CTC TAT CCA	1927	
Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro		
595	600	605
GCA GAC ACA CCT GTT GGA AAT GAT CAA CTG CTG GAA ATA CTT AAT AAA	1975	20
Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu Leu Glu Ile Leu Asn Lys		
610	615	620
TTA ATC AAA TAC ATC CAA ATT AAG TTT GTT CGT GGT AGC ACC TTC AAA	2023	
Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys		
630	635	640
GAA ATC CCC GTG ACT GTC TAT AAG CCA ATT ATT AAA AAA TAC ACC AAA	2071	
Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr Lys Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Lys		30
645	650	655
ATC ATT GAT GGA GTG CCT GTG GAA ATA ACT GAA AAA GAG ACA CGA GAA	2119	
Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys Glu Thr Arg Glu		
660	665	670
GAA CGA ATC ATT ACA GGT CCT GAA ATA AAA TAC ACT AGG ATT TCT ACT	2167	
Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr		40
675	680	685
GGA GGT GGA GAA ACA GAA GAA ACT CTG AAG AAA TTG TTA CAA GAA GAG	2215	
Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu Glu		



&lt;213&gt; human (Homo sapiens)

&lt;400&gt; 21

GAATTCGGAG ATCTACAGGG AGAGACTCAA G ATG ATT CCC TTT TTA CCC ATG 52  
Met Ile Pro Phe Leu Pro Met  
-20 -15

TTT TCT CTA CTA TTG CTG CTT ATT GTT AAC CCT ATA AAC GCC AAC AAT 100 10  
Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn  
-10 -5 1

CAT TAT GAC AAG ATC TTG GCT CAT AGT CGT ATC AGG GGT CGG GAC CAA 148  
His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln  
5 10 15

GGC CCA AAT GTC TGT GCC CTT CAA CAG ATT TTG GGC ACC AAA AAG AAA 196 20  
Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys  
20 25 30

TAC TTC AGC ACT TGT AAG AAC TGG TAT AAA AAG TCC ATC TGT GGA CAG 244  
Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln  
35 40 45 50

AAA ACG ACT GTT TTA TAT GAA TGT TGC CCT GGT TAT ATG AGA ATG GAA 292 30  
Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu  
55 60 65

GGA ATG AAA GGC TGC CCA GCA GTT TTG CCC ATT GAC CAT GTT TAT GGC 340 Gly  
Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu Pro Ile Asp His Val Tyr Gly  
70 75 80

ACT CTG GGC ATC GTG GGA GCC ACC ACA ACG CAG CGC TAT TCT GAC GCC 388  
Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala 40  
85 90 95

TCA AAA CTG AGG GAG GAG ATC GAG GGA AAG GGA TCC TTC ACT TAC TTT 436  
Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe

100	105	110	
GCA CCG AGT AAT GAG GCT TGG GAC AAC TTG GAT TCT GAT ATC CGT AGA 484			
Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg			
115	120	125	130
GGT TTG GAG AGC AAC GTG AAT GTT GAA TTA CTG AAT GCT TTA CAT AGT 532			
Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser			
	135	140	145
CAC ATG ATT AAT AAG AGA ATG TTG ACC AAG GAC TTA AAA AAT GGC ATG 580			
His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met			
	150	155	160
ATT ATT CCT TCA ATG TAT AAC AAT TTG GGG CTT TTC ATT AAC CAT TAT 628			
Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr			
	165	170	175
CCT AAT GGG GTT GTC ACT GTT AAT TGT GCT CGA ATC ATC CAT GGG AAC 676			
Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys Ala Arg Ile Ile His Gly Asn			
	180	185	190
CAG ATT GCA ACA AAT GGT GTT GTC CAT GTC ATT GAC CGT GTG CTT ACA 724			
Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr			
195	200	205	210
CAA ATT GGT ACC TCA ATT CAA GAC TTC ATT GAA GCA GAA GAT GAC CTT 772			
Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu			
	215	220	225
TCA TCT TTT AGA GCA GCT GCC ATC ACA TCG GAC ATA TTG GAG GCC CTT 820			
Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu			
	230	235	240
GGA AGA GAC GGT CAC TTC ACA CTC TTT GCT CCC ACC AAT GAG GCT TTT 868			
Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe			
	245	250	255
GAG AAA CTT CCA CGA GGT GTC CTA GAA AGG TTC ATG GGA GAC AAA GTG 916			

Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu Arg Phe Met Gly Asp Lys Val  
 260 265 270  
 GCT TCC GAA GCT CTT ATG AAG TAC CAC ATC TTA AAT ACT CTC CAG TGT 964  
 Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys  
 275 280 285 290  
 TCT GAG TCT ATT ATG GGA GGA GCA GTC TTT GAG ACG CTG GAA GGA AAT 1012  
 Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn 10  
 295 300 305  
 ACA ATT GAG ATA GGA TGT GAC GGT GAC AGT ATA ACA GTA AAT GGA ATC 1060  
 Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile  
 310 315 320  
 AAA ATG GTG AAC AAA AAG GAT ATT GTG ACA AAT AAT GGT GTG ATC CAT 1108  
 Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val Thr Asn Asn Gly Val Ile His 20  
 325 330 335  
 TTG ATT GAT CAG GTC CTA ATT CCT GAT TCT GCC AAA CAA GTT ATT GAG 1156  
 Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu  
 340 345 350  
 CTG GCT GGA AAA CAG CAA ACC ACC TTC ACG GAT CTT GTG GCC CAA TTA 1204  
 Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu  
 355 360 365 370 30  
 GGC TTG GCA TCT GCT CTG AGG CCA GAT GGA GAA TAC ACT TTG CTG GCA 1252  
 Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala  
 375 380 385  
 CCT GTG AAT AAT GCA TTT TCT GAT GAT ACT CTC AGC ATG GTT CAG CGC 1300  
 Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp Thr Leu Ser Met Val Gln Arg  
 390 395 400 40  
 CTC CTT AAA TTA ATT CTG CAG AAT CAC ATA TTG AAA GTA AAA GTT GGC 1348  
 Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly  
 405 410 415

CTT AAT GAG CTT TAC AAC GGG CAA ATA CTG GAA ACC ATC GGA GGC AAA 1396  
 Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys  
 420 425 430

CAG CTC AGA GTC TTC GTA TAT CGT ACA GCT GTC TGC ATT GAA AAT TCA 1444  
 Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser  
 435 440 445 450

TGC ATG GAG AAA GGG AGT AAG CAA GGG AGA AAC GGT GCG ATT CAC ATA 1492 10  
 Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile  
 455 460 465

TTC CGC GAG ATC ATC AAG CCA GCA GAG AAA TCC CTC CAT GAA AAG TTA 1540  
 Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu  
 470 475 480

AAA CAA GAT AAG CGC TTT AGC ACC TTC CTC AGC CTA CTT GAA GCT GCA 1588 20  
 Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala  
 485 490 495

GAC TTG AAA GAG CTC CTG ACA CAA CCT GGA GAC TGG ACA TTA TTT GTG 1636  
 Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val  
 500 505 510

CCA ACC AAT GAT GCT TTT AAG GGA ATG ACT AGT GAA GAA AAA GAA ATT 1684 30  
 Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile  
 515 520 525 530

CTG ATA CGG GAC AAA AAT GCT CTT CAA AAC ATC ATT CTT TAT CAC CTG 1732  
 Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu  
 535 540 545

ACA CCA GGA GTT TTC ATT GGA AAA GGA TTT GAA CCT GGT GTT ACT AAC 1780  
 Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn 40  
 550 555 560

ATT TTA AAG ACC ACA CAA GGA AGC AAA ATC TTT CTG AAA GAA GTA AAT 1828  
 Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn

565	570	575	
GAT ACA CTT CTG GTG AAT GAA TTG AAA TCA AAA GAA TCT GAC ATC ATG 1876			
Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met			
580	585	590	
ACA ACA AAT GGT GTA ATT CAT GTT GTA GAT AAA CTC CTC TAT CCA GCA 1924			
Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala			
595	600	605	10
GAC ACA CCT GTT GGA AAT GAT CAA CTG CTG GAA ATA CTT AAT AAA TTA 1972			
Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu			
615	620	625	
ATC AAA TAC ATC CAA ATT AAG TTT GTT CGT GGT AGC ACC TTC AAA GAA 2020			
Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu			
630	635	640	20
ATC CCC GTG ACT GTC TAT ACA ACT AAA ATT ATA ACC AAA GTT GTG GAA 2068			
Ile Pro Val Thr Val Tyr Thr Thr Lys Ile Ile Thr Lys Val Val Glu			
645	650	655	
CCA AAA ATT AAA GTG ATT GAA GGC AGT CTT CAG CCT ATT ATC AAA ACT 2116			
Pro Lys Ile Lys Val Ile Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ile Ile Lys Thr			
660	665	670	30
GAA GGA CCC ACA CTA ACA AAA GTC AAA ATT GAA GGT GAA CCT GAA TTC 2164			
Glu Gly Pro Thr Leu Thr Lys Val Lys Ile Glu Gly Glu Pro Glu Phe			
675	680	685	690
AGA CTG ATT AAA GAA GGT GAA ACA ATA ACT GAA GTG ATC CAT GGA GAG 2212			
Arg Leu Ile Lys Glu Gly Glu Thr Ile Thr Glu Val Ile His Gly Glu			
695	700	705	
CCA ATT ATT AAA AAA TAC ACC AAA ATC ATT GAT GGA GTG CCT GTG GAA 2260			40
Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu			
710	715	720	
ATA ACT GAA AAA GAG ACA CGA GAA GAA CGA ATC ATT ACA GGT CCT GAA 2308			

Ile Thr Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu  
           725                                  730                                  735  
 ATA AAA TAC ACT AGG ATT TCT ACT GGA GGT GGA GAA ACA GAA GAA ACT 2356  
 Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr  
           740                                  745                                  750  
 CTG AAG AAA TTG TTA CAA GAA GAG GTC ACC AAG GTC ACC AAA TTC ATT 2404  
 Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu Glu Val Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile  
           755                                  760                                  765                                  770  
 GAA GGT GGT GAT GGT CAT TTA TTT GAA GAT GAA GAA ATT AAA AGA CTG 2452  
 Glu Gly Gly Asp Gly His Leu Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu  
                                   775                                  780                                  785  
 CTT CAG GGA GAC ACA CCC GTG AGG AAG TTG CAA GCC AAC AAA AAA GTT 2500  
 Leu Gln Gly Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val  
                                   790                                  795                                  800  
 CAA GGT TCT AGA AGA CGA TTA AGG GAA GGT CGT TCT CAG TGA 2542  
 Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln \*\*\*  
           805                                  810                                  815  
 AAATCCAAAA ACCAGAAAAA AATGTTTATA CAACCCTAAG TCAATAACCT GACCTTAGAA 2602  
 AATTGTGAGA GCCAAGTTGA CTTCAGGAAC TGAAACATCA GCACAAAGAA GCAATCATCA 2662  
 AATAATTCTG AACACAAATT TAATATTTTT TTTTCTGAAT GAGAAACATG AGGGAAATTG 2722  
 TGGAGTTAGC CTCCTGTGGT AAAGGAATTG AAGAAAATAT AACACCTTAC ACCCTTTTTC 2782  
 ATCTTGACAT TAAAAGTTCT GGCTAACTTT GGAATCCATT AGAGAAAAAT CCTTGTCACC 2842  
 AGATTCATTA CAATTCAAAT CGAAGAGTTG TGAAGTGTG TCCCATTGAA AAGACCGAGC 2902  
 CTTGTATGTA TGTATGGAT ACATAAAATG CACGCAAGCC ATTATCTCTC CATGGGAAGC 2962  
 TAAGTTATAA AAATAGGTGC TTGGTGTACA AACTTTTTTA TATCAAAAGG CTTTGCACAT 3022  
 TTCTATATGA GTGGGTTTAC TGGTAAATTA TGTATTTTTT TACAACTAAT TTTGTA CTCT 3082  
 CAGAAATGTTT GTCATATGCT TCTTGCAATG CATATTTTTT AATCTCAAAC GTTTCAATAA 3142  
 AACCATTTTT CAGATATAAA GAGAATTACT TCAAATGAG TAATTCAGAA AACTCAAGA 3202  
 TTTAAGTTAA AAAGTGGTTT GGAAGTGGGA ACCCTGTAGA TCTCCGAATT C 3253

<210> 22

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

aagaatatta aaagtiattt gigggcagga gacagatg

10

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

catttaaaag cctatecaagt gtcaggicca ctctc

20

<210> 24

<211> 2141

<212> DNA

<213> human (Homo sapience)

<400> 24

30

actagtgcac aaaactgggt gcaaagaacg actagggttaa aattgttctt gaaaataatc 60  
 aataaaattt taattcgttc caggcaatat taagaaagca ggcaacatgg caggaaattt 120  
 tgattcttcc ttcactccct giattcacia icaggictat cagttatcat tccggactgt 180  
 atttaaaaat atatatittt ttacccttga tacttattac acaagtctat atctctttct 240  
 cigagtacct catccttcac ctccagtcac accctattgg atitgagcag atatcagctt 300  
 cattacaaaa aggtctgtaa gtagttacat cagtctaaag atgaaaagtg iggcattagt 360  
 agcagtgtaa tctatattat aatgtctaac tggcttagag ttgaagactt itatatatcc 420  
 atttaaccag gaatgtccta acagctaatt taalaatatt gatagtttat ccgtccta 480

40

caataagcag ttactgacca cctgccatit gcacaacata agagtaatag aaagctataa 540  
tataaagcaa aagatgacit cataaagica gaatgattcc altcagagaa atgtaaata 600  
tagactaaac tcttcttcc acaaaggacc agggicagaa tataatttaa cttttatgct 660  
atctctctc cagctcttct ttggaattgc ccttcatit tctataacti aatcccaaga 720  
ttttcatatt gaaatggcct ctcgatcata tticagcatt tgtigtitca ctgigtgctt 780  
tcttaataaa ctaagcagca agttgtagaa tattttaata tcccatagtg agittaagca 840  
taactcagga tactcagaat cctctctagt tcagtcaggc tccccaaag ccttcccaat 900 10  
agaacaacia ggagaattct gacaaaatct ctctatctca ccagtgggaa aagaacatgg 960  
atatgacatt acagagggag catctttagc caaatggat tggaattaca ctttaggatg 1020  
gtgtgcagct tgtttattca aggaagctga ttgtggttac catttcagct cattgtttcc 1080  
ctctgatatt cagatttctt ttatccaaag tttctcgaac atttgacata tgcattggagt 1140  
agtaagaacg cacattcctt tggctagggc ttgcatagtg taacattgaa aggccttagt 1200  
tattcttgat aaaatcagaa gaatcatttt ggcaatgtcc atgtttccta ataigtattt 1260 20  
aattgttcta gttatcteta gattcgtaac acttgcctcc aatattggct gctttcacc 1320  
agtggttatc agtagatgtg ctgcatagac atgttcaaca tcacataaag tgtgtcatga 1380  
aaaacaataa agcacaaatg tttttcctt ctgcttcatt tcaaaccita gagaaatttg 1440  
tcagagtaga ttatgttaa ctctatatgt tcttgatat ttgaaaaaga aaggaaatga 1500  
gaggtagctc tctttttgt acgatagcaa ggaaaataig gactctccta catggttctt 1560  
cagcaagtta gaattcttat ttcatatctt acacaagttt taaatctatc cagagtttgt 1620  
ttttaatcaa cagcctttac ccccttgtga ttgtcagact cgcactacc ttigtittct 1680 30  
ggtaaaaata ataataataa taatctttca gttctgatgt gaactgcaat aacacctaac 1740  
aataatcttg agcacacaga cattatacat tctactctgg aaaggattgc agaatactc 1800  
tfaaaactca acaaaagaat ttttcttaa aacctctaa gatacaaagg aataaaactg 1860  
agacttaaac atgcagtgag tcaattgttc ataigttaa aaataagtac cttctttata 1920  
atgaaaagga aaagtagctc aatgtgttcc ttaaataata ctaacccaaa caaatcttag 1980  
ctggcaattt gaagtgtccg atgcttctc gaaagagttc agactctcag gttgatgcag 2040 40  
tgttccctcc cacaactctg acatgtatat aaattctgag ctctccaaag cccactgcca 2100  
gttctgttcc gggactaact gcaacggaga gactcaagat g

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 2  
 tgagcatata tcatgctttc

10

<210> 26  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 26  
 aatcatctctcg agtctctccg ttgcagttag tcccc

20

【図面の簡単な説明】

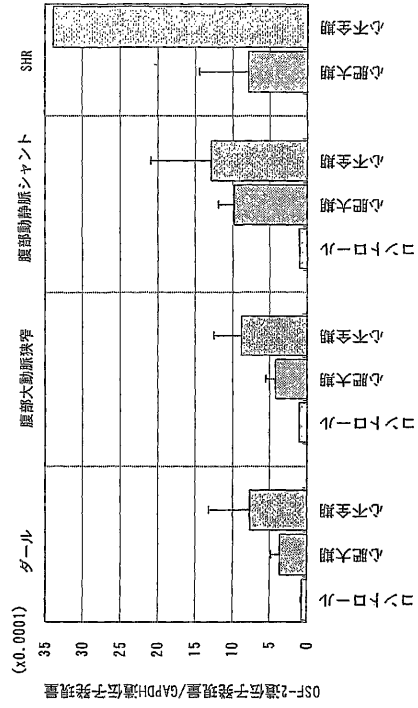
図 1 は、各動物モデルにおける、GAPDH 遺伝子の発現量で標準化した OSF - 2 遺伝子の発現量を示す図である。

図 2 は、配列番号 12 乃至 16 の各アンチセンスヌクレオチドに係る OSF - 2 タンパク質産生阻害活性を示す図である。C はコントロールを意味する。

図 3 は、アンチセンスヌクレオチド（配列番号 12）、センスヌクレオチド（配列番号 17）及びスクランブルヌクレオチド（配列番号 18）に係る OSF - 2 タンパク質産生阻害活性を示す図である。

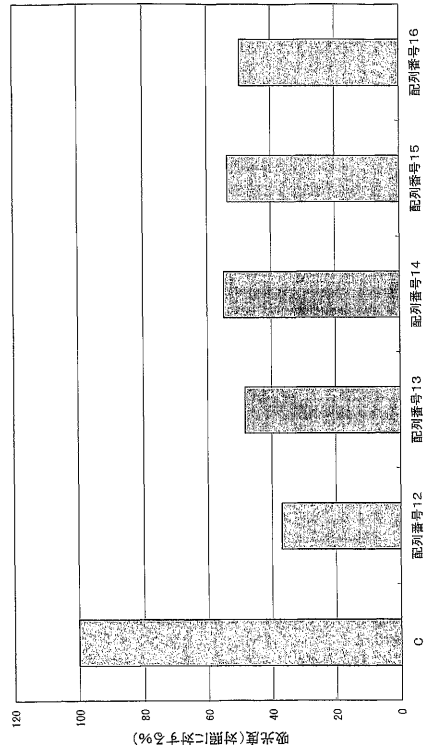
【図1】

図1



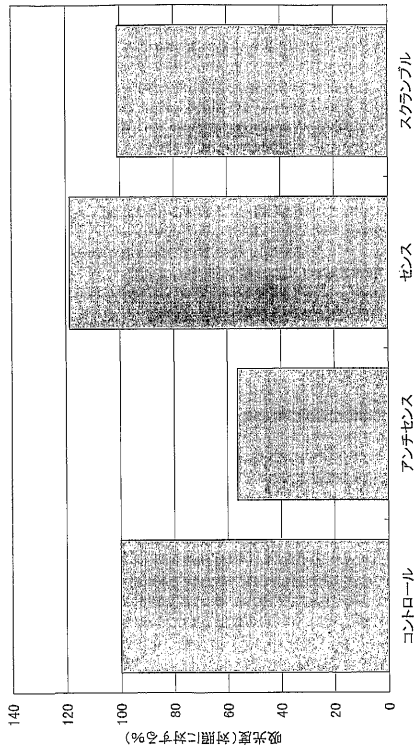
【図2】

図2



【図3】

図3



## フロントページの続き

- (74)代理人 100118902  
弁理士 山本 修
- (74)代理人 100092886  
弁理士 村上 清
- (72)発明者 河島 佳代子  
大阪府高槻市真上町6 - 1 1 - 1 - 1 1 3
- (72)発明者 葛城 鳴門  
大阪府茨木市三島丘2 - 3 0 - 3 - 4 1 0
- (72)発明者 杉村 恵二郎  
大阪府茨木市春日3 - 1 1 - 2 4 - 3 0 1
- (72)発明者 古谷 真優美  
大阪府三島郡島本町山崎4 - 2 - 3
- (72)発明者 森下 竜一  
大阪府大阪市淀川区宮原2 - 1 1 - 2 2 - 5 0 2

審査官 田村 聖子

- (56)参考文献 特開平05 - 2 6 8 9 8 2 ( J P , A )  
特開平07 - 1 1 8 1 5 6 ( J P , A )  
国際公開第00 / 0 3 5 4 7 3 ( W O , A 1 )  
国際公開第96 / 0 1 9 2 2 5 ( W O , A 1 )  
薬理と臨床, 1982年, Vol.10, No.9, P.409-416

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-31/80  
A61K 45/00  
A61K 38/00-38/58  
A61K 39/00-39/44  
A61K 48/00  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq