

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 2 月 15 日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/018316 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)本町二丁目 17 番 85 号 武田薬品工業株式会社内
Osaka (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2006/316070

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安
田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日:

2006 年 8 月 9 日 (09.08.2006)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護
が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2005-230797 2005 年 8 月 9 日 (09.08.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田
薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL
COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪
市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近藤 伸一
(KONDO, Shinichi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市
淀川区十三本町二丁目 17 番 85 号 武田薬品工業
株式会社内 Osaka (JP). 砂原 英次 (SUNAHARA, Eiji)
[JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁
目 17 番 85 号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP).
荒井 俊光 (ARAI, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒5328686 大阪
府大阪市淀川区十三本町二丁目 17 番 85 号 武田
薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 内海 寛子 (UTSUMI,
Hiroko) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROPHYLACTIC/THERAPEUTIC AGENT FOR CANCER

(54) 発明の名称: 癌の予防・治療剤

(57) Abstract: The object is to identify a novel target molecule for the prevention/treatment of cancer to provide a prophylactic/therapeutic agent for cancer which targets the molecule. An antibody directed against a protein having an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 or 18; an antisense polynucleotide for the protein (preferably, siRNA for mRNA of the protein); an agent for promoting the apoptosis and/or inhibiting the growth of a cancer cell or prophylactic/therapeutic agent for cancer comprising a substance capable of regulating the expression and/or activity of the protein; and a method for screening a an agent for promoting the apoptosis and/or inhibiting the growth of a cell or prophylactic/therapeutic agent for cancer by using the protein (preferably a cell capable of producing the protein) and an antibody directed against the protein or a polynucleotide encoding the protein.

(57) 要約: 本発明は、新規癌予防・治療標的分子の同定および該分子をターゲットとする癌予防・治療剤、即ち、配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10、配列番号: 12、配列番号: 14、配列番号: 16 もしくは配列番号: 18 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体、上記タンパク質のアンチセンスポリヌクレオチド (好ましくは上記タンパク質の mRNA に対する siRNA)、上記タンパク質の発現および/または活性を調節する物質を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および/または増殖阻害剤、癌の予防・治療剤を提供する。また、本発明は、上記タンパク質 (好ましくはそれを産生する細胞) および上記タンパク質に対する抗体もしくは上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いる、細胞のアポトーシス促進および/または増殖阻害物質、癌の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

WO 2007/018316 A1

明細書

癌の予防・治療剤

技術分野

- 5 本発明は、新規な癌予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤に関する。詳細には、本発明は、新規標的タンパク質の発現および／または活性を抑制する物質を含有してなる癌予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤に関する。また、本発明は、該標的タンパク質またはそれをコードする遺伝子の発現を検出し得る物質を含有してなる癌の診断剤に
- 10 関する。さらに、本発明は、該標的タンパク質またはそれをコードする核酸を用いた癌予防・治療、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

- 15 分子生物学の急速な進歩により、癌細胞の増殖あるいは悪性化の分子機構が明らかにされつつある。そして、それらの機構に関与する分子標的とその機能の解明を通じて、機能を制御することによって治療に結びつけようとする分子標的治療という新しいコンセプトによる研究が始まり、これまでにハーセプチン、グリベック、イレッサなどの新しい分子標的薬が開発され、一定の成果を収めてはい
- 20 る。しかしながら、これらの薬剤の有効性はあくまで限定的であることから、癌治療のための新たな創薬ターゲット分子の探索は依然として重要な課題である。

- 癌において、遺伝子のマイクロアレイプロファイリングデータでその病態が評価されることが予見され、実際、白血病においては遺伝子発現プロファイルによる白血病の分類が可能であることが報告されている。また個々の癌組織の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その分類を積み重ねることによって、特定の
- 25 癌治療法に対する反応性を予測したり特定の癌に対する新たな創薬標的タンパク質を発見したりすることが可能となると考えられる。具体的には、ある種の癌で

ある種のタンパク質の発現亢進が認められる場合には、新たに抗原陽性と診断された患者に対して (i) その発現量を低下させる、(ii) 機能を抑制する、(iii) 該タンパク質に対する宿主免疫応答を顕在化させる等の方法によって抗腫瘍活性を導くことが可能となる。これと同時に、抗原陰性と診断された患者に対しては、
5 別の治療法への切替が迅速に行えるなど、患者に無用な負担をかける懸念がなくなると予想される。以上のように発現プロファイル解析は、癌の分子診断と分子標的治療薬の開発に多大な貢献をなしうるものと期待されている。

LY6G6D 遺伝子 (RefSeq Accession No. NM_021246) は、ヒトMHCクラス III 領域にあると予想された遺伝子の一つである。ヒト単球系白血病細胞株 U937 由来
10 cDNA から単離されており、133 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている (RefSeq Accession No. NP_067069)。さらに、LY6G6D 遺伝子に相同性を示すマウス遺伝子 (RefSeq Accession No. NM_033478) がマウス組織由来の cDNA からクローニングされており、135 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている (RefSeq Accession No. NP_258439)。このマウス遺伝子は LY6G6D 遺伝子に対して塩基配列で約 77%、アミノ酸配列で約 67% の相同性を有している。LY6G6D
15 は LY-6 ファミリーに属する分子であり、GPI と結合し細胞膜上に局在すると予想されている。

LY6G6D 遺伝子は、癌の診断等に有用なタンパク質の一つである (WO 2003/024392 号公報)、大腸癌の診断等に有用なタンパク質である (WO 2003/083074 号公報および WO 2004/046342 号公報) と報告されている。しかし、これらの特許文献では、
20 LY6G6D 遺伝子は、いずれも 382 アミノ酸からなるタンパク質をコードすると予想しており、また、それらのタンパク質の存在および有用性は遺伝子の発現解析から類推されたものに過ぎず、仮説の実証を伴う具体的事例は何ら明示されていない。

25 PTPRO (Protein tyrosine phosphatase receptor type 0) 遺伝子は 1995 年、ヒト腎臓由来 cDNA ライブラリーより単離された遺伝子である。以後、PTPRO 遺伝子としては 6 つのバリエーション (Refseq Accession No. NM_002848, 030667,

030668, 030669, 030670, 030671)、タンパク質としては 1216 アミノ酸よりなるアイソフォーム a (Refseq Accession No. NP_109592)、1118 アミノ酸よりなるアイソフォーム b (Refseq Accession No. NP_002839)、405 アミノ酸よりなるアイソフォーム c (Refseq Accession No. NP_109594, 109596) および 377 アミノ酸よりなるアイソフォーム d (Refseq Accession No. NP_109593, 109595) の 4 つのアイソフォームが報告されている。PTPRO タンパク質は、アイソフォームによって Fibronectin type III モチーフを含む細胞外と予想される部分の長さ、及び細胞内にあると考えられる連続する 28 アミノ酸の有無が違ふものの、共通して 1 つの細胞膜貫通部位と 1 つのチロシンフォスファターゼ活性部位とを持つ受容体型チロシンフォスファターゼと予想されている。受容体型チロシンフォスファターゼファミリーのメンバーの機能については、PTP α のように一種類の分子が、ある研究グループによると癌形成に対し促進的に働くと報告され、ある研究グループによると癌形成に対し抑制的に働くだらう報告されるという具合に、現時点で癌形成に対する作用について、見解の統一は行われていない。

PTPRO については、造血細胞の生理的ターンオーバーに際しアポトーシスを誘導すると示唆する報告、B 細胞の増殖過程において G0/G1 アレストを促進する事により増殖を制御すると示唆する報告、肺がんにおいて遺伝子発現が減少しており、癌抑制因子として働くのではないかとする報告 (PNAS (2004), 101: 13844-13849) がある。先行特許としては、PTPRO は、大腸癌、子宮癌で遺伝子発現が正常組織に比べて増加しており、診断と治療に有用な遺伝子の一つであると報告されている (WO 2003/057160 号公報)。しかし、それらの有用性は遺伝子の発現解析から類推されたものに過ぎず、仮説の実証を伴う具体的事例は何ら明示されていない。

TM4SF17 遺伝子は、酵母 two-hybrid スクリーニング法を用いて Skp1 遺伝子と相互作用する遺伝子と配列の相同性が高いことを指標として、EST ライブラリーより部分的に見出された遺伝子である (Winston et al, Current Biology, 9, 20, 1180-1182)。TM4SF17 遺伝子は、TM4SF17a 遺伝子 (Refseq Accession No. NM_012171)

およびそのスプライシングバリエーションである、TM4SF17b 遺伝子 (RefSeq Accession No. NM_130465) および TM4SF17c 遺伝子 (RefSeq Accession No. NM_001006616) よりなり、それぞれ 332 アミノ酸 (Refseq Accession No. NP_036303)、329 アミノ酸 (Refseq Accession No. NP_569732) および 266 アミノ酸 (Refseq Accession No. NP_001006617) よりなるタンパク質をコードしている。これら TM4SF17a、TM4SF17b、TM4SF17c の他、さらにスプライシングバリエーションが知られており、本明細書においては TM4SF17d (swissprot Accession No. Q96FV3) と称している (以下、TM4SF17a 乃至 TM4SF17 d 遺伝子および新規に発見されるそれらのバリエーションを TM4SF17 遺伝子と総称することもある)。また、TM4SF17 遺伝子に相同性を示すマウス遺伝子 (RefSeq Accession No. NM_028841) がマウス組織由来の cDNA からクローニングされており、270 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている (RefSeq Accession No. NP_083117)。このマウス遺伝子は、TM4SF17a 遺伝子に対して塩基配列で約 91%、アミノ酸配列で約 96% の相同性を有している。TM4SF17 は FBX23 という異名を持ち、4 回膜貫通型分子ファミリーであるテトラスパニンスーパーファミリーに属しており、細胞膜上に局在すると予想されている。

TM4SF17 は、癌の診断等に有用なタンパク質の一つである (WO 2000/56891 号公報、WO 2001/77173 号公報) と報告されている。しかし、それらの有用性は遺伝子の発現解析から類推されたものに過ぎず、仮説の実証を伴う具体的事例は何ら明示されていない。

発明の開示

上述の通り、癌細胞に特異的に発現する分子を標的とし、癌細胞の増殖阻害を誘導する安全な新規薬剤が切望されている。癌細胞において、有意に発現が変動し得る遺伝子は数多く知られているが、それらの中で、どの遺伝子およびその発現産物が、癌治療における創薬ターゲットとなり得るかについては、依然として不明な点が多い。したがって、本発明の目的は、癌分子標的治療の新規ターゲットとなり得る分子を同定し、該標的分子の発現や機能を制御することによる癌の

予防・治療手段を提供することであり、また、該標的分子を用いて癌予防・治療活性を有する物質をスクリーニングする手法を提供することである。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、癌組織で発現が顕著に増加する遺伝子を見出した。さらに、これらの遺伝子に対する siRNA

5 が癌細胞の増殖を抑制することを見出し、該遺伝子が癌予防・治療のための標的となり得ることを実証した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、
- (2) 癌の予防・治療用である上記 (1) 記載の剤、
- (3) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的
15 もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、
- (4) 癌の予防・治療用である上記 (3) 記載の剤、
- (5) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、
20 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、
- (6) 癌の予防・治療用である上記 (5) 記載の剤、
- (7) 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法、
- 25 (8) 癌の予防・治療のためである上記 (7) 記載の方法、
- (9) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列

を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用、

(10) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治療用である上記(9)記載の使用、

5 (11) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法、

10 (12) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞の形態で提供される、上記(11)記載の方法、

(13) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、さらに用いることを特徴とする、上記(12)記載の方法、

15

(14) 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である上記(11)記載の方法、

(15) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

20

(16) 癌の予防・治療用である上記(15)記載の剤、

(17) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその

25

一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

(18) 癌の予防・治療用である上記(17)記載の剤、

5 (19) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

(20) 癌の予防・治療用である上記(19)記載の剤、

10 (21) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法、

15 (22) 癌の予防・治療のためである上記(21)記載の方法、

(23) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用、

20 (24) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治療用である上記(23)記載の使用、

(25) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法、

(26) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞の形態で提供される、上記(25)記載の方法、

5 (27) 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、さらに用いることを特徴とする、上記(26)記載の方法、

10 (28) 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である上記(25)記載の方法、

(29) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有して
15 なる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

(30) 癌の予防・治療用である上記(29)記載の剤、

(31) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌ
20 クレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

(32) 癌の予防・治療用である上記(31)記載の剤、

(33) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、
25 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤、

(34) 癌の予防・治療用である上記(33)記載の剤、

(35) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のア

ミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、
癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法、

(36) 癌の予防・治療のためである上記(35)記載の方法、

(37) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、

5 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列
を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用、

(38) 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治
療用である上記(37)記載の使用、

(39) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のア
10 ミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とす
る、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方
法、

(40) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のア
ミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞
15 の形態で提供される、上記(39)記載の方法、

(41) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のア
ミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該
タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリ
ヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、さらに用いることを特徴と
20 する、上記(40)記載の方法、

(42) 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である上記(39)記載の方
法、

などを提供する。

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、
25 配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表
されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパ
ク質やこれらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、癌組織に特異的に

発現し、癌の診断マーカーとなり得る。さらに、上記タンパク質に対する抗体、上記ポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド、上記タンパク質の発現および／または活性を調節する物質は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、5 卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療剤）、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤などとして安全に使用することができる。また、上記タンパク質、上記ポリヌクレオチド、上記抗体などは、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆10 道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療物質（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療物質）、癌細胞のアポトーシス促進物質、癌細胞の増殖阻害物質などのスクリーニングに有用である。

15

図面の簡単な説明

図 1 は、各種癌組織由来 mRNA および周辺正常組織由来 mRNA を用いて作製した、LY6G6D の遺伝子発現プロファイルを示す。

図 2 は、LY6G6D 遺伝子発現細胞株 SW480 における LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与の結果を示す。図 2 A : siRNA 投与により、ヒト肺癌細胞株 SW480 の細胞増20 殖が抑制されたことを示す；図 2 B : siRNA 投与により、LY6G6D 遺伝子の mRNA 発現量が低下したことを示す。

図 3 は、LY6G6D 遺伝子発現細胞株 COLO 320DM における LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与の結果を示す。図 3 A : siRNA 投与により、ヒト肺癌細胞株 COLO 320DM の細胞増殖が抑制されたことを示す；図 3 B : siRNA 投与により、LY6G6D 遺伝子25 の mRNA 発現量が低下したことを示す。

図 4 は、LY6G6D 遺伝子を発現しない細胞株 HCT116 における LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与の結果を示す。図 4 A : siRNA 投与により、ヒト肺癌細胞株 HCT116

の細胞増殖は抑制されないことを示す；図 4 B : siRNA 導入効率を、GAPDH 遺伝子の mRNA 発現量により示す。

図 5 は、LY6G6D を一過性発現させた時の細胞増殖および細胞内シグナル伝達経路への影響を示す。図 5 A : LY6G6D タンパク質を発現させることにより細胞増殖が促進されたことを示す。図 5 B : LY6G6D タンパク質発現による細胞増殖促進作用が PI3K 阻害剤で抑制されたことを示す。図 5 C : LY6G6D タンパク質発現により Akt リン酸化能が亢進されたことを示す。

図 6 は、LY6G6D 安定発現細胞株において LY6G6D タンパク質が GPI を介して細胞膜表層に局在されることを示す。図 6 A : FACSscan を用いた解析結果を示す。

10 図 6 B : ウェスタンブロット解析結果を示す。

図 7 は、LY6G6D 安定発現細胞株において LY6G6D タンパク質が糖鎖修飾を受けることを示す。

図 8 は、LY6G6D 遺伝子発現細胞株 COLO 320DM および SW480 における LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与により、LY6G6D タンパク質が減少したことを示す。

15 図 9 は、LY6G6D 遺伝子発現ヒト大腸癌細胞株において LY6G6D タンパク質が発現していることを示す。

図 10 は、平板培養における LY6G6D 安定発現細胞株の増殖速度が LY6G6D タンパク質の発現量と正相関することを示す。

20 図 11 は、LY6G6D 安定発現細胞株を用いた細胞染色法において LY6G6D タンパク質が細胞膜に局在することを示す。

図 12 は、三次元的培養における LY6G6D 安定発現細胞株のミトコンドリア呼吸能が LY6G6D タンパク質発現量と正相関することを示す。

図 13 は、ヒト正常組織あるいはヒト大腸癌組織における LY6G6D タンパク質の発現プロファイルを示す。

25 図 14 は、各種癌組織由来 mRNA および周辺正常組織由来 mRNA を用いて作製した、TM4SF17 の遺伝子発現プロファイルを示す。

図 15 は、TM4SF17 タンパク質が翻訳後修飾を受けることを示す。

図 1 6 は、組換え TM4SF17 b-3xFLAG、FLAG-b および FLAG-d タンパク質が糖鎖修飾を受けることを示す。

図 1 7 は、TM4SF17 isoform a および b タンパク質が細胞膜に局在することを示す。

- 5 図 1 8 は、TM4SF17 isoform e および isoform f および isoform h タンパク質のアミノ酸配列と、それをコードする cDNA 配列、およびその他のスプライスバリエーションとの比較を模式的に示す。

発明を実施するための最良の形態

- 10 本発明で用いられるタンパク質(本発明のタンパク質と称することもある)は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。本発明のタンパク質は、ヒトや他の温血動物(例えば、モルモット、ラ
- 15 ット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞[例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、
- 20 乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など]もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉(例、平滑筋、骨格筋)、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血
- 25 管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織(例、白色脂肪組織、褐色脂肪組織)など]等から単離・精製さ

れるタンパク質であってもよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成されたタンパク質であってもよいし、あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってもよい。

- 5 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、
配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表
されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：2、配
列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、
配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配
10 列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、い
っそう好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは
約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」
とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸
配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリ
15 ズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導
入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対
する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。「類似アミ
ノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族
アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性アミ
20 ノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、
水酸基を有するアミノ酸（Ser、Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly、Ala、Ser、
Thr、Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような
類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保
存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当
25 該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている（例えば、Bowie ら、
Science, 247 : 1306-1310 (1990)を参照）。

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; マトリクス=BLOSUM62 ; フィルタリング=OFF) にて計算することができる。アミノ酸配列の相

5 同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlin ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 5873-5877 (1993) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは NBLAST および XBLAST プログラム (version 2.0) に組み込まれている (Altschul ら, Nucleic Acids Res., 25 : 3389-3402 (1997))]、Needleman ら, J. Mol. Biol., 48 : 444-453 (1970) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェア

10 パッケージ中の GAP プログラムに組み込まれている]、Myers および Miller, CABIOS, 4 : 11-17 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは CGC 配列アライメントソフトウェアパッケージの一部である ALIGN プログラム (version 2.0) に組み込まれている]、Pearson ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 2444-2448 (1988) に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムは GCG ソフトウェアパッケージ中

15 の FASTA プログラムに組み込まれている] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

より好ましくは、配列番号 : 2、配列番号 : 4、配列番号 : 6、配列番号 : 8、配列番号 : 10、配列番号 : 12、配列番号 : 14、配列番号 : 16 もしくは配列番号 : 18 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列

20 番号 : 2、配列番号 : 4、配列番号 : 6、配列番号 : 8、配列番号 : 10、配列番号 : 12、配列番号 : 14、配列番号 : 16 もしくは配列番号 : 18 で表されるアミノ酸配列と約 50% 以上、好ましくは約 60% 以上、より好ましくは約 70% 以上、いっそう好ましくは約 80% 以上、特に好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

25 本発明で用いられるタンパク質は、配列番号 : 2、配列番号 : 4、配列番号 : 6、配列番号 : 8、配列番号 : 10、配列番号 : 12、配列番号 : 14、配列番号 : 16 もしくは配列番号 : 18 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含有し、かつ配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質である。

- 5 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などが挙げられる。ここで「実質的に同質」とは、それらの性質が定性的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、本発明のタンパク質の活性が同等であることが好ましいが、これらの活性の程度（例、約0.01～約100倍、好ましくは約0.1～約10倍、より好ましくは0.5～2倍）や、
- 10 タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後述する本発明で用いられるタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法において用いられる方法等に従って行うことができる。

- 15 また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(i) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5、4、3もしくは2）個）の
- 20 アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5、4、3もしくは2）個）のアミノ酸が付加したア
- 25 ミノ酸配列、(iii) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、

好ましくは1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数(1〜5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10、配列番号: 12、配列番号: 14、配列番号: 16もしくは配列番号: 18で表される
5 アミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1〜50個程度、好ましくは1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数(1〜5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

- 10 上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本発明で用いられるタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(Refseq Accession No. NP_067069.2)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ(例えば、GenBankに
15 RefSeq Accession No. NP_258439.1として登録されているマウスホモログ)、配列番号: 4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(Refseq Accession No. NP_109592.1)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ(例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NP_035346.2として登録されているマウスホモログ)、配列番号: 6で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(RefSeq Accession No.
20 NP_036303)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ(例えば、GenBankにRefSeq Accession No. NP_083117として登録されているマウスホモログ)、配列番号: 8で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(RefSeq Accession No. NP_569732)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号: 10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(RefSeq Accession No. NP_001006617)
25 あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号: 12で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質(Swissprot Accession No. Q96FV3)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号: 14で表されるアミノ酸配列を含有

するタンパク質あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、などがあげられる。

- 5 本明細書において、タンパク質およびペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）で記載される。配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用い
10 られるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

- ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルな
15 どの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化さ
20 れているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断
25 されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、

アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つ該タンパク質と実質的に同質の活性を有する限り、何れのものであってもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定は、前記した本発明で用いられるタンパク質の場合と同様に行うことができる。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは150個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5、4、3もしくは2)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、本発明で用いられるタンパク質について前記したと同様のものが挙げられる。本発明の部分ペプチドがC

末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、C末端のエステルと同様のものなどが用いられる。

- 5 さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。
- 10

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作製のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドは遊離体であってもよいし、塩であってもよい（本明細書において、特にことわらない限り同様である）。

- 15 そのような塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
- 20

- 本発明で用いられるタンパク質は、前述したヒトや他の温血動物の細胞または組織から、自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。具体的には、哺乳動物の組織または細胞を界面活性剤の存在下でホモジナイズし、得られる組織の粗抽出物画分を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等
- 25
- に付すことにより、本発明で用いられるタンパク質を調製することができる。

本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドを
5 構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のタンパク質（ペプチド）を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の (i) ~ (v) に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide
10 Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

(ii) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、
15 (1977 年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

このようにして得られたタンパク質（ペプチド）は、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などが挙げられる。

20 上記方法で得られるタンパク質（ペプチド）が遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にタンパク質（ペプチド）が塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチド、あるいはそのアミド
25 体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコー

ル樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜

選択され、通常約-20～約 50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5～4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ

る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz*1、*Cl*₂-*Bz*1、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、*t*-ブチルなどが用いられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*Tos*、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタ
10 ンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれら
の混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミ
ン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリ
ウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃
～約40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノ
15 ール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、
1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕
捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いら
れる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプ
トファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタ
20 ンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以
外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっ
ても除去される。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水
物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,
25 4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルア
ルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-
ヒドロキシフタルイミド、*HOBt*）とのエステル〕などが用いられる。原料の

アミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、
5 アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得
10 られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

15 タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドは、本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。
20

さらに、本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドは、それをコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養し、得られる培養物から該タンパク質または該部分ペプチドを分離精製することによって製造することもできる。本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリ
25 リヌクレオチドはDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖

DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、サル、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターなど）のあらゆる細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など〕もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織〔例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織（例、褐色脂肪組織、白色脂肪組織）、骨格筋など〕由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction（以下、「PCR法」と略称する）およびReverse Transcriptase-PCR（以下、「RT-PCR法」と略称する）によって直接増幅することもできる。あるいは、本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDN

AライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

- 5 本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15もしくは配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、
10 配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15もしくは配列番号：17で表
15 される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15もしくは配列番号：17で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、いっそう好ましくは約80%以上、特に好ましくは約
20 90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 本明細書における塩基配列の相同性は、例えば、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; フィルタリング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。塩
25 基配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19～約 40mM、好ましくは約 19～約 20mM で、温度が約 50～約 70℃、好ましくは約 60～約 65℃ の条件を示す。特に、ナトリウム塩濃度が約 19mM で温度が約 65℃ の場合が好ましい。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードする DNA は、好ましくは、配列番号：1 で表される塩基配列を含有する DNA (Refseq Accession No. NM_021246) あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ (例えば、GenBank に RefSeq Accession No. NM_033478 として登録されているマウスホモログ)、配列番号：3 で表される塩基配列を含有する DNA (Refseq Accession No. NM_030667) あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ (例えば、GenBank に RefSeq Accession No. NM_011216 として登録されているマウスホモログ)、配列番号：5 で表される塩基配列を含有する DNA (RefSeq Accession No. NM_012171) あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ (例えば、GenBank に RefSeq Accession No. NM_028841 として登録されているマウスホモログ)、配列番号：7 で表される塩基配列を含有する DNA (RefSeq Accession No. NM_130465) あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：9 で表される塩基配列を含有する DNA (RefSeq Accession No. NM_001006616) あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：11 で表される塩基配列を含有する DNA あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：13 で表される塩基配列を含有する DNA あるいは他の哺乳動物にお

けるそのホモログ、配列番号：15で表される塩基配列を含有するDNAあるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ、配列番号：17で表される塩基配列を含有するDNAあるいは他の哺乳動物におけるそのホモログなどが挙げられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド
5 (例、DNA) としては、前述した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

- 10 本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15もしくは配列番号：17で表される塩基配列の部分塩基配列、または配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配
15 列番号：15もしくは配列番号：17で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、かつ本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：1
20 5もしくは配列番号：17で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAとは、前記と同意義を示す。また、ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件としては、前記と同様のものが用いられる。

- 本発明で用いられるタンパク質およびその部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明
25 のタンパク質と略記する場合がある）をコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組

み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)

5 に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造(株))、MutanTM-K (宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有して

15 いてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

20 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-1.1、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

25

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿

主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp
5 pプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞
10 である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、
15 Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

20 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体
25 分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

5 エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 巻, 160 (1968)]、JM103 [Nucleic Acids Research, 9 巻, 309 (1981)]、JA221 [Journal of Molecular Biology, 120 巻, 517 (1978)]、HB101 [Journal of Molecular Biology, 41 巻, 459 (1969)]、C600 [Genetics, 39 巻, 440 (1954)] などが用いられる。

10 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24 巻, 255 (1983)]、207-21 [Journal of Biochemistry, 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス・
15 ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913、NCYC2036、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の MG1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five™ 細胞、*Mamestra brassicae*
20 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが BmNPV の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; BmN 細胞) などが用いられる。該 Sf 細胞としては、例えば、Sf9 細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21 細胞 [以上、Vaughn, J.L. et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977)] などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [Maeda et al., Nature,
25 315 巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-1、COS-3、COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (以下、CHO 細胞と略記)、dhfr 遺伝子欠損 CHO 細胞 (以

下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウス L 細胞、マウス AtT-20、マウスミエローマ細胞、マウス ATDC5 細胞、ラット GH3、ヒト FL 細胞、ヒト 293 細胞、ヒト HeLa 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 5 69 巻, 2110 (1972) や Gene, 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行うことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Mol. Gen. Genet., 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行うことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Meth. Enzymol., 194 巻, 182-187 (1991)、10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行うことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6 巻, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロト15 コール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、Virology, 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行うことができる。

このようにして、タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養20 に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機25 物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5~約 8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。

- ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15～約 43℃で約 3～約 24 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30～約 40℃で約 6～約 24 時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 10 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5～約 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20～約 35℃で約 24～約 72 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 15 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) に非働化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2～約 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃で約 3～約 5 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 20 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～約 20% の胎仔牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122 巻, 501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8 巻, 396 (1959)]、RPMI1640 培地 [J. Am. Med. Assoc., 199 巻, 519 (1967)]、199 培地 [Proc. Soc. Biol. Med., 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6～約 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30～約 40℃で約 25 15～約 60 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、
5 リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを
10 分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルア
15 ミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

20 かくして得られる本発明のタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを
25 部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプ

シン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどにより測定することができる。

- 5 さらに、本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドは、それをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞タンパク質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、カルモジュリン
- 10 またはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞タンパク質（転写／）翻訳系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液はPratt J. M. ら, “Transcription and Translation”, Hames B. D. および Higgins S. J. 編, IRL Press, Oxford 179-209 (1984) に記載の方法等に準じて調製することもできる。市販の細胞ライセートと
- 15 しては、大腸菌由来のものはE. coli S30 extract system (Promega 社製) や RTS 500 Rapid Translation System (Roche 社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega 社製) 等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS™ (TOYOBO 社製) 等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。コムギ胚芽ライセートの作製法とし
- 20 ては、例えば Johnston F. B. ら, Nature, 179, 160-161 (1957) あるいは Erickson A. H. ら, Meth. Enzymol., 96, 38-50 (1996) 等に記載の方法を用いることができる。

- タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J. M. ら (1984) 前述) や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連
- 25 続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin A. S. ら, Science, 242, 1162-1164 (1988))、透析法 (木川ら, 第 21 回日本分子生物学会, WID6)、あるいは重層法 (PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis core kit 取扱説明書: TOYOBO

社製)等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法(特開2000-333673)等を用いることができる。

5 本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体(以下、本発明の抗体と略記することがある)は、本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。

10 また、本発明の抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域(CDR)を少なくとも有するものであれば特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール(PEG)等のタンパク質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

15 本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチド(以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある)に対する抗体は、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

以下に、本発明の抗体の免疫原調製法、および該抗体の製造法について説明する。

20 (1) 抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、上記した本発明のタンパク質またはその部分ペプチド、あるいはそれと同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する(合成)ペプチドなど、何れのものも使用することができる(以下、これらを単に本発明の抗原と称することもある)。

25 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドは、上記した通り、例えば、(a)ヒト、サル、ラット、マウス、ニワトリなどの温血動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製、(b)ペプチド・シンセサイザ

一等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、(c) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養、あるいは(d) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードする核酸を鋳型として無細胞転写／翻訳系を用いて生化学的に合成することによって製造される。

- 5 (a) 温血動物の組織または細胞から本発明のタンパク質を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、粗分画物（例、膜画分、可溶性画分）をそのまま抗原として用いることもできる。あるいは酸、界面活性剤またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することもできる。得られた本発明のタンパク質をそのまま免疫原とすることもできるし、ペプチダーゼ等を用いた限定分解により部分ペプチドを調製してそれを免疫原とすることもできる。
- 10

- (b) 化学的に本発明の抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述の(a)の方法を用いて天然材料より精製した本発明のタンパク質と同一の構造を有するもの、具体的には、該タンパク質のアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチドなどが用いられる。
- 15

- (c) DNAを含有する形質転換体を用いて本発明の抗原を製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例えば、Molecular Cloning 2nd ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従って作製することができる。該クローニング方法とは、(1) 本発明のタンパク質をコードする遺伝子配列に基づきデザインしたDNAプローブを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により該抗原をコードするDNAを単離するか、(2) 本発明のタンパク質をコードする遺伝子配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、cDNAを鋳型としてPCR法により該抗原をコードするDNAを調製し、該DNAを宿主に適合する発現ベクターに挿入する方法など
- 20
- 25

が挙げられる。該発現ベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体を適当な培地中で培養することにより、所望の抗原を得ることができる。

- (d) 無細胞転写／翻訳系を利用する場合、上記 (c) と同様の方法により調製した抗原をコードする DNA を挿入した発現ベクター（例えば、該 DNA が T7、
- 5 SP6 プロモーター等の制御下におかれた発現ベクターなど）を鋳型とし、該プロモーターに適合する RNA ポリメラーゼおよび基質（NTPs）を含む転写反応液を用いて mRNA を合成した後、該 mRNA を鋳型として公知の無細胞翻訳系（例：大腸菌、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽等の抽出液）を用いて翻訳反応を行わせる方法などが挙げられる。塩濃度等を適当に調整することにより、転写反
- 10 応と翻訳反応を同一反応液中で一括して行うこともできる。

- 免疫原としては完全な本発明のタンパク質分子やその部分アミノ酸配列を有するペプチドを用いることができる。部分アミノ酸配列としては、例えば 3 個以上の連続するアミノ酸残基からなるもの、好ましくは 4 個以上、より好ましくは 5 個以上、いっそう好ましくは 6 個以上の連続するアミノ酸残基からなるものが挙
- 15 げられる。あるいは、該アミノ酸配列としては、例えば 20 個以下の連続するアミノ酸残基からなるもの、好ましくは 18 個以下、より好ましくは 15 個以下、いっそう好ましくは 12 個以下の連続するアミノ酸残基からなるものが挙げられる。これらのアミノ酸残基の一部（例：1 ないし数個）は置換可能な基（例：Cys、水酸基等）によって置換されていていもよい。免疫原として用いられるペプチド
- 20 は、このような部分アミノ酸配列を 1 ないし数個含むアミノ酸配列を有する。

- あるいは、本発明のタンパク質を発現する温血動物細胞自体を、本発明の抗原として直接用いることもできる。温血動物細胞としては、上記 (a) 項で述べたような天然の細胞、上記 (c) 項で述べたような方法で形質転換した細胞などを用いることができる。形質転換に用いる宿主としては、ヒト、サル、ラット、マウス、
- 25 ハムスター、ニワトリなどから採取した細胞であれば何れのものでも良く、HEK293、COS7、CHO-K1、NIH3T3、Balb3T3、FM3A、L929、SP2/0、P3U1、B16、または P388 などが好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現する天然の温血動物細胞

または形質転換した温血動物細胞は、組織培養に用いられる培地（例、RPMI1640）または緩衝液（例、Hanks' Balanced Salt Solution）に懸濁された状態で免疫動物に注射することができる。免疫方法としては、抗体産生を促すことのできる方法であれば何れの方法でも良く、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射または
5 皮下注射などが好ましく用いられる。

本発明の抗原は、免疫原性を有していれば不溶化したものを直接免疫することもできるが、分子内に 1 ないし数個の抗原決定基しか有しない低分子量（例えば、分子量約 3,000 以下）の抗原（即ち、本発明のタンパク質の部分ペプチド）を用いる場合には、これらの抗原は通常免疫原性の低いハプテン分子なので、適当な
10 担体（キャリアー）に結合または吸着させた複合体として免疫することができる。担体としては天然もしくは合成の高分子を用いることができる。天然高分子としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のサイログロブリン、例えばニワトリのオボアルブミン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホール
15 リンペットヘモシアニン（KLH）などが用いられる。合成高分子としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または共重合物などの各種ラテックスなどが挙げられる。

該キャリアーとハプテンとの混合比は、担体に結合あるいは吸着させた抗原に対する抗体が効率よく産生されれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテンに対する抗体の作製にあたり常用されている上記の天然もしくは合成の高分子キャリアーを、重量比でハプテン 1 に対し
20 0.1~100 の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ
25 化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同士を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同士を架橋する N, N'-o-フェニレン

ジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同士を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、3-(2-
5 ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-スクシンイミジル (SPDP) など) を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

(2) モノクローナル抗体の作製

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

10 本発明の抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射、皮内注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独で、あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1~6 週毎に 1 回ずつ、計 2~10 回程度行われる。用いられる温血動物
15 としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ニワトリが挙げられる。抗 Ig 抗体産生の問題を回避するためには投与対象と同一種の哺乳動物を用いることが好ましいが、モノクローナル抗体作製には一般にマウスおよびラットが好ましく用いられる。

ヒトに対する人為的免疫感作は倫理的に困難であることから、本発明の抗体が
20 ヒトを投与対象とする場合には、(i) 後述する方法に従って作製されるヒト抗体産生動物（例：マウス）を免疫してヒト抗体を得る、(ii) 後述する方法に従ってキメラ抗体、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体を作製する、あるいは(iii) 体外免疫法とウイルスによる細胞不死化、ヒト-ヒト（もしくはマウス）ハイブリドーマ作製技術、ファージディスプレイ法等とを組み合わせるヒト抗体を得ることが好
25 ましい。尚、体外免疫法は、通常の免疫では抗体産生が抑制される抗原に対する抗体を取得できる可能性があることその他、 $\text{ng} \sim \mu\text{g}$ オーダーの抗原量で抗体を得ることが可能であること、免疫が数日間で終了することなどから、不安定で大

量調製の困難な抗原に対する抗体を得る方法として、非ヒト動物由来の抗体を調製する場合にも好ましく用いられ得る。

体外免疫法に用いられる動物細胞としては、ヒトおよび上記した温血動物（好ましくはマウス、ラット）の末梢血、脾臓、リンパ節などから単離されるリンパ球、好ましくはBリンパ球等が挙げられる。例えば、マウスやラット細胞の場合、
5 4～12週齢程度の動物から脾臓を摘出・脾細胞を分離し、適当な培地（例：ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、ハムF12培地等）で洗浄した後、抗原を含む胎仔ウシ血清（FCS；5～20%程度）添加培地に浮遊させて4～10日間程度CO₂インキュベーターなどを用いて培養する。抗原濃度としては、例え
10 ば0.05～5μgが挙げられるがこれに限定されない。同一系統の動物（1～2週齢程度が好ましい）の胸腺細胞培養上清を常法に従って調製し、培地に添加することが好ましい。

ヒト細胞の体外免疫では、胸腺細胞培養上清を得ることは困難なので、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6等数種のサイトカインおよび必要に応じてアジュバント物質
15 （例：ムラミルジペプチド等）を抗原とともに培地に添加して免疫感作を行うことが好ましい。

モノクローナル抗体の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物（例：マウス、ラット）もしくは動物細胞（例：ヒト、マウス、ラット）から抗体価の上昇が認められた個体もしくは細胞集団を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓または
20 リンパ節を採取もしくは体外免疫後4～10日間培養した後に細胞を回収して抗体産生細胞を単離し、これと骨髓腫細胞とを融合させることにより抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗体価の測定は、例えば標識化抗原と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。

25 骨髓腫細胞は多量の抗体を分泌するハイブリドーマを産生し得るものであれば特に制限はないが、自身は抗体を産生もしくは分泌しないものが好ましく、また、細胞融合効率が高いものがより好ましい。また、ハイブリドーマの選択を容易に

するために、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）感受性の株を用いることが好ましい。例えばマウス骨髄腫細胞としては NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 等が、ラット骨髄腫細胞としては R210、RCY3、Y3-Ag 1. 2. 3 等が、ヒト骨髄腫細胞としては SKO-007、GM 1500-6TG-2、LICR-LON-HMy2、UC729-6 等が挙げられる。

- 5 融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 [ネイチャー (Nature)、256 巻、495 頁(1975 年)] に従って実施することができる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG などが用いられる。PEG の分子量は特に制限はないが、低毒性で且つ粘性が比較的低い PEG1000～PEG6000 が好ましい。PEG 濃度としては
- 10 例えば 10～80%程度、好ましくは 30～50%程度が例示される。PEG の希釈用溶液としては無血清培地（例：RPMI1640）、5～20%程度の血清を含む完全培地、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、トリス緩衝液等の各種緩衝液を用いることができる。所望により DMSO（例：10～20%程度）を添加することもできる。融合液の pH としては、例えば 4～10 程度、好ましくは 6～8 程度が挙げられる。

- 15 抗体産生細胞（脾細胞）数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常 1:1～20:1 程度であり、通常 20～40℃、好ましくは 30～37℃で通常 1～10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- 抗体産生細胞株はまた、リンパ球をトランスフォームし得るウイルスに抗体産生細胞を感染させて該細胞を不死化することによっても得ることができる。その
- 20 ようなウイルスとしては、例えばエプスタインバー (EB) ウイルス等が挙げられる。大多数の人は伝染性単核球症の無症状感染としてこのウイルスに感染した経験があるので免疫を有しているが、通常の EB ウイルスを用いた場合にはウイルス粒子も産生されるので、適切な精製を行うべきである。ウイルス混入の可能性のない EB システムとして、B リンパ球を不死化する能力を保持するがウイルス粒
- 25 子の複製能力を欠損した組換え EB ウイルス（例えば、潜伏感染状態から溶解感染状態への移行のスイッチ遺伝子における欠損など）を用いることもまた好ましい。

マーマセト由来の B95-8 細胞は EB ウイルスを分泌しているので、その培養上清を用いれば容易に B リンパ球をトランスフォームすることができる。この細胞を例えば血清及びペニシリン／ストレプトマイシン (P/S) 添加培地 (例: RPMI1640) もしくは細胞増殖因子を添加した無血清培地で培養した後、濾過もしくは遠心分離等により培養上清を分離し、これに抗体産生 B リンパ球を適当な濃度 (例: 約 5
10⁷ 細胞/mL) で浮遊させて、通常 20~40℃、好ましくは 30~37℃ で通常 0.5~2 時間程度インキュベートすることにより抗体産生 B 細胞株を得ることができる。

ヒトの抗体産生細胞が混合リンパ球として提供される場合、大部分の人は EB ウイルス感染細胞に対して傷害性を示す T リンパ球を有しているので、トランスフォーメーション頻度を高めるためには、例えばヒツジ赤血球等と E ロゼットを形成させることによって T リンパ球を予め除去しておくことが好ましい。また、可溶性抗原を結合したヒツジ赤血球を抗体産生 B リンパ球と混合し、パーコール等の密度勾配を用いてロゼットを分離することにより標的抗原に特異的なリンパ球を選別することができる。さらに、大過剰の抗原を添加することにより抗原特異的な B リンパ球はキャップされて表面に IgG を提示しなくなるので、抗 IgG 抗体を結合したヒツジ赤血球と混合すると抗原非特異的な B リンパ球のみがロゼットを形成する。従って、この混合物からパーコール等の密度勾配を用いてロゼット非形成層を採取することにより、抗原特異的 B リンパ球を選別することができる。

トランスフォーメーションによって無限増殖能を獲得したヒト抗体分泌細胞は、抗体分泌能を安定に持続させるためにマウスもしくはヒトの骨髓腫細胞と戻し融合させることができる。骨髓腫細胞としては上記と同様のものが用いられ得る。

ハイブリドーマのスクリーニング、育種は通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、5~20% FCS を含む動物細胞用培地 (例: RPMI1640) もしくは細胞増殖因子を添加した無血清培地で行われる。ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンの濃度としては、例えばそれぞれ約 0.1mM、約 0.4 μM および約 0.016mM 等が挙げられる。ヒト-マウスハイブリドーマの選択にはウワバイン耐性を用いることができる。ヒト細胞株はマウス細胞株に比べてウワバイ

ンに対する感受性が高いので、 $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{M}$ 程度で培地に添加することにより未融合のヒト細胞を排除することができる。

ハイブリドーマの選択にはフィーダー細胞やある種の細胞培養上清を用いることが好ましい。フィーダー細胞としては、ハイブリドーマの出現を助けて自身は死滅するように生存期間が限られた異系の細胞種、ハイブリドーマの出現に有用な増殖因子を大量に産生し得る細胞を放射線照射等して増殖力を低減させたもの等が用いられる。例えば、マウスのフィーダー細胞としては、脾細胞、マクロファージ、血液、胸腺細胞等が、ヒトのフィーダー細胞としては、末梢血単核細胞等が挙げられる。細胞培養上清としては、例えば上記の各種細胞の初代培養上清や種々の株化細胞の培養上清が挙げられる。

また、ハイブリドーマは、抗原を蛍光標識して融合細胞と反応させた後、蛍光活性化セルソータ（FACS）を用いて抗原と結合する細胞を分離することによっても選択することができる。この場合、標的抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマを直接選択することができるので、クローニングの労力を大いに軽減することが可能である。

標的抗原に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのクローニングには種々の方法が使用できる。

アミノプテリンは多くの細胞機能を阻害するので、できるだけ早く培地から除去することが好ましい。マウスやラットの場合、ほとんどの骨髓腫細胞は10～14日以内に死滅するので、融合2週間後からはアミノプテリンを除去することができる。但し、ヒトハイブリドーマについては通常融合後4～6週間程度はアミノプテリン添加培地で維持される。ヒポキサンチン、チミジンはアミノプテリン除去後1週間以上後に除去するのが望ましい。即ち、マウス細胞の場合、例えば融合7～10日後にヒポキサンチンおよびチミジン（HT）添加完全培地（例：10% FCS添加 RPMI1640）の添加または交換を行う。融合後8～14日程度で目視可能なクローンが出現する。クローンの直径が1mm程度になれば培養上清中の抗体量の測定が可能となる。

抗体量の測定は、例えば標的抗原またはその誘導体あるいはその部分ペプチド（抗原決定基として用いた部分アミノ酸配列を含む）を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質（例： ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C ）、酵素（例： β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッシェンイソチオシアネート）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン）などで標識した抗免疫グロブリン（IgG）抗体（もとの抗体産生細胞が由来する動物と同一種の動物由来の IgG に対する抗体が用いられる）またはプロテイン A を加え、固相に結合した標的抗原（抗原決定基）に対する抗体を検出する方法、抗 IgG 抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、上記と同様の標識剤で標識した標的抗原またはその誘導体あるいはその部分ペプチドを加え、固相に結合した標的抗原（抗原決定基）に対する抗体を検出する方法などによって行うことができる。

クローニング方法としては限界希釈法が通常用いられるが、軟寒天を用いたクローニングや FACS を用いたクローニング（上述）も可能である。限界希釈法によるクローニングは、例えば以下の手順で行うことができるがこれに限定されない。

上記のようにして抗体量を測定して陽性ウェルを選択する。適当なフィーダー細胞を選択して 96 ウェルプレートに添加しておく。抗体陽性ウェルから細胞を吸い出し、完全培地（例：10% FCS および P/S 添加 RPMI1640）中に 30 細胞/mL の密度となるように浮遊させ、フィーダー細胞を添加したウェルプレートに 0.1 mL（3 細胞/ウェル）加え、残りの細胞懸濁液を 10 細胞/mL に希釈して別のウェルに同様にまき（1 細胞/ウェル）、さらに残りの細胞懸濁液を 3 細胞/mL に希釈して別のウェルにまく（0.3 細胞/ウェル）。目視可能なクローンが出現するまで 2~3 週間程度培養し、抗体量を測定・陽性ウェルを選択し、再度クローニングする。ヒト細胞の場合はクローニングが比較的困難なので、10 細胞/ウェルのプレートも調製しておく。通常 2 回のサブクローニングでモノクローナル抗体産生ハイブ

リドーマを得ることができるが、その安定性を確認するためにさらに数ヶ月間定期的に再クローニングを行うことが望ましい。

ハイブリドーマはインビトロまたはインビボで培養することができる。

インビトロでの培養法としては、上記のようにして得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、細胞密度を例えば $10^5 \sim 10^6$ 細胞/mL 程度に保ちながら、また、FCS 濃度を徐々に減らしながら、ウェルプレートから徐々にスケールアップしていく方法が挙げられる。

インビボでの培養法としては、例えば、腹腔内にミネラルオイルを注入して形質細胞腫 (MOPC) を誘導したマウス (ハイブリドーマの親株と組織適合性のマウス) に、5~10 日後に $10^6 \sim 10^7$ 細胞程度のハイブリドーマを腹腔内注射し、2~5 週間後に麻酔下で腹水を採取する方法が挙げられる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法 [例：塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例：DEAE、QEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテイン A あるいはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など] に従って行うことができる。

以上のようにして、ハイブリドーマを温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、モノクローナル抗体を製造することができる。

本発明の抗体を癌予防・治療に利用する場合、該抗体は抗腫瘍活性を持つものでなければならないので、得られたモノクローナル抗体の抗腫瘍活性の程度について調べる必要がある。抗腫瘍活性は、抗体の存在下および非存在下における癌細胞の増殖、アポトーシス誘導などを比較することにより測定することができる。

好ましい一実施態様において、本発明の抗体はヒトを投与対象とする医薬品として使用されることから、本発明の抗体 (好ましくはモノクローナル抗体) はヒ

トに投与した場合に抗原性を示す危険性が低減された抗体、具体的には、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、マウスーヒトキメラ抗体などであり、特に好ましくは完全ヒト抗体である。ヒト化抗体およびキメラ抗体は、後述する方法に従って遺伝子工学的に作製することができる。また、完全ヒト抗体は、上記したヒトーヒト（もしくはマウス）ハイブリドーマより製造することも可能ではあるが、大量の抗体を安定に且つ低コストで提供するためには、後述するヒト抗体産生動物（例：マウス）またはファージディスプレイ法を用いて製造することが望ましい。

(i) キメラ抗体の作製

本明細書において「キメラ抗体」とは、H鎖およびL鎖の可変領域（ V_H および V_L ）の配列がある哺乳動物種に由来し、定常領域（ C_H および C_L ）の配列が他の哺乳動物種に由来する抗体を意味する。可変領域の配列は、例えばマウス等の容易にハイブリドーマを作製することができる動物種由来であることが好ましく、定常領域の配列は投与対象となる哺乳動物種由来であることが好ましい。

キメラ抗体の作製法としては、例えば米国特許第 6,331,415 号に記載される方法あるいはそれを一部改変した方法などが挙げられる。具体的には、まず、上述のようにして得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ（例えば、マウスーマウスハイブリドーマ）から、常法に従って mRNA もしくは全 RNA を調製し、cDNA を合成する。該 cDNA を鋳型として、適当なプライマー（例えば、センスプライマーとして V_H および V_L の各 N 末端配列をコードする塩基配列を含むオリゴ DNA、アンチセンスプライマーとして C_H および C_L の N 末端配列をコードする塩基配列とハイブリダイズするオリゴ DNA（例えば Bio/Technology, 9: 88-89, 1991 参照））を用い、常法に従って PCR で V_H および V_L をコードする DNA を増幅・精製する。同様の方法により、他の哺乳動物（例：ヒト）のリンパ球等より調製した RNA から RT-PCR により C_H および C_L をコードする DNA を増幅・精製する。常法を用いて V_H と C_H 、 V_L と C_L をそれぞれ連結し、得られたキメラ H 鎖 DNA およびキメラ L 鎖 DNA を、それぞれ適当な発現ベクター（例えば、CHO 細胞、COS 細胞、マウス骨髄腫細胞等で転写活性を有するプロモーター（例：CMV プロモーター、SV40 プ

ロモーター等)を含むベクターなど)に挿入する。両鎖をコードする DNA は別個のベクターに挿入してもよいし、1 個のベクターにタンデムに挿入してもよい。

得られたキメラ H 鎖およびキメラ L 鎖発現ベクターで宿主細胞を形質転換する。

宿主細胞としては、動物細胞、例えば上記したマウス骨髓腫細胞の他、チャイニ

- 5 ーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、サル由来の COS-7 細胞、Vero 細胞、ラット由来の GHS 細胞などが挙げられる。形質転換は動物細胞に適用可能ないかなる方法を用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法などが挙げられる。宿主細胞に適した培地中で一定期間培養後、培養上清を回収して上記と同様の方法で精製することにより、キメラモノクローナル抗体を単離することができる。あ
- 10 るいは、宿主細胞としてウシ、ヤギ、ニワトリ等のトランスジェニック技術が確立し、且つ家畜 (家禽) として大量繁殖のノウハウが蓄積されている動物の生殖系列細胞を用い、常法によってトランスジェニック動物を作製することにより、得られる動物の乳汁もしくは卵から容易に且つ大量にキメラモノクローナル抗体を得ることもできる。さらに、トウモロコシ、イネ、コムギ、ダイズ、タバコな
- 15 どのトランスジェニック技術が確立し、且つ主要作物として大量に栽培されている植物細胞を宿主細胞として、プロトプラストへのマイクロインジェクションやエレクトロポレーション、無傷細胞へのパーティクルガン法や Ti ベクター法などを用いてトランスジェニック植物を作製し、得られる種子や葉などから大量にキメラモノクローナル抗体を得ることも可能である。

- 20 得られたキメラモノクローナル抗体をパパインで分解すれば Fab が、ペプシンで分解すれば $F(ab')_2$ がそれぞれ得られる。

また、マウス V_H および V_L をコードする DNA を適当なリンカー、例えば 1~40 アミノ酸、好ましくは 3~30 アミノ酸、より好ましくは 5~20 アミノ酸からなるペプチド (例: $[\text{Ser}-(\text{Gly})_m]_n$ もしくは $[(\text{Gly})_m-\text{Ser}]_n$ (m は 0~10 の整数、 n は 1

25 ~5 の整数) 等) をコードする DNA を介して連結することにより scFv とすることができ、さらに C_{H3} をコードする DNA を適当なリンカーを介して連結することにより minibody モノマーとしたり、 C_H 全長をコードする DNA を適当なリンカーを介

して連結することにより scFv-Fc とすることもできる。このような遺伝子工学的に修飾（共役）された抗体分子をコードする DNA は、適当なプロモーターの制御下におくことにより大腸菌や酵母などの微生物で発現させることができ、大量に抗体分子を生産することができる。

- 5 マウス V_H および V_L をコードする DNA を 1 つのプロモーターの下流にタンデムに挿入して大腸菌に導入すると、モノシストロニックな遺伝子発現により Fv と呼ばれる二量体を形成する。また、分子モデリングを用いて V_H および V_L の FR 中の適当なアミノ酸を Cys に置換すると、両鎖の分子間ジスルフィド結合により dsFv と呼ばれる二量体が形成される。

10 (ii) ヒト化抗体

本明細書において「ヒト化抗体」とは、可変領域に存在する相補性決定領域 (CDR) 以外のすべての領域（即ち、定常領域および可変領域中のフレームワーク領域 (FR)）の配列がヒト由来であり、CDR の配列のみが他の哺乳動物種由来である抗体を意味する。他の哺乳動物種としては、例えばマウス等の容易にハイブリドーマを作製することができる動物種が好ましい。

- 15 ヒト化抗体の作製法としては、例えば米国特許第 5,225,539 号、第 5,585,089 号、第 5,693,761 号および第 5,693,762 号に記載される方法あるいはそれらを一
部改変した方法などが挙げられる。具体的には、上記キメラ抗体の場合と同様に
して、ヒト以外の哺乳動物種（例：マウス）由来の V_H および V_L をコードする DNA
20 を単離した後、常法により自動 DNA シークエンサー（例：Applied Biosystems 社製等）を用いてシークエンスを行い、得られる塩基配列もしくはそこから推定されるアミノ酸配列を公知の抗体配列データベース〔例えば、Kabat database (Kabat ら,「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, NIH 編, 第 5 版, 1991 参照) 等]
25 を用いて解析し、両鎖の CDR および FR を決定する。決定された FR 配列に類似した FR 配列を有するヒト抗体の L 鎖および H 鎖をコードする塩基配列〔例：ヒト κ 型 L 鎖サブグループ I およびヒト H 鎖サブグループ II もしくは III (Kabat ら,

1991 (上述) を参照)] の CDR コード領域を、決定された異種 CDR をコードする塩基配列で置換した塩基配列を設計し、該塩基配列を 20~40 塩基程度のフラグメントに区分し、さらに該塩基配列に相補的な配列を、前記フラグメントと交互にオーバーラップするように 20~40 塩基程度のフラグメントに区分する。各フラグメントを DNA シンセサイザーを用いて合成し、常法に従ってこれらをハイブリダイズおよびライゲートさせることにより、ヒト由来の FR と他の哺乳動物種由来の CDR を有する V_H および V_L をコードする DNA を構築することができる。より迅速かつ効率的に他の哺乳動物種由来 CDR をヒト由来 V_H および V_L に移植するには、PCR による部位特異的変異誘発を用いることが好ましい。そのような方法としては、例えば特開平 5-227970 号公報に記載の逐次 CDR 移植法等が挙げられる。このようにして得られる V_H および V_L をコードする DNA を、上記キメラ抗体の場合と同様の方法でヒト由来の C_H および C_L をコードする DNA とそれぞれ連結して適当な宿主細胞に導入することにより、ヒト化抗体を産生する細胞あるいはトランスジェニック動植物を得ることができる。

ヒト化抗体もキメラ抗体と同様に遺伝子工学的手法を用いて scFv、scFv-Fc、minibody、dsFv、Fv などに改変することができ、適当なプロモーターを用いることで大腸菌や酵母などの微生物でも生産させることができる。

ヒト化抗体作製技術は、例えばハイブリドーマの作製技術が確立していない他の動物種に好ましく投与し得るモノクローナル抗体を作製するのにも応用することができる。例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの家畜（家禽）として広く繁殖されている動物やイヌやネコなどのペット動物などが対象として挙げられる。

(iii) ヒト抗体産生動物を用いた完全ヒト抗体の作製

内因性免疫グロブリン (Ig) 遺伝子をノックアウト (KO) した非ヒト温血動物に機能的なヒト Ig 遺伝子を導入し、これを抗原で免疫すれば、該動物由来の抗体の代わりにヒト抗体が産生される。従って、マウス等のようにハイブリドーマ作製技術が確立している動物を用いれば、従来のマウスモノクローナル抗体の作製

と同様の方法によって完全ヒトモノクローナル抗体を取得することが可能となる。まず、ヒト Ig の H 鎖および L 鎖のミニ遺伝子を通常のトランスジェニック (Tg) 技術を用いて導入したマウスと、内因性マウス Ig 遺伝子を通常の KO 技術を用いて不活性化したマウスとを交配して得られたヒト抗体産生マウス (Immunol.

5 Today, 17: 391-397, 1996 を参照) を用いて作製されたヒトモノクローナル抗体のいくつかは既に臨床段階にあり、現在までのところ抗ヒト Ig ヒト抗体 (HAHA) の産生は報告されていない。

その後、Abgenix 社 [商品名: XenoMouse (Nat. Genet., 15: 146-156, 1997; 米国特許第 5, 939, 598 号等を参照)] や Medarex 社 [商品名: Hu-Mab Mouse (Nat. Biotechnol., 14: 845-851, 1996; 米国特許第 5, 545, 806 号等を参照)] が酵母人工染色体 (YAC) ベクターを用いてより大きなヒト Ig 遺伝子を導入した Tg マウスを作製し、よりレパートリーに富んだヒト抗体を産生し得るようになった。しかしながら、ヒト Ig 遺伝子は、例えば H 鎖の場合、約 80 種の V 断片、約 30 種の D 断片および 6 種の J 断片が様々に組み合わせられた VDJ エクソンが抗原結合部位をコードすることによりその多様性を実現しているため、その全長は H 鎖が約 1.5Mb (14 番染色体)、 κ L 鎖が約 2Mb (2 番染色体)、 λ L 鎖が約 1Mb (22 番染色体) に達する。ヒトにおけるのと同様の多様な抗体レパートリーを他の動物種で再現するためには、各 Ig 遺伝子の全長を導入することが望ましいが、従来の遺伝子導入ベクター (プラスミド、コスミド、BAC、YAC 等) に挿入可能な DNA は通常数 kb~数百 kb であり、クローニングした DNA を受精卵に注入する従来のトランスジェニック動物作製技術では全長の導入は困難であった。

Tomizuka ら (Nat. Genet., 16: 133-143, 1997) は、Ig 遺伝子を担持するヒト染色体の自然断片 (hCF) をマウスに導入して (染色体導入 (TC) マウス)、完全長ヒト Ig 遺伝子を有するマウスを作製した。即ち、まず、H 鎖遺伝子を含む 14 番染色体および κ L 鎖遺伝子を含む 2 番染色体を例えば薬剤耐性マーカー等で標識したヒト染色体を有するヒト-マウスハイブリッド細胞を 48 時間程度紡錘糸形成阻害剤 (例: コルセミド) で処理して、1~数本の染色体もしくはその断片

が核膜に被包されたミクロセルを調製し、微小核融合法によりマウス ES 細胞に染色体を導入する。薬剤を含む培地を用いてヒト Ig 遺伝子を有する染色体もしくはその断片を保持するハイブリッド ES 細胞を選択し、通常の KO マウス作製の場合と同様の方法によりマウス胚へ顕微注入する。得られるキメラマウスからコート
5 カラーを指標にする等して生殖系列キメラを選択し、ヒト 14 番染色体断片を伝達する TC マウス系統 (TC(hCF14)) およびヒト 2 番染色体断片を伝達する TC マウス系統 (TC(hCF2)) を樹立する。常法により内因性 H 鎖遺伝子および κ L 鎖遺伝子を KO されたマウス (KO(IgH) および KO(Ig κ)) を作製し、これら 4 系統の交配を繰り返すことにより、4 種の遺伝子改変をすべて有するマウス系統 (ダブル
10 TC/KO) を樹立することができる。

上記のようにして作製されるダブル TC/KO マウスに、通常のマウスモノクローナル抗体を作製する場合と同様の方法を適用すれば、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することができる。しかしながら、 κ L 鎖遺伝子を含む hCF2 がマウス細胞内で不安定なため、ハイブリドーマ取得効率は通常
15 のマウスの場合に比べて低いという欠点がある。

一方、前記 Hu-Mab Mouse は κ L 鎖遺伝子の約 50%を含むが、可変領域クラスターが倍加した構造を有するため完全長を含む場合と同等の κ 鎖の多様性を示し (他方、H 鎖遺伝子は約 10%しか含まないので H 鎖の多様性は低く、抗原に対する応答性が不十分である)、且つ YAC ベクター (Ig κ -YAC) によりマウス染色体
20 中に挿入されているので、マウス細胞内で安定に保持される。この利点を生かし、TC(hCF14) マウスと Hu-Mab Mouse とを交配して hCF14 と Ig κ -YAC とを安定に保持するマウス (商品名: KM マウス) を作製することにより、通常のマウスと同等のハイブリドーマ取得効率および抗体の抗原親和性を得ることができる。

さらに、より完全にヒトにおける多様な抗体レパートリーを再現するために、
25 λ L 鎖遺伝子をさらに導入したヒト抗体産生動物を作製することもできる。かかる動物は、上記と同様の方法で λ L 鎖遺伝子を担持するヒト 22 番染色体もしくはその断片を導入した TC マウス (TC(hCF22)) を作製し、これと上記ダブル TC/KO

マウスや KM マウスとを交配することにより得ることもできるし、あるいは、例えば H 鎖遺伝子座と λ L 鎖遺伝子座とを含むヒト人工染色体 (HAC) を構築してマウス細胞に導入することにより得ることもできる (Nat. Biotechnol., 18: 1086-1090, 2000)。

- 5 本発明の抗体を医薬品として利用する場合はモノクローナル抗体であることが望ましいが、ポリクローナル抗体であってもよい。本発明の抗体がポリクローナル抗体である場合には、ハイブリドーマの利用を要しないので、ハイブリドーマ作製技術は確立されていないがトランスジェニック技術は確立されている動物種、好ましくはウシ等の有蹄動物を用いて、上記と同様の方法によりヒト抗体産生動物
- 10 物を作製すれば、より大量のヒト抗体を安価に製造することも可能である (例えば、Nat. Biotechnol., 20: 889-894, 2002 参照)。得られるヒトポリクローナル抗体は、ヒト抗体産生動物の血液、腹水、乳汁、卵など、好ましくは乳汁、卵を採取し、上記と同様の精製技術を組み合わせることによって精製することができる。

- 15 (iv) ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーを用いた完全ヒト抗体の作製
- 完全ヒト抗体を作製するもう 1 つのアプローチはファージディスプレイを用いる方法である。この方法は PCR による変異が CDR 以外に導入される場合があり、そのため臨床段階で少数の HAHA 産生の報告例があるが、その一方で宿主動物に由来する異種間ウイルス感染の危険性がない点や抗体の特異性が無限である (禁止
- 20 クローンや糖鎖などに対する抗体も容易に作製可能) 等の利点を有している。

ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーの作製方法としては、例えば、以下のものが挙げられるが、これに限定されない。

- 用いられるファージは特に限定されないが、通常繊維状ファージ (Ff バクテリオファージ) が好ましく用いられる。ファージ表面に外来タンパク質を提示する方法としては、g3p、g6p~g9p のコートタンパク質のいずれかとの融合タンパク
- 25 質として該コートタンパク質上で発現・提示させる方法が挙げられるが、よく用いられるのは g3p もしくは g8p の N 末端側に融合させる方法である。ファージデ

ディスプレイベクターとしては、1)ファージゲノムのコートタンパク質遺伝子に外来遺伝子を融合した形で導入して、ファージ表面上に提示されるコートタンパク質をすべて外来タンパク質との融合タンパク質として提示させるものの他、2)融合タンパク質をコードする遺伝子を野生型コートタンパク質遺伝子とは別に挿入して、融合タンパク質と野生型コートタンパク質とを同時に発現させるものや、3)融合タンパク質をコードする遺伝子を有するファージミドベクターを持つ大腸菌に野生型コートタンパク質遺伝子を有するヘルパーファージを感染させて融合タンパク質と野生型コートタンパク質とを同時に発現するファージ粒子を産生させるものなどが挙げられるが、1)の場合は大きな外来タンパク質を融合させると感染能力が失われるため、抗体ライブラリーの作製のためには2)または3)のタイプが用いられる。

具体的なベクターとしては、Holtら (Curr. Opin. Biotechnol., 11: 445-449, 2000) に記載されるものが例示される。例えば、pCES1 (J. Biol. Chem., 274: 18218-18230, 1999 参照) は、1つのラクトースプロモーターの制御下に g3p のシグナルペプチドの下流に κ L 鎖定常領域をコードする DNA と g3p シグナルペプチドの下流に CH3 をコードする DNA、His-tag、c-myc tag、アンバー終止コドン (TAG) を介して g3p コード配列とが配置された Fab 発現型ファージミドベクターである。アンバー変異を有する大腸菌に導入すると g3p コートタンパク質上に Fab を提示するが、アンバー変異を持たない HB2151 株などで発現させると可溶性 Fab 抗体を産生する。また、scFv 発現型ファージミドベクターとしては、例えば pHEN1 (J. Mol. Biol., 222:581-597, 1991) 等が用いられる。

一方、ヘルパーファージとしては、例えば M13-K07、VCSM13 等が挙げられる。

また、別のファージディスプレイベクターとして、抗体遺伝子の 3' 末端とコートタンパク質遺伝子の 5' 末端にそれぞれシステインをコードするコドンを含む配列を連結し、両遺伝子を同時に別個に (融合タンパク質としてではなく) 発現させて、導入されたシステイン残基同士による S-S 結合を介してファージ表面

のコートタンパク質上に抗体を提示し得るようにデザインされたもの (Morphosys 社の CysDisplay™ 技術) 等も挙げられる。

ヒト抗体ライブラリーの種類としては、ナイーブ/非免疫ライブラリー、合成ライブラリー、免疫ライブラリー等が挙げられる。

- 5 ナイーブ/非免疫 (non-immunized) ライブラリーは、正常なヒトが保有する V_H および V_L 遺伝子を RT-PCR により取得し、それらをランダムに上記のファージディスプレイベクターにクローニングして得られるライブラリーである。通常、正常人の末梢血、骨髓、扁桃腺などのリンパ球由来の mRNA 等が鋳型として用いられる。疾病履歴などの V 遺伝子のバイアスをなくすため、抗原感作によるクラス
- 10 スイッチが起こっていない IgM 由来の mRNA のみを増幅したものを特にナイーブライブラリーと呼んでいる。代表的なものとしては、CAT 社のライブラリー (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991; Nat. Biotechnol., 14: 309-314, 1996 参照)、MRC 社のライブラリー (Annu. Rev. Immunol., 12: 433-455, 1994 参照)、Dyax 社のライブラリー (J. Biol. Chem., 1999 (上述); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14:
- 15 7969-7974, 2000 参照) 等が挙げられる。

- 合成ライブラリーは、ヒト B 細胞内の機能的な特定の抗体遺伝子を選び、V 遺伝子断片の、例えば CDR3 等の抗原結合領域の部分を適当な長さのランダムなアミノ酸配列をコードする DNA で置換し、ライブラリー化したものである。最初から機能的な scFv や Fab を産生する V_H および V_L 遺伝子の組み合わせでライブラリー
- 20 を構築できるので、抗体の発現効率や安定性に優れているとされる。代表的なものとしては、Morphosys 社の HuCAL ライブラリー (J. Mol. Biol., 296: 57-86, 2000 参照)、BioInvent 社のライブラリー (Nat. Biotechnol., 18: 852, 2000 参照)、Crucell 社のライブラリー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3938, 1995; J. Immunol. Methods, 272: 219-233, 2003 参照) 等が挙げられる。

- 25 免疫 (immunized) ライブラリーは、癌、自己免疫疾患、感染症等の患者やワクチン接種を受けた者など、標的抗原に対する血中抗体価が上昇したヒトから採取したリンパ球、あるいは上記体外免疫法により標的抗原を人為的に免疫したヒト

リンパ球等から、上記ナイーブ／非免疫ライブラリーの場合と同様にして mRNA を調製し、RT-PCR 法によって V_H および V_L 遺伝子を増幅し、ライブラリー化したものである。最初から目的の抗体遺伝子がライブラリー中に含まれるので、比較的小さなサイズのライブラリーからでも目的の抗体を得ることができる。

- 5 ライブラリーの多様性は大きいほどよいが、現実的には、以下のパンニング操作で取り扱えるファージ数 ($10^{11} \sim 10^{13}$ ファージ) と通常のパニングでクローンの単離および増幅に必要なファージ数 (100~1,000 ファージ/クローン) を考慮すれば、 $10^8 \sim 10^{11}$ クローン程度が適当であり、約 10^8 クローンのライブラリーで通常 10^{-9} オーダーの K_d 値を有する抗体をスクリーニングすることができる。
- 10 標的抗原に対する抗体をファージディスプレイ法で選別する工程をパンニングという。具体的には、例えば、抗原を固定化した担体とファージライブラリーとを接触させ、非結合ファージを洗浄除去した後、結合したファージを担体から溶出させ、大腸菌に感染させて該ファージを増殖させる、という一連の操作を 3~5 回程度繰り返すことにより抗原特異的な抗体を提示するファージを濃縮する。抗
- 15 原を固定化する担体としては、通常の抗原抗体反応やアフィニティークロマトグラフィーで用いられる各種担体、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス、金属などからなるマイクロプレート、チューブ、メンブレン、カラム、ビーズなど、さらには表面プラズモン共鳴 (SPR) のセンサーチップ
- 20 などが挙げられる。抗原の固定化には物理的吸着を用いてもよく、また、通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。例えばビオチン- (ストレプト) アビジン系等が好ましく用いられる。標的抗原である内因性リガンドがペプチドなどの小分子である場合には、抗原決定基として用いた部分が担体との結合により被覆されないように特に注意
- 25 する必要がある。非結合ファージの洗浄には、BSA 溶液などのブロッキング液 (1-2 回)、Tween 等の界面活性剤を含む PBS (3-5 回) などを順次用いることができる。クエン酸緩衝液 (pH5) などの使用が好ましいとの報告もある。特異的ファージの

溶出には、通常酸（例：0.1M 塩酸など）が用いられるが、特異的プロテアーゼによる切断（例えば、抗体遺伝子とコートタンパク質遺伝子との連結部にトリプシン切断部位をコードする遺伝子配列を導入することができる。この場合、溶出するファージ表面には野生型コートタンパク質が提示されるので、コートタンパク質のすべてが融合タンパク質として発現しても大腸菌への感染・増殖が可能となる）や可溶性抗原による競合的溶出、あるいはS-S結合の還元（例えば、前記したCysDisplay™では、パンニングの後、適当な還元剤を用いて抗体とコートタンパク質とを解離させることにより抗原特異的ファージを回収することができる）による溶出も可能である。酸で溶出した場合は、トリスなどで中和した後で溶出

5 質のすべてが融合タンパク質として発現しても大腸菌への感染・増殖が可能となる）や可溶性抗原による競合的溶出、あるいはS-S結合の還元（例えば、前記したCysDisplay™では、パンニングの後、適当な還元剤を用いて抗体とコートタンパク質とを解離させることにより抗原特異的ファージを回収することができる）による溶出も可能である。酸で溶出した場合は、トリスなどで中和した後で溶出

10 ファージを大腸菌に感染させ、培養後、常法によりファージを回収する。

パンニングにより抗原特異的抗体を提示するファージが濃縮されると、これら

を大腸菌に感染させた後プレート上に播種してクローニングを行う。再度ファージを回収し、上述の抗体価測定法（例：ELISA、RIA、FIA等）やFACSあるいはSPRを利用した測定により抗原結合活性を確認する。

15 選択された抗原特異的抗体を提示するファージクローンからの抗体の単離・精製は、例えば、ファージディスプレイベクターとして抗体遺伝子とコートタンパク質遺伝子の連結部にアンバー終止コドンが導入されたベクターを用いる場合には、該ファージをアンバー変異を持たない大腸菌（例：HB2151株）に感染させると、可溶性抗体分子が産生されペリプラズムもしくは培地中に分泌されるので、

20 細胞壁をリゾチームなどで溶解して細胞外画分を回収し、上記と同様の精製技術を用いて行うことができる。His-tagやc-myc tagを導入しておけば、IMACや抗c-myc抗体カラムなどを用いて容易に精製することができる。また、パンニングの際に特異的プロテアーゼによる切断を利用する場合には、該プロテアーゼを作用させると抗体分子がファージ表面から分離されるので、同様の精製操作を実施

25 することにより目的の抗体を精製することができる。

ヒト抗体産生動物およびファージディスプレイヒト抗体ライブラリーを用いた完全ヒト抗体作製技術は、他の動物種のモノクローナル抗体を作製するのにも応

用することができる。例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどの家畜（家禽）として広く繁殖されている動物やイヌやネコなどのペット動物などが対象として挙げられる。非ヒト動物においては標的抗原の人為的免疫に対する倫理的問題が少ないので、免疫ライブラリーの利用がより有効である。

5 (3) ポリクローナル抗体の作製

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質もしくはペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発
10 明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアータンパク質とハプテンとの混合比は、キャリアータンパク質に架橋させて免疫したハプテンに対して
15 抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1～約 20、好ましくは約 1～約 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアータンパク質のカプリングには、種々の縮合剤を用
20 いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全
25 フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 1～約 6 週毎に 1 回ずつ、計約 2～約 10 回程度行われる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

目的のポリヌクレオチドの標的領域と相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチド、即ち、目的のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、該目的ポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということが出来る。

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、本発明のタンパク質をコードするDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該ポリヌクレオチドの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の塩基配列と、オーバーラップする領域に関して、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列である。ここで「相同性」とは、前記した本発明のDNAの場合と同義である。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列のうち、(a) 翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以

上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、(b) RNaseH による RNA 分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明の DNA の全塩基配列の相補鎖と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15 もしくは配列番号：17 で表わされる塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは、例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15 もしくは配列番号：17 で表わされる塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

本発明の DNA の塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドともいう）は、クローン化した、あるいは決定された本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする遺伝子（以下、単に本発明の遺伝子ともいう）の複製または発現を阻害することができる。即ち、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明の遺伝子から転写される RNA (mRNA または初期転写産物) とハイブリダイズすることができ、mRNA の合成（プロセッシング）または機能（タンパク質への翻訳）を阻害することができるか、あるいは本発明の遺伝子に関連する RNA との相互作用を介して本発明の遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明の遺伝子に関連する RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明の遺伝子に関連する RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオ

チドは、生体内および生体外で本発明の遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドの標的領域は、アンチセンスポリヌクレオチドがハイブリダイズすることにより、結果として本発明のタンパク質への
5 翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、該タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約10～約40塩基、特に約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいが、それに限定されない。具体的には、
10 本発明の遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどが、アンチセンスポリヌクレオチドの好ましい標的領域として選択されうるが、本発明の遺伝子内の如何なる領域も対象として選択されうる。例えば、該遺伝子のイン
15 トロン部分を標的領域とすることもできる。

さらに、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質のmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAである本発明の遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。あるいはD
20 NA:RNAハイブリッドを形成してRNaseHによる分解を誘導するものであってもよい。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスポリヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよい。

く、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15もしくは配列番号：17で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。

- 5 アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステ
- 10 ステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化
- 15 剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の
- 20
- 25

複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えば Pharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年、Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着さ

5 せることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

本発明のタンパク質をコードするmRNAもしくは初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得る
10 リボザイムもまた、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドに包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有するオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られ
15 るセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基
20 質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。本発明のタンパク質のmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる
[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザ
25 イムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに

連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

本明細書においては、本発明のタンパク質のmRNAもしくは初期転写産物のコード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的なオリゴRNAとその相補鎖とからなる二本鎖RNA、いわゆる siRNA もまた、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドに包含されるものとして定義される。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が動物細胞でも広く起こることが確認されて以来 [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として汎用されている。siRNAは標的となるmRNAの塩基配列情報に基づいて、市販のソフトウェア（例：RNAi Designer; Invitrogen）を用いて適宜設計することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、本発明の遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。siRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。あるいは、siRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を適当な長さ（例えば約3～約10塩基）のリンカーを介して連結したRNA（shRNA）として合成し、導入する動物細胞内の酵素ダイサー（dicer）などによってプロセッシングされるように設計することもできる。さらには、セン

ス鎖およびアンチセンス鎖をコードするDNAがそれぞれ別個のU6やH1などのPol III系プロモーターの制御下におかれた発現ベクター、あるいは上記センス鎖とアンチセンス鎖とをリンカーを介して連結したRNA鎖をコードするDNAがPol III系プロモーターの制御下におかれた発現ベクターとして調製し、動物細胞内で発現させ、siRNAを形成させてもよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の遺伝子を導入した形質転換体、生体内や生体外の本発明の遺伝子発現系、または生体内や生体外の本発明のタンパク質翻訳系を用いて調べることができる。

以下に、本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、単に本発明のDNAと略記する場合がある）、上述の本発明の抗体、上述の本発明のアンチセンスポリヌクレオチドの用途を説明する。

本発明のタンパク質は、癌組織で発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することができる。すなわち、癌組織における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

さらに、本発明のタンパク質の発現および／または活性を阻害することにより、癌細胞のアポトーシスが促進され、癌細胞の増殖が抑制され、癌細胞の運動性が抑制されるので、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明の抗体、あるいは上記タンパク質の発現および／または活性を阻害する物質（例、低分子化合物）を含有する医薬は、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害および／または運動性阻害剤、従って、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療および／または転移抑制剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療および／または転移抑制剤）として使用することができる。尚、本明細書に

おいて「癌細胞」とは、将来的に癌化するように方向づけられている細胞をも含む概念として用いられる。

(1) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体（中和抗体）は、本発明のタンパク質の活性を中和することができるため、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療剤）として使用することができる。本発明において中和とは、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC 活性）、補体依存性細胞傷害活性（CDC 活性）、癌細胞の増殖シグナルの阻害（狭義の中和活性）、アポトーシスの誘導など（これらに限定されない）を包括した概念として定義される。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤、促進剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与することができる。

本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体およびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによ

て調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50
5 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる
10 坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、
15 希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げ
20 られる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

本発明の抗体を含有する上記製剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の乳癌の治療・予防のために使用
25 する場合には、本発明の抗体を 1 回量として、通常 0.01～20mg/kg 体重程度、好ましくは 0.1～10mg/kg 体重程度、さらに好ましくは 0.1～5mg/kg 体重程度を、1 日 1～5 回程度、好ましくは 1 日 1～3 回程度、静脈注射により投与するのが好

都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、
5 経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

10 さらに、本発明の抗体は、他の薬剤、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イフォスファミド等）、代謝拮抗剤（例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、アドリアマイシン等）、植物由来抗癌剤（例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシド、イリノテカンなどと併用しても
15 よい。本発明の抗体および上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。

（２）アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明の遺伝子の転写産物に相補的に結合し、該遺伝子の発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明の遺伝子の機能や作用を抑制し、癌細胞のア
20 ポトーシスを誘導することができるので、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前
25 立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療剤）として使用することができる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤、アポトーシス促進剤、増殖阻害剤などとして使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウ
5 イルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウ
イルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトま
たは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルな
ど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポ
リヌクレオチドは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学
10 的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのよ
うなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として
気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的
に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担体と
15 ともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルー
トなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンス
ポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重 60kg）においては、一日
につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約 0.1～約 100mg 投与する。

20 本発明のタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含むポリヌクレオ
チド（本発明のセンスポリヌクレオチドともいう）および本発明のアンチセンス
ポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明の遺伝子の発現状況を調べるた
めの診断用ヌクレオチドプローブ（もしくはプライマー）として使用することも
できる。

25 (3) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は癌組織で発現が亢進しており、さらに、本発明のタンパ
ク質の発現および／または活性を阻害すると、癌細胞がアポトーシスを起こし、

癌細胞の増殖が抑制され得る。従って、本発明のタンパク質の発現および／または活性を阻害する化合物またはその塩は、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、
5 脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療剤）として使用することができる。

したがって、本発明のタンパク質は、該タンパク質の発現および／または活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする、該タン
10 パク質の発現および／または活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする場合、該スクリーニング方法は、

(a-1) 単離された本発明のタンパク質の活性を、被験物質の存在下と非存在下と
15 で比較する方法と、

(a-2) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における本発明のタンパク質の活性を比較する方法とに大別される。

上記 (a-1) のスクリーニング方法において用いられる本発明のタンパク質は、
20 上記した本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの製造方法を用いて、単離・精製することができる。

上記 (a-2) のスクリーニング方法において用いられる本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、それを生来発現しているヒトもしくは他の温血動物細胞またはそれを含む生体試料（例：血液、組織、臓器等）であれば特に
25 制限はないが、例えば、ヒト乳癌細胞株 MCF7、T47D 等が挙げられる。非ヒト動物由来の血液、組織、臓器等の場合は、それらを生体から単離して培養してもよい

し、あるいは生体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

また、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記の遺伝子工学的手法により作製された各種の形質転換体が例示される。宿主としては、
5 例えば、COS7 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。

被験物質としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これらの物質は新規なものであってもよいし、公知のものであってもよい。

上記(a-1)のスクリーニング方法における本発明のタンパク質の活性の測定は、
10 例えば、(i)本発明のタンパク質、または(ii)本発明のタンパク質および被験物質を、本発明のタンパク質により細胞増殖シグナルが活性化される温血動物細胞と接触させ、該細胞における細胞増殖またはアポトーシス誘導を測定することによって行うことができる。また、上記(a-1)のスクリーニング方法における本発明のタンパク質の活性の測定は、該本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞
15 における細胞増殖またはアポトーシス誘導を測定することによって行うことができる。

アポトーシス（細胞死）誘導を指標とする場合には、細胞を適当な培地または緩衝液に懸濁し、被験物質を添加し（あるいは添加せずに）、さらに酸化ストレス（例： H_2O_2 添加）等の刺激を加えて、通常約 20～約 40℃、好ましくは約 30～
20 約 37℃で約 6～約 72 時間インキュベートした後で、アポトーシス（細胞死）誘導率を測定する。

アポトーシス（細胞死）は、例えば、光学顕微鏡、位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡などを用いた形態学的観察により膜のブレッピング（blebbing）、細胞サイズの縮小化、クロマチン凝縮、DNA断片化等を検出することにより調べることができる。例えば、マルチウェルプレート中で細胞を培養し、プレートから剥離した
25 細胞あるいは膜のブレッピングを生じた細胞を顕微鏡下で計数し、視野中の全細胞に占める死細胞の割合（%）を計算する。数視野で観察を行ってそれらの平均

値を細胞死誘導率とする。また、トリパンプルー、エリスロシンB、ネグロシン、エオシンY、フルオレッセンジアセテート、アクリジンオレンジ、エチジウムブロマイド等の色素を用いて死細胞を染色、顕微鏡下で計数することによっても細胞死誘導率を導出することができる。さらに、DAPI やヘキスト 33342 等の蛍光色素を用いてDNAを染色し、蛍光顕微鏡下でクロマチン凝縮の起こっている細胞を計数することもできる。あるいは、断片化されたDNAの3'末端にターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (TdT) を用いてビオチンや蛍光色素などで標識した d U T P を付加させ (TUNEL 法)、強く染色された細胞数を光学顕微鏡、蛍光顕微鏡などを用いて計数することにより、アポトーシス誘導率を算出することもできる。

また、粒子サイズ測定装置 (例: Coulter multisizer 等) を用いて細胞サイズ分布を測定することにより縮小化・断片化した細胞数を計数し、アポトーシス誘導率を計算することができる。あるいは、フローサイトメトリー (FACS) を用いて細胞サイズの縮小・アポトーシス小体への断片化を検出することにより、生死細胞を分離、細胞死誘導率を算出することもできる。

さらには、常法を用いて細胞から染色体DNAを抽出し、ゲル電気泳動してDNAの断片化の度合をデンストメーターなどを用いて測定することにより、生化学的にアポトーシスを検出することもできる。あるいは、3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) が生細胞によりホルマザンに還元されることを利用して、マイクロプレートリーダーを用いて 570~630nm における吸光度の減少を測定することにより細胞死誘導率を算出することもできる。

例えば、上記(a-1)のスクリーニング方法において、被験物質の存在下における本発明のタンパク質の活性が、被験物質の非存在下における活性に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害された場合に、該被験物質を、本発明のタンパク質の活性阻害物質として選択することができる。

上述のように、本発明のタンパク質の発現を阻害する物質は、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害、従って癌の予防・治療に有効である。

- すなわち、本発明はまた、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞における該タンパク質の発現を、被験物質の存在下と非存在下で比較することを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質、癌の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明のタンパク質の発現量は、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチド（即ち、前記した本発明のタンパク質をコードする塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド（本発明のセンスポリヌクレオチドともいう）、あるいは本発明のアンチセンスポリヌクレオチド）を用いてそのmRNAを検出することにより、転写レベルで測定することもできる。あるいは、該発現量は、前記した本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質を検出することにより、翻訳レベルで測定することもできる。

- 従って、より具体的には、本発明は、

- (b)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における本発明のタンパク質をコードするmRNAの量を、本発明のセンスもしくはアンチセンスポリヌクレオチドを用いて測定、比較することを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質、癌の予防・治療物質のスクリーニング方法、および

(c)本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を被験物質の存在下および非存在下に培養し、両条件下における本発明のタンパク質の量を、本発明の抗体を用いて測定、比較することを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質、癌の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。

- 上記 (b) および (c) のスクリーニング方法において、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記(a-2)のスクリーニング方法において用いられるのと同様のものが好ましく用いられる。

例えば、本発明のタンパク質のmRNA量またはタンパク質量の測定は、具体的には以下のようにして行うことができる。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、トリなど）に対して、薬剤（例えば、
- 5 TNF- α 、IL-1、Fas、抗癌剤など）あるいは物理化学的ストレス（例えば、UV、活性酸素、虚血など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、あるいは臓器から単離した組織または細胞を得る。

- 得られた細胞に含まれる本発明のタンパク質のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、RT-PCRなどの手法を用いること
- 10 により定量することができ、あるいは自体公知のノーザンブロット解析により定量することもできる。一方、本発明のタンパク質量は、ウェスタンブロット解析や以下に詳述する各種イムノアッセイ法を用いて定量することができる。

- (ii) 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入した形質転換体
- 15 を上記の方法に従って作製し、該形質転換体に含まれる本発明のタンパク質またはそれをコードするmRNAを、上記(i)と同様にして定量、解析することができる。

本発明のタンパク質の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト温血動物に対して、薬剤あるいは物理化学的
- 20 ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理化学的ストレスと同時に被験物質を投与し、投与から一定時間が経過した後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好まし
- 25 くは1時間後～24時間後）、該動物から単離した細胞に含まれる本発明のタンパク質をコードするmRNA量、または本発明のタンパク質の量を定量、解析することにより、あるいは

(ii) 形質転換体を常法に従って培養する際に被験物質を培地中に添加し、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のタンパク質のmRNA量または本発明のタンパク質の量を定量、解析することにより行うことができる。

- 5 被験物質としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

上記(c)のスクリーニング方法における本発明のタンパク質の量の測定は、具体的には、例えば、

- 10 (i) 本発明の抗体と、試料液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質を検出することにより試料液中の本発明のタンパク質を定量する方法や、

(ii) 試料液と、担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された別の本発明の抗体とを、同時あるいは連続的に反応させた後、不溶化担体上の標識剤の量

- 15 (活性)を測定することにより、試料液中の本発明のタンパク質を定量する方法等が挙げられる。

上記(ii)の定量法においては、2種の抗体は本発明のタンパク質の異なる部分を認識するものであることが望ましい。例えば、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体として本発明のタンパク質の

20 C端部と反応するものを用いることができる。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素
- 25 酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ル

ミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン（ストレプト）アビジン系を用いることもできる。

試料液としては、本発明のタンパク質が細胞内に局在する場合は、細胞を適当な緩衝液に懸濁した後、超音波処理または凍結融解などによって細胞を破壊して得られる細胞破碎液が、本発明のタンパク質が細胞外に分泌される場合には、細胞培養上清がそれぞれ用いられる。必要に応じて、破碎液や培養上清から本発明のタンパク質を分離・精製した後に定量を行ってもよい。また、標識剤の検出が可能である限り、無傷細胞を試料として用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、試料液中の抗原量に対応した、抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。感度、特異性の点で、例えば、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化・固定化するのに用いられる化学結合を用いてもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明の抗体に試料液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明の抗体を反応させ（２次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の量もしくは活性を測定することにより、試料液中の本発明のタンパク質を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし、時間をずらして行ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による

免疫測定法において、固相化抗体あるいは標識化抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

5 本発明の抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどにも用いることができる。

競合法では、試料液中の本発明のタンパク質と標識した本発明のタンパク質とを抗体に対して競合的に反応させた後、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定することにより、試料液中の本発明のタンパク質を定量する。本反応法には、抗体
10 として可溶性抗体を用い、ポリエチレングリコールや前記抗体(1次抗体)に対する2次抗体などを用いてB/F分離を行う液相法、および、1次抗体として固相化抗体を用いるか(直接法)、あるいは1次抗体は可溶性のものを用い、2次抗体として固相化抗体を用いる(間接法)固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、試料液中の本発明のタンパク質と固相化した本発明
15 のタンパク質とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは試料液中の本発明のタンパク質と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化した本発明のタンパク質を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させた後、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し試料液中の抗原量を定量する。

20 また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。試料液中の本発明のタンパク質の量がわずかであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特
25 別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築

すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、
10 同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

15 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、細胞における本発明のタンパク質の生産量を感度よく定量することができる。

例えば、上記 (b) および (c) のスクリーニング法において、被験物質の存在下における本発明のタンパク質の発現量 (mRNA量またはタンパク質量) が、被験物質の非存在下における場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、
20 より好ましくは約50%以上阻害された場合、該被験物質を、本発明のタンパク質の発現阻害物質として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、単に本発明のタンパク質ともいう）を含有する。本発明のタンパク質は上述のいずれかの方法を用いて、単離・精製されたものであってもよいし、
25 あるいは上述のように、それを産生する細胞（温血動物細胞）の形態で提供されてもよい。

本発明のスクリーニングキットは、上記本発明のタンパク質を産生する細胞における該タンパク質の発現量を測定するために、上述の本発明の抗体、あるいは本発明のセンスもしくはアンチセンスポリヌクレオチドをさらに含有することもできる。

- 5 該スクリーニングキットは、上記に加えて、任意で、反応緩衝液、ブロッキング液、洗浄用緩衝液、標識試薬、標識検出試薬などを含むことができる。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる、本発明のタンパク質の発現および／または活性阻害物質（遊離体であっても塩の形態であってもよい）は、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤、
10 癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の治療・予防剤（好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌などの予防・治療剤）として、低毒性で安全な医薬として有用である。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる
15 化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

- 例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられ
20 る。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

- 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、
25 注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油

性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の発現および／または活性阻害物質を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1～約 100mg、好ましくは約 1.0～約 50mg、より好ましくは約 1.0～約 20mg 投与する。非経口的に投

与する場合は、該阻害物質の1回投与量は、投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の発現および／または活性阻害物質を注射剤の形で通常成人（体重 60kg として）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約 0.01～約 30mg、好ましくは約 0.1～約 20mg、
5 より好ましくは約 0.1～約 10mg を癌病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（４）癌の診断剤

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被験液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。したがって、
10 上述の本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の発現阻害物質のスクリーニング方法において、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の代わりに、被験温血動物から採取した生体試料（例、血液、血漿、尿、生検など）を用いてイムノアッセイを実施することにより、該動物体内における本発明のタンパク質の発現の度合を調べることができ、ひいては癌の診断に用いることができる。イ
15 ムノアッセイの結果、該試料中の本発明のタンパク質の増加が検出された場合は、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）を発症しているか、あるいは将来発症する可能性が高いと診断することができる。

20 同様に、前記した本発明のセンスもしくはアンチセンスポリヌクレオチドは、プローブもしくはプライマーとして使用することにより、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど）における本発明のタンパク質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することがで
25 きるので、例えば、該DNAの増幅やmRNAの発現過多などの遺伝子診断剤、特に癌の診断剤として有用である。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドもしくは対応するアンチセンスポリヌクレオチドは、プローブもしくはプ

ライマーとして必要な長さ（例えば、約 15 塩基以上）を有する限り特に制限されない。

本発明のセンスもしくはアンチセンスポリヌクレオチドを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーション、定量的 RT-PCR、
5 PCR-SSCP 法、アレル特異的 PCR、PCR-SSOP 法、DGGE 法、RNase プロテクション法、PCR-RFLP 法などにより実施することができる。

例えば、被験温血動物の細胞から抽出した RNA 画分についてのノーザンハイブリダイゼーションや定量的 RT-PCR の結果、本発明のタンパク質の発現増加が検出された場合、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、
10 胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）を発症しているか、あるいは将来発症する可能性が高いと診断することができる。

（５）本発明のタンパク質を含有する医薬

本発明のタンパク質は癌で過剰に発現していることから、癌患者の免疫系を活性化するために本発明のタンパク質を癌ワクチンとして用いることもできる。
15

例えば、強力な抗原提示細胞（例、樹状細胞）を本発明のタンパク質存在下に培養し、該タンパク質を貪食させた後に、再び患者の体内に戻す、所謂養子免疫療法などを好ましく適用し得る。体内に戻された樹状細胞は癌抗原特異的な細胞障害性 T 細胞を誘導、活性化することにより癌細胞を死滅させることが可能である。
20

また、本発明のタンパク質は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防または治療のためのワクチン製剤として、安全に、哺乳動物（例、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、
25 ブタ）に投与することもできる。

該ワクチン製剤は、通常、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる担体を含有する。担体としては例えば、水、食塩水（生理食塩水を含む）、緩衝

液（例、リン酸緩衝液）、アルコール（例、エタノール）などの液体の担体がある。液（例、リン酸緩衝液）、アルコール（例、エタノール）などの液体の担体がある。

ワクチン製剤は、通常のワクチン製剤の製造方法に従って調製することができる。

- 5 通常、本発明のタンパク質は、生理学的に許容されうる担体に溶解または懸濁される。また、本発明のタンパク質と生理学的に許容されうる担体とを別々に調製し、用時それらを混合して用いてもよい。

ワクチン製剤には、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる担体に加え、アジュバント（例、水酸化アルミニウムゲル、血清アルブミンなど）、防腐剤（例、チメロサルなど）、無痛化剤（例、ブドウ糖、ベンジルアルコールなど）などを配合させてもよい。また、本発明のタンパク質に対する抗体産生を促進させるために、例えばサイトカイン（例、インターロイキン-2などのインターロイキン類、インターフェロン- γ などのインターフェロン類など）をさらに配合させてもよい。

- 15 ワクチン製剤として用いる際、本発明のタンパク質は活性体として用いてもよいが、抗原性を高めるために該タンパク質を変性させてもよい。本発明のタンパク質の変性は、通常、加熱処理、タンパク質変性剤（例、ホルマリン、塩酸グアニジン、尿素）による処理により行われる。

得られたワクチン製剤は低毒性であり、通常注射剤として、例えば皮下、皮内、筋肉内に投与してもよく、また癌細胞塊またはその近傍に局所的に投与してもよい。

本発明のタンパク質の投与量は、例えば対象疾患、投与対象、投与ルートなどによって異なるが、例えば本発明のタンパク質を癌に罹患した成人（体重 60kg）に皮下的に注射剤として投与する場合、1 回当たり通常 0.1~300mg 程度、好ましくは 100~300mg 程度である。ワクチン製剤の投与回数は 1 回でもよいが、抗体産生量を高めるために、約 2 週間~約 6 ヶ月の間隔をあけて、該ワクチン製剤を 2~4 回投与することもできる。

(6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

5 すなわち、本発明は、

(1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、

(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および

(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において

10 発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般
15 に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用すること
20 ともでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作製の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、
25

B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など) またはラット(例えば、Wistar、SDなど) などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

- 5 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 10 該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

- 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA
15 Aコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物(例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど)由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNA
20 Aを結合したDNAコンストラクト(例、ベクターなど)を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

- 本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファ
25 ージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由

来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス(例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど) に由来するDNAのプロモーター、

5 (ii) 各種哺乳動物(ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲン

10 I型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ(一般にTie2と略される)、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素(Na, K-ATPase)、ニ

15 ューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原(H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)、ペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、

20 免疫グロブリン、H鎖可変部(VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α)のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターな

25 どが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列(一般にターミネーターと呼ばれる)を有していることが

好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などを
5 プロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝
10 臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変
15 異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽
20 細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

25 本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

10 本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の
15 解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および
25

体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 25 (i) 組織培養のための細胞源としての使用、
- (ii) 本発明のDNA転移動物の組織中DNAもしくはRNAを直接分析するか、または

DNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

(iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

5 (iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質の単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行うことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行うために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

25 (7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- 5 (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺
- 10 伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発
- 15 現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性

20 を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的

25 手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行うことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み

取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufma の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかでないES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用

いう。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で
5 有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖
10 系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行うことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要して
15 いたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行うことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の
20 100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例え
25 ば、STO線維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、

継代時には、例えば、トリプシン／EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン／0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン／1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行うが、この際に細胞
5 の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans 及び M. H. Kaufman,
10 Nature、第 292 巻、154 頁、1981 年；G. R. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第 78 巻、7634 頁、1981 年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年〕、本発明の ES 細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

15 本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明の DNA と入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明の DNA を
20 ノックアウトさせることができる。

25 本発明の DNA がノックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用した

マウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同士を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の

雌雄を交配することにより、該不活性化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- 5 また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- 10 (8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 15 すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 20 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 25 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

- 5 例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

- 15 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 20 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。
- 25

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60kg として）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約 0.1～約 100mg、好ましくは約 1.0～約 50mg、より好ましくは約 1.0～約 20mg 投与する。非経口的に投与
10 する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重 60kg として）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～約 30mg、好ましくは約 0.1～約 20mg、より好ましくは約 0.1～約 10mg を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

15 （8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方
20 法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられ
25 る。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

5 本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

10
15
20

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭

25

化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 5 本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤として有用である。

- 10 さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 15 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60kg として）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約 0.1～約 100mg、好ましくは約 1.0～約 50mg、より好ましくは約 1.0～約 20mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重
20 60kg として）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～約 30mg、
25 好ましくは約 0.1～約 20mg、より好ましくは約 0.1～約 10mg を静脈注射により投

与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明の DNA 発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有する DNA を使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作製すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
20	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
25	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸

	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
5	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
10	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
15	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
20	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
25	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸

S e c : セレノシステイン (selenocysteine)

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	M e	: メチル基
5	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
10	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l ₂ -Bz l	: 2,6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
15	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル
	T r t	: トリチル
20	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾ トリアジン
25	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
	D C C	: N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

LY6G6D をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

LY6G6D のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：3〕

PTPRO をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

PTPRO のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

10 TM4SF17a をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

TM4SF17a のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

TM4SF17b をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：8〕

TM4SF17b のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

TM4SF17c をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

20 TM4SF17c のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

TM4SF17d をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

TM4SF17d のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：13〕

TM4SF17e をコードするDNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

TM4SF17e のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

TM4SF17f をコードする DNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

5 TM4SF17f のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

TM4SF17h をコードする DNA (CDS) の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

TM4SF17h のアミノ酸配列を示す。

10 〔配列番号：19〕

配列番号20と共に siRNA-1 を形成する RNA 配列を示す。

〔配列番号：20〕

配列番号19と共に siRNA-1 を形成する RNA 配列を示す。

〔配列番号：21〕

15 配列番号22と共に siRNA-2 を形成する RNA 配列を示す。

〔配列番号：22〕

配列番号21と共に siRNA-2 を形成する RNA 配列を示す。

〔配列番号：23〕

配列番号24と共に siRNA-3 を形成する RNA 配列を示す。

20 〔配列番号：24〕

配列番号23と共に siRNA-3 を形成する RNA 配列を示す。

〔配列番号：25〕

プライマーLY-HindATG の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

25 プライマーLY-TAGXba の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

プライマーLY-CoKoATG の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

プライマーLY-OrKoATGの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

プライマーLY-TAGXbaの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：30〕

プライマーDESNHE-Fの塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

プライマーDESNHE-Rの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

10 合成DNA His-FNdeBamの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

合成DNA His-RNdeBamの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

LY6G-FNDEの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：35〕

LY6G-RNHEの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

合成DNA HAT-Fの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

20 合成DNA HAT-Rの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

siRNA1の塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

siRNA2の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：40〕

プライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

プライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 2〕

プライマー 3 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 3〕

5 プライマー 4 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 4〕

プライマー 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 5〕

プライマー 6 の塩基配列を示す。

10 〔配列番号： 4 6〕

プライマー 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 7〕

プライマー 8 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 8〕

15 プライマー 9 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 4 9〕

プライマー 10 の塩基配列を示す。

〔配列番号： 5 0〕

プライマー 11 の塩基配列を示す。

20 〔配列番号： 5 1〕

プライマー 12 の塩基配列を示す。

実施例

以下において、実施例および参考例により本発明をより具体的に示すが、この

25 発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与によるヒト大腸癌細胞株の細胞増殖抑制

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌細胞株 SW480 を、トリプシン-E D T A (Invitrogen 社) で組織培養ディッシュから剥がし、Nucleofector Kit T for Cell Line (Amaxa 社) の添付プロトコールに従い、トランスフェクションした。

具体的には、LY6G6D 遺伝子の mRNA を切断する活性を持つ siRNA-1 を配列番号 19 と配列番号 20 の RNA 断片をハイブリダイズさせることにより作製した。同様の方法で、siRNA-2 を配列番号 21 と配列番号 22 の RNA 断片を用い、siRNA-3 を配列番号 23 と配列番号 24 の RNA 断片を用いて作製した。上記の RNA 断片は 3'末端を 2'-デオキシチミジンで 2 塩基付与したものを使用した。作製した 3 種の siRNA を等量ずつ混和しトランスフェクションに供した(以下、siRNA-C と略する)。コントロールとしては、細胞に対し非特異的な RNAi 効果を示さないことが保証されている siRNA (B-Bridge 社、以下 non-silencing dsRNA と略する) を用いた。100 万個の細胞を T 溶液 (Amaxa 社) 100 μ l で懸濁し、40pmol の LY6G6D 遺伝子に対する siRNA または 40pmol の non-silencing dsRNA を添加し、Nucleofector (Amaxa 社) T-20 プログラムで siRNA をトランスフェクションした。細胞を 10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) [培養培地] で洗浄した後、培養培地中、37°C で、24 時間培養した。培養後、細胞を回収し、1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレートに播種し、培養培地中で、さらに 5 日間培養した。細胞培養液に Cell Counting Kit-8 試薬 (DOJINDO 社) を 1 ウェル当たり 10 μ L 添加し、さらに 3 時間培養した。反応後の培養液を 620nm の吸光度を参照波長にとり、450nm の吸光度を計測することにより、ミトコンドリア呼吸活性を測定した。その結果、LY6G6D 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて約 23% 発光強度が低下し、統計学的に有意な差 ($P < 0.001$) を示した (図 2 A)。

実施例 2

LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与による LY6G6D 遺伝子の mRNA 発現量低下

- 実施例 1 のトランスフェクション 24 時間後に回収した細胞を RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。約 400ng のトータル RNA を鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。LY6G6D 遺伝子の発現量の測定はトータル RNA にして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 10 μ L、LY6G6D 遺伝子の第 2 エクソンの一部と第 3 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) 1 μ L を加え、反応液量 20 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C・2 分、95°C・10 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin Control Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。
- LY6G6D 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与群に比して LY6G6D の mRNA 発現量は 53% 低下していた。これらの結果より、LY6G6D 遺伝子の発現量の低下によりヒト大腸癌細胞株 SW480 の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された (図 2 B)。

20 実施例 3

PTPRO 遺伝子の siRNA 投与によるヒト肺癌細胞株の細胞増殖抑制

- アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌由来細胞株 HT-29 を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、5% 炭酸ガス気流中、37°C で 4 日間培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、PTPRO 遺伝子の mRNA を切断する活性を持つ 3 種の siRNA (B-Bridge 社) を混和し、トランスフェクションに供した。コントロールとしては、実施例 1

で使用した non-silencing dsRNA を用いた。230pmol の PTPRO 遺伝子に対する siRNA、または 230pmol の non-silencing dsRNA を含む 3 μ L の溶液を、HT-29 細胞 100 万個を懸濁した Nucleofector Solution R (Amaxa biosystems 社) 100 μ L と混合した後、Nucleofector program W-017 によりトランスフェクションした。この混合液を HT-29 細胞培養液 4mL に全量添加し、24 時間培養した後、細胞を回収した。回収した細胞を 1 ウェル当たり 5 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレートに播種し、HT-29 細胞培養液中で、5%炭酸ガス気流中、37°C で、さらに 2 日間培養した。Cell-Counting Kit-8 溶液 (和光純薬) を 1 ウェルあたり 10 μ L 添加し、5%炭酸ガス気流中、37°C で、さらに 2 時間放置した後、450nm の吸光度を計測することにより、細胞数を測定した。その結果、PTPRO 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて約 20% 吸光度が低下し、統計学的に有意な差 ($P < 0.001$) を示した。

実施例 4

15 PTPRO 遺伝子の siRNA 投与による PTPRO 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 3 で用いたヒト大腸癌由来細胞株 HT-29 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、5%炭酸ガス気流中、37°C で 4 日間培養した後、siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続した後に RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。400ng のトータル RNA を鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。PTPRO 遺伝子の発現量の測定はトータル RNA にして 40ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 10 μ L、PTPRO 遺伝子の第 15 エクソンの一部と第 16 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 1 μ L を加え、反応液量 20 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C · 2 分、95°C · 10 分の後、95°C · 15 秒、

60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。一方、同量の鋳型cDNA中に含まれるβ-アクチン遺伝子発現量をTaqMan β-actin Control Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。

PTPRO 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与群に比して PTPRO の mRNA 発現量は 70% 低下していた。これらの結果より、PTPRO 遺伝子の発現量の低下によりヒト大腸癌由来細胞株 HT-29 の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された。

実施例 5

10 TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与によるヒト乳癌細胞株の細胞増殖抑制

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37℃で一晩培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子および TM4SF17c 遺伝子全ての mRNA を切断する活性を持つ 3 種の siRNA を混和し、トランスフェクションに供した。コントロールとしては、実施例 1 で使用した non-silencing dsRNA を用いた。4pmol の TM4SF17 遺伝子に対する siRNA、または 4pmol の non-silencing dsRNA を Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μL に添加し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.2 μL を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μL と混合した後、室温で 20 分間放置した。上記混合液を MDA-MB-231 細胞培養液に全量添加し、更に 24 時間培養を継続した後、培地を交換した。これらの細胞を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) 中で、37℃で、さらに 3 日間培養した。培地を除去後、プレートを -80℃で 30 分間以上静置し、室温で 5 分間放置した。0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェル

あたり 200 μ L 添加し、15 分間放置した後、励起波長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて約 23% 蛍光強度が低下し、統計学的に有意な差 ($P < 0.05$) を示した。

5

実施例 6

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与による TM4SF17 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 5 で用いたヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を Leibovitz' s L-15 培地に懸濁し、1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37°C で一晚培養した後、実施例 5 の方法に準じて siRNA を
10 トランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続した後、RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。約 100ng のトータル RNA を鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応
15 した。TM4SF17 遺伝子の発現量の測定はトータル RNA にして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、TM4SF17 遺伝子の第 1 エクソンの一部と第 2 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。
20 PCR 反応は、50°C · 2 分、95°C · 10 分の後、95°C · 15 秒、60°C · 1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin forward primer、reverse primer、probe (いずれも Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与
25 群に比して TM4SF17 の mRNA 発現量は 91% 低下した。これらの結果より、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子もしくは TM4SF17c 遺伝子の発現量の低下によりヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された。

実施例 7

癌における LY6G6D 遺伝子の発現亢進

癌患者より摘出した癌組織由来 mRNA、および周辺正常組織由来 mRNA を用い、
5 ハイブリダイゼーション法を行うことにより、遺伝子発現プロファイルを作製した。遺伝子発現プロファイル解析の結果、当該遺伝子が癌組織において高発現していることが見出された。特に結腸直腸癌において、周辺正常組織に対する顕著な発現亢進が観察された (図 1)。

10 実施例 8

ヒト大腸癌培養細胞株における LY6G6D 遺伝子発現量の検討

以下で使用されるヒト大腸癌細胞株 WiDr、COLO 320DM、DLD-1、COLO 205、COLO 201、HCT-15、SW 620、SW 480、LoVo、SW 1116、SW 837、SW 948、HCT-8、HCT 116、LS 123、LS 174T、SNU-C1、Caco-2 および HT-29 の 19 株は、ATCC より購入した。

15 上記記載の細胞株 19 株より RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を調製した。このトータル RNA を鋳型として TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) の添付プロトコールに従い、ランダムプライマーを用いた逆転写反応で cDNA を調製した。この cDNA を鋳型として定量的 PCR 反応を行うことにより、LY6G6D 遺伝子の発現量の検討を行った。

20 該反応は上記トータル RNA 4 ng より得られた cDNA を鋳型として使用し、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、LY6G6D 遺伝子の第 2 エクソンの一部と第 3 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C・2 分、
25 95°C・10 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin Control Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。そ

の結果、ヒト大腸癌細胞株における LY6G6D 遺伝子発現量は WiDr、COLO 205、LoVo、SW 837、HCT 116、LS123、LS 174T、Caco-2 および HT-29 の 9 株が検出限界以下であったが、COLO 320DM、DLD-1、COLO 201、HCT-15、SW 680、SW 480、SW 1116、SW 948、HCT-8、および SNU-C1 の 10 株で発現が認められた。そして、LY6G6D 遺伝子発現量が β -アクチン遺伝子発現量の約 1% と高発現している COLO 320DM が見出された。

実施例 9

ヒト正常組織およびヒト癌細胞株における LY6G6D 遺伝子発現量の検討

Human Marathon-Ready cDNA (Clontech 社) を用いてヒト正常組織およびヒト癌細胞株における LY6G6D 遺伝子発現量を検討した。ヒト正常組織として Adrenal Gland、Bone Marrow、Brain(whole)、Brain(cerebellum)、Brain(cerebral cortex)、Brain(hippocampus)、Brain(hypothalamus)、Colon、Heart、Kidney、Leukocyte、Liver、Lung、Lymph Node、Mammary Gland、Ovary、Pancreas、Pituitary Gland、Placenta、Prostate、Skeletal Muscle、Small Intestine、Spleen、Testis、Thymus、Thyroid Gland、Uterus、Fetal Brain、Fetal Kidney および Fetal Liver を用いた。ヒト癌細胞株として Melanoma (G361)、Lung Carcinoma (A549)、Burkitt's Lymphoma (Daudi)、Lymphoblastic Leukemia (MOLT-4)、Promyelocytic Leukemia (HL-60)、Prostatic adenocarcinoma (PC-3) および Colorectal adenocarcinoma (SW480) を用いた。上記の cDNA 1.5ng を鋳型とし、LY6G6D 遺伝子発現量および内部標準として β -アクチン遺伝子発現量を実施例 8 に記載した方法に従い定量的 PCR 法により計測した。その結果、 β -アクチン遺伝子発現量に対する LY6G6D 遺伝子発現量は、ヒト癌細胞株 Colorectal adenocarcinoma (SW480) で 0.58% と高かった。一方、ヒト正常組織では Testis の 0.45% や Prostate の 0.15% を除いてほとんどが 0.1% を下回るか検出限界以下であった。

これらの結果より、LY6G6D 遺伝子はヒト正常組織ではほとんど発現が認められないことが示された。

実施例 10

LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与によるヒト大腸癌細胞株 COLO320 DM の細胞増殖抑制

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌細胞株

- 5 細胞株 COLO 320DM を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 1 千 6 百個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD Falcon 社) に播種すると同時に、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、実施例 1 で作製した LY6G6D 遺伝子の mRNA を切断する活性を持つ siRNA-2 をトランスフェクションに供した。コントロールとしては、実施例 1 で

- 10 使用した non-silencing dsRNA を用いた。2pmol の LY6G6D 遺伝子に対する siRNA または 2pmol の non-silencing dsRNA を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.12 μ L を添加した Opti-MEM I

(Invitrogen 社) 10 μ L を混合し、この混合液を 96 穴平底組織培養プレートの 1 ウェルに全量添加し、室温で 20 分間放置した。次に、96 穴平底組織培養プレートに

- 15 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) で懸濁した細胞を 1 ウェル当たり 1 千 6 百個の細胞密度で播種し、5%炭酸ガス気流中、37°C で、一晚培養した。トランスフェクション 1 日後、培地を交換し、さらに、3 日間培養した後、CellTiter-Glo 試薬 (Promega 社) を 1 ウェル当たり 100 μ L 添加し、遮光下で、30 分間攪拌し、発光強度を計測することにより、細胞内 ATP 含量を測定した。

- 20 その結果、LY6G6D 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて約 29% 発光強度が低下し、統計学的に有意な差 ($P < 0.05$) を示した (図 3 A)。

実施例 11

- 25 LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与によるヒト大腸癌細胞株 COLO320 DM の mRNA 発現量低下

実施例 10 のトランスフェクション 1 日後に回収した細胞を RNeasy Micro

Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータルRNAを抽出した。トータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。LY6G6D 遺伝子発現量および内部標準として β -アクチン遺伝子発現量の測定は、トータルRNAを逆転写したcDNAを鋳型とし、実施例8に記載した方法に従い定量的PCR法により計測した。その結果、LY6G6D 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与群に比してLY6G6D の mRNA 発現量は77%低下していた (図3B)。これらの結果より、LY6G6D 遺伝子発現量の低下によりヒト大腸癌細胞株 COLO 320DM の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された。

10

実施例 1 2

LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与によるヒト大腸癌細胞株 HCT116 におけるオフターゲット効果と導入効率の確認

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入した LY6G6D 遺伝子を発現しないヒト大腸癌細胞株 HCT116 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 1 千 6 百個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD Falcon 社) に播種すると同時に、siRNA をトランスフェクションした。並行して GAPDH 遺伝子に対する siRNA をトランスフェクションし、GAPDH 遺伝子量の低下により導入効率の確認を行った。

15

具体的には、実施例1で作製した LY6G6D 遺伝子の mRNA を切断する活性を持つ siRNA-2 をトランスフェクションに供した。コントロールとしては、実施例1で使用した non-silencing dsRNA を用いた。導入効率の確認用として GAPDH 遺伝子に対する siRNA を用いた。2pmol の LY6G6D 遺伝子に対する siRNA、non-silencing dsRNA または GAPDH 遺伝子に対する siRNA を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.08 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L を混合し、この混合液を 96 穴平底組織培養プレートの 1 ウェルに全量添加し、室温で 20 分間放置した。次に、96 穴

20

25

平底組織培養プレートに 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) で懸濁した細胞を 1 ウェル当たり 1 千 6 百個の細胞密度で播種し、5%炭酸ガス気流中、37℃で、一晚培養した。トランスフェクション 1 日後、培地を交換し、さらに 3 日間培養した細胞を PBS で洗浄し、-80℃で 30 分間以上

- 5 静置させ、室温で 5 分間放置した後、0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェル当たり 200 μ L 添加し、15 分間攪拌させた。励起波長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、LY6G6D 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて蛍光強度は 104%と差がなかった (図 4 A)。

- 一方、トランスフェクション 1 日後に回収した細胞を、実施例 10 の方法に準じてトータル RNA を抽出および逆転写反応させた。GAPDH 遺伝子の発現量の測定はトータル RNA を逆転写した cDNA を鋳型とし、GAPDH 遺伝子発現量を Human GAPD (Applied Biosystems 社) を用い、内部標準として β -アクチン遺伝子発現量を実施例 8 と同様の定量的 PCR 法により計測した。その結果、GAPDH 遺伝子に対する siRNA 投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて GAPDH 遺伝子発現量が 84%低下しており、本実験における siRNA 導入効率は良好であった (図 4 B)。

- 上記の結果で、LY6G6D 遺伝子に対する siRNA が LY6G6D 遺伝子を発現しない細胞において増殖抑制を誘発しなかったことから、実施例 11 で記載した LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与による細胞増殖抑制の誘発作用がオフターゲット効果によるものでないことが示された。

実施例 13

- 25 組換え型完全長 LY6G6D タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

ヒト大腸癌細胞株 SW480 由来の Marathon-Ready cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、LY-HindATG : 5' -AAGCTTATGA AACCCAGTT TGTG-3' (配列番号 : 25) と

LY-TAGXba : 5' -TCTAGACTAT CCGCTCCACA GTCC-3' (配列番号 : 26) のプライマーを用いて PCR 反応を行った。該反応液 20 μ l は、0.5 μ L の上記 cDNA、1U LA Taq DNA Polymerase (Takara Bio 社)、各 0.5 μ M の上記プライマー、400 μ M dNTPs、および 10 μ l 2x GC Buffer I (Takara Bio 社) を含む組成とした。PCR 反応は、
5 94°C・1 分の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・2 分を 35 サイクル繰り返し、さらに 72°C・7 分間伸長反応を行った。得られた PCR 反応産物は、PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。これを TOPO TA PCR クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミドベクター pCR4-TOPO (Invitrogen 社) へサブクローニングし、プラスミド LY6G6D/pCR4-TOPO を得た。塩基配列を解析した結果、配列番号 : 1 で表される cDNA の塩基配列を有していた。
10

上記で得たプラスミド LY6G6D/pCR4-TOPO を制限酵素 HindIII および XbaI にて処理した。pcDNA3.1(+) (Invitrogen 社) も制限酵素 HindIII および XbaI にて処理した。これらをアガロースゲル電気泳動で分離後、LY6G6D をコードする塩基配列を含む DNA 断片と pcDNA3.1(+) に相当する DNA 断片をそれぞれ回収し、Gel
15 Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。それぞれの DNA 断片を DNA Ligation Kit ver.2 (Takara Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 TOP10 に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択し、LY6G6D タンパク質をコードする cDNA 配列を有するプラスミド LY6G6D/pcDNA3.1(+) を得た。

上記で得たプラスミド LY6G6D/pcDNA3.1(+) を鋳型とし、コザック配列を含む
20 LY-CoKoATG : 5' -GCCACCATGA AACCCAGTT TGTTG-3' (配列番号 : 27) あるいは LY-OrKoATG : 5' -ACTGCGATGA AACCCAGTT TGTTG-3' (配列番号 : 28) と LY-TAGXba : 5' -TCTAGACTAT CCGCTCCACA GTCC-3' (配列番号 : 29) のプライマーを用いて PCR 反応を行った。該反応液 50 μ L は、1.63ng の上記 cDNA、1U Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen 社)、各 0.3 μ M の上記プライマー、
25 300 μ M dNTPs、および 1mM 硫酸マグネシウムを含む組成とした。PCR 反応は、95°C・2 分の後、94°C・15 秒、55°C・30 秒、68°C・1 分を 25 サイクル繰り返した。PCR 反応産物の 3' 端に dATP を付加するため、5U の Ex Taq DNA Polymerase (Takara

Bio 社) を添加して 72°C・7 分間保温した。得られた PCR 反応産物は、PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。これを TOPO TA PCR クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミドベクター pCR4-TOPO (Invitrogen 社) へサブクローニングし、プラスミド CoLY6G6D/pCR4-TOPO およ
5 び OrLY6G6D/pCR4-TOPO を得た。

上記で得たプラスミド CoLY6G6D/pCR4-TOPO および OrLY6G6D/pCR4-TOPO を制限酵素 S_{pe}I および X_{ba}I にて処理した。pcDNA3.1(+) (Invitrogen 社) も制限酵素 S_{pe}I および X_{ba}I にて処理した。これらをアガロースゲル電気泳動で分離後、LY6G6D をコードする塩基配列を含む DNA 断片と pcDNA3.1(+) に相当する DNA 断片をそれぞれ
10 回収し、Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。それぞれの DNA 断片を DNA Ligation Kit ver.2 (Takara Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 TOP10 に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択し、LY6G6D タンパク質をコードする cDNA 配列を有するプラスミド CoLY6G6D/pcDNA3.1(+) およ
15 び OrLY6G6D/pcDNA3.1(+) を得た。

実施例 14

組換え型ポリヒスチジンタグ付き分泌型 LY6G6D タンパク質の大腸菌用発現ベクターの構築

LY6G6D-His 発現用プラスミドの作製にあたり、先ず目的遺伝子の N 末端と C 末端のどちらにも 6×His-tag 配列を付加させることのできるタグ付きの発現用ベ
20 クターを作製した。すなわち、大腸菌発現用ベクター pET-3a (MERCK 社) の 229bp に存在する Nhe I 制限酵素切断サイトがなくなるように、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社) のプロトコールに従って、
DESNHE-F : 5' -CCAGTCACTA TGGCGTGCTC CTAGCGCTAT ATGCG-3' (配列番号 : 30)
25 と DESNHE-R : 5' -CGCATATAGC GCTAGGAGCA CGCCATAGTG ACTGG-3' (配列番号 : 31) をプライマーとして pET-3a を鋳型に PCR 反応を行って、変異を導入した pET3a-desNhe を作製した。次に pET-3a の制限酵素サイト Nde I と BamH I の間に、

開始コドン+6×His配列+Nhe I 制限酵素切断サイト+6×His配列+終始コドンとなるように、合成 DNA His-FNdeBam : 5' -TATGCATCATC ATCATCATC ACGCTAGCCA TCATCATCAT CATCACTGAG-3' (配列番号 : 3 2) と His-RNdeBam : 5' -GATCCTCAGT GATGATGATG ATGATGGCTA GCGTGATGAT GATGATGATG CA-3' (配列番号 : 3 3) を作製し、それぞれを 10mM になるように TE で希釈後、等量を混合し、95℃・10min 加熱後徐冷してアニーリングを行った。上記で得られた pET3a-desNhe を制限酵素 Nde I と BamH I (Takara Bio 社) で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いてゲルより抽出した。この制限酵素処理した発現用ベクターとアニーリング溶液を混合し Ligation High (TOYOBO 社) で連結させて、6×His-tag を付加した大腸菌発現用ベクター pET3-HH を作製した。

次に、C 末端 6×His-tag 付加用として LY6G6D 遺伝子の 5' 末端側に Nde I と 3' 末端側に Nhe I の制限酵素切断サイトを付加するようなプライマーを用い PCR 反応を行い、上記で作製した pET3-HH に挿入することにより LY6G6D-His 発現用ベクターを作製した。すなわち、LY6G-FNDE : 5' -CATATGAACC GAATGCGGTG CTACAA-3' (配列番号 : 3 4) と LY6G-RNHE : 5' -GCTAGCGTTG CACAGGTCTC CCAGGT-3' (配列番号 : 3 5) を用い、実施例 1 3 で得たプラスミド LY6G6D/pCR4-TOPO を鋳型に Pyrobest DNA Polymerase (Takara Bio 社) を使用して、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) で 98℃・10 sec、60℃・10 sec、72℃・30 sec の PCR 反応を 35 回行った。得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動により分離し、約 200bp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit で回収後、pCR4blunt-TOPO (Invitrogen 社) にクローニングして pCR4/LY6G6D を得た。塩基配列を確認後、pCR4/LY6G6D 及び発現用ベクター pET3-HH を制限酵素 Nde I と Nhe I (Takara Bio 社) とで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い QIAquick Gel Extraction Kit で DNA 断片と発現用ベクターを回収し、制限酵素 Nde I と Nhe I で処理した DNA 断片と発現用ベクターを Ligation High で連結させ、C 末端に 6×His-tag を付加させた LY6G6D 発現用ベクター pET3/ LY6G6D-His を作製した。

組換え型LY6G6D-Hisタンパク質の調製は、上記で作製したpET3/ LY6G6D-HisプラスミドをBL21-Gold(DE3)コンピテントセル (STRATAGENE社) に形質転換させて行った。形質転換して得られた大腸菌を200mLのLB培地 (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、0.01%アンピシリン) に接種し、30℃で16時間培養した。得られた培養液を3Lの主発酵用培地 (1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューポールLB-625、0.0005%塩化チアミン、1.5%ソルビトール、1.5%カザミノ酸、0.01%アンピシリン) を仕込んだジャー培養槽に移植して、37℃、通気量3L/min、攪拌回転数200rpmで培養を開始した。

10 培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、培養温度を20℃に下げた後イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度0.5mMとなるように添加し、さらに4時間培養を行うことでLY6G6D-Hisの誘導発現を行った。培養終了後、培養液を5,000rpm、10minで遠心分離を行い、LY6G6D-His発現大腸菌を得た。LY6G6D-His発現大腸菌を1mM EDTAを含むPBSに懸濁後、Microfluidizer

15 (Microfluidics社) を用いて100MPaで2回処理した。この破碎液を超遠心分離 (10,000×G、30min、Beckman Coulter社) し、得られた上清を予めPBSで平衡化したNi-NTA Superflow (QIAGEN社) カラムに通液して吸着させた後、50mMイミダゾールを含むPBSで洗浄後250mMイミダゾールを含むPBSで溶出させた。この溶出液を2M酢酸でpH5.0に調整し、さらに10%グリセロールを添加した後、Amicon

20 Ultra-15 5K (MILLIPORE社) で濃縮を行った。濃縮後の溶液を、予め10%グリセロールを含むPBSで平衡化したSuperdex200 pgカラムでゲルろ過を行い、精製LY6G6D-Hisタンパク質とした。タンパク質濃度は、BSAをスタンダードとしてBCA Protein Assay Kit (PIERCE社) を用いて測定した。

25 実施例 15

組換え型H A T タグ付き分泌型 LY6G6D タンパク質の大腸菌用発現ベクターの構築

実施例 1 4 で作製した発現用ベクター pET3/ LY6G6D-His の His の部分を切り出し、合成 DNA で作製した HAT (ヒスチジンアフィニティータグ) を挿入して LY6G6D-HAT 発現用プラスミドを作製した。すなわち、合成 DNA HAT-F : 5' - CTAGCAAGGA TCATCTCATC CACAATGTCC ACAAAGAGGA GCACGCTCAT GCCCACAACA AGTGAG-3' .

- 5 (配列番号 : 3 6) と HAT-R : 5' - GATCCTCACT TGTGTGGGC ATGAGCGTGC TCCTCTTTGT GGACATTGTG GATGAGATGA TCCTTG-3' (配列番号 : 3 7) を作製し、それぞれを 10mM になるように TE で希釈後、等量を混合し、95℃・10min 加熱後徐冷してアニーリングを行った。上記で作製した pET3/ LY6G6D-His を制限酵素 Nhe I と BamH I で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit を
10 用いてゲルより抽出した。この制限酵素処理した発現用ベクターとアニーリング溶液を混合し Ligation High で連結させて、HAT を付加した大腸菌発現用ベクター pET3/ LY6G6D-HAT を作製した。

- 組換え型 LY6G6D-HAT タンパク質の調製は、上記で作製した pET3/ LY6G6D-HAT プラスミドを BL21-Gold (DE3) コンピテントセルに形質転換させて行った。形質転換
15 して得られた大腸菌を 200mL の LB 培地 (1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、0.01% アンピシリン) に接種し、30℃ で 16 時間培養した。得られた培養液を 3 L の主発酵用培地 (1.68% リン酸一水素ナトリウム、0.3% リン酸二水素ナトリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.024% 硫酸マグネシウム、0.02% ニューポール LB-625、0.0005% 塩化チアミン、1.5% ソルビ
20 トール、1.5% カザミノ酸、0.01% アンピシリン) を仕込んだジャー培養槽に移植して、37℃、通気量 3L/min、攪拌回転数 200rpm で培養を開始した。培養液の濁度が約 500 クレット単位になった時点で、培養温度を 20℃ に下げた後イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 0.5mM となるように添加し、さらに 4 時間培養を行うことで LY6G6D-HAT の誘導発現を行った。培養終了後、培養液
25 を 5,000rpm、10min で遠心分離を行い、LY6G6D-HAT 発現大腸菌を得た。LY6G6D-HAT 発現大腸菌を 1mM EDTA を含む PBS に懸濁後、Microfluidizer を用いて 100MPa で 2 回処理した。この破碎液を超遠心分離 (10,000×G、30min) し、得られた上清を予

めPBSで平衡化したNi-NTA Superflowカラムに通液して吸着させた後、25mMイミダゾールを含むPBSで洗浄後250mMイミダゾールを含むPBSで溶出させた。この溶出液をAmicon Ultra-15 5Kで濃縮後、PBSで平衡化したSuperdex200 pgカラムでゲルろ過を行い、精製LY6G6D-HATタンパク質とした。タンパク質濃度は、BSAをスタンダードとしてBCA Protein Assay Kitを用いて測定した。

実施例 16

抗 LY6G6D ウサギポリクローナル抗体の作製と精製

実施例 14 で調製した組換え型 LY6G6D-His タンパク質を免疫原として抗 LY6G6D ウサギポリクローナル抗体を作製した。

LY6G6D-His タンパク質の PBS 溶液とフロインド完全アジュバントとを等量混合して作製したエマルションを、家兎（日本白色種、雌、3 kg）3 羽の背部皮下および皮内に 1 羽あたり LY6G6D-His タンパク質として 0.1 mg ずつ免疫した。2 回目以降の免疫にはフロインド不完全アジュバントを用いたタンパク質エマルションを同様に調製し、2 週間毎に 7 回追加免疫した。免疫前および 4 回目と 6 回目の免疫 1 週間後に耳静脈より試験採血し、LY6G6D-His タンパク質をコートしたイムノプレートを用いた ELISA により血清抗体価の上昇を確認した。最終免疫の 1 週間後に 3 羽のウサギより麻酔下頸動脈採血を行い、それぞれ 77.6 mL、77.0 mL、71.7 mL の抗血清を取得した。

上記で得られた抗血清を 1M 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5 で 2 倍希釈し、プロテイン A セルロファイン（BIOCHEMICALS 社）カラムに供した。カラムを 1M 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄後、1M 塩化ナトリウムを含む 0.25M グリシン・塩酸緩衝液、pH 2.5 で溶出し、溶出液を速やかに 1M トリス・塩酸緩衝液、pH 9 で中和した。中和した溶出液を実施例 15 で作製した組換え型 LY6G6D-HAT タンパク質を NHS-Activated Sepharose（Amersham Biosciences 社）に固定化し作製した抗原カラムに供した。カラムを 1M 塩化ナトリウムを含む 20mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5 で洗浄後、1M 塩化ナトリウムを含む

0. 1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5、1M塩化ナトリウムを含む0. 1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH4、そして1M塩化ナトリウムを含む0. 1Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH3で段階的に溶出し、これらの溶出液を速やかに1Mトリス・塩酸緩衝液、pH9で中和した。分画分子量1万の膜を装着したビバスピリン (Sartorius社) を用いて、
- 5 PBSに置換すると共にし、抗LY6G6Dウサギポリクローナル抗体 (R1、R2、およびR3) を取得した。

実施例 17

LY6G6D 一過性発現による細胞増殖への影響

- 10 プラスミド発現ベクター導入により LY6G6D タンパク質を一過性発現させ、LY6G6D タンパク質が細胞の増殖速度に及ぼす影響を調べた。
- 具体的には、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌由来 HCT116 細胞 50 万個を 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) 2 mL に懸濁し、6 穴組織培養プレート (BD Falcon 社)
- 15 に播種した後、5%炭酸ガス気流下、37°Cで1日培養した。次に、1 μ g のコントロールベクター (pcDNA3.1(+), Invitrogen 社) あるいは、実施例 13 で作製した LY6G6D 発現ベクター (プラスミド pcDNA3.1(+)/CoLY6G6D、プラスミド pcDNA3.1(+)/OrLY6G6D) を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 250 μ L と、3 μ L の Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を添加した Opti-MEM I 250 μ L を混合
- 20 し、室温で 20 分間放置した。この混合液を培養液に滴下し、8 時間培養した後、培地を交換し、さらに 1 日培養を継続した。

- 各プラスミドのトランスフェクション 2 日後の細胞を PBS で洗浄した後、1mM EDTA および 0.1% BSA を含む PBS で分散し、2 千個の細胞を 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy's 5A 培地に懸濁し、96 穴平底組織培養プレート (BD Falcon 社)
- 25 に播種し、陰性コントロールとして DMSO を終濃度 0.1% となるように加えた。
- PI3K-Akt 経路阻害剤の LY294002 を 2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、MAPK 経路阻害剤の PD98059 を 1.25 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、p38 MAPK 経路阻害剤の SB20385 を 1.25

μM 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、または、JNK経路阻害剤のSP600125を $1.25\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ となるように加えた。各細胞内シグナル伝達経路阻害剤についても 0.1% DMSOとなるようにした。 5% 炭酸ガス気流下、 37°C で3日間培養した後、実施例12に記載した方法に従い細胞内DNA含量を測定した。その結果、陰性

5 コントロール群において、LY6G6D発現ベクター(プラスミドpcDNA3.1(+)/CoLY6G6D、プラスミドpcDNA3.1(+)/OrLY6G6D)導入細胞はコントロールベクター導入細胞に比べて蛍光強度が1.34倍および1.70倍と増加しており、統計学的に有意な差($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)を示した(図5A)。この増殖促進作用はPI3K-Akt経路阻害剤のLY294002によって用量依存性に抑制された(図5B)。

10

実施例18

LY6G6D一過性発現によるAKTリン酸化への影響

実施例17の方法に従いプラスミドpcDNA3.1(+)あるいはプラスミドpcDNA3.1(+)/OrLY6G6Dを導入し、トランスフェクション1日後、細胞をPBSで洗

15 浄した後、牛胎仔血清を含まないMcCoy's 5A培地でさらに一晚培養した。次に、培養液を除去し、 10% 牛胎仔血清を含むMcCoy's 5A培地を添加して5分間あるいは15分間、 5% 炭酸ガス気流下、 37°C で保温した。 10% 牛胎仔血清を含むMcCoy's 5A培地で保温した細胞と保温前の細胞を氷冷したPBSで3回洗浄し、

20 氷冷した $200\mu\text{L}$ 改変RIPA緩衝液[50mM トリス・塩酸緩衝液、 $\text{pH } 7.5$ 、 150mM 塩化ナトリウム、 1% Triton X-100、 0.05% SDS、 0.25% デオキシコール酸、Complete™ タブレット (Roche Diagnostics 社)、Phosphatase Inhibitor Cocktail-1 (Sigma 社)、Phosphatase Inhibitor Cocktail-2 (Sigma 社)]を添加し 4°C で15分間放置した。この改変RIPA緩衝液を回収し、 $15,000\text{rpm}$ で20分間遠心分離した上澄液を無細胞抽出液とした。これら無細胞抽出液のタンパク質濃

25 度をBCA Protein Assay Kitを用いて測定し、タンパク質濃度が揃うように改変RIPA緩衝液で希釈した後、5倍濃度SDS-PAGE用サンプルバッファーを5分の1容量混合し、 95°C で5分間加熱し、 $20\mu\text{L}$ を 10% アクリルアミドゲルでのSDS-PAGE

に供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアブロット P 膜 (ATTO 社) に転写した後、ブロッキング溶液 [50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、0.1%Tween 20、5%スキムミルク] 中に 1 時間室温放置した。

次に、ウサギ抗リン酸化 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology 社) あるいはウ

- 5 サギ抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology 社) を、50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、0.1%Tween20、5%BSA 溶液で 2 千倍希釈し、室温にて 2 時間反応させた。続いて、ブロッキング溶液で 1 万倍に希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare 社) 中で 1 時間室温放置した。検出には Immobilon Western HRP substrate (MILLIPORE 社) を用い、添付プロトコールに従
- 10 いリン酸化 Akt あるいは総 Akt タンパク質を検出した。その結果、牛胎仔血清で 15 分間処理したプラスミド pcDNA3.1(+)/OrLY6G6D 導入細胞は同処理 pcDNA3.1(+)
- 導入細胞に比べてリン酸化 Akt 量が増加していた。一方、総 Akt 量は変わらなかった (図 5 C)。

これらの結果から、LY6G6D タンパク質は PI3K-Akt 経路を活性化させることで、

- 15 細胞増殖を促進させる機能を有していることが示された。

実施例 19

組換え型完全長 LY6G6D タンパク質安定発現細胞株の樹立

- 実施例 17 においてプラスミド pcDNA3.1(+)/CoLY6G6D あるいは
- 20 pcDNA3.1(+)/OrLY6G6D をトランスフェクションし 2 日間培養した細胞を、1mM EDTA および 0.2%BSA を含む PBS で細胞を分散し、10%牛胎仔血清、800 μ g/mL G418 (Promega 社) および 10mM HEPES を含む McCoy's 5A 培地 [G418 選択培地] に懸濁し、T-150 組織培養フラスコ (BD Falcon 社) に播種した。3 日または 4 日ごとに G418 選択培地を交換しながら 5%炭酸ガス気流下、37°C で 10 日間培養を継続した。
- 25 G418 耐性細胞を 1 ウェル当たり 0.8 個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレートに播種し、1 個の細胞が増殖してコロニーを形成したウェルから細胞を回収し、48 穴組織培養プレート (BD Falcon 社) に播種した。細胞密度が 50%以上になる

まで培養を継続した後、6 穴組織培養プレートに播種した。細胞密度が 50% 以上になるまで培養を継続し、各クローンをセルバンカー (ZENOAQ 社) に懸濁し、 -80°C で保存した。一方で、12 穴組織培養プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養した各クローンを PBS で洗浄後、2mM EDTA および 0.2% BSA を含む

5 PBS 細胞を分散させ、BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) (BD Biosciences 社) で細胞を懸濁し、終濃度 $1\mu\text{g/mL}$ となるように実施例 16 で得た R2 抗体を加え、氷中に 2 時間放置した。次に、 $5\mu\text{g/mL}$ の Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes 社) を含む BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) で懸濁し、氷上にて 1 時間放置した。BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) で再び懸濁した後、FACScan (BD

10 Biosciences 社) にて解析し、LY6G6D タンパク質を細胞表層に局在する安定発現細胞株として高発現クローン (C03、C12 および 003)、中発現クローン (C01 および 030) および低発現クローン (C07) の計 6 クローンを得た。

実施例 20

15 LY6G6D タンパク質が GPI アンカー型細胞膜タンパク質であることの証明 (PI-PLC 処理)

LY6G6D タンパク質が GPI (Glycosylphosphatidylinositol) を介して細胞表層に局在するかを調べた。具体的には、実施例 19 で得た LY6G6D 安定発現細胞株 6 クローン (C01、C03、C07、C12、003 および 030) をサブコンフルエントになるま

20 で培養し、PBS で洗浄した細胞を 2mM EDTA, 0.2% BSA を含む PBS で分散し、100 万個の細胞を再度 PBS で洗浄した後、1units/mL PI-PLC (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, Sigma 社) を含む OPTI-MEM I 溶液 $100\mu\text{L}$ あるいは OPTI-MEM I 溶液 $100\mu\text{L}$ に懸濁し、 37°C で、90 分間反応させた。

25 上記で反応させた 50 万個の細胞を BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) (BD Biosciences 社) に懸濁し、終濃度 $3\mu\text{g/mL}$ となるように実施例 16 で得た R2 抗体を加え、氷中に 1 時間放置した。次に、 $5\mu\text{g/mL}$ の Alexa488 標識抗ウサギ IgG

抗体 (Molecular Probes 社) を含む BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) で懸濁し、氷上にて 1 時間放置した。次に BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) に再懸濁し、FACScan (BD Biosciences 社) にて解析した。その結果、全ての LY6G6D 安定発現細胞株において、PI-PLC を反応させることにより染色強度が低下した (図 6 A)。

- 5 一方、上記で反応させた 50 万個の細胞を、PBS で洗浄した後、100 μ L の SDS-PAGE 用サンプルバッファー [62.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、20%グリセロール、1%SDS、0.02%プロモフェノールブルーおよび 2% 2-メルカプトエタノール] に懸濁し、95°C で 5 分間加熱した後、20 μ L を 15%アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアブロット P 膜 (ATTO 社)
- 10 に転写した後、ブロッキング溶液 [50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、0.1%Tween20、5%スキムミルク] 中に 1 時間室温放置した。次に、実施例 16 で得た R2 抗体を 3 μ g/mL の濃度となるように 50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、0.1%Tween20、5%BSA 溶液で希釈し、4°C にて 2 時間保温させた。続いて、ブロッキング溶液で 10 万倍に希釈した HRP
- 15 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare 社) 中で 1 時間室温放置した。検出には Immobilon Western HRP substrate (MILLIPORE 社) を用い、添付プロトコールに従い LY6G6D タンパク質を検出した。その結果、全ての LY6G6D 安定発現細胞株で認められた分子量 15kD から 20kD の LY6G6D タンパク質に由来する特異的なバンドが、PI-PLC を反応させたことにより減少した (図 6 B)。
- 20 上記の結果から LY6G6D タンパク質が GPI を介して細胞表層に局在していることが明らかとなった。

実施例 2 1

LY6G6D タンパク質の糖鎖修飾の検討

- 25 LY6G6D タンパク質の生化学的な特徴付けるため糖鎖修飾について調べた。具体的には、実施例 19 で得た LY6G6D 安定発現株 C03 クローンを 2mM EDTA および 0.2%BSA を含む PBS で分散し、100 万個の細胞を PBS で洗浄した後、Complete™

タブレット (Roche Diagnostics 社) を含む 10mM Tris・HCl、pH7.5 の低張液で懸濁し、氷上 20 分間放置し、細胞を破裂させた。破碎させた細胞を低張液で 3 回洗浄し、1% Triton X-100、0.1% SDS および 0.4% 2-メルカプトエタノールを含む 50mM リン酸緩衝液、pH7.0 に懸濁し、95℃で 5 分間加熱した後、ENZYMATIC
5 DEGLYCOSYLATION KIT (PROZYME 社) の処方に従い、1) 酵素なし、2) N-Glycanase (PNGase F)、3) N-Glycanase (PNGase F) および Sialidase A、4) N-Glycanase (PNGase F)、Sialidase A および O-Glycanase を加え、37℃、4 時間反応させた。5 倍濃度 SDS-PAGE 用サンプルバッファー [312.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、40%グリセロール、5%SDS、0.1%ブロモフェノールブルーおよび
10 10% 2-メルカプトエタノール] を 5 分の 1 容量で混合し、95℃で 5 分間加熱した後、2 μ L を 15%アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。検出は実施例 20 記載の方法に準拠した。その結果、分子量約 15kD から約 20kD にかけて出現した LY6G6D タンパク質に由来する特異的なバンドが 15kD へと集束された。

この結果から LY6G6D タンパク質はシアル酸を含有する N-linked 糖鎖および
15 O-linked 糖鎖の修飾を受けることが示された (図 7)。

実施例 2 2

LY6G6D 遺伝子の siRNA 投与によるヒト大腸癌細胞株 COLO320 DM および SW480 のタンパク質発現量低下

20 アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌細胞株 COLO 320DM またはヒト大腸癌細胞株 SW 480 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) または DMEM 培地 (Invitrogen 社) [培養培地] で懸濁し、75 万個の細胞密度で 10cm ϕ 組織培養ディッシュ (BD フアルコン社) に播種すると同時に、siRNA をトランスフェクションした。具体的には、
25 実施例 1 で作製した LY6G6D 遺伝子の mRNA を切断する活性を持つ siRNA-2 をトランスフェクションに供した。コントロールとしては、実施例 1 で使用した non-silencing dsRNA を用いた。400pmol の LY6G6D 遺伝子に対する siRNA また

は 400pmol の non-silencing dsRNA を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 1.25mL と、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 15 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 1.25mL を混合液し、この混合液を 10cm ϕ 組織培養ディッシュに全量添加し、室温で 20 分間放置した。放置後の 10cm ϕ 組織培養ディッシュに

5 各培養培地に懸濁した細胞を 75 万個の細胞密度で播種し、5%炭酸ガス気流中、37 $^{\circ}$ C で、一晚培養した。トランスフェクション 1 日後に培地を交換し、さらに 1 日間培養した細胞を 1mM EDTA および 0.1%BSA を含む PBS で分散し、実施例 2 1 に記載した方法で細胞を破裂させ、0.5%SDS および 1% 2-メルカプトエタノールを含む水溶液に懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後、ENZYMATIC DEGLYCOSYLATION

10 KIT (PROZYME 社) の処方に従い、1%Triton X-100 および 50mM リン酸緩衝液となるように加えた後、さらに N-Glycanase (PNGase F)、Sialidase A および O-Glycanase を添加し、37 $^{\circ}$ C、4 時間反応させた。次に、5 倍濃度 SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 5 分の 1 容量で混合し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後、25 μ L を 15%アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。検出は実施例 1 6 で得た R2 抗

15 体を 5 μ g/mL の濃度として実施例 2 0 に記載した方法に準拠した。その結果、LY6G6D タンパク質に由来する特異的な分子量 15kD バンドが LY6G6D 遺伝子に対する siRNA 投与により減少した (図 8)。

この結果から、LY6G6D タンパク質のダウンレギュレーションが細胞増殖の抑制を誘発することが示された。

20

実施例 2 3

大腸癌細胞株における LY6G6D タンパク質発現量の解析

LY6G6D 遺伝子発現細胞株における LY6G6D タンパク質の発現を調べた。具体的には、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸

25 癌細胞株 SNU-C1、COLO 320DM、DLD-1、SW480 および HCT116 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) または DMEM 培地 (Invitrogen 社) でサブコンフルエントまで培養し、0.5mM EDTA および 0.2%BSA を含む PBS

で分散し、200 万個の細胞を PBS で洗浄した後、実施例 2.1 に記載した方法に従い細胞を破裂させ、0.5% SDS、1% 2-メルカプトエタノールを含む 50mM リン酸緩衝液、pH7.0 に懸濁し、95°C で 10 分間加熱した。次に Triton X-100 を 1% となるように加えた後、ENZYMATIC DEGLYCOSYLATION KIT (PROZYME 社) の処方に従い

5 N-Glycanase (PNGase F)、Sialidase A および O-Glycanase を加え、37°C、4 時間反応させた。5 倍濃度 SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 5 分の 1 容量で混合し、95°C で 5 分間加熱した後、20 μ L を 15% アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供した。検出は実施例 16 で得た R2 抗体を 3 μ g/mL の濃度として実施例 20 に記載の方法に準拠した。その結果、LY6G6D 遺伝子の発現細胞株 SNU-C1、COLO 320DM、DLD-1

10 および SW480 において LY6G6D タンパク質に由来する特異的な分子量 15kD バンドが検出された。一方、LY6G6D 遺伝子の非発現細胞株 HCT116 ではそのバンドは検出されなかった (図 9)。

実施例 2 4

15 LY6G6D 安定発現細胞株の細胞増殖速度 (平板培養)

LY6G6D タンパク質が細胞の増殖速度に影響を及ぼすか調べた。実施例 19 で得た LY6G6D 安定発現細胞株 6 クローン (C01、C03、C07、C12、003 および 030) をサブコンフルエントになるまで培養し、トリプシン-EDTA (Invitrogen 社) で組織培養ディッシュから剥がし、10% 牛胎仔血清 (JRH 社)、800 μ g/ml G418 (プロメガ社) および 10mM HEPES を含む McCoy's 5A 培地 (Invitrogen 社) に懸濁

20 し、1 ウェル当たり 3 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種し、5% 炭酸ガス気流下、37°C で培養させた。1 日培養した細胞あるいは 3 日培養した細胞を実施例 12 に記載した方法に従い細胞内 DNA 含量を測定し、細胞内 DNA 含量が培養開始 1 日目に対する 3 日目の倍数を算出し増殖

25 速度とした。その結果、LY6G6D タンパク質発現量 (実施例 20 における PI-PLC 非処理細胞の FACSscan 解析結果) と細胞増殖との間で正の相関関係 ($R=0.8445$) を示した (図 10)。

実施例 2 5

LY6G6D タンパク質の局在性検討(細胞染色)

- 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy' s 5A 培養培地で2か月馴化培養した
- 5 実施例 1 9 で得た LY6G6D 安定発現細胞株 クローン C12 とヒト大腸癌細胞株 HCT116 をトリプシン-EDTA (Invitrogen 社) で組織培養ディッシュから剥がし、上記培養培地に懸濁し、ポリ D-リシンコート 8 穴チャンバースライド (BD フェルコン社) に播種し、5 %炭酸ガス気流下、37℃で2日間培養させた。その後、PBS で2回洗浄し、10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温で20分間固定し、
- 10 0.1%Triton X-100 を含む PBS を加えて室温で5分間透徹した。PBS で2回洗浄した後、1%BSA を含む PBS を加え、室温で1時間ブロッキングした。実施例 1 6 で得た R2 抗体を 1 μ g/mL 含むブロッキング溶液を加え、4℃で2時間放置した後、PBS で3回洗浄した。次に、10 μ g/mL の Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes 社) を含むブロッキング溶液を加え、室温で1時間放置した後、PBS で4
- 15 回洗浄した。DAPI を含む封入剤で核を染色した。蛍光顕微鏡下で LY6G6D タンパク質の染色部位を観察した。その結果、LY6G6D タンパク質は細胞が隣接している箇所ほど細胞の輪郭が強く染色された (図 1 1)。

実施例 2 6

- 20 LY6G6D 安定発現細胞株の細胞増殖速度(三次元的培養)

- 10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む McCoy' s 5A 培養培地で2か月馴化培養した
- 実施例 1 9 で得た LY6G6D 安定発現細胞株 6 クローン (C01、C03、C07、C12、003 および 030) とアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト大腸癌細胞株 HCT116 とで三次元的培養における細胞増殖能および馴化後における LY6G6D タンパク質発現量を比較した。具体的にはサブコンフルエントになるまで培養した各細胞をトリプシン-EDTA (Invitrogen 社) で組織培養ディッシュから剥がし、上記培養培地に懸濁し、1 ウェル当たり 1 万 5 千個の細胞密
- 25

度で96穴スフェロイド培養プレート (SUMILON 社) に播種し、5%炭酸ガス気流下、37℃で4日間培養させた。その後、5mg/mL MTT を含む PBS を 10 μ l 加え、さらに4時間培養した後、培養液を抜き取り、0.04N 塩酸を含むイソプロパノールを加え、遮光して室温で1時間攪拌した。690nm を対照に取り、540nm の吸光度を計測することにより、ミトコンドリア呼吸能を測定した。一方、サブコンフルエントになるまで培養した各細胞を 0.5mM EDTA および 0.2%BSA を含む PBS で分散し、2 μ g/mL の実施例 16 で得た R2 抗体を 4℃で1時間、5 μ g/mL Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes 社) を 4℃で30分間放置し、FACScan (BD Biosciences 社) にて解析した。その結果、LY6G6D タンパク質発現量とミトコンドリア呼吸能との間で正の相関関係 ($R=0.935$) を示した (図 12)。

実施例 27

ヒト大腸癌組織および正常組織における LY6G6D タンパク質発現量の解析

Total Protein-Human Tumor (Biochain社) および Total Protein-Human Normal (Biochain社) を用いてヒト大腸癌組織および正常組織LY6G6Dタンパク質発現量を検討した。ヒト大腸癌組織サンプルとしてColon cancerを7サンプル、Rectum cancerを4サンプル用いた。ヒト正常組織としてColonとRectumが2サンプル、Breast、Lung、Prostate、Pancreas、Ovary、Brain、Testis、Heart、Liver、Kidney、Kidney、StomachおよびSpleenが各1サンプル用いた。上記組織抽出液のタンパク質濃度が3.3mg/mLとなるようにSDS-PAGE用サンプルバッファー [62.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、10%グリセロール、1%SDS、0.02%ブロモフェノールブルーおよび2% 2-メルカプトエタノール] で希釈し、95℃で10分間加熱変性させた後、45 μ gのタンパク質をENZYMATIC DEGLYCOSYLATION KIT (PROZYME社)の処方に従い、1%Triton X-100含む50mMリン酸緩衝液となるように加え、次に、N-Glycanase (PNGase F)、Sialidase AおよびO-Glycanaseを加え、37℃、3時間反応させた。5倍濃度SDS-PAGE用サンプルバッファー [312.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、40%グリセロール、5%SDS、0.1%ブロモフェノールブルーおよび10% 2-

メルカプトエタノール] を5分の1容量で混合し、95℃で5分間加熱した後、10 μ L を15%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアブロットP膜 (ATTO社) に転写した後、ブロッキング溶液 [50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM塩化ナトリウム、0.1%Tween20、5%BSA] 中に1時間室温放置した。次に、ブロッキング溶液に3 μ g/mLとなるように希釈した実施例16で得たR2抗体を室温で2時間保温させた。続いて、50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM塩化ナトリウム、0.1%Tween20、5%スキムミルクで2千倍に希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Cell Signaling Technology社) を室温で1時間保温した。検出にはImmobilon Western HRP substrate (MILLIPORE社) を用い、添付プロトコールに従いLY6G6Dタンパク質を検出した。これらの結果より、ヒト大腸癌組織の11サンプル中4サンプルにおいてLY6G6Dタンパク質に由来する特異的な分子量15kDバンドが検出された。一方、いずれのヒト正常組織サンプルにおいてもLY6G6Dタンパク質に由来する特異的な分子量15kDバンドは検出されなかった (図13)。

15

実施例28

癌における TM4SF17 遺伝子の発現亢進

癌患者より摘出した癌組織由来 mRNA、および周辺正常組織由来 mRNA を用い、ハイブリダイゼーション法を行うことにより、遺伝子発現プロファイルを作製した。遺伝子発現プロファイル解析の結果、当該遺伝子が癌組織において高発現していることが見出された。特に乳癌、肺癌、および卵巣癌において、周辺正常組織に対する顕著な発現亢進が観察された (図14)。

20

実施例29

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与によるヒト乳癌細胞株の細胞増殖抑制

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地

25

(Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37°C で一晚培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子および TM4SF17c 遺伝子全ての mRNA を切断する活性を持つ 3 種の siRNA を混和し、トランスフェクションに供した。コントロールとしては、細胞に対し非特異的な RNAi 効果を示さないことが保証されている siRNA (以下 non-silencing dsRNA と略する) を用いた。4pmol の TM4SF17 遺伝子に対する siRNA、または 4pmol の non-silencing dsRNA を Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L に添加し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.2 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と混合した後、室温で 20 分間放置した。上記混合液を MDA-MB-231 細胞培養液に全量添加し、更に 24 時間培養を継続した後、培地を交換した。これらの細胞を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) 中で、37°C で、さらに 3 日間培養した。培地を除去後、プレートを -80°C で 30 分間以上静置し、室温で 5 分間放置した。0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェルあたり 200 μ L 添加し、15 分間放置した後、励起波長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて約 23% 蛍光強度が低下し、統計学的に有意な差 ($P < 0.05$) を示した (表 1)。

実施例 30

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与による TM4SF17 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 29 で用いたヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を Leibovitz' s L-15 培地に懸濁し、1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37°C で一晚培養した後、実施例 29 の方法に準じて siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続し

た後に RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータルRNAを抽出した。約 100ng のトータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。TM4SF17 遺伝子の発現量の測定はトータルRNAにして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、TM4SF17 遺伝子の第 1 エクソンの一部と第 2 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C・2 分、95°C・10 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin forward primer、reverse primer、probe (いずれも Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。

TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与群に比して TM4SF17 の mRNA 発現量は 91% 低下した。これらの結果より、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子もしくは TM4SF17c 遺伝子の発現量の低下によりヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された (表 1)。

実施例 3 1

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与によるヒト乳癌細胞株 MDA-MB-436 の細胞増殖抑制
アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト乳癌細胞株 MDA-MB-436 を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 3 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37°C で一晩培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子および TM4SF17c 遺伝子全ての mRNA を切断する活性を持つ 2 種の siRNA1 および siRNA2 をトランスフェクシ

オンに供した。これら siRNA は、示した塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハングをつけた一本鎖オリゴ RNA と、それに相補的な塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハングをつけた一本鎖オリゴ RNA をアニールさせて使用した。コントロールとしては、細胞に対し非特異的な RNAi 効果を示さないことが保証されている。

5 siRNA (以下 non-silencing dsRNA と略する) を用いた。1pmol の TM4SF17 遺伝子に対する siRNA、または 1pmol の non-silencing dsRNA を Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L に添加し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.1 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と混合した後、室温で 20 分間放置した。上記混合液を MDA-MB-436 細胞培養液に全量添加し、更に 24 時間培養を継続した後、

10 培地を交換した。これらの細胞を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) 中で、37°C で、さらに 4 日間培養した。培地を除去後、プレートを -80°C で 30 分間以上静置し、室温で 5 分間放置した。0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェルあたり 175 μ L 添加し、15 分間放置した後、励起波

15 長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、TM4SF17 遺伝子に対する 2 種の siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて、siRNA1 で約 28% ($P=0.0114$)、siRNA2 で約 21% ($P=0.1070$) 蛍光強度が低下した (表 1)。

siRNA1: cccagaaccucgugaguga (配列番号: 38)

20 siRNA2: gggccaaucuggagugaaa (配列番号: 39)

実施例 3 2

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与によるヒト乳癌細胞株 MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII の細胞増殖抑制

25 アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト乳癌細胞株 MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 2 千個の細

胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD ファルコン社) に播種した。37℃で一晩培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子および TM4SF17c 遺伝子全ての mRNA を切断する活性を持つ 2 種の siRNA1 および siRNA2 をトランスフェクションに供した。これら siRNA は、示した塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハングをつけた一本鎖オリゴ RNA と、それに相補的な塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハングをつけた一本鎖オリゴ RNA をアニールさせて使用した。コントロールとしては、細胞に対し非特異的な RNAi 効果を示さないことが保証されている siRNA (以下 non-silencing dsRNA と略する) を用いた。1pmol の TM4SF17 遺伝子
10 に対する siRNA、または 1pmol の non-silencing dsRNA を Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L に添加し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.1 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と混合した後、室温で 20 分間放置した。上記混合液を MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII 細胞培養液に全量添加し、更に 24 時間培養を継続した後、培地を交換した。これらの細胞を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) 中で、37℃で、さらに 3 日
15 間培養した。培地を除去後、プレートを -80℃で 30 分間以上静置し、室温で 5 分間放置した。0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェルあたり 150 μ L 添加し、15 分間放置した後、励起波長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測
20 することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、TM4SF17 遺伝子に対する 2 種の siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて、MDA-MB-435S においては siRNA1 で約 64% ($P=0.0002$)、siRNA2 で約 57% ($P<0.0001$)、MDA-MB-175VII においては siRNA1 で約 41% ($P=0.0072$)、siRNA2 で約 40% ($P=0.0086$) 蛍光強度が低下した (表 1)。

25

実施例 3 3

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与によるヒト乳癌細胞株 HCC1937 および T-47D の細胞

増殖抑制

アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト乳癌細胞株 HCC1937 および T-47D を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) および 1mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1
5 ウェル当たり 3 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フアルコン社) に播種した。37℃で一晩培養した後、siRNA をトランスフェクションした。

具体的には、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子および TM4SF17c 遺伝子全ての mRNA を切断する活性を持つ 2 種の siRNA1 および siRNA2 をトランスフェクションに供した。これら siRNA は、示した塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハ
10 ングをつけた一本鎖オリゴ RNA と、それに相補的な塩基配列の 3' 末端に dTdT のオーバーハングをつけた一本鎖オリゴ RNA をアニールさせて使用した。コントロールとしては、細胞に対し非特異的な RNAi 効果を示さないことが保証されている siRNA (以下 non-silencing dsRNA と略する) を用いた。1pmol の TM4SF17 遺伝子
15 に対する siRNA、または 1pmol の non-silencing dsRNA を Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L に添加し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) 0.1 μ L を添加した Opti-MEM I (Invitrogen 社) 10 μ L と混合した後、室温で 20 分間放置した。上記混合液を HCC1937 および T-47D 細胞培養液に全量添加し、更に 24 時間培養を継続した後、培地を交換した。これらの細胞を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) および 1mM
20 ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen 社) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社) 中で、37℃で、さらに 3 日間培養した。培地を除去後、プレートを -80℃で 30 分間以上静置し、室温で 5 分間放置した。0.25% CyQUANT GR reagent (Molecular Probes 社) ならびに 5% cell lysis buffer (Molecular Probes 社) を含む水溶液を 1 ウェルあたり HCC1937 の場合 175 μ L または T-47D の場合 150 μ L 添加し、
15 分間放置した後、励起波長 485nm、発光波長 535nm にて蛍光強度を計測することにより、細胞内 DNA 含量を測定した。その結果、TM4SF17 遺伝子に対する 2
25 種の siRNA を投与した細胞は non-silencing dsRNA 投与細胞に比べて、HCC1937 においては siRNA1 で約 36% ($P=0.0195$)、siRNA2 で約 25% ($P=0.0124$)、T-47D

においては siRNA1 で約 24% ($P=0.0061$)、siRNA2 で約 28% ($P=0.0743$) 蛍光強度が低下した (表 1)。

実施例 3 4

- 5 TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与による乳癌細胞株 MDA-MB-436 での TM4SF17 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 3 1 で用いたヒト乳癌細胞株 MDA-MB-436 を 10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) に懸濁し、1 ウェル当たり 3 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD フェルコン社) に播種した。37°C
10 で一晩培養した後、実施例 3 1 の方法に準じて siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続した後に RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。約 150ng のトータル RNA を鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。TM4SF17 遺伝子の発現量の測
15 定はトータル RNA にして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、TM4SF17 遺伝子の第 1 エクソンの一部と第 2 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C $\cdot$ 2 分、95°C $\cdot$ 10
20 分の後、95°C $\cdot$ 15 秒、60°C $\cdot$ 1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin forward primer、reverse primer、probe (いずれも Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。

TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた
25 non-silencing dsRNA 投与群に対して TM4SF17 の mRNA 発現量は siRNA1 で約 102%、siRNA2 で約 91% 低下していた。これらの結果より、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子もしくは TM4SF17c 遺伝子の発現量の低下によりヒト乳癌細胞株

MDA-MB-436 の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された (表 1)。

実施例 3 5

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与による乳癌細胞株 MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII
5 での TM4SF17 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 3 2 で用いたヒト乳癌細胞株 MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII を 10%
牛胎仔血清 (JRH 社) を含む Leibovitz' s L-15 培地 (Invitrogen 社) に懸濁し、
1 ウェル当たり 2 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD ファルコン
社) に播種した。37℃で一晩培養した後、実施例 3 2 の方法に準じて siRNA をト
10 ランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続した後
に RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。
MDA-MB-435S では約 200ng、MDA-MB-175VII では約 120ng のトータル RNA を鋳型と
して、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用
いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。TM4SF17 遺伝子の発現量の測定は
15 トータル RNA にして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR
Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、TM4SF17 遺伝子の第 1 エクソンの一
部と第 2 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む
TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L と
し、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50℃・2 分、95℃・10 分
20 の後、95℃・15 秒、60℃・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型
cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin forward
primer、reverse primer、probe (いずれも Applied Biosystems 社) を用いて測
定し内部標準とした。

TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた
25 non-silencing dsRNA 投与群に対して TM4SF17 の mRNA 発現量は MDA-MB-435S
においては siRNA1 で約 93%、siRNA2 で約 89%、MDA-MB-175VII においては siRNA1
で約 94%、siRNA2 で約 64%低下していた。これらの結果より、TM4SF17a 遺伝子、

TM4SF17b 遺伝子もしくは TM4SF17c 遺伝子の発現量の低下によりヒト乳癌細胞株 MDA-MB-435S および MDA-MB-175VII の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された (表 1)。

5 実施例 3 6

TM4SF17 遺伝子の siRNA 投与による乳癌細胞株 HCC1937 および T-47D での TM4SF17 遺伝子の mRNA 発現量低下

実施例 3 3 で用いたヒト乳癌細胞株 HCC1937 および T-47D を 10% 牛胎仔血清 (JRH 社) および 1mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen 社) を含む RPMI1640 10 培地に懸濁し、1 ウェル当たり 3 千個の細胞密度で 96 穴平底組織培養プレート (BD ファルコン社) に播種した。37°C で一晩培養した後、実施例 3 3 の方法に準じて siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションの後、24 時間培養を継続した後に RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を抽出した。HCC1937 では約 400ng、T-47D では約 85ng のトータル RNA を鋳型とし 15 て、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。TM4SF17 遺伝子の発現量の測定はトータル RNA にして 4ng に相当する cDNA を鋳型とし、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L、TM4SF17 遺伝子の第 1 エクソンの一部と第 2 エクソンの一部に由来する塩基配列を増幅するプライマーセットを含む 20 TaqMan Reagent (Applied Biosystems 社) を 0.5 μ L を加え、反応液量 10 μ L とし、定量的 PCR 法を用いて測定した。PCR 反応は、50°C・2 分、95°C・10 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分のサイクルを 40 回繰り返した。一方、同量の鋳型 cDNA 中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量を TaqMan β -actin forward primer、reverse primer、probe (いずれも Applied Biosystems 社) を用いて測定し内部標準とした。 25

TM4SF17 遺伝子に対する siRNA を投与した群では、陰性対照として用いた non-silencing dsRNA 投与群に対して TM4SF17 の mRNA 発現量は HCC1937 にお

いては siRNA1 で約 112%、siRNA2 で約 85%、T-47D においては siRNA1 で約 76%、siRNA2 で約 74%低下していた。これらの結果より、TM4SF17a 遺伝子、TM4SF17b 遺伝子もしくは TM4SF17c 遺伝子の発現量の低下によりヒト乳癌細胞株 HCC1937 および T-47D の細胞増殖抑制が誘発されたことが示された（表 1）。

5 (表 1)

細胞株	siRNA	mRNA発現量 (% to NS)	細胞増殖 (% to NS)
MDA-MB-231	mixture	9	77
HCC1937	siRNA1	-12	64
	siRNA2	15	75
MDA-MB-435S	siRNA1	7	36
	siRNA2	11	43
MDA-MB-175-VII	siRNA1	6	59
	siRNA2	36	60
T-47D	siRNA1	24	72
	siRNA2	26	76
MDA-MB-436	siRNA1	-2	72
	siRNA2	9	79

実施例 3 7

組換え型 C 末端 3xFLAG タグ付き TM4SF17 isoform b タンパク質の動物細胞用発現
10 ベクターの構築

ヒト肺がん細胞株 A549 由来の cDNA を鋳型とし、プライマー 1（配列番号：4
0）およびプライマー 2（配列番号：4 1）を用いた ATG から 726bp の断片 1 と、
プライマー 3（配列番号：4 2）およびプライマー 4（配列番号：4 3）を用い
た 291bp から isoform b の終止コドン直前の 987bp までの断片 2 についてそれぞ
15 れ PCR を行った。TM4SF17 isoform b と一致する配列の他に、プライマー 1 には
制限酵素 EcoRI、プライマー 4 には制限酵素 XbaI の認識配列 6bp を付加した。該
反応における反応液の組成は上記 cDNA 約 50 ng を鋳型として使用し、TAKARA LA
taq (TaKaRa Bio 社) 0.2 μ L、プライマー 1（配列番号：4 0）およびプライマ

ー 2 (配列番号: 4 1)、またはプライマー 3 (配列番号: 4 2) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 2xGC Buffer (TaKaRa Bio 社) を 10 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、94°C・1 分の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 40 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動で分離し、断片 1 および断片 2 それぞれで予測される長さに相当する DNA 断片を確認した。上記 PCR 産物のうち反応液 15 μ L を MinElute PCR purification kit (Qiagen 社) を用いて精製し 8 μ L の産物を得た。このうち 4 μ L を用いて TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社) により pCR4-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 7) のうち ATG から 726bp の断片 1 を有するクローンと、291bp から isoform b の終止コドン直前の 987bp までの断片 2 をそれぞれ含む pCR4-TOPO ベクターを得た。

断片 1 を含む pCR4-TOPO ベクター約 1 μ g を制限酵素 EcoRI および BamHI で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離し、断片 1 を MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で精製した。同様にして断片 2 を含む pCR4-TOPO ベクター約 1 μ g を制限酵素 BamHI および XbaI で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離し、断片 2 を MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で精製した。同時に p3XFLAG-CMV-14 (SIGMA 社) 約 1 μ g を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。このベクターと断片 1 および断片 2 を用いて、DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 7) を有する動物細胞用発現ベクター p3XFLAG-CMV-14- TM4SF17b を得た (以下、これを b-3F または b-3xFLAG と称することもある)。

プライマー 1 GAATTCATGCCCGGCAAGCACCAGCAT (配列番号: 4 0)

プライマー 2 GAAGACTCCCGCCACCACAATCAG (配列番号: 4 1)

プライマー 3 CGTGTTCCCTCGGTCTCATCTTCTTC (配列番号: 4 2)

プライマー 4 TCTAGACCAATTTTAAAGGTTGGCTC (配列番号: 4 3)

5 実施例 3 8

組換え型 C 末端 3xFLAG タグ付き TM4SF17 isoform a タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

実施例 3 7 で作製した TM4SF17 isoform b ベクターを鋳型とし、PCR によって TM4SF17 isoform a をプライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 5 (配列番号: 4 4) を用いた断片 3 と、プライマー 6 (配列番号: 4 5) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を用いた断片 4 についてそれぞれ PCR を行った。この反応における反応液の組成は上記ベクター 約 400 ng を鋳型として使用し、TAKARA LA taq (TaKaRa Bio 社) 0.2 μ L、プライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 5 (配列番号: 4 4)、またはプライマー 6 (配列番号: 4 5) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 2xGC Buffer (TaKaRa Bio 社) を 10 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、94°C・1 分の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 30 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動で分離し、断片 3 および断片 4 それぞれで予測される長さに相当する DNA 断片を確認した。上記 PCR 産物のうち反応液 17 μ L を MinElute Gel Extraction kit (Qiagen 社) を用いて精製しそれぞれ 8 μ L の産物を得た。これを用いて、TM4SF17 isoform a 全長を増幅する PCR 反応を行った。この反応液の組成は、断片 3 精製産物 1 μ L および断片 4 精製産物 0.3 μ L を混合したものを鋳型として使用し、TAKARA LA taq (TaKaRa Bio 社) 0.2 μ L、プライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 2xGC Buffer (TaKaRa Bio 社) を 10 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、94°C・1 分の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 25 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動で分離し、予測される長さに相当する DNA 断片を確認した。TOPO TA

Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社) により pCR4-TOP0 ベクターに組み込み、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TM4SF17 isoform a タンパク質 (配列番号: 6) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 5) を含む pCR4-TOP0 ベクターを得た。

TM4SF17 isoform a 配列を含む pCR4-TOP0 ベクター約 2 μ g を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で精製した。同時に p3XFLAG-CMV-14 (SIGMA 社) 約 0.3 μ g を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。このベクターと上記断片を用いて、DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 ECOS DH5 α (Nippon Gene 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、TM4SF17 isoform a タンパク質 (配列番号: 6) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 5) を有する動物細胞用発現ベクター p3XFLAG-CMV-14- TM4SF17a を得た (以下、これを a-3F または a-3xFLAG と称することもある)。

プライマー 5 GCTCCCCTCTCACCAGTTTGAGCCGGACGTCGTAG (配列番号: 44)

プライマー 6 AACTGGTGAGAGGGGAGCTGGAGCAGCAGGGCTTC (配列番号: 45)

20 実施例 39

組換え型 N 末端 FLAG タグ付き TM4SF17 isoform b タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

TM4SF17 isoform b in p3XFLAG-CMV-14 を約 2.5 μ g 用いて制限酵素 Eco RI および Xba I で切断し、断片を MinElute Gel Extraction kit (Qiagen 社) で精製したものを鋳型とし、Pfu Ultra を用いてプライマー 7 (配列番号: 46) およびプライマー 8 (配列番号: 47) を用いた PCR 反応を行った。この PCR 反応液の組成は、上記精製断片 約 120ng を鋳型として使用し、Pfu Ultra High-Fidelity

DNA Polymerase (Stratagene 社) $0.4\mu\text{L}$ 、プライマー7 (配列番号: 46) およびプライマー8 (配列番号: 47) を各 500 nM 、dNTPs を $400\mu\text{M}$ 、および $10\times\text{Pfu}$ Ultra High-Fidelity DNA Polymerase Reaction Buffer (Stratagene 社) を $2\mu\text{L}$ 加え、 $20\mu\text{L}$ の液量とした。PCR は、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{分}$ の後、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $60^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{分}$ のサイクルを 30 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動で分離して予測される長さの断片が増幅されていることを確認した後、蒸留水にて 50 倍希釈し、次のプライマー9 (配列番号: 48) およびプライマー8 (配列番号: 47) を用いた PCR 反応の鋳型とした。この PCR 反応液の組成は、上記希釈 PCR 産物 $1\mu\text{L}$ を鋳型として使用し、 Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene 社) $0.4\mu\text{L}$ 、プライマー9 (配列番号: 48) およびプライマー8 (配列番号: 47) を各 500 nM 、dNTPs を $400\mu\text{M}$ 、および $10\times\text{Pfu}$ Ultra High-Fidelity DNA Polymerase Reaction Buffer (Stratagene 社) を $2\mu\text{L}$ 加え、 $20\mu\text{L}$ の液量とした。PCR は、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{分}$ の後、 $95^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $60^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 2\text{分}$ のサイクルを 30 回繰り返した。産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、MinElute Gel Extraction kit (Qiagen 社) で精製した。この断片を、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社) により pCR-Blunt II-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、カナマイシンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、N 末側に 1xFLAG を持ち、C 末は終始コドンを持つ TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 7) を含む pCR-Blunt II-TOPO ベクターを得た。

この pCR-Blunt II-TOPO ベクター約 $2.5\mu\text{g}$ を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離し、断片を MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で精製した。同時に pcDNA3.1(+) (Invitrogen 社) 約 $1\mu\text{g}$ を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。このベクターと上記の断片を用いて、DNA Ligation Kit ver. 2 (TaKaRa Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 ECOS DH5 α (Nippon Gene 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々

のクローンの配列を解析した結果、N 末側に 1xFLAG を持ち、C 末は終始コドンを持つ TM4SF17 isoform b タンパク質（配列番号：8）をコードする cDNA 配列（配列番号：7）を有する動物細胞用発現ベクター pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17b を得た（以下、これを F-b または FLAG-b と称することもある）。

- 5 プライマー 7 AAAGACGATGACGACAAGCCCGCAAGCACCAGCATTTTC（配列番号：46）
プライマー 8 ATGTCTAGACTACCAATTTTAAAGGTTGGCTC（配列番号：47）
プライマー 9 GCCGCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAG（配列番号：48）

実施例 40

- 10 組換え型 N 末端 FLAG タグ付き TM4SF17 isoform d タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

isoform d は、isoform c の 211-213 の 3 アミノ酸がかけた配列の isoform である（図 1.8）。N 末端 FLAG タグ付き TM4SF17 isoform b タンパク質をコードする cDNA 配列を持つ pcDNA3.1(+) を鋳型とし、Pfu Ultra を用いてプライマー 9（配列番号：48）およびプライマー 10（配列番号：49）を用いた PCR 反応を行った。

15 この PCR 反応液の組成は、上記精製断片 約 300ng を鋳型として使用し、Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase（Stratagene 社）0.4 μ L、プライマー 9（配列番号：48）およびプライマー 10（配列番号：49）を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 10x Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase Reaction Buffer

20 （Stratagene 社）を 2 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、95°C・2 分の後、95°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・3 分のサイクルを 30 回繰り返した。産物を QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社）を用いて精製し、この断片を制限酵素 EcoRI および XbaI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社）を用いて精製した。同時に pcDNA3.1(+)（Invitrogen 社）約 1 μ g を制限酵素 EcoRI および

25 XbaI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN 社）を用いて精製した。このベクターと上記の断片を用いて、DNA Ligation Kit ver.2（TaKaRa Bio 社）を用いてライゲーション反応を行った後、大腸菌 ECOS DH5 α （Nippon Gene 社）

に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、N 末側に 1xFLAG を持ち、C 末は終始コドンを持つ TM4SF17 isoform d タンパク質（配列番号：12）をコードする cDNA 配列（配列番号：11）を有する動物細胞用発現ベクター、pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17d を得た（以下、これを F-d または FLAG-d と称することもある）。

プライマー 10：ATGTCTAGATCATTCATTTGCTCGAGGTTCTGGGCCAGGCAGA（配列番号：49）

実施例 41

- 10 ヒト胎児腎細胞 HEK293 での組換え TM4SF17 タンパク質 a-3xFLAG、b-3xFLAG、FLAG-b および FLAG-d の強制発現

実施例 38、37、39 および 40 で作製した動物細胞用発現ベクター p3xFLAG-CMV-14-TM4SF17a (a-3xFLAG) p3xFLAG-CMV-14-TM4SF17b (b-3xFLAG)、pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17b (FLAG-b) または pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17d (FLAG-d) を用いてヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に組換えタンパク質を一過性に強制発現させた。具体的には、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト胎児腎細胞 HEK293 を、10% 牛胎仔血清 (JRH 社) および 0.1mM MEM non-essential amino acid solution および 1mM ピルビン酸ナトリウムを含む MEM 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、1 ウェル当たり 30000 個の細胞密度で 6-well 培養ディッシュ (BD フアルコン社) に播種した。37°C で一晩培養した後、動物細胞用発現ベクターをトランスフェクションした。

具体的には 3 μ L の FuGENE6 (Roche 社) を 97 μ L の OPTI-MEM (Invitrogen 社) と混合したものに、p3xFLAG-CMV-14-TM4SF17a、p3xFLAG-CMV-14-TM4SF17b、pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17b または pcDNA3.1(+)-FLAG-TM4SF17d を 1 μ g 加え室温で 15 分放置した。上記混合液を、予め約 4 時間前に培地を交換しておいた HEK293 細胞の各ウェルの培養液に全量添加し、更に 37°C で 24 時間または 48 時間または 72 時間培養した。コントロールとしては、ベクターを加えずに同様の反応を行っ

た。培養終了後は培地を除去後、細胞を 0.5%EDTA-Na および 0.2%BSA を含む PBS(-) (Invitrogen 社) で回収、PBS(-)で洗浄し、1mL 当たり 5,000,000 細胞となるように、5%の 2-mercaptoethanol を含む Laemmli Sample Buffer と混合し、95℃で 5 分間加熱することで細胞溶解液とした。これらのサンプルについてウェ

5 スタンブロットを行い、抗 FLAG M2-Peroxidase conjugate 抗体 (SIGMA 社) で検出した。その結果、a-3xFLAG および b-3xFLAG および FLAG-b および FLAG-d タンパク質の発現が確認された。これらのタンパク質は全て推測される分子量よりやや分子量の低い位置に検出された。また、さらに分子量の低い位置に複数のバンドが検出されたものもあった。以上のことから、いずれのベクターを使用しても

10 組換え TM4SF17 タンパク質が HEK293 細胞に発現していることが示され、また、TM4SF17 タンパク質が分解などの翻訳後修飾を受けている可能性が示唆された (図 1.5 および表 2)。

(表 2)

Plasmid	略号	アミノ酸	推定分子量
Isoform a-3xFLAG (p3XFLAG-CMV-14)	a-3F a-3xFLAG	360	40382.21
Isoform b-3xFLAG (p3XFLAG-CMV-14)	b-3F b-3xFLAG	357	40069.84
1xFLAG-Isoform b (pcDNA3.1(+))	F-b FLAG-b	337	37737.45
1xFLAG-Isoform d (pcDNA3.1(+))	F-d FLAG-d	271	30564.44

15 実施例 4 2

ヒト胎児腎細胞 HEK293 での強制発現 TM4SF17 タンパク質 FLAG-b、b-3xFLAG および FLAG-d の糖鎖修飾

実施例 4 1 のようにして調製した b-3xFLAG および FLAG-b および FLAG-d タンパ

ク質を含む細胞溶解液を用いて、組換え TM4SF17 タンパク質の糖鎖修飾について検討した。コントロール、b-3xFLAG、FLAG-b および FLAG-d を強制発現させ、1mL 当たり 5,000,000 細胞となるように 5%の 2-mercaptoethanol を含む Laemmli Sample Buffer と混合し、95℃で 5 分間加熱することで調製した細胞溶解液を 20
5 μ L 用意した。脱糖鎖反応には Enzymatic Deglycosylation Kit (PROzyme 社) を用いた。5 μ L の 5x incubation buffer (PROzyme 社) を加え 95℃で 10 分間加熱した。室温に戻した溶液に 2.5 μ L の 10% Triton-X 溶液を加え、混合した後、N-Glycanase、Sialidase A および O-Glycanase を各 0.5 μ L ずつ加えて、37℃で 5 時間保温した。ここに 5x Laemmli Sample Buffer を加え 95℃で 10 分間加熱した
10 後、ウエスタンブロットに供した。抗 FLAG M2-Peroxidase conjugate 抗体 (SIGMA 社) で組換え TM4SF17 タンパク質を検出したところ、脱糖鎖処理の前後では各サンプルにおいて最大の分子量の位置が低分子側に移動していた。これより、組換え TM4SF17 b-3xFLAG および FLAG-b および FLAG-d タンパク質は糖鎖修飾を受けていることが示された (図 16)。

15

実施例 4 3

ヒト胎児腎細胞 HEK293 での強制発現 TM4SF17 isoform a および b タンパク質の細胞膜への局在

実施例 3 8 および 3 7 で作製した動物細胞用発現ベクター p3xFLAG-CMV-14-
20 TM4SF17a および p3xFLAG-CMV-14- TM4SF17b を用いてヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に組換えタンパク質を一過性に強制発現させた。具体的には、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト胎児腎細胞 HEK293 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社) および 0.1mM MEM non-essential amino acid solution および 1mM ピルビン酸ナトリウムを含む MEM 培地 (Invitrogen 社) で懸濁し、ディッ
25 シュ当たり 670000 個の細胞密度で 6cm 径組織培養ディッシュ (BD フアルコン社) に播種した。37℃で一晩培養した後、動物細胞用発現ベクターをトランスフェクションした。

具体的には $6\mu\text{L}$ の FuGENE6 (Roche 社) を $194\mu\text{L}$ の OPTI-MEM (Invitrogen 社) と混合したものに、p3xFLAG-CMV-14- TM4SF17a または p3xFLAG-CMV-14- TM4SF17b を $2\mu\text{g}$ を加え室温で 15 分放置した。上記混合液を、予め 4 時間前に培地を交換しておいた HEK293 細胞培養液に全量添加し、更に 37°C で 48 時間培養した。コントロールとしては、ベクターを加えずに同様の反応を行った。培地を除去後、細胞を PBS(-) (Invitrogen 社) 中でピペッティングにより回収し、PBS(-) で洗浄し、 $500\mu\text{L}$ の PBS(-) に懸濁した。biotin ラベル化には Cellular Labelling and Immunoprecipitation Kit (Roche 社) を用いた。 $500\mu\text{L}$ の細胞懸濁液に biotin-7-NHS (Roche 社) を終濃度 $50\mu\text{g/mL}$ となるように加え、室温で 15 分放置した。その後、 $25\mu\text{L}$ の stop solution (Roche 社) を加え、 4°C で 15 分保温した。細胞を PBS(-) で洗浄後 $500\mu\text{L}$ の RIPA buffer (1% Triton-X100、0.25% デオキシコール酸、150mM 塩化ナトリウム、50mM Tris-HCl (pH7.5)) で細胞を溶解させ、遠心上清を biotin ラベル化 lysate として得た。このうち $100\mu\text{L}$ を 4% の 2-Mercaptoethanol (WAKO 社) を含む Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad 社) $100\mu\text{L}$ と混合し、 95°C で 5 分間加熱することで SDS-PAGE サンプルとした。残りの $400\mu\text{L}$ について、RIPA buffer で平行化した M2-anti-FLAG antibody (SIGMA 社) を結合した anti-FLAG M2-agarose (Sigma 社) $100\mu\text{L}$ スラリーと混合し、 4°C で終夜混合した。ビーズを RIPA buffer で洗浄した後、2% の 2-Mercaptoethanol (WAKO 社) を含む 2 倍希釈 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad 社) $100\mu\text{L}$ を加えて 95°C で 5 分間加熱した。遠心後、上清を免疫沈降サンプルとした。これらの biotin ラベル化 lysate および免疫沈降サンプルについてウエスタンブロットを行い、抗 FLAG M2-Peroxidase conjugate 抗体 (SIGMA 社) および Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham 社) で検出した。その結果、抗 FLAG M2 抗体により TM4SF17 isoform a および b タンパク質の発現が確認された。また、免疫沈降サンプルから同じ分子量の位置に streptavidin でバンドが検出されたことから、TM4SF17 isoform a および b タンパク質が細胞膜上に局在していることが示された (図 17)。

実施例 4 4

TM4SF17 isoform e および isoform f の同定

実施例 3 7 において TM4SF17 isoform b をクローニングしたが、その際同時に新規 isoform e および isoform f が同定された。ヒト肺がん細胞株 A549 由来の cDNA を鋳型とし、プライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 2 (配列番号: 4 1) を用いた PCR 反応と、プライマー 3 (配列番号: 4 2) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を用いた PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 約 50 ng を鋳型として使用し、TAKARA LA taq (TaKaRa Bio 社) 0.2 μ L、プライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 2 (配列番号: 4 1)、またはプライマー 3 (配列番号: 4 2) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 2xGC Buffer (TaKaRa Bio 社) を 10 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、94°C・1 分の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 40 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動で分離し、それぞれの PCR 反応で予測される長さに相当する DNA 断片を確認したが、同時に予測断片より長い断片が確認された。上記 PCR 産物のうち反応液 15 μ L を MinElute PCR purification kit (Qiagen 社) を用いて精製し 8 μ L の産物を得た。このうち 4 μ L を用いて TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社) により pCR4-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、プライマー 1 (配列番号: 4 0) およびプライマー 2 (配列番号: 4 1) を用いた PCR 反応からは TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 7) のうち ATG から 726bp の断片 1 を有するクローンと、TM4SF17 isoform a タンパク質 (配列番号: 6) をコードする cDNA 配列 (配列番号: 5) のうち ATG から 735bp の断片 5 を有するクローンが得られた。また、プライマー 3 (配列番号: 4 2) およびプライマー 4 (配列番号: 4 3) を用いた PCR 反応からは、TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) をコ

ードする cDNA 配列（配列番号：7）のうち 291bp から isoform b の終止コドン直前の 987bp までの断片 2 を有するクローンの他に、これまでに知られていない新規の TM4SF17 isoform の部分配列、断片 6 を持つクローンが見出された。これは TM4SF17 isoform a タンパク質（配列番号：6）の配列において、exon 8 に続く intron に当たる配列が mRNA に転写されているため、intron 配列の先頭にある終止コドンによってペプチドが TM4SF17 isoform a タンパク質（配列番号：6）より短くなったものである。断片 5 と断片 6 が連続した mRNA になっている isoform が存在すると考え、TM4SF17 isoform e とした。TM4SF17 isoform e タンパク質の 273 アミノ酸配列（配列番号：14）と、それをコードする cDNA 配列（配列番号：13）を示した。また、断片 1 と断片 6 が連続した mRNA になっている isoform が存在すると考え、TM4SF17 isoform f とした。TM4SF17 isoform f タンパク質の 270 アミノ酸配列（配列番号：16）と、それをコードする cDNA 配列（配列番号：15）を示した。また、その他のスプライシングバリエーションと比較した模式図を図 18 に示した。

実施例 45

TM4SF17 isoform h の同定

ヒト大腸がん細胞株 SW480 由来の Human Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型とし、プライマー 11（配列番号：50）およびプライマー 12（配列番号：51）を用いて PCR を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 約 50 ng を鋳型として使用し、Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene 社) 0.4 μ L、プライマー 11（配列番号：50）およびプライマー 12（配列番号：51）を各 500 nM、dNTPs を 400 μ M、および 10x Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase Reaction Buffer (Stratagene 社) を 2 μ L 加え、20 μ L の液量とした。PCR は、95°C・2 分の後、95°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・3 分のサイクルを 30 回繰り返した。産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、断片を MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。この断片を制限酵素 EcoRI

および XbaI で処理し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。精製物を、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社) により pCR-Blunt II-TOPO ベクターに組み込み、大腸菌 One Shot TOP10 (Invitrogen 社) に導入し、カナマイシンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、これまでに知られていない新規の TM4SF17 isoform の配列を持つクローンが見出された。これは TM4SF17 isoform b タンパク質 (配列番号: 8) の配列から、exon 8 に当たる部分が欠失した配列である。これを TM4SF17 isoform h とした。TM4SF17 isoform h タンパク質の 308 アミノ酸配列 (配列番号: 18) と、それをコードする cDNA 配列 (配列番号: 17) を示した。また、その他のスプライシングバリエーションと比較した模式図を図 18 に示した。

プライマー 11 : GGCGAATTCCCGCTCACCATGCCCGGCAAGCACCA (配列番号: 50)

プライマー 12 : ATGTCTAGACTACCAATTTTAAAGGTTGGCTC (配列番号: 51)

産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質やそれらをコードするポリヌクレオチドは、癌組織に特異的に発現し、癌の診断マーカーとなるだけでなく、それらの活性および/または発現を抑制することにより、癌細胞のアポトーシス促進および/または増殖阻害効果が得られるので、上記タンパク質に対する抗体、上記ポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド、上記タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、上記タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩などは、癌の予防・治療剤、癌細胞のアポトーシス促進剤、癌細胞の増殖阻害剤などとして安全に使用することができる。また、上記タンパク質、上記ポリヌクレオチド、上記抗体などは、癌の予防・治療物質、癌細胞のアポトーシス促進物質、および/または癌細胞の増殖阻害物質のスクリーニングにも有用である。

本出願は、日本で出願された特願 2005-230797 (出願日: 2005 年 8 月 9 日) を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。
- 5 2. 癌の予防・治療用である請求項1記載の剤。
3. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。
- 10 4. 癌の予防・治療用である請求項3記載の剤。
5. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。
6. 癌の予防・治療用である請求項5記載の剤。
- 15 7. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法。
8. 癌の予防・治療のためである請求項7記載の方法。
9. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、配
- 20 列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用。
10. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治療用である請求項9記載の使用。
11. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ
- 25 ノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法。
12. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞の形態で提供される、請求項 1 1 記載の方法。

1 3. 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、さらに用いることを特徴とする、請求項 1 2 記載の方法。

1 4. 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である請求項 1 1 記載の方法。

1 5. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16 もしくは配列番号：18 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

1 6. 癌の予防・治療用である請求項 1 5 記載の剤。

1 7. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16 もしくは配列番号：18 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

1 8. 癌の予防・治療用である請求項 1 7 記載の剤。

1 9. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16 もしくは配列番号：18 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

2 0. 癌の予防・治療用である請求項 1 9 記載の剤。

2 1. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法。

2 2. 癌の予防・治療のためである請求項21記載の方法。

2 3. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用。

2 4. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治療用である請求項23記載の使用。

2 5. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法。

2 6. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞の形態で提供される、請求項25記載の方法。

2 7. 配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16もしくは配列番号：18で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、

さらに用いることを特徴とする、請求項 26 記載の方法。

28. 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である請求項 25 記載の方法。

29. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

30. 癌の予防・治療用である請求項 29 記載の剤。

31. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列に、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含むアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

32. 癌の予防・治療用である請求項 31 記載の剤。

33. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤。

34. 癌の予防・治療用である請求項 33 記載の剤。

35. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性を阻害することを含む、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害方法。

36. 癌の予防・治療のためである請求項 35 記載の方法。

37. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤の製造のための、配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質の発現および／または活性阻害物質の使用。

38. 癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤が癌の予防・治療用である請求項 37 記載の使用。

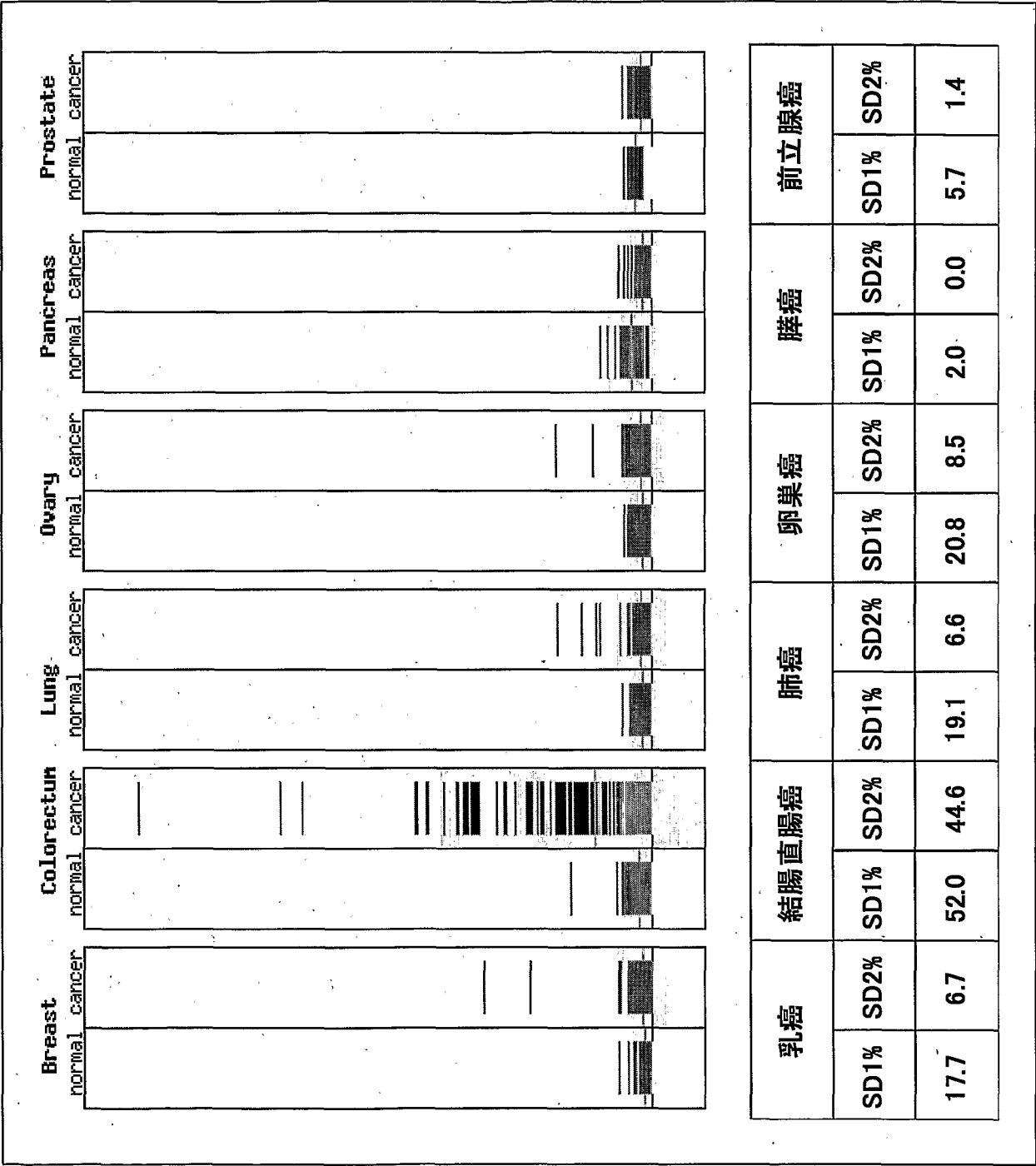
39. 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドを用いることを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害物質のスクリーニング方法。

40. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドが、それを産生する細胞の形態で提供される、請求項39記載の方法。

41. 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体、並びに該タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその塩基配列の一部を含むポリヌクレオチドからなる群より選択されるいずれかを、さらに用いることを特徴とする、請求項40記載の方法。

42. 癌の予防・治療物質のスクリーニング用である請求項39記載の方法。

図 1



2/12

図 2

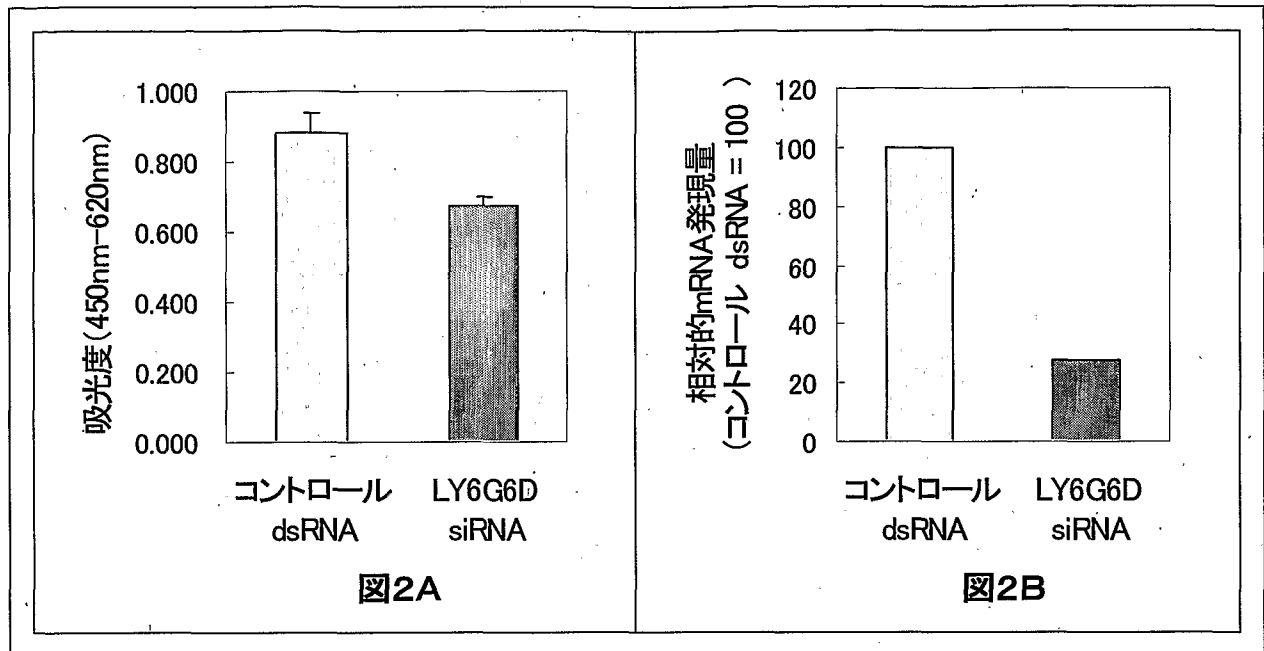


図 3

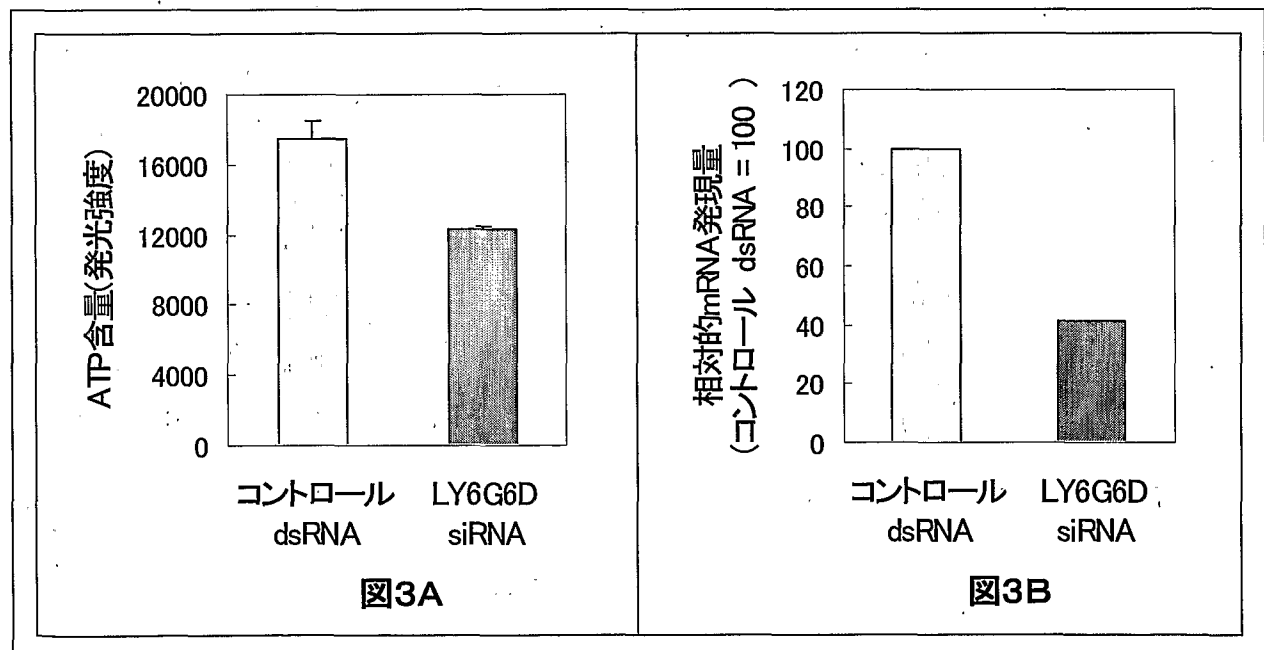
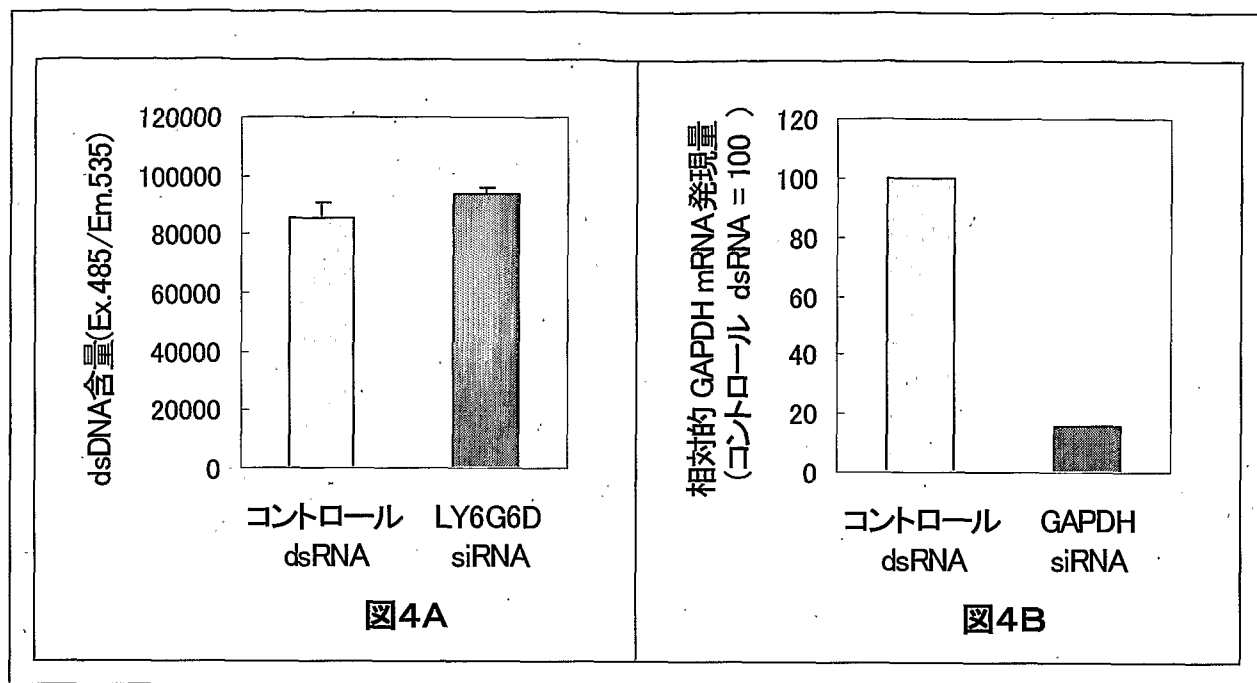


図 4



4/12

図 5

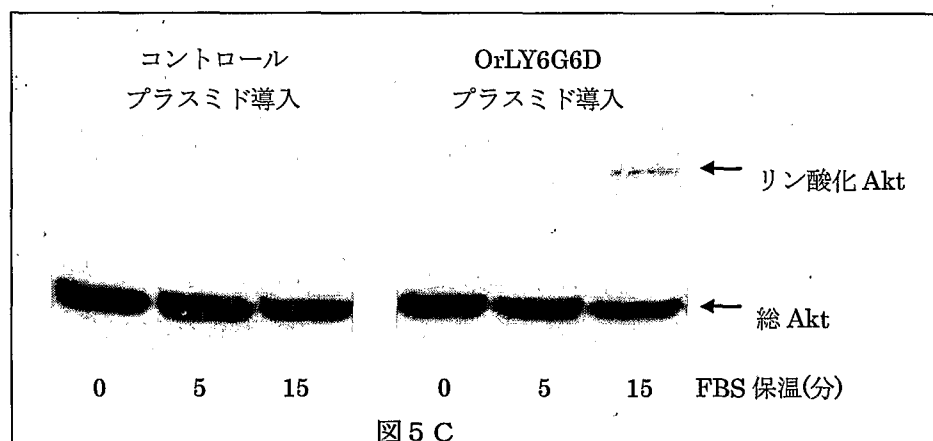
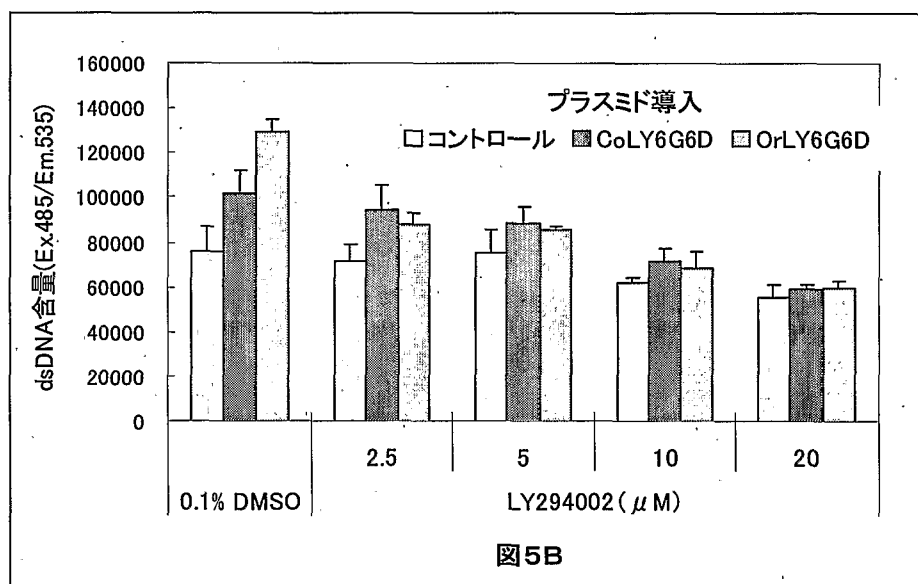
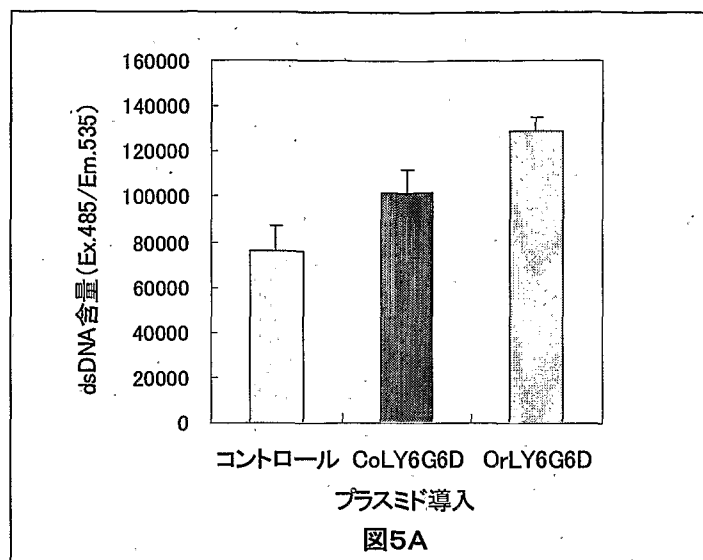


図 6

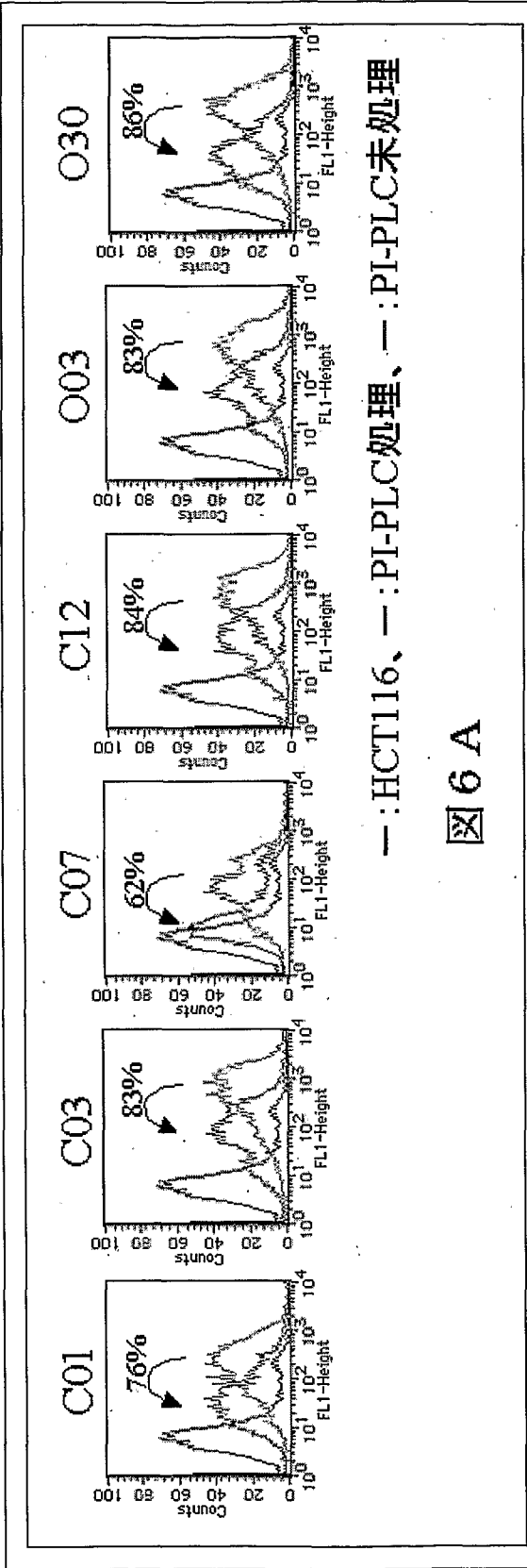


図 6 A

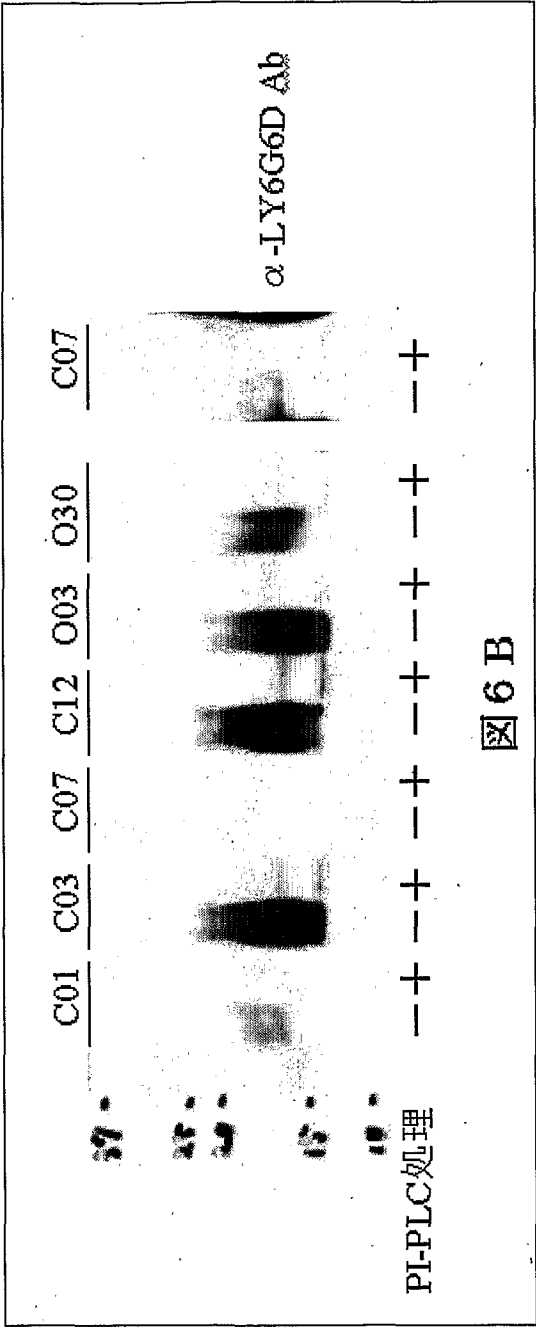


図 6 B

図 7

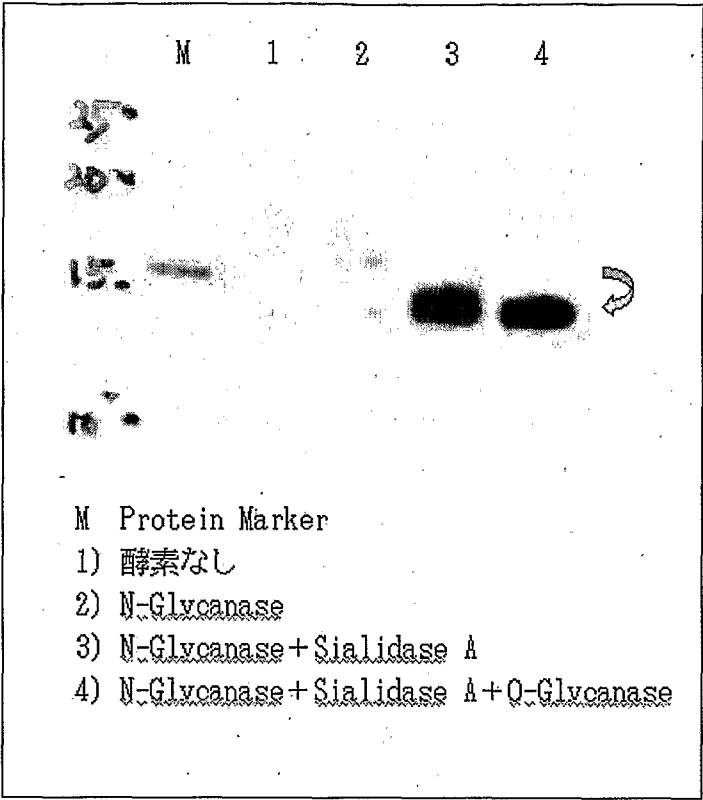
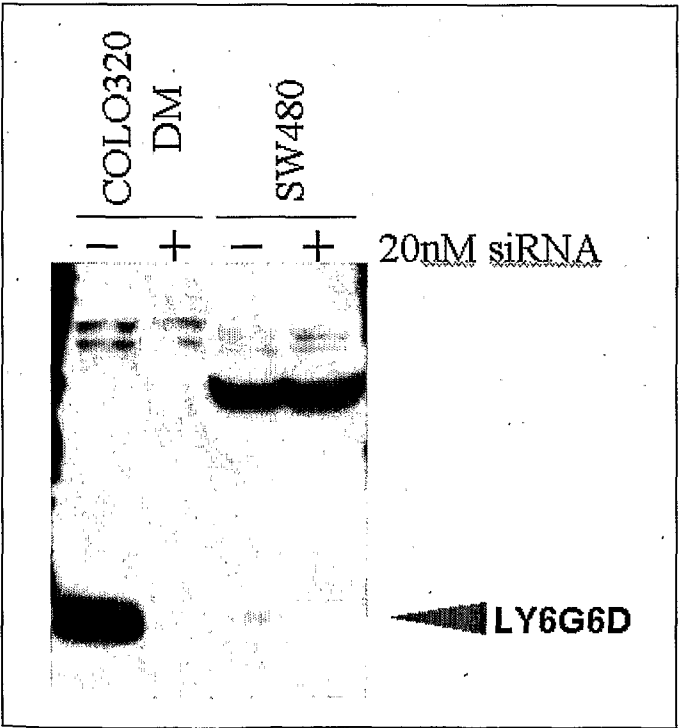


図 8



7/12

図 9

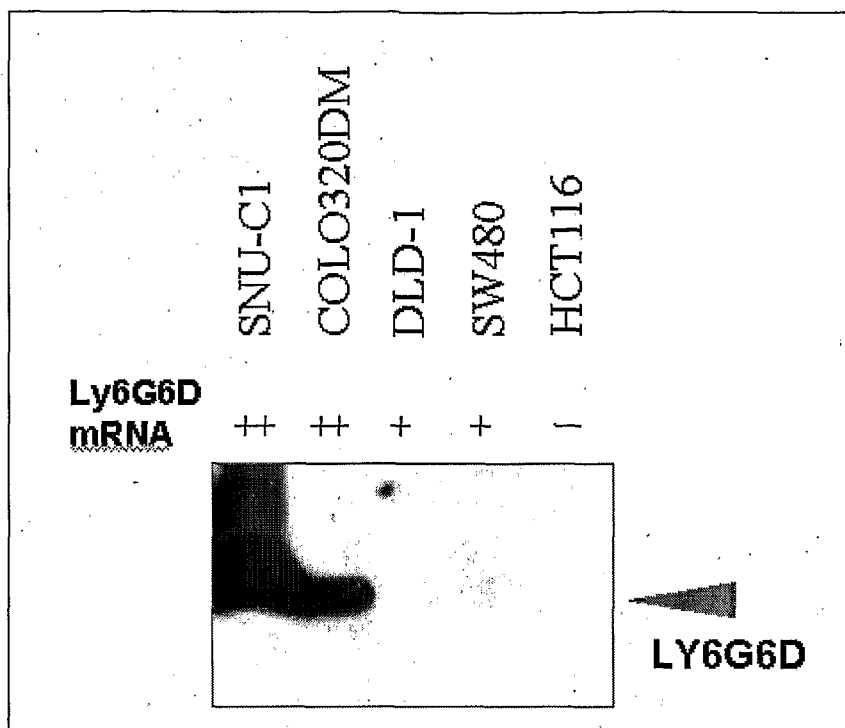
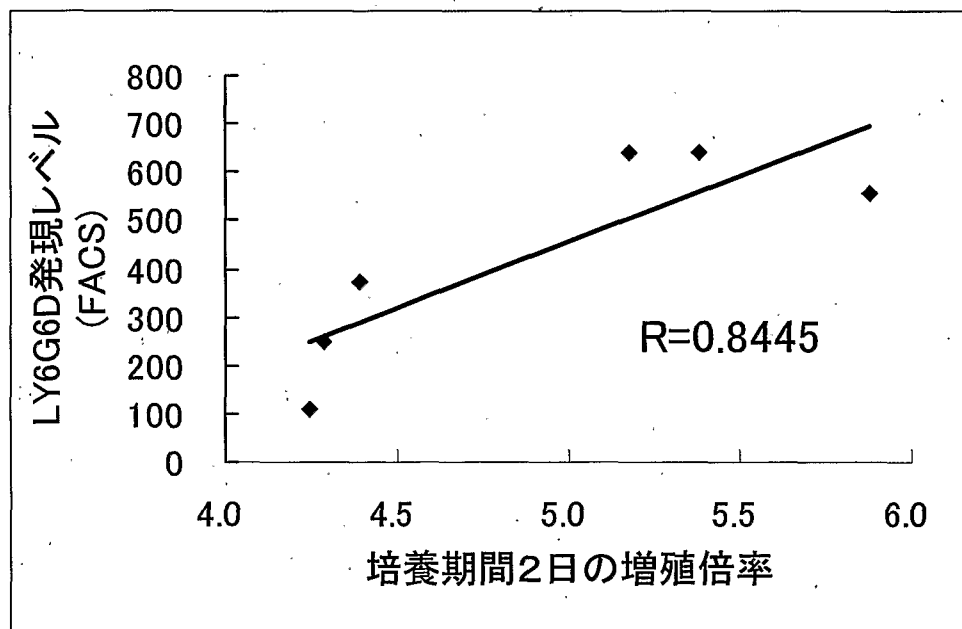


図 10



8/12

図 1 1

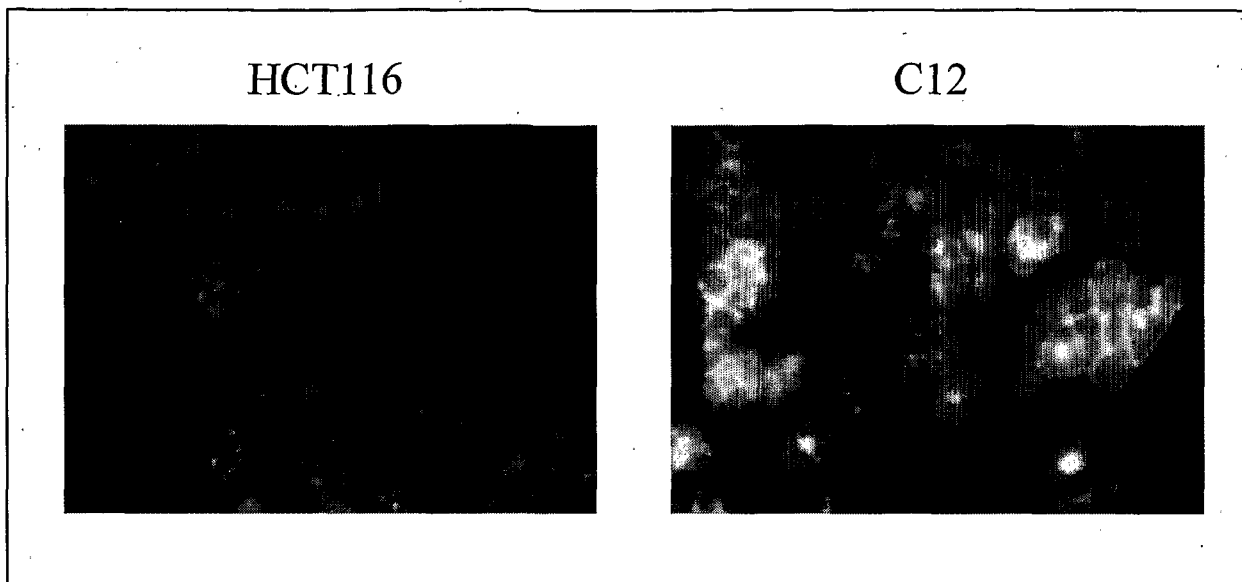
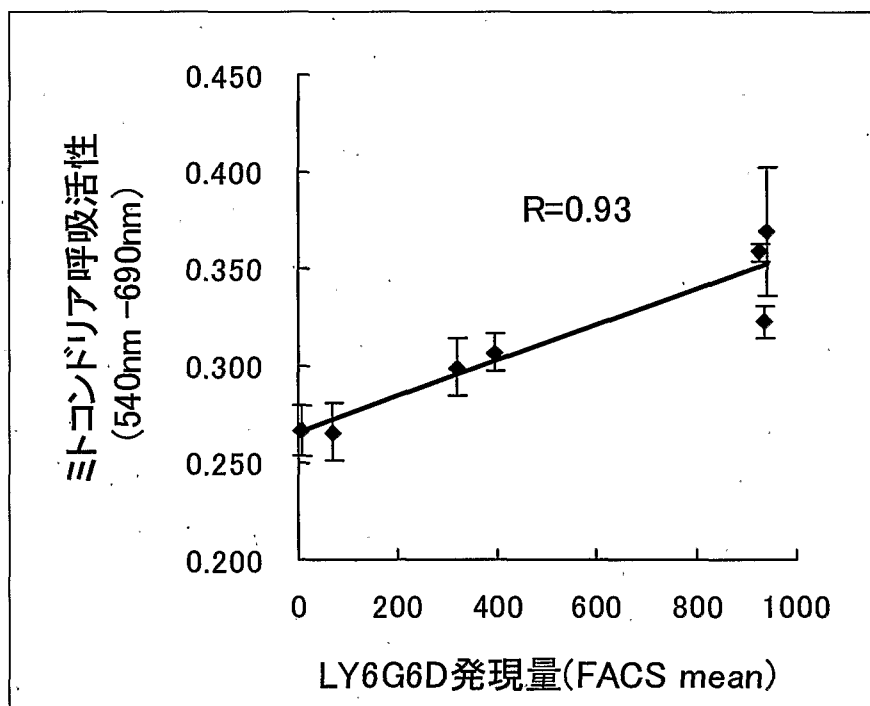


図 1 2



9/12

Figure 13

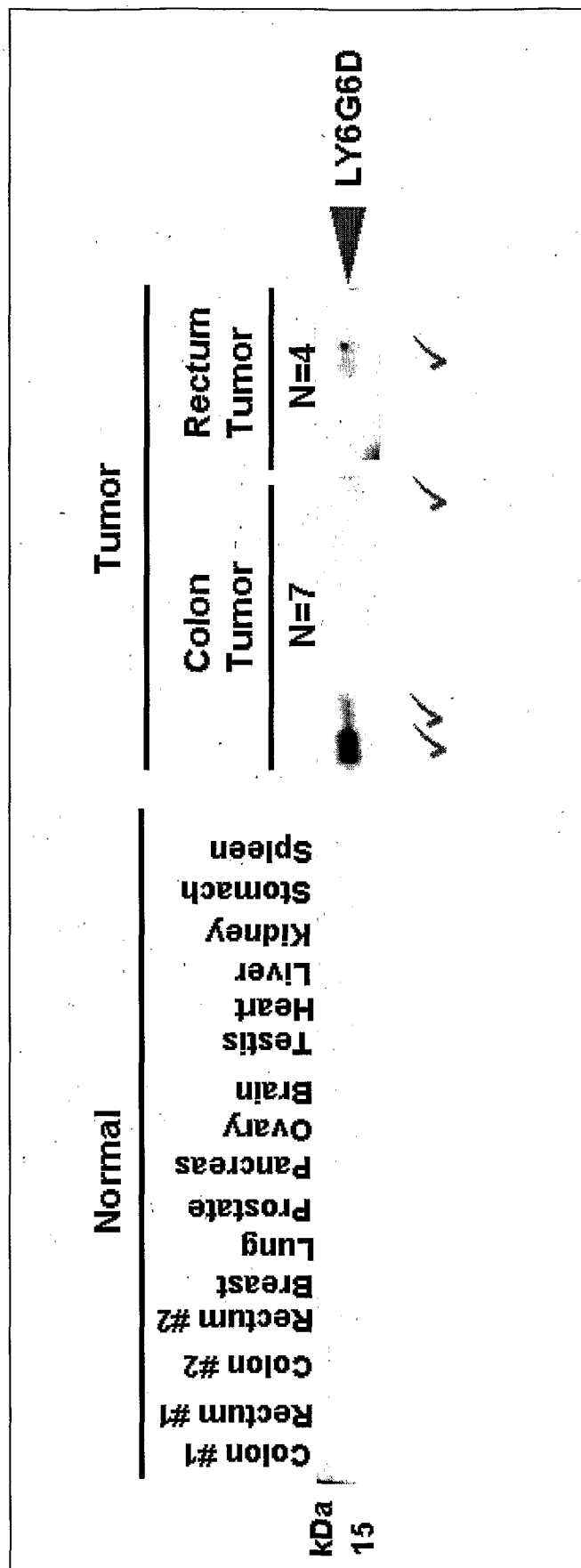
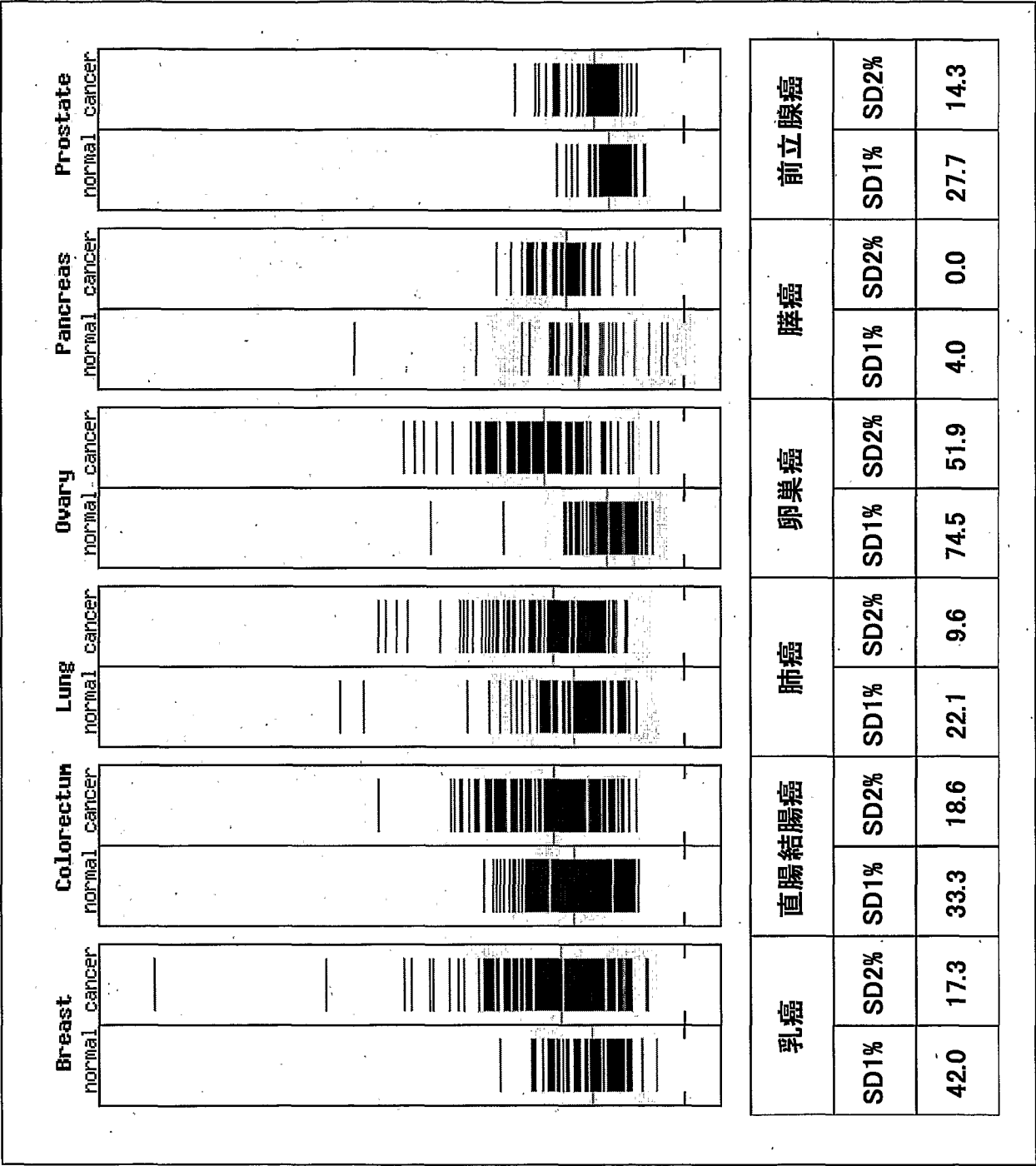


図 14



11/12

図 1 5

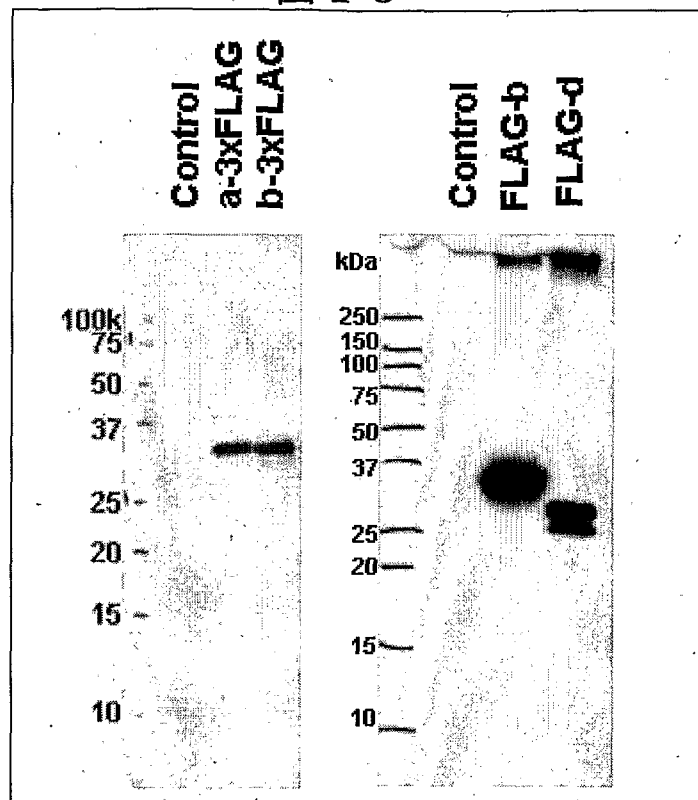
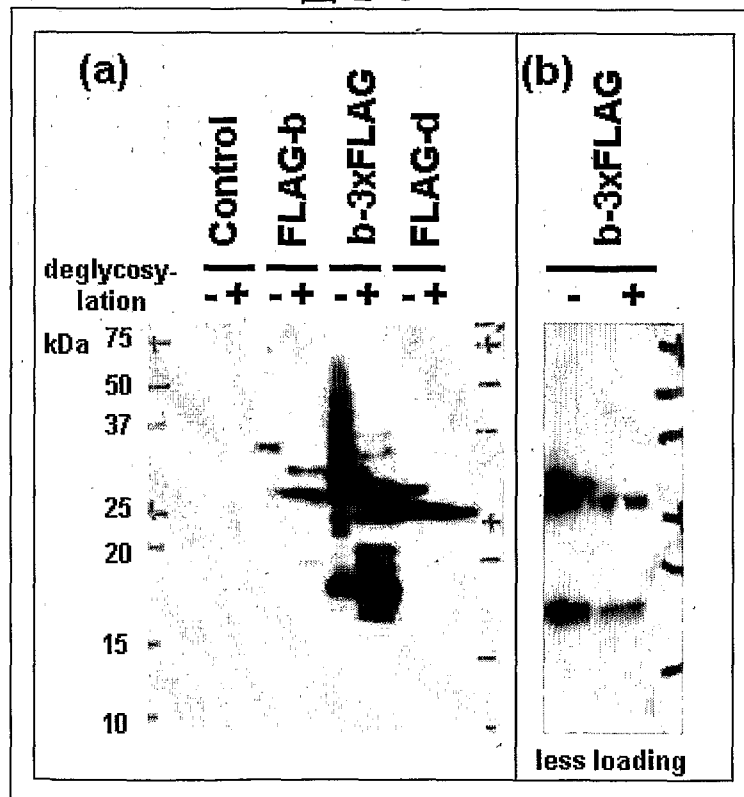


図 1 6



12/12

図 1 7

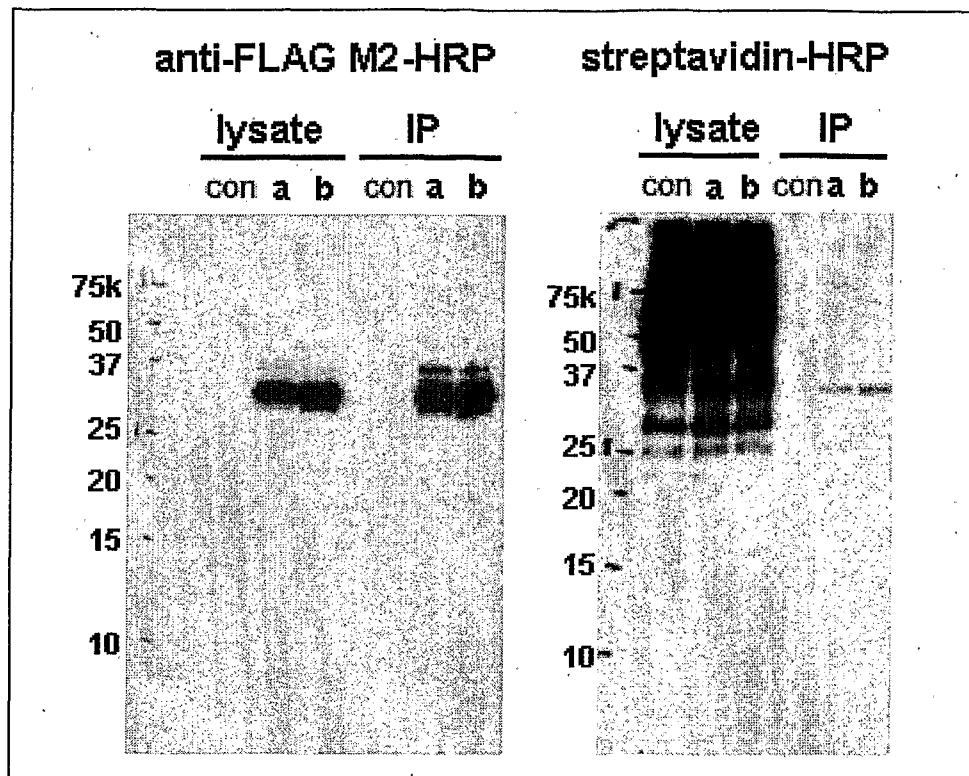
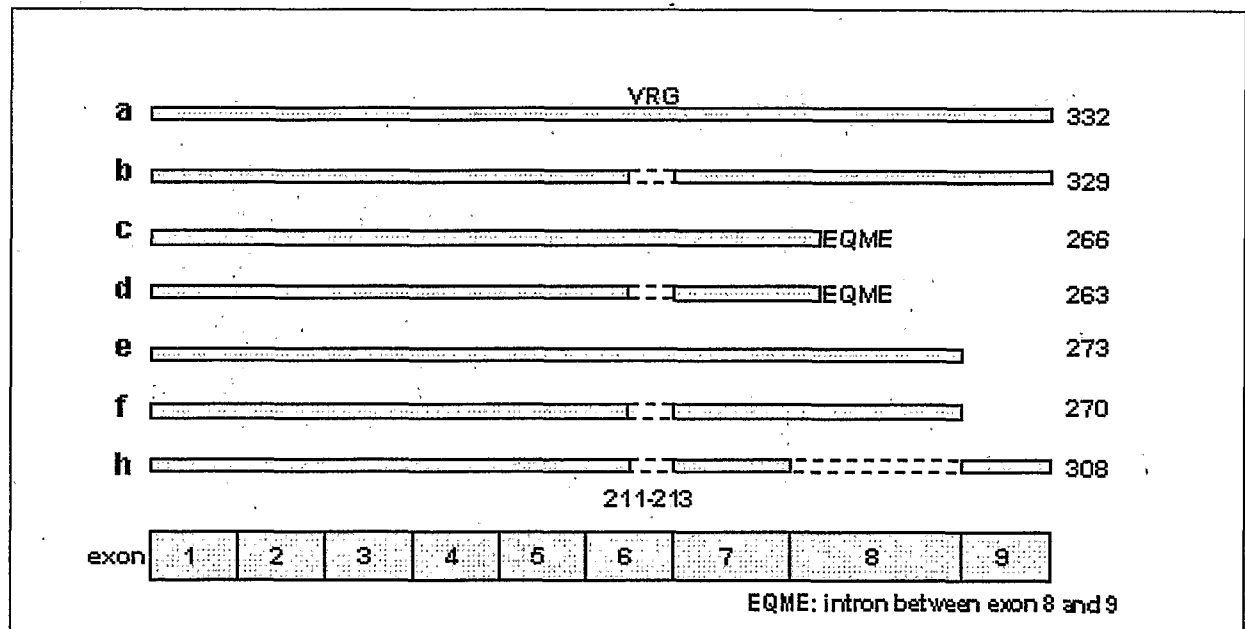


図 1 8



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited

<120> Preventing and Treating Agent for Cancer

<130> 09961

<150> JP 2005-230797

<151> 2005-08-09

<160> 51

<170> PatentIn version 3.2

$\langle 210 \rangle$ 1

399 <211>

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1).. (399)

 $\langle 400 \rangle$ 1

atg aaa ccc cag ttt gtt ggg atc ttg ctc agc tcc ctg cta ggg gct 48
Met Lys Pro Gln Phe Val Gly Ile Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

gcc ttg gga aac cga atg cgg tgc tac aac tgt ggt gga agc ccc agc 96
Ala Leu Gly Asn Arg Met Arg Cys Tyr Asn Cys Gly Gly Ser Pro Ser
20 25 30

agt tct tgc aaa gag gcc gtg acc acc tgt ggc gag ggc aga ccc cag 144
 Ser Ser Cys Lys Glu Ala Val Thr Thr Cys Gly Glu Gly Arg Pro Gln
 35 40 45

cca ggc ctg gaa cag atc aag cta cct gga aac ccc cca gtg acc ttg 192
Pro Gly Leu Glu Gln Ile Lys Leu Pro Gly Asn Pro Pro Val Thr Leu

50

60

gga ctg tgg agc gga 399
Gly Leu Trp Ser Gly
130

$\langle 400 \rangle$ 2

Ser Ser Cys Lys Glu Ala Val Thr Thr Cys Gly Glu Gly Arg Pro Gln
35 40 45

3/59

Pro Gly Leu Glu Gln Ile Lys Leu Pro Gly Asn Pro Pro Val Thr Leu
 50 55 60

Ile His Gln His Pro Ala Cys Val Ala Ala His His Cys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Ser Val Gly Asp Val Thr Tyr Pro Ala His Arg Asp Cys
 85 90 95

Tyr Leu Gly Asp Leu Cys Asn Ser Ala Val Ala Ser His Val Ala Pro
 100 105 110

Ala Gly Ile Leu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Leu Trp Ser Gly
 130

<210> 3
 <211> 3648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3648)

<400> 3

atg ggg cac ctg ccc acg ggg ata cac ggc gcc cgc cgc ctc ctg cct
 Met Gly His Leu Pro Thr Gly Ile His Gly Ala Arg Arg Leu Leu Pro
 1 5 10 15

48

4/59

ctg ctc tgg ctc ttt gtg ctg ttc aag aat gct aca gct ttc cat gta	96
Leu Leu Trp Leu Phe Val Leu Phe Lys Asn Ala Thr Ala Phe His Val	
20 25 30	
act gtc caa gat gat aat aac atc gtt gtc tca tta gaa gct tca gac	144
Thr Val Gln Asp Asp Asn Asn Ile Val Val Ser Leu Glu Ala Ser Asp	
35 40 45	
gtc atc agt cca gca tct gtg tat gtt gtg aag ata act ggt gaa tcc	192
Val Ile Ser Pro Ala Ser Val Tyr Val Val Lys Ile Thr Gly Glu Ser	
50 55 60	
aaa aat tat ttc ttc gaa ttt gag gaa ttc aac agc act ttg cct cct	240
Lys Asn Tyr Phe Phe Glu Phe Glu Glu Phe Asn Ser Thr Leu Pro Pro	
65 70 75 80	
cct gtt att ttc aag gcc agt tat cat ggc ctt tat tat ata atc act	288
Pro Val Ile Phe Lys Ala Ser Tyr His Gly Leu Tyr Tyr Ile Ile Thr	
85 90 95	
ctg gta gtg gta aat gga aat gtg gtg acc aag cca tcc aga tca atc	336
Leu Val Val Val Asn Gly Asn Val Val Thr Lys Pro Ser Arg Ser Ile	
100 105 110	
act gtg tta aca aaa cct cta cct gta acc agt gtt tcc ata tat gac	384
Thr Val Leu Thr Lys Pro Leu Pro Val Thr Ser Val Ser Ile Tyr Asp	
115 120 125	
tat aaa cct tct cct gaa aca gga gtc ctg ttt gaa ata cat tat cca	432
Tyr Lys Pro Ser Pro Glu Thr Gly Val Leu Phe Glu Ile His Tyr Pro	
130 135 140	
gaa aaa tat aac gtt ttc aca aga gtg aac att agc tac tgg gaa ggt	480
Glu Lys Tyr Asn Val Phe Thr Arg Val Asn Ile Ser Tyr Trp Glu Gly	
145 150 155 160	
aaa gac ttc cgg aca atg cta tat aaa gat ttc ttt aag gga aaa aca	528
Lys Asp Phe Arg Thr Met Leu Tyr Lys Asp Phe Phe Lys Gly Lys Thr	
165 170 175	

5/59

gta ttt aat cac tgg ctg cca gga atg tgt tat agt aat atc acc ttt	576
Val Phe Asn His Trp Leu Pro Gly Met Cys Tyr Ser Asn Ile Thr Phe	
180 185 190	
cag ctg gta tct gag gca act ttt aat aaa agt acc ctt gtt gag tac	624
Gln Leu Val Ser Glu Ala Thr Phe Asn Lys Ser Thr Leu Val Glu Tyr	
195 200 205	
agt ggt gtc agt cac gaa ccc aaa cag cac aga act gcc cct tat cca	672
Ser Gly Val Ser His Glu Pro Lys Gln His Arg Thr Ala Pro Tyr Pro	
210 215 220	
cct caa aat att tcc gtt cgt atc gta aac ttg aac aaa aac aac tgg	720
Pro Gln Asn Ile Ser Val Arg Ile Val Asn Leu Asn Lys Asn Asn Trp	
225 230 235 240	
gaa gaa cag agt ggc aat ttc cca gaa gaa tcc ttc atg aga tca caa	768
Glu Glu Gln Ser Gly Asn Phe Pro Glu Glu Ser Phe Met Arg Ser Gln	
245 250 255	
gat aca ata gga aaa gaa aaa ctc ttc cat ttt aca gaa gaa acc cct	816
Asp Thr Ile Gly Lys Glu Lys Leu Phe His Phe Thr Glu Glu Thr Pro	
260 265 270	
gaa att ccc tcg ggc aac att tct tcc ggt tgg cct gat ttt aat agc	864
Glu Ile Pro Ser Gly Asn Ile Ser Ser Gly Trp Pro Asp Phe Asn Ser	
275 280 285	
agt gac tat gaa act acg tct cag cca tat tgg tgg gac agt gca tct	912
Ser Asp Tyr Glu Thr Thr Ser Gln Pro Tyr Trp Trp Asp Ser Ala Ser	
290 295 300	
gca gct cct gaa agt gaa gat gaa ttt gtc agc gta ctt ccc atg gaa	960
Ala Ala Pro Glu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ser Val Leu Pro Met Glu	
305 310 315 320	
tac gaa aat aac agt aca ctc agt gag aca gag aag tca aca tca ggc	1008
Tyr Glu Asn Asn Ser Thr Leu Ser Glu Thr Glu Lys Ser Thr Ser Gly	
325 330 335	

6/59

tct ttc tcc ttt ttc cct gtg caa atg ata ttg acc tgg tta cca ccc	1056
Ser Phe Ser Phe Phe Pro Val Gln Met Ile Leu Thr Trp Leu Pro Pro	
340 345 350	
aaa cca ccc act gct ttt gat ggg ttc cat atc cat att gaa cga gaa	1104
Lys Pro Pro Thr Ala Phe Asp Gly Phe His Ile His Ile Glu Arg Glu	
355 360 365	
gag aac ttt act gaa tat ttg atg gtg gat gaa gaa gca cat gaa ttt	1152
Glu Asn Phe Thr Glu Tyr Leu Met Val Asp Glu Glu Ala His Glu Phe	
370 375 380	
gtt gca gaa ctg aag gaa cct ggg aaa tat aag tta tct gtg aca acc	1200
Val Ala Glu Leu Lys Glu Pro Gly Lys Tyr Lys Leu Ser Val Thr Thr	
385 390 395 400	
ttt agt tcc tca gga tct tgt gaa act cga aaa agt cag tca gca aaa	1248
Phe Ser Ser Ser Gly Ser Cys Glu Thr Arg Lys Ser Gln Ser Ala Lys	
405 410 415	
tca ctc agc ttt tat atc agt cct tca gga gag tgg att gaa gaa ctg	1296
Ser Leu Ser Phe Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Glu Trp Ile Glu Glu Leu	
420 425 430	
acc gag aag ccg cag cac gtg agt gtc cac gtt tta agc tca acc act	1344
Thr Glu Lys Pro Gln His Val Ser Val His Val Leu Ser Ser Thr Thr	
435 440 445	
gcc ttg atg tcc tgg aca tct tcc caa gag aac tac aac agc acc att	1392
Ala Leu Met Ser Trp Thr Ser Ser Gln Glu Asn Tyr Asn Ser Thr Ile	
450 455 460	
gtg tct gtg gtg tcg ctg acc tgc cag aaa caa aag gag agc cag agg	1440
Val Ser Val Val Ser Leu Thr Cys Gln Lys Gln Lys Glu Ser Gln Arg	
465 470 475 480	
ctt gaa aag cag tac tgc act cag gtg aac tca agc aaa cct att att	1488
Leu Glu Lys Gln Tyr Cys Thr Gln Val Asn Ser Ser Lys Pro Ile Ile	
485 490 495	

7/59

gaa aat ctg gtt cct ggt gcc cag tac cag gtt gta ata tac cta agg	1536
Glu Asn Leu Val Pro Gly Ala Gln Tyr Gln Val Val Ile Tyr Leu Arg	
500 505 510	
aaa ggc cct ttg att gga cca cct tca gat cct gtg aca ttt gct att	1584
Lys Gly Pro Leu Ile Gly Pro Pro Ser Asp Pro Val Thr Phe Ala Ile	
515 520 525	
gtt ccc aca gga ata aag gat tta atg ctc tat cct ttg ggt cct acg	1632
Val Pro Thr Gly Ile Lys Asp Leu Met Leu Tyr Pro Leu Gly Pro Thr	
530 535 540	
gcc gtg gtt ctg agc tgg acc aga cct tat tta ggc gtg ttc aga aaa	1680
Ala Val Val Leu Ser Trp Thr Arg Pro Tyr Leu Gly Val Phe Arg Lys	
545 550 555 560	
tac gtg gtt gaa atg ttt tat ttc aac cct gct aca atg aca tca gag	1728
Tyr Val Val Glu Met Phe Tyr Phe Asn Pro Ala Thr Met Thr Ser Glu	
565 570 575	
tgg acc acc tac tat gaa ata gca gca act gtt tcc tta act gca tcc	1776
Trp Thr Thr Tyr Tyr Glu Ile Ala Ala Thr Val Ser Leu Thr Ala Ser	
580 585 590	
gtg aga ata gct aat ctg ctg cca gca tgg tac tac aac ttc cgg gtt	1824
Val Arg Ile Ala Asn Leu Leu Pro Ala Trp Tyr Tyr Asn Phe Arg Val	
595 600 605	
acc atg gtg acg tgg gga gat cca gaa ttg agc tgc tgt gac agc tct	1872
Thr Met Val Thr Trp Gly Asp Pro Glu Leu Ser Cys Cys Asp Ser Ser	
610 615 620	
acc atc agc ttc ata aca gcc cca gtg gct ccg gaa atc act tct gtg	1920
Thr Ile Ser Phe Ile Thr Ala Pro Val Ala Pro Glu Ile Thr Ser Val	
625 630 635 640	
gaa tat ttc aac agt ctg tta tat atc agt tgg aca tat ggg gat gat	1968
Glu Tyr Phe Asn Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Trp Thr Tyr Gly Asp Asp	
645 650 655	

8/59

aca acg gac ttg tcc cat tct aga atg ctt cac tgg atg gtg gtt gca	2016
Thr Thr Asp Leu Ser His Ser Arg Met Leu His Trp Met Val Val Ala	
660 665 670	
gaa gga aaa aag aaa att aaa aag agt gta aca cgc aat gtc atg act	2064
Glu Gly Lys Lys Lys Ile Lys Lys Ser Val Thr Arg Asn Val Met Thr	
675 680 685	
gca att ctc agc ttg cct cca ggc gac atc tat aac ctc tca gta act	2112
Ala Ile Leu Ser Leu Pro Pro Gly Asp Ile Tyr Asn Leu Ser Val Thr	
690 695 700	
gct tgt act gaa aga gga agt aat acc tcc atg ctc cgc ctt gtc aag	2160
Ala Cys Thr Glu Arg Gly Ser Asn Thr Ser Met Leu Arg Leu Val Lys	
705 710 715 720	
cta gaa cca gct cca ccc aaa tca ctc ttc gca gtg aac aaa acc cag	2208
Leu Glu Pro Ala Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ala Val Asn Lys Thr Gln	
725 730 735	
act tca gtg act ttg ctg tgg gtg gaa gag gga gta gct gat ttc ttt	2256
Thr Ser Val Thr Leu Leu Trp Val Glu Glu Gly Val Ala Asp Phe Phe	
740 745 750	
gaa gtt ttc tgt caa caa gtt ggc tcc agt cag aaa acc aaa ctt cag	2304
Glu Val Phe Cys Gln Gln Val Gly Ser Ser Gln Lys Thr Lys Leu Gln	
755 760 765	
gaa cca gtt gct gtt tct tcc cat gtc gtg acc atc tcc agc ctt ctt	2352
Glu Pro Val Ala Val Ser Ser His Val Val Thr Ile Ser Ser Leu Leu	
770 775 780	
cct gcc act gcc tac aat tgt agt gtc acc agc ttt agc cat gac agc	2400
Pro Ala Thr Ala Tyr Asn Cys Ser Val Thr Ser Phe Ser His Asp Ser	
785 790 795 800	
ccc agt gtc cct acg ttc ata gcc gtc tca aca atg gtt aca gag atg	2448
Pro Ser Val Pro Thr Phe Ile Ala Val Ser Thr Met Val Thr Glu Met	
805 810 815	

9/59

aat ccc aat gtg gta gtg atc tcc gtg ctg gcc atc ctt agc aca ctt	2496
Asn Pro Asn Val Val Val Ile Ser Val Leu Ala Ile Leu Ser Thr Leu	
820 825 830	
tta att gga ctg ttg ctt gtt acc ctc att att ctt agg aaa aag cat	2544
Leu Ile Gly Leu Leu Leu Val Thr Leu Ile Ile Leu Arg Lys Lys His	
835 840 845	
ctg cag atg gct agg gag tgt gga gct ggt aca ttt gtc aat ttt gca	2592
Leu Gln Met Ala Arg Glu Cys Gly Ala Gly Thr Phe Val Asn Phe Ala	
850 855 860	
tcc tta gag agg gat gga aag ctt cca tac aac tgg cgt agg agt ata	2640
Ser Leu Glu Arg Asp Gly Lys Leu Pro Tyr Asn Trp Arg Arg Ser Ile	
865 870 875 880	
ttt gct ttc tta acc ctg cta ccc tca tgt ctt tgg act gat tat ctt	2688
Phe Ala Phe Leu Thr Leu Leu Pro Ser Cys Leu Trp Thr Asp Tyr Leu	
885 890 895	
ttg gca ttt tat att aat cct tgg agt aaa aat ggt tta aag aag agg	2736
Leu Ala Phe Tyr Ile Asn Pro Trp Ser Lys Asn Gly Leu Lys Lys Arg	
900 905 910	
aaa ctg aca aac ccg gtt caa ctg gat gac ttt gat gcc tat att aag	2784
Lys Leu Thr Asn Pro Val Gln Leu Asp Asp Phe Asp Ala Tyr Ile Lys	
915 920 925	
gat atg gcc aaa gac tct gac tat aaa ttt tct ctt cag ttt gag gag	2832
Asp Met Ala Lys Asp Ser Asp Tyr Lys Phe Ser Leu Gln Phe Glu Glu	
930 935 940	
ttg aaa ttg att gga ctg gat atc cca cac ttt gct gca gat ctt cca	2880
Leu Lys Leu Ile Gly Leu Asp Ile Pro His Phe Ala Ala Asp Leu Pro	
945 950 955 960	
ctg aat cga tgt aaa aac cgt tac aca aac atc cta cca tat gac ttc	2928
Leu Asn Arg Cys Lys Asn Arg Tyr Thr Asn Ile Leu Pro Tyr Asp Phe	
965 970 975	

10/59

agc cgt gtg aga tta gtc tcc atg aat gaa gag gaa ggt gca gac tac	2976
Ser Arg Val Arg Leu Val Ser Met Asn Glu Glu Glu Gly Ala Asp Tyr	
980 985 990	
atc aat gcc aac tat att cct gga tac aac tca ccc cag gag tat att	3024
Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Pro Gly Tyr Asn Ser Pro Gln Glu Tyr Ile	
995 1000 1005	
gcc acc cag ggg cca ctg cct gaa acc aga aat gac ttc tgg aag	3069
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Arg Asn Asp Phe Trp Lys	
1010 1015 1020	
atg gtc ctg caa caa aag tct cag att att gtc atg ctc act cag	3114
Met Val Leu Gln Gln Lys Ser Gln Ile Ile Val Met Leu Thr Gln	
1025 1030 1035	
tgt aat gag aaa agg agg gtg aaa tgt gac cat tac tgg cca ttc	3159
Cys Asn Glu Lys Arg Arg Val Lys Cys Asp His Tyr Trp Pro Phe	
1040 1045 1050	
acg gaa gaa cct ata gcc tat gga gac atc act gtg gag atg att	3204
Thr Glu Glu Pro Ile Ala Tyr Gly Asp Ile Thr Val Glu Met Ile	
1055 1060 1065	
tca gag gaa gag cag gac gac tgg gcc tgt aga cac ttc cgg atc	3249
Ser Glu Glu Glu Gln Asp Asp Trp Ala Cys Arg His Phe Arg Ile	
1070 1075 1080	
aac tat gct gac gag atg cag gat gtg atg cat ttt aac tac act	3294
Asn Tyr Ala Asp Glu Met Gln Asp Val Met His Phe Asn Tyr Thr	
1085 1090 1095	
gca tgg cct gat cat ggt gtg ccc aca gca aat gct gca gaa agt	3339
Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ser	
1100 1105 1110	
atc ctg cag ttt gta cac atg gtc cga cag caa gct acc aag agc	3384
Ile Leu Gln Phe Val His Met Val Arg Gln Gln Ala Thr Lys Ser	
1115 1120 1125	

11/59

aaa ggt ccc atg atc att cac tgc agt gct ggc gtg gga cgg aca 3429
 Lys Gly Pro Met Ile Ile His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr
 1130 1135 1140

gga aca ttc att gcc ctg gac agg ctc ttg cag cac att cgg gat 3474
 Gly Thr Phe Ile Ala Leu Asp Arg Leu Leu Gln His Ile Arg Asp
 1145 1150 1155

cat gag ttt gtt gac atc tta ggg ctg gtg tca gaa atg agg tca 3519
 His Glu Phe Val Asp Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Met Arg Ser
 1160 1165 1170

tac cgg atg tct atg gta cag aca gag gag cag tac att ttt atc 3564
 Tyr Arg Met Ser Met Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Ile Phe Ile
 1175 1180 1185

cat cag tgt gtg caa ctg atg tgg atg aag aag aag cag cag ttc 3609
 His Gln Cys Val Gln Leu Met Trp Met Lys Lys Lys Gln Gln Phe
 1190 1195 1200

tgc atc agt gat gtc ata tac gag aat gtt agc aag tcc 3648
 Cys Ile Ser Asp Val Ile Tyr Glu Asn Val Ser Lys Ser
 1205 1210 1215

<210> 4

<211> 1216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly His Leu Pro Thr Gly Ile His Gly Ala Arg Arg Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Leu Phe Val Leu Phe Lys Asn Ala Thr Ala Phe His Val
 20 25 30

12/59

Thr Val Gln Asp Asp Asn Asn Ile Val Val Ser Leu Glu Ala Ser Asp
 35 40 45

Val Ile Ser Pro Ala Ser Val Tyr Val Val Lys Ile Thr Gly Glu Ser
 50 55 60

Lys Asn Tyr Phe Phe Glu Phe Glu Glu Phe Asn Ser Thr Leu Pro Pro
 65 70 75 80

Pro Val Ile Phe Lys Ala Ser Tyr His Gly Leu Tyr Tyr Ile Ile Thr
 85 90 95

Leu Val Val Val Asn Gly Asn Val Val Thr Lys Pro Ser Arg Ser Ile
 100 105 110

Thr Val Leu Thr Lys Pro Leu Pro Val Thr Ser Val Ser Ile Tyr Asp
 115 120 125

Tyr Lys Pro Ser Pro Glu Thr Gly Val Leu Phe Glu Ile His Tyr Pro
 130 135 140

Glu Lys Tyr Asn Val Phe Thr Arg Val Asn Ile Ser Tyr Trp Glu Gly
 145 150 155 160

Lys Asp Phe Arg Thr Met Leu Tyr Lys Asp Phe Phe Lys Gly Lys Thr
 165 170 175

Val Phe Asn His Trp Leu Pro Gly Met Cys Tyr Ser Asn Ile Thr Phe
 180 185 190

13/59

Gln Leu Val Ser Glu Ala Thr Phe Asn Lys Ser Thr Leu Val Glu Tyr
 195 200 205

Ser Gly Val Ser His Glu Pro Lys Gln His Arg Thr Ala Pro Tyr Pro
 210 215 220

Pro Gln Asn Ile Ser Val Arg Ile Val Asn Leu Asn Lys Asn Asn Trp
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Ser Gly Asn Phe Pro Glu Glu Ser Phe Met Arg Ser Gln
 245 250 255

Asp Thr Ile Gly Lys Glu Lys Leu Phe His Phe Thr Glu Glu Thr Pro
 260 265 270

Glu Ile Pro Ser Gly Asn Ile Ser Ser Gly Trp Pro Asp Phe Asn Ser
 275 280 285

Ser Asp Tyr Glu Thr Thr Ser Gln Pro Tyr Trp Trp Asp Ser Ala Ser
 290 295 300

Ala Ala Pro Glu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ser Val Leu Pro Met Glu
 305 310 315 320

Tyr Glu Asn Asn Ser Thr Leu Ser Glu Thr Glu Lys Ser Thr Ser Gly
 325 330 335

Ser Phe Ser Phe Phe Pro Val Gln Met Ile Leu Thr Trp Leu Pro Pro
 340 345 350

14/59

Lys Pro Pro Thr Ala Phe Asp Gly Phe His Ile His Ile Glu Arg Glu
 355 360 365

Glu Asn Phe Thr Glu Tyr Leu Met Val Asp Glu Glu Ala His Glu Phe
 370 375 380

Val Ala Glu Leu Lys Glu Pro Gly Lys Tyr Lys Leu Ser Val Thr Thr
 385 390 395 400

Phe Ser Ser Ser Gly Ser Cys Glu Thr Arg Lys Ser Gln Ser Ala Lys
 405 410 415

Ser Leu Ser Phe Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Glu Trp Ile Glu Glu Leu
 420 425 430

Thr Glu Lys Pro Gln His Val Ser Val His Val Leu Ser Ser Thr Thr
 435 440 445

Ala Leu Met Ser Trp Thr Ser Ser Gln Glu Asn Tyr Asn Ser Thr Ile
 450 455 460

Val Ser Val Val Ser Leu Thr Cys Gln Lys Gln Lys Glu Ser Gln Arg
 465 470 475 480

Leu Glu Lys Gln Tyr Cys Thr Gln Val Asn Ser Ser Lys Pro Ile Ile
 485 490 495

Glu Asn Leu Val Pro Gly Ala Gln Tyr Gln Val Val Ile Tyr Leu Arg
 500 505 510

15/59

Lys Gly Pro Leu Ile Gly Pro Pro Ser Asp Pro Val Thr Phe Ala Ile
515 520 525

Val Pro Thr Gly Ile Lys Asp Leu Met Leu Tyr Pro Leu Gly Pro Thr
530 535 540

Ala Val Val Leu Ser Trp Thr Arg Pro Tyr Leu Gly Val Phe Arg Lys
545 550 555 560

Tyr Val Val Glu Met Phe Tyr Phe Asn Pro Ala Thr Met Thr Ser Glu
565 570 575

Trp Thr Thr Tyr Tyr Glu Ile Ala Ala Thr Val Ser Leu Thr Ala Ser
580 585 590

Val Arg Ile Ala Asn Leu Leu Pro Ala Trp Tyr Tyr Asn Phe Arg Val
595 600 605

Thr Met Val Thr Trp Gly Asp Pro Glu Leu Ser Cys Cys Asp Ser Ser
610 615 620

Thr Ile Ser Phe Ile Thr Ala Pro Val Ala Pro Glu Ile Thr Ser Val
625 630 635 640

Glu Tyr Phe Asn Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Trp Thr Tyr Gly Asp Asp
645 650 655

Thr Thr Asp Leu Ser His Ser Arg Met Leu His Trp Met Val Val Ala
660 665 670

16/59

Glu Gly Lys Lys Lys Ile Lys Lys Ser Val Thr Arg Asn Val Met Thr
 675 680 685

Ala Ile Leu Ser Leu Pro Pro Gly Asp Ile Tyr Asn Leu Ser Val Thr
 690 695 700

Ala Cys Thr Glu Arg Gly Ser Asn Thr Ser Met Leu Arg Leu Val Lys
 705 710 715 720

Leu Glu Pro Ala Pro Pro Lys Ser Leu Phe Ala Val Asn Lys Thr Gln
 725 730 735

Thr Ser Val Thr Leu Leu Trp Val Glu Glu Gly Val Ala Asp Phe Phe
 740 745 750

Glu Val Phe Cys Gln Gln Val Gly Ser Ser Gln Lys Thr Lys Leu Gln
 755 760 765

Glu Pro Val Ala Val Ser Ser His Val Val Thr Ile Ser Ser Leu Leu
 770 775 780

Pro Ala Thr Ala Tyr Asn Cys Ser Val Thr Ser Phe Ser His Asp Ser
 785 790 795 800

Pro Ser Val Pro Thr Phe Ile Ala Val Ser Thr Met Val Thr Glu Met
 805 810 815

Asn Pro Asn Val Val Val Ile Ser Val Leu Ala Ile Leu Ser Thr Leu
 820 825 830

17/59

Leu Ile Gly Leu Leu Leu Val Thr Leu Ile Ile Leu Arg Lys Lys His
835 840 845

Leu Gln Met Ala Arg Glu Cys Gly Ala Gly Thr Phe Val Asn Phe Ala
850 855 860

Ser Leu Glu Arg Asp Gly Lys Leu Pro Tyr Asn Trp Arg Arg Ser Ile
865 870 875 880

Phe Ala Phe Leu Thr Leu Leu Pro Ser Cys Leu Trp Thr Asp Tyr Leu
885 890 895

Leu Ala Phe Tyr Ile Asn Pro Trp Ser Lys Asn Gly Leu Lys Lys Arg
900 905 910

Lys Leu Thr Asn Pro Val Gln Leu Asp Asp Phe Asp Ala Tyr Ile Lys
915 920 925

Asp Met Ala Lys Asp Ser Asp Tyr Lys Phe Ser Leu Gln Phe Glu Glu
930 935 940

Leu Lys Leu Ile Gly Leu Asp Ile Pro His Phe Ala Ala Asp Leu Pro
945 950 955 960

Leu Asn Arg Cys Lys Asn Arg Tyr Thr Asn Ile Leu Pro Tyr Asp Phe
965 970 975

Ser Arg Val Arg Leu Val Ser Met Asn Glu Glu Glu Gly Ala Asp Tyr
980 985 990

18/59

Ile Asn Ala Asn Tyr Ile Pro Gly Tyr Asn Ser Pro Gln Glu Tyr Ile
995 1000 1005

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Pro Glu Thr Arg Asn Asp Phe Trp Lys
1010 1015 1020

Met Val Leu Gln Gln Lys Ser Gln Ile Ile Val Met Leu Thr Gln
1025 1030 1035

Cys Asn Glu Lys Arg Arg Val Lys Cys Asp His Tyr Trp Pro Phe
1040 1045 1050

Thr Glu Glu Pro Ile Ala Tyr Gly Asp Ile Thr Val Glu Met Ile
1055 1060 1065

Ser Glu Glu Glu Gln Asp Asp Trp Ala Cys Arg His Phe Arg Ile
1070 1075 1080

Asn Tyr Ala Asp Glu Met Gln Asp Val Met His Phe Asn Tyr Thr
1085 1090 1095

Ala Trp Pro Asp His Gly Val Pro Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ser
1100 1105 1110

Ile Leu Gln Phe Val His Met Val Arg Gln Gln Ala Thr Lys Ser
1115 1120 1125

Lys Gly Pro Met Ile Ile His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr
1130 1135 1140

19/59

Gly Thr Phe Ile Ala Leu Asp Arg Leu Leu Gln His Ile Arg Asp
 1145 1150 1155

His Glu Phe Val Asp Ile Leu Gly Leu Val Ser Glu Met Arg Ser
 1160 1165 1170

Tyr Arg Met Ser Met Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Ile Phe Ile
 1175 1180 1185

His Gln Cys Val Gln Leu Met Trp Met Lys Lys Lys Gln Gln Phe
 1190 1195 1200

Cys Ile Ser Asp Val Ile Tyr Glu Asn Val Ser Lys Ser
 1205 1210 1215

<210> 5
 <211> 996
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(996)

<400> 5
 atg ccc ggc aag cac cag cat ttc cag gaa cct gag gtc ggc tgc tgc 48
 Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15
 ggg aaa tac ttc ctg ttt ggc ttc aac att gtc ttc tgg gtg ctg gga 96
 Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

20/59

gcc ctg ttc ctg gct atc ggc ctc tgg gcc tgg ggt gag aag ggc gtt	144
Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val	
35 40 45	
ctc tcg aac atc tca gcg ctg aca gat ctg gga ggc ctt gac ccc gtg	192
Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val	
50 55 60	
tgg ctg ttt gtg gta gtt gga ggc gtc atg tcg gtg ctg ggc ttt gct	240
Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala	
65 70 75 80	
ggc tgc att ggg gcc ctc cgg gag aac acc ttc ctg ctc aag ttt ttc	288
Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Gly Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe	
85 90 95	
tcc gtg ttc ctc ggt ctc atc ttc ttc ctg gag ctg gca aca ggg atc	336
Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile	
100 105 110	
ctg gcc ttt gtc ttc aag gac tgg att cga gac cag ctc aac ctc ttc	384
Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe	
115 120 125	
atc aac aac aac gtc aag gcc tac cgg gac gac att gac ctc cag aac	432
Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn	
130 135 140	
ctc att gac ttt gct cag gaa tac tgg tct tgc tgc gga gcc cga ggc	480
Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly	
145 150 155 160	
ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac	528
Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn	
165 170 175	
ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac	576
Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp	
180 185 190	

21/59

cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc 624
 Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

aaa ctg gtg aga ggg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa 672
 Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys
 210 215 220

ggc tgc gtg ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg 720
 Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val
 225 230 235 240

gtg gcg gga gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag atc ttt ggc atc 768
 Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile
 245 250 255

tgc ctg gcc cag aac ctc gtg agt gac atc aag gca gtg aaa gcc aac 816
 Cys Leu Ala Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn
 260 265 270

tgg agc aaa tgg aat gat gac ttt gaa aac cac tgg ctt acg ccc acc 864
 Trp Ser Lys Trp Asn Asp Asp Phe Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr
 275 280 285

att tcc gag gtc ctg tcc acg gcg ggg cct cag cag aac tct ctg act 912
 Ile Ser Glu Val Leu Ser Thr Ala Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr
 290 295 300

ggg gcc cct ggc ccg gcc cca ccc agc cga cat gtt ttc ttt ggc ctg 960
 Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu
 305 310 315 320

ggt ggt tta tac cct gag cca acc ttt aaa aat tgg 996
 Gly Gly Leu Tyr Pro Glu Pro Thr Phe Lys Asn Trp
 325 330

<210> 6

<211> 332

<212> PRT

22/59

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

23/59

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
 165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
 180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys
 210 215 220

Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val
 225 230 235 240

Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile
 245 250 255

Cys Leu Ala Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn
 260 265 270

Trp Ser Lys Trp Asn Asp Asp Phe Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr
 275 280 285

Ile Ser Glu Val Leu Ser Thr Ala Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr
 290 295 300

24/59

Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu
 305 310 315 320

Gly Gly Leu Tyr Pro Glu Pro Thr Phe Lys Asn Trp
 325 330

<210> 7
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(987)

<400> 7
 atg ccc ggc aag cac cag cat ttc cag gaa cct gag gtc ggc tgc tgc 48
 Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15
 ggg aaa tac ttc ctg ttt ggc ttc aac att gtc ttc tgg gtg ctg gga 96
 Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30
 gcc ctg ttc ctg gct atc ggc ctc tgg gcc tgg ggt gag aag ggc gtt 144
 Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45
 ctc tcg aac atc tca gcg ctg aca gat ctg gga ggc ctt gac ccc gtg 192
 Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60
 tgg ctg ttt gtg gta gtt gga ggc gtc atg tcg gtg ctg ggc ttt gct 240
 Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80
 ggc tgc att ggg gcc ctc cgg gag aac acc ttc ctg ctc aag ttt ttc 288

25/59

Gly	Cys	Ile	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Phe	Leu	Leu	Lys	Phe	Phe		
				85					90					95			
tcc	gtg	ttc	ctc	ggt	ctc	atc	ttc	ttc	ctg	gag	ctg	gca	aca	ggg	atc	336	
Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ile		
			100				105						110				
ctg	gcc	ttt	gtc	ttc	aag	gac	tgg	att	cga	gac	cag	ctc	aac	ctc	ttc	384	
Leu	Ala	Phe	Val	Phe	Lys	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Gln	Leu	Asn	Leu	Phe		
			115				120					125					
atc	aac	aac	aac	gtc	aag	gcc	tac	cgg	gac	gac	att	gac	ctc	cag	aac	432	
Ile	Asn	Asn	Asn	Val	Lys	Ala	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn		
	130					135					140						
ctc	att	gac	ttt	gct	cag	gaa	tac	tgg	tct	tgc	tgc	gga	gcc	cga	ggc	480	
Leu	Ile	Asp	Phe	Ala	Gln	Glu	Tyr	Trp	Ser	Cys	Cys	Gly	Ala	Arg	Gly		
145					150					155					160		
ccc	aat	gac	tgg	aac	ctc	aat	atc	tac	ttc	aac	tgc	act	gac	ttg	aac	528	
Pro	Asn	Asp	Trp	Asn	Leu	Asn	Ile	Tyr	Phe	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu	Asn		
				165				170						175			
ccc	agc	cgg	gag	cgc	tgc	ggg	gtg	ccc	ttc	tcc	tgc	tgc	gtc	agg	gac	576	
Pro	Ser	Arg	Glu	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Phe	Ser	Cys	Cys	Val	Arg	Asp		
			180					185					190				
cct	gcg	gag	gat	gtc	ctc	aac	acc	cag	tgt	ggc	tac	gac	gtc	cgg	ctc	624	
Pro	Ala	Glu	Asp	Val	Leu	Asn	Thr	Gln	Cys	Gly	Tyr	Asp	Val	Arg	Leu		
			195				200					205					
aaa	ctg	gag	ctg	gag	cag	cag	ggc	ttc	atc	cac	acc	aaa	ggc	tgc	gtg	672	
Lys	Leu	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Gly	Phe	Ile	His	Thr	Lys	Gly	Cys	Val		
	210					215					220						
ggc	cag	ttt	gag	aag	tgg	ctg	cag	gac	aac	ctg	att	gtg	gtg	gcg	gga	720	
Gly	Gln	Phe	Glu	Lys	Trp	Leu	Gln	Asp	Asn	Leu	Ile	Val	Val	Ala	Gly		
225					230				235					240			
gtc	ttc	atg	ggc	atc	gcc	ctc	ctc	cag	atc	ttt	ggc	atc	tgc	ctg	gcc	768	

26/59

Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

cag aac ctc gtg agt gac atc aag gca gtg aaa gcc aac tgg agc aaa 816
 Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn Trp Ser Lys
 260 265 270

tgg aat gat gac ttt gaa aac cac tgg ctt acg ccc acc att tcc gag 864
 Trp Asn Asp Asp Phe Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr Ile Ser Glu
 275 280 285

gtc ctg tcc acg gcg ggg cct cag cag aac tct ctg act ggg gcc cct 912
 Val Leu Ser Thr Ala Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr Gly Ala Pro
 290 295 300

ggc ccg gcc cca ccc agc cga cat gtt ttc ttt ggc ctg ggt ggt tta 960
 Gly Pro Ala Pro Pro Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu Gly Gly Leu
 305 310 315 320

tac cct gag cca acc ttt aaa aat tgg 987
 Tyr Pro Glu Pro Thr Phe Lys Asn Trp
 325

<210> 8
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val

27/59

35

40

45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
145 150 155 160

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu

28/59

195

200

205

Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
 210 215 220

Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
 225 230 235 240

Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn Trp Ser Lys
 260 265 270

Trp Asn Asp Asp Phe Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr Ile Ser Glu
 275 280 285

Val Leu Ser Thr Ala Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr Gly Ala Pro
 290 295 300

Gly Pro Ala Pro Pro Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Tyr Pro Glu Pro Thr Phe Lys Asn Trp
 325

<210> 9

<211> 798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

29/59

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (798)

<400> 9

atg ccc ggc aag cac cag cat ttc cag gaa cct gag gtc ggc tgc tgc	48
Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys	
1 5 10 15	

ggg aaa tac ttc ctg ttt ggc ttc aac att gtc ttc tgg gtg ctg gga	96
Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly	
20 25 30	

gcc ctg ttc ctg gct atc ggc ctc tgg gcc tgg ggt gag aag ggc gtt	144
Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val	
35 40 45	

ctc tcg aac atc tca gcg ctg aca gat ctg gga ggc ctt gac ccc gtg	192
Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val	
50 55 60	

tgg ctg ttt gtg gta gtt gga ggc gtc atg tcg gtg ctg ggc ttt gct	240
Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala	
65 70 75 80	

ggc tgc att ggg gcc ctc cgg gag aac acc ttc ctg ctc aag ttt ttc	288
Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe	
85 90 95	

tcc gtg ttc ctc ggt ctc atc ttc ttc ctg gag ctg gca aca ggg atc	336
Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile	
100 105 110	

ctg gcc ttt gtc ttc aag gac tgg att cga gac cag ctc aac ctc ttc	384
Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe	
115 120 125	

atc aac aac aac gtc aag gcc tac cgg gac gac att gac ctc cag aac	432
Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn	

30/59

130	135	140	
ctc att gac ttt gct cag gaa tac tgg tct tgc tgc gga gcc cga ggc			480
Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly			
145	150	155	160
ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac			528
Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn			
	165	170	175
ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac			576
Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp			
	180	185	190
cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc			624
Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu			
	195	200	205
aaa ctg gtg aga ggg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa			672
Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys			
	210	215	220
ggc tgc gtg ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg			720
Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val			
225	230	235	240
gtg gcg gga gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag atc ttt ggc atc			768
Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile			
	245	250	255
tgc ctg gcc cag aac ctc gag caa atg gaa			798
Cys Leu Ala Gln Asn Leu Glu Gln Met Glu			
	260	265	

<210> 10
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

31/59

<400> 10

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

32/59

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
195 200 205

Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys
210 215 220

Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val
225 230 235 240

Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile
245 250 255

Cys Leu Ala Gln Asn Leu Glu Gln Met Glu
260 265

<210> 11
<211> 958
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(789)

33/59

<400> 11

atg ccc ggc aag cac cag cat ttc cag gaa cct gag gtc ggc tgc tgc 48
 Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

ggg aaa tac ttc ctg ttt ggc ttc aac att gtc ttc tgg gtg ctg gga 96
 Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

gcc ctg ttc ctg gct atc ggc ctc tgg gcc tgg ggt gag aag ggc gtt 144
 Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

ctc tcg aac atc tca gcg ctg aca gat ctg gga ggc ctt gac ccc gtg 192
 Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

tgg ctg ttt gtg gta gtt gga ggc gtc atg tcg gtg ctg ggc ttt gct 240
 Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

ggc tgc att ggg gcc ctc cgg gag aac acc ttc ctg ctc aag ttt ttc 288
 Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

tcc gtg ttc ctc ggt ctc atc ttc ttc ctg gag ctg gca aca ggg atc 336
 Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

ctg gcc ttt gtc ttc aag gac tgg att cga gac cag ctc aac ctc ttc 384
 Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

atc aac aac aac gtc aag gcc tac cgg gac gac att gac ctc cag aac 432
 Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

ctc att gac ttt gct cag gaa tac tgg tct tgc tgc gga gcc cga ggc 480
 Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

34/59

ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac 528
 Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
 165 170 175

ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac 576
 Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
 180 185 190

cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc 624
 Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

aaa ctg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa ggc tgc gtg 672
 Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
 210 215 220

ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg gtg gcg gga 720
 Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
 225 230 235 240

gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag atc ttt ggc atc tgc ctg gcc 768
 Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

cag aac ctc gag caa atg gaa tgatgacttt gaaaaccact ggcttacgcc 819
 Gln Asn Leu Glu Gln Met Glu
 260

caccatttcc gaggtcctgt ccacggcggg gcctcagcag aactctctga ctggggcccc 879

tggcccggcc ccaccagcc gacatgtttt ctttggcctg ggtggtttat accctgagcc 939

aacctttaaa aattggtag 958

<210> 12

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35/59

<400> 12

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly

36/59

145 150 155 160

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
 165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
 180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
 210 215 220

Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240

Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

Gln Asn Leu Glu Gln Met Glu
 260

<210> 13

<211> 822

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(822)

37/59

<400> 13

atg ccc ggc aag cac cag cat ttc cag gaa cct gag gtc ggc tgc tgc 48
 Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

ggg aaa tac ttc ctg ttt ggc ttc aac att gtc ttc tgg gtg ctg gga 96
 Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

gcc ctg ttc ctg gct atc ggc ctc tgg gcc tgg ggt gag aag ggc gtt 144
 Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

ctc tcg aac atc tca gcg ctg aca gat ctg gga ggc ctt gac ccc gtg 192
 Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

tgg ctg ttt gtg gta gtt gga ggc gtc atg tcg gtg ctg ggc ttt gct 240
 Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

ggc tgc att ggg gcc ctc cgg gag aac acc ttc ctg ctc aag ttt ttc 288
 Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

tcc gtg ttc ctc ggt ctc atc ttc ttc ctg gag ctg gca aca ggg atc 336
 Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

ctg gcc ttt gtc ttc aag gac tgg att cga gac cag ctc aac ctc ttc 384
 Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

atc aac aac aac gtc aag gcc tac cgg gac gac att gac ctc cag aac 432
 Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

ctc att gac ttt gct cag gaa tac tgg tct tgc tgc gga gcc cga ggc 480
 Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly

38/59

145	150	155	160	
ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac				528
Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn				
	165	170	175	
ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac				576
Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp				
	180	185	190	
cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc				624
Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu				
	195	200	205	
aaa ctg gtg aga ggg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa				672
Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys				
	210	215	220	
ggc tgc gtg ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg				720
Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val				
	225	230	235	240
gtg gcg gga gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag atc ttt ggc atc				768
Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile				
	245	250	255	
tgc ctg gcc cag aac ctc gtg agt gac atc aag gca gtg aaa gcc aac				816
Cys Leu Ala Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn				
	260	265	270	
tgg tga				822
Trp				

<210> 14

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

39/59

<400> 14

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

40/59

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
195 200 205

Lys Leu Val Arg Gly Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys
210 215 220

Gly Cys Val Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val
225 230 235 240

Val Ala Gly Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile
245 250 255

Cys Leu Ala Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn
260 265 270

Trp

<210> 15

<211> 813

<212> DNA

<213> Homo sapiens

41/59

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (813)

<400> 15

atg	ccc	ggc	aag	cac	cag	cat	ttc	cag	gaa	cct	gag	gtc	ggc	tgc	tgc	48
Met	Pro	Gly	Lys	His	Gln	His	Phe	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	Cys	Cys	
1				5					10					15		

ggg	aaa	tac	ttc	ctg	ttt	ggc	ttc	aac	att	gtc	ttc	tgg	gtg	ctg	gga	96
Gly	Lys	Tyr	Phe	Leu	Phe	Gly	Phe	Asn	Ile	Val	Phe	Trp	Val	Leu	Gly	
			20					25					30			

gcc	ctg	ttc	ctg	gct	atc	ggc	ctc	tgg	gcc	tgg	ggt	gag	aag	ggc	gtt	144
Ala	Leu	Phe	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	Trp	Ala	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Val	
		35					40					45				

ctc	tgc	aac	atc	tca	gcg	ctg	aca	gat	ctg	gga	ggc	ctt	gac	ccc	gtg	192
Leu	Ser	Asn	Ile	Ser	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Pro	Val	
	50						55				60					

tgg	ctg	ttt	gtg	gta	gtt	gga	ggc	gtc	atg	tgc	gtg	ctg	ggc	ttt	gct	240
Trp	Leu	Phe	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Met	Ser	Val	Leu	Gly	Phe	Ala	
65					70					75					80	

ggc	tgc	att	ggg	gcc	ctc	cgg	gag	aac	acc	ttc	ctg	ctc	aag	ttt	ttc	288
Gly	Cys	Ile	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Phe	Leu	Leu	Lys	Phe	Phe	
				85					90					95		

tcc	gtg	ttc	ctc	ggt	ctc	atc	ttc	ttc	ctg	gag	ctg	gca	aca	ggg	atc	336
Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ile	
			100					105						110		

ctg	gcc	ttt	gtc	ttc	aag	gac	tgg	att	cga	gac	cag	ctc	aac	ctc	ttc	384
Leu	Ala	Phe	Val	Phe	Lys	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Gln	Leu	Asn	Leu	Phe	
		115					120				125					

atc	aac	aac	aac	gtc	aag	gcc	tac	cgg	gac	gac	att	gac	ctc	cag	aac	432
Ile	Asn	Asn	Asn	Val	Lys	Ala	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	
	130						135				140					

42/59

ctc att gac ttt gct cag gaa tac tgg tct tgc tgc gga gcc cga ggc 480
 Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac 528
 Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
 165 170 175

ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac 576
 Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
 180 185 190

cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc 624
 Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

aaa ctg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa ggc tgc gtg 672
 Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
 210 215 220

ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg gtg gcg gga 720
 Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
 225 230 235 240

gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag atc ttt ggc atc tgc ctg gcc 768
 Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

cag aac ctc gtg agt gac atc aag gca gtg aaa gcc aac tgg tga 813
 Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn Trp
 260 265 270

<210> 16

<211> 270

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

43/59

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
 130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
 145 150 155 160

44/59

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
 165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
 180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
 195 200 205

Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
 210 215 220

Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
 225 230 235 240

Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ile Phe Gly Ile Cys Leu Ala
 245 250 255

Gln Asn Leu Val Ser Asp Ile Lys Ala Val Lys Ala Asn Trp
 260 265 270

<210> 17
 <211> 927
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (927)

<400> 17

atg	ccc	ggc	aag	cac	cag	cat	ttc	cag	gaa	cct	gag	gtc	ggc	tgc	tgc		48
Met	Pro	Gly	Lys	His	Gln	His	Phe	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	Cys	Cys		
1				5					10					15			
ggg	aaa	tac	ttc	ctg	ttt	ggc	ttc	aac	att	gtc	ttc	tgg	gtg	ctg	gga		96
Gly	Lys	Tyr	Phe	Leu	Phe	Gly	Phe	Asn	Ile	Val	Phe	Trp	Val	Leu	Gly		
			20					25					30				
gcc	ctg	ttc	ctg	gct	atc	ggc	ctc	tgg	gcc	tgg	ggc	gag	aag	ggc	gtt		144
Ala	Leu	Phe	Leu	Ala	Ile	Gly	Leu	Trp	Ala	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Val		
		35					40					45					
ctc	tcg	aac	atc	tca	gcg	ctg	aca	gat	ctg	gga	ggc	ctt	gac	ccc	gtg		192
Leu	Ser	Asn	Ile	Ser	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Pro	Val		
	50					55					60						
tgg	ctg	ttt	gtg	gta	gtt	gga	ggc	gtc	atg	tgc	gtg	ctg	ggc	ttt	gct		240
Trp	Leu	Phe	Val	Val	Val	Gly	Gly	Val	Met	Ser	Val	Leu	Gly	Phe	Ala		
65				70					75					80			
ggc	tgc	att	ggg	gcc	ctc	cgg	gag	aac	acc	ttc	ctg	ctc	aag	ttt	ttc		288
Gly	Cys	Ile	Gly	Ala	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Phe	Leu	Leu	Lys	Phe	Phe		
				85				90						95			
tcc	gtg	ttc	ctc	ggc	ctc	atc	ttc	ttc	ctg	gag	ctg	gca	aca	ggg	atc		336
Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ile		
			100					105					110				
ctg	gcc	ttt	gtc	ttc	aag	gac	tgg	att	cga	gac	cag	ctc	aac	ctc	ttc		384
Leu	Ala	Phe	Val	Phe	Lys	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Gln	Leu	Asn	Leu	Phe		
		115					120					125					
atc	aac	aac	aac	gtc	aag	gcc	tac	cgg	gac	gac	att	gac	ctc	cag	aac		432
Ile	Asn	Asn	Asn	Val	Lys	Ala	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn		
	130					135					140						
ctc	att	gac	ttt	gct	cag	gaa	tac	tgg	tct	tgc	tgc	gga	gcc	cga	ggc		480
Leu	Ile	Asp	Phe	Ala	Gln	Glu	Tyr	Trp	Ser	Cys	Cys	Gly	Ala	Arg	Gly		
145					150				155						160		

46/59

ccc aat gac tgg aac ctc aat atc tac ttc aac tgc act gac ttg aac	528
Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn	
165 170 175	
ccc agc cgg gag cgc tgc ggg gtg ccc ttc tcc tgc tgc gtc agg gac	576
Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp	
180 185 190	
cct gcg gag gat gtc ctc aac acc cag tgt ggc tac gac gtc cgg ctc	624
Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu	
195 200 205	
aaa ctg gag ctg gag cag cag ggc ttc atc cac acc aaa ggc tgc gtg	672
Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val	
210 215 220	
ggc cag ttt gag aag tgg ctg cag gac aac ctg att gtg gtg gcg gga	720
Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly	
225 230 235 240	
gtc ttc atg ggc atc gcc ctc ctc cag agc aaa tgg aat gat gac ttt	768
Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ser Lys Trp Asn Asp Asp Phe	
245 250 255	
gaa aac cac tgg ctt acg ccc acc att tcc gag gtc ctg tcc acg gcg	816
Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr Ile Ser Glu Val Leu Ser Thr Ala	
260 265 270	
ggg cct cag cag aac tct ctg act ggg gcc cct ggc ccg gcc cca ccc	864
Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro	
275 280 285	
agc cga cat gtt ttc ttt ggc ctg ggt ggt tta tac cct gag cca acc	912
Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Glu Pro Thr	
290 295 300	
ttt aaa aat tgg tag	927
Phe Lys Asn Trp	
305	

47/59

<210> 18
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Pro Gly Lys His Gln His Phe Gln Glu Pro Glu Val Gly Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Lys Tyr Phe Leu Phe Gly Phe Asn Ile Val Phe Trp Val Leu Gly
 20 25 30

Ala Leu Phe Leu Ala Ile Gly Leu Trp Ala Trp Gly Glu Lys Gly Val
 35 40 45

Leu Ser Asn Ile Ser Ala Leu Thr Asp Leu Gly Gly Leu Asp Pro Val
 50 55 60

Trp Leu Phe Val Val Val Gly Gly Val Met Ser Val Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80

Gly Cys Ile Gly Ala Leu Arg Glu Asn Thr Phe Leu Leu Lys Phe Phe
 85 90 95

Ser Val Phe Leu Gly Leu Ile Phe Phe Leu Glu Leu Ala Thr Gly Ile
 100 105 110

Leu Ala Phe Val Phe Lys Asp Trp Ile Arg Asp Gln Leu Asn Leu Phe
 115 120 125

48/59

Ile Asn Asn Asn Val Lys Ala Tyr Arg Asp Asp Ile Asp Leu Gln Asn
130 135 140

Leu Ile Asp Phe Ala Gln Glu Tyr Trp Ser Cys Cys Gly Ala Arg Gly
145 150 155 160

Pro Asn Asp Trp Asn Leu Asn Ile Tyr Phe Asn Cys Thr Asp Leu Asn
165 170 175

Pro Ser Arg Glu Arg Cys Gly Val Pro Phe Ser Cys Cys Val Arg Asp
180 185 190

Pro Ala Glu Asp Val Leu Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Asp Val Arg Leu
195 200 205

Lys Leu Glu Leu Glu Gln Gln Gly Phe Ile His Thr Lys Gly Cys Val
210 215 220

Gly Gln Phe Glu Lys Trp Leu Gln Asp Asn Leu Ile Val Val Ala Gly
225 230 235 240

Val Phe Met Gly Ile Ala Leu Leu Gln Ser Lys Trp Asn Asp Asp Phe
245 250 255

Glu Asn His Trp Leu Thr Pro Thr Ile Ser Glu Val Leu Ser Thr Ala
260 265 270

Gly Pro Gln Gln Asn Ser Leu Thr Gly Ala Pro Gly Pro Ala Pro Pro
275 280 285

49/59

Ser Arg His Val Phe Phe Gly Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Glu Pro Thr
290 295 300

Phe Lys Asn Trp
305

<210> 19

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense oligonucleotide for siRNA-1

<400> 19

gcaaucaagu ggagacaga

19

<210> 20

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense oligonucleotide for siRNA-1

<400> 20

ucugucucca cuugauugc

19

<210> 21

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense oligonucleotide for siRNA-2

50/59

<400> 21

agacagaguc ggugggaga

19

<210> 22

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense oligonucleotide for siRNA-2

<400> 22

ucucccaccg acucugucu

19

<210> 23

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sense oligonucleotide for siRNA-3

<400> 23

cgguggggaga cgugacuua

19

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense oligonucleotide for siRNA-3

<400> 24

uaagucacgu cuccaccg

19

51/59

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 25

aagcttatga aaccccagtt tgttg

25

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 26

tctagactat ccgctccaca gtcc

24

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 27

gccaccatga aaccccagtt tgttg

25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

52/59

<220>

<223> primer

<400> 28

actgcgatga aaccccagtt tgttg

25

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 29

tctagactat ccgctccaca gtcc

24

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 30

ccagtcacta tggcgtgctc ctagcgctat atgcg

35

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

53/59

<400> 31
cgcatatagc gctaggagca cgccatagtg actgg 35

<210> 32
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> His-FNdeBam

<400> 32
tatgcatcat catcatcatc acgctaggca tcatcatcat catcactgag 50

<210> 33
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> His-RNdeBam

<400> 33
gacccatcagt gatgatgatg atgatggcta gcgtgatgat gatgatgatg ca 52

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> LY6G-FNDE

<400> 34
catatgaacc gaatgcggtg ctacaa 26

54/59

<210> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> LY6G-RNHE

<400> 35
gctagcgttg cacaggtctc ccaggt

26

<210> 36
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HAT-F

<400> 36
ctagcaagga tcattctcgc cacaatgtcc acaaagagga gcacgtctcat gccacaaca

60

agtgag

66

<210> 37
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HAT-R

<400> 37
gatcctcact tgttgtgggc atgagcgtgc tcctctttgt ggacattgtg gatgagatga

60

tccttg

55/59

<210> 38
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA1

<400> 38
cccagaaccu cgugaguga

19

<210> 39
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> siRNA2

<400> 39
gggccaau cu ggagugaaa

19

<210> 40
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 40
gaattcatgc ccggcaagca ccagcat

27

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

56/59

<220>

<223> primer

<400> 41

gaagactccc gccaccacaa tcag

24

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 42

cgtgttcctc ggtctcatct tcttc

25

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 43

tctagaccaa tttttaagg ttggctc

27

<210> 44

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

57/59

<400> 44
gctccccctct caccagtttg agccggacgt cgtag 35

<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 45
aactggtgag aggggagctg gagcagcagg gcttc 35

<210> 46
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 46
aaagacgatg acgacaagcc cggcaagcac cagcatttc 39

<210> 47
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 47
atgtctagac taccaatttt taaaggttgg etc 33

58/59

<210> 48
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 48
gccgccacca tggactacaa agacgatgac gacaag

36

<210> 49
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 49
atgtctagat cattccattt gctcgagggtt ctgggccagg caga

44

<210> 50
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 50
ggcgaattcc cgtccacat gcccggaag cacca

35

<210> 51
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

59/59

<220>

<223> primer

<400> 51

atgtctagac taccaatttt taaaggttgg etc

33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61K45/00(2006.01) i,
A61K48/00(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/395, A61K31/7088, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004/046342 A2 (BIOGEN IDEC INC.), 03 June, 2004 (03.06.04), Full text & AU 2003297300 A1	11-14 1-6, 9, 10
X Y	WO 2003/024392 A2 (GENENTECH INC.), 27 March, 2003 (27.03.03), Full text & US 2003/148408 A1 & US 2004/229277 A1 & US 2004/242860 A1 & EP 1487877 A2 & US 2005/226868 A1 & US 2005/226869 A1 & JP 2005-536439 A	11-14 1-6, 9, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 November, 2006 (08.11.06)

Date of mailing of the international search report
14 November, 2006 (14.11.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316070

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/016317 A1 (ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CT), 26 February, 2004 (26.02.04), Full text & EP 1393776 A1 & EP 1531907 A1 & JP 2006-508645 A	1-6,9,10
Y	HATA,T. <i>et al</i> , RNA interference targeting aurora kinase A suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.7, p.2899-905, full text	1-6,9,10
Y	ANAZAWA,Y. <i>et al</i> , PCOTH, a novel gene overexpressed in prostate cancers, promotes prostate cancer cell growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-Ibeta/SET, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.11, p.4578-86, full text	1-6,9,10
A	LU,L. <i>et al</i> , The immunotherapeutic effects in tumor-bearing mice of Ly-6 monoclonal antibodies, J Immunol, 1989, Vol.142, No.2, p.719-25, full text	1-6,9-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316070

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7, 8, 21, 22, 35, 36
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7, 8, 21, 22, 35 and 36 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6 and 9-14

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316070

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

When the invention of claim 1 "an agent for promoting the apoptosis and/or inhibiting the growth of a cancer cell, which comprises an antibody directed against a protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid depicted in SEQ ID NO:2 or a partial peptide of the peptide" is regarded as the specified invention, it is considered that the common matter between this invention and the invention of claim 15 "an agent for promoting the apoptosis and/or inhibiting the growth of a cancer cell, which comprises an antibody directed against a protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid depicted in SEQ ID NO:6 or a partial peptide of the peptide" resides in "an agent for promoting the apoptosis and/or inhibiting the growth of a cancer cell, which comprises an antibody directed against a protein whose expression is enhanced in a cancer cell".

However, it is already known that the growth of a cancer cell can be inhibited by an antibody directed against Ly-6 which is a protein whose expression is enhanced in a cancer cell", as disclosed in the document below. Thus, the constitution of the common matter cannot be regarded as being novel, therefore cannot be considered to be the main part of the invention.

In addition, it cannot also be considered that these two inventions share a common technical issue that has been unresolved until the time of the filing of the present application.

In conclusion, since it does not appear that there is a technical relationship between the inventions of claims 15-20 and 23-28 and the invention of claim 1 involving one or more of the same or corresponding special technical features, these inventions are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

Similar comments apply to claims 29-34 and 37-42.

Document: LU, L. et al., The immunotherapeutic effects in tumor-bearing mice of Ly-6 monoclonal antibodies, J Immunol, 1989, Vol.142, No.2, p.719-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/395, A61K31/7088, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), C Aplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 2004/046342 A2 (BIOGEN IDEC INC) 2004.06.03, 全文 & AU 2003297300 A1	11-14 1-6, 9, 10
X Y	WO 2003/024392 A2 (GENENTECH INC) 2003.03.27, 全文 & US 2003/148408 A1 & US 2004/229277 A1 & US 2004/242860 A1 & EP 1487877 A2 & US 2005/226868 A1 & US 2005/226869 A1 & JP 2005-536439 A	11-14 1-6, 9, 10

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 1 1 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 4 . 1 1 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

2 9 3 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2004/016317 A1 (ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CT) 2004.02.26, 全文 & EP 1393776 A1 & EP 1531907 A1 & JP 2006-508645 A	1-6, 9, 10
Y	HATA, T. <i>et al</i> , RNA interference targeting aurora kinase A suppresses tumor growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells, Cancer Res, 2005, Vol.65, No. 7, p. 2899-905, 全文	1-6, 9, 10
Y	ANAZAWA, Y. <i>et al</i> , PCOTH, a novel gene overexpressed in prostate cancers, promotes prostate cancer cell growth through phosphorylation of oncoprotein TAF-Ibeta/SET, Cancer Res, 2005, Vol.65, No.11, p. 4578-86, 全文	1-6, 9, 10
A	LU, L. <i>et al</i> , The immunotherapeutic effects in tumor-bearing mice of Ly-6 monoclonal antibodies, J Immunol, 1989, Vol.142, No. 2, p. 719-25, 全文	1-6, 9-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7, 8, 21, 22, 35, 36 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲7, 8, 21, 22, 35, 36は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

別紙参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-6, 9-14

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

本願の請求の範囲1に係る発明「配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤」を特定発明とみると、請求の範囲15に係る発明「配列番号：6～（略）で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤」との共通部は、「癌細胞で発現亢進されるタンパク質に対する抗体を含有してなる、癌細胞のアポトーシス促進および／または増殖阻害剤」であると認められる。

しかしながら、下記文献に記載のとおり、癌細胞で発現亢進されるタンパク質である Ly-6 に対する抗体により癌細胞の増殖を抑制することは公知であるため、当該共通部の構成は新規とは認められず、発明の主要部と見ることはできない。

また、両者がこの出願時まで未解決であった技術上の共通の課題を持つものとも認められない。

したがって、請求の範囲15-20, 23-28に係る発明は、上記特定発明と一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

請求の範囲29-34, 37-42についても同様である。

文献：LU, L. *et al*, The immunotherapeutic effects in tumor-bearing mice of Ly-6 monoclonal antibodies, J Immunol, 1989, Vol.142, No.2, p.719-25