

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4671570号
(P4671570)

(45) 発行日 平成23年4月20日(2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年1月28日(2011.1.28)

(51) Int.Cl.	F 1		
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	105

請求項の数 3 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2001-518076 (P2001-518076)	(73) 特許権者	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成12年8月22日 (2000.8.22)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/005617	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(87) 国際公開番号	W02001/013940	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開日	平成13年3月1日 (2001.3.1)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
審査請求日	平成19年8月21日 (2007.8.21)	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(31) 優先権主張番号	特願平11-236007	(72) 発明者	小阪 昌明 徳島県徳島市八万町千鳥11-10 最終頁に続く
(32) 優先日	平成11年8月23日 (1999.8.23)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2000-38689 (P2000-38689)		
(32) 優先日	平成12年2月16日 (2000.2.16)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 HM 1 . 2 4 抗原の発現増強剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インターフェロン またはインターフェロン を有効成分とする、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質 (HM 1 . 2 4 抗原) の骨髄腫細胞における発現増強剤。

【請求項 2】

IRF - 2 蛋白質を有効成分とする、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質 (HM 1 . 2 4 抗原) の骨髄腫細胞における発現増強剤。

【請求項 3】

IRF - 2 蛋白質を有効成分とするHM 1 . 2 4 プロモーターの活性化剤。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、骨髄腫における HM 1 . 2 4 抗原の発現増強剤としてのインターフェロン 及びインターフェロン 並びに IRF - 2 蛋白質の使用に関する。

背景技術

骨髄腫 (myeloma) は、形質細胞種 (plasmacytoma) 、多発性骨髄腫 (multiple myeloma) とも呼ばれ、モノクローナルな形質細胞の骨髄内集積を特徴とする腫瘍性疾患である。骨髄腫は、免疫グロブリンを产生し分泌する終末分化 B 細胞、すなわち形質細胞がモノクローナルに主として骨髄において増加する疾患で、この疾患の患者の血清中にはモノクローナルな免疫グロブリンもしくはその構成成分である L 鎮、H 鎮などが検出される。

骨髄腫の治療としては、これまで化学療法剤等が使用されているが、骨髄腫を完全寛解に導き、骨髄腫患者の生存期間を延長するような有効な治療剤は見いだされておらず、骨髄腫の治療効果を有する薬剤の登場が待たれていた。

一方、Goto, T. は、ヒト骨髄腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体（マウス抗HM1.24抗体）を報告している（Blood（1994）84, 1922-1930）。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗HM1.24抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと（小阪昌明ら、日本臨床（1995）53, 627-635）から、抗HM1.24抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。10

また、上記Blood（1994）84, 1922-1930には、抗HM1.24抗体が、*in vitro*において、ヒト骨髄腫細胞株 RPMI 8226に対して細胞傷害活性を有することが述べられている。また、マウス抗HM1.24抗体をキメラ化したキメラ抗HM1.24抗体、およびヒト型化した再構成抗HM1.24抗体が、骨髄腫細胞に特異的に結合すること、さらには細胞傷害活性を有することが示されている（Blood（1999）93, 3922-3930）。

このように、HM1.24抗原は、終末分化B細胞である骨髄腫細胞に特異的に高発現しており、この抗原を認識する抗HM1.24抗体は、細胞表面のHM1.24分子数に比例して殺細胞活性を発揮することから、抗HM1.24抗体を用いた免疫療法は多発性骨髄腫に有効な治療法と考えられる。従って、抗HM1.24抗体の抗原であるHM1.24抗原の細胞表面上の発現量を増強することができれば、より少量の抗体投与により同等の細胞傷害活性が期待でき、副作用をより低下させることができるとなる。20

一方、ウイルス増殖抑制活性を示す物質として発見されたインターフェロンは、現在、ほ乳類においては、*λ*, *γ*, *β* 及び *α* の4種類に分類され、多彩な生理活性を有することが知られている（Pestka, S., et al., Ann. Rev. Biochem.（1987）56, 727-777; Langer, J. A., et al., Immunology Today（1988）9, 393-400）。しかしながら、インターフェロン *α* およびインターフェロン *γ* が、骨髄腫細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加させる作用を有することについては報告がなかった。

他方、インターフェロン調節因子（interferon regulatory factor）（IRF）-1および2は、IFN- γ 遺伝子の転写調節因子として同定された。IRF-1および2は一般に同じ遺伝子制御配列に結合し、IRE-1は転写活性化因子、IRF-2は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF-2を高発現させたNIH3T3細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルロースグルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF-2は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。30

一方、最近の研究の進展により、IRF-2が細胞周期の調節に働くヒストンH4の発現に必要であることが示されている。また、IRF-2は筋肉細胞においてvascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1）の発現を上昇させることができ、VCAM-1の活性化にはIRF-2の酸性領域（182から218）が作用していることも明らかになっている。このことからIRF-2は転写抑制因子として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。40

しかしながら、IRF-2蛋白質がHM1.24抗原遺伝子のプロモーター（HM1.24プロモーター）に結合し、該プロモーターを活性化することは知られていなかった。

発明の開示

現在行われている骨髄腫の治療は、上記のごとく、未だ完全ではなく、骨髄腫を完全寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。抗HM1.24抗体による骨髄腫の治療は、特異性及び有効性の点で画期的な治療剤となる可能性があり、抗HM1.24抗体の作用をより効果的に発揮させる方法が望まれている。50

従って、本発明の目的は、骨髄腫細胞において、HM1.24抗原の発現量を増加させることで、抗HM1.24抗体の骨髄腫抑制作用を増強させる手段を提供することである。本発明者らは、かかる方法を提供すべく、HM1.24抗原の発現量を増加させる薬剤を探索した結果、インターフェロン およびインターフェロン が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、インターフェロン またはインターフェロン を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髄腫細胞における発現の増強剤を提供する。

本発明はまた、有効成分として、

(1)インターフェロン またはインターフェロン 、及び 10

(2)配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体、

を含んで成る、骨髄腫の治療剤を提供する。

上記の骨髄腫として典型的なものは多発性骨髄腫である。

前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体であり、好ましくは細胞傷害活性を有するものである。

本発明者らはまたHM1.24プロモーターの活性化剤を探索した結果、IRF-2蛋白質が所望の活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

従って本発明は、IRF-2蛋白質を有効成分とする、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質（HM1.24抗原）の骨髄腫細胞における発現の増強剤を提供する 20

。本発明はまた、IRF-2蛋白質を有効成分とするHM1.24プロモーターの活性化剤を提供する。

本発明はまた、有効成分として、

(1)IRF-2蛋白質、及び

(2)配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体、

を含んで成る、骨髄腫の治療剤を提供する。

上記の骨髄腫として典型的なものは多発性骨髄腫である。

前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体であり、好ましくは細胞傷害活性を有するものである。 30

本発明はまた、IRF-2蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24抗原の骨髄腫細胞における発現増強剤を提供する。

本発明はまた、IRF-2蛋白質の発現を増強する化合物を有効成分として含有するHM1.24プロモーターの活性化剤を提供する。

本発明はさらに、HM1.24抗原の発現増強剤をスクリーニングする方法を提供する。

本発明はさらに、骨髄腫を有する患者を治療するためのキットであって、

(1)配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体；及び

(2)上記抗体を、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤と組合させて患者に投与することを指示する指示書； 40

を含んで成るキットを提供する。

前記骨髄腫は、例えば多発性骨髄腫である。前記抗体は、好ましくはヒト型化抗HM1.24抗体である。また、前記配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤は、好ましくはインターフェロン またはインターフェロン である。

本発明はさらに、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合し、且つ細胞傷害活性を有する抗体を含んで成る、骨髄腫を有する患者を治療するための医薬組成物であって、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤と組合させて患者に投与するための医薬組成物を提供する。 50

前記骨髄腫は、例えば多発性骨髄腫である。前記抗体は、好ましくはヒト型化抗HM1.24抗体である。前記配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を増強する薬剤は、好ましくはインターフェロン またはインターフェロン である。

発明の実施の形態

インターフェロン 及びインターフェロン

本発明で使用されるインターフェロン 及びインターフェロン は、HM1.24抗原の発現量を増加させる活性を有する限り変異体を用いることも可能である。HM1.24抗原の発現量を測定するには、実施例に記載されたように、骨髄腫細胞株あるいは骨髄腫患者から採取した骨髄腫細胞を用いて、フローサイトメトリーにより検出することができる。変異体としては、例えば、1もしくは数個、あるいは複数個のアミノ酸残基が、欠失または置換または挿入または付加等により変異されたインターフェロン 及びインターフェロン であってもよい。

欠失または置換または挿入を蛋白に導入する方法としては、対応する遺伝子を改変する部位特異的変異誘発法を用いることができる(Hashimoto-Gotoh, Gene (1995) 152, 271-275, Zoller, Methods Enzymol. (1983) 100, 468-500, Kramer, Nucleic Acids Res. (1984) 12, 9441-8456, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492、「新細胞工学実験プロトコール 東京大学医科学研究所 制癌研究部編 (1993) p241-248」)。

また、市販のPCRを利用した「部位特異的変異誘発システム(GIBCO-BRL)」や「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」(ストラタジーン社製)を利用することも可能である。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は自然界においても生じることもある。また、この様に変異を導入された蛋白がもとの蛋白と同様の活性を有することは、Mark, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666に示されている。

アミノ酸残基の置換においては、性質の保存されたアミノ酸どうしで置換することが好ましい。例えば、疎水性アミノ酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H, F, Y, W)どうしの置換が好ましい。

さらに、変異体としては、インターフェロン 又はインターフェロン のペプチド断片を用いることも可能である。特に、インターフェロン 又はインターフェロン 受容体との結合部位を有するペプチド断片が好ましい。好ましくは100個以上、さらに好ましくは130個以上、さらに好ましくは150個、最も好ましくは160個以上の連続するアミノ酸残基から構成されるペプチド断片である。

IRF-2蛋白質

インターフェロン調節因子(interferon regulatory factor) (IRF) - 1 および 2 は IFN- 遺伝子の転写調節因子として同定された。IRF - 1 および 2 は一般に同じ遺伝子制御配列に結合し、IRF - 1 は転写活性化因子、IRF - 2 は転写抑制因子として拮抗的に作用することが知られている。IRF - 2 を高発現させた NIH3T3 細胞は細胞飽和密度の上昇、メチルセルロースゲルでのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、IRF - 2 は癌遺伝子として機能することが明らかになっている。

一方、最近の研究の進展により、IRF - 2 が細胞周期の調節に働くヒストンH4の発現に必要であることが示されている。また、IRF - 2 は筋肉細胞において vascular cell adhesion molecule - 1 (VCAM - 1) の発現を上昇させることが示され、VCAM - 1 の活性化には IRF - 2 の酸性領域(182から218)が作用していることも明らかになっている。このことから IRF - 2 は転写抑制因子

10

20

30

40

50

として働くばかりでなく、転写活性化因子として作用を示す場合も知られている。

ハイブリドーマ

本発明で使用される抗体を產生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPMM2(特開平7-236475)やKPC-32(Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400)を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌(E. coli)は、平成5年(1993年)10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、Escherichia coli DH5 (pRS38-pUC19)として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特開平7-196694参照)。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。

具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4~21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653(J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), NS-1(Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11(Margulies. D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0(Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), FO(de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194(Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210(Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133)等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステ

10

20

30

40

50

インらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1 ~ 10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI 1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。10

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37 度に加温した PEG 溶液、例えば、平均分子量 1000 - 6000 程度の PEG 溶液を通常、30 ~ 60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日 ~ 数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。20

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を in vitro で HM1.24 抗原または HM1.24 抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、HM1.24 抗原または HM1.24 抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平 1-59878 参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる HM1.24 抗原または HM1.24 抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい (国際特許出願公開番号 WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO94/25585, WO96/34096, WO96/33735 参照)。30

このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。40

モノクローナル抗体

具体的には、抗 HM1.24 抗体產生ハイブリドーマの作製は、Goto, T. らの方法 (Blood (1994) 84: 1922 - 1930) により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成7年4月27日に FERM BP-5233 としてブダペスト条約に基づき国際寄託された抗 HM1.24 抗体產生ハイブリドーマを BALB/c マウス (日本クレア製) の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗 HM1.24 抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10% ウシ胎児血清、5% B M - C on d i med H 1 (Boehringer Mannheim 製) 含有 RPMI 1640 培地、ハイブリドーマ S FM 培地 (GIBCO-BRL 製)、P F HM - I I 培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し50

、その培養上清から抗HM1.24抗体を精製する方法で行うことができる。

組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chmczyński, P. ら、(1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、Quick Prep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002；Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

変更抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に変更した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの変更抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP125023、国際特許出願公開番号WO96/02576参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 (pUC19-1.24L-g-) およびEscherichia coli DH5 (pUC19-1.24H-g-1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644

10

20

30

40

50

としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平8-264756参照）。ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR；complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework-region；FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

例えば、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 (pUC19-RVL_a-AHM-gk)およびEscherichia coli DH5 (pUC19-RVH_r-AHM-g1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特願平8-264756参照）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、細胞傷害活性を呈するヒト抗体C領域として、ヒトC 例えば、C1, C2, C3, C4を使用することができる。これらのうち、特にC1, C3を有する抗体が強力な細胞傷害活性、すなわち、ADCC活性、CDC活性を有し、本発明に好適に使用される。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域（framework region；FR）およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる（特願平8-264756参照）。

発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1（HEF1）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法（Nature (1979) 277, 108）、また、HEF1プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法（Nucleic Acids

10

20

30

40

50

Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Bettlerらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、WO96/30394を参照)。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の產生系を使用することができる。抗体製造のための產生系は、*in vitro* および *in vivo* の產生系がある。*in vitro* の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる產生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa, Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, TN5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640, IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を產生してもよい。

一方、*in vivo* の產生系としては、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993)。また、昆虫としては、カイコなどを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコなどを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を產生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ カゼインのような乳汁中に固有に產生される蛋

10

20

30

40

50

白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい(Ebert, K. M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る(Susumu, M. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る(Julian, K. - C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* または *in vivo* の產生系にて抗体を產生する場合、抗体重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい(国際特許出願公開番号 WO94-11523 参照)。

上述のように得られた抗体は、ポリエチレン glycol (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

抗体の分離、精製

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーコロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティーコロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. 等が挙げられる。

その他、通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーコロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

抗体の濃度測定

上記方法で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.35ODとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液(pH 9.6)で1μg/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG(BIO SOURCE 製) 100μlを96穴プレート(Nun c 製)に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

プロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG(CAPPEL 製) 100μlを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフェオヌクレオターゼ標識抗ヒトIgG(BIO SOURCE 製) 100μlを加え、室温にて1時間インキュベート

10

20

30

40

50

する。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad製)を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

F C M 解析

骨髄腫細胞と本発明で使用される抗体との反応性は、F C M (フローサイトメトリー) 解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。樹立細胞株としては、骨髄腫由来 RPMI 8226 (ATCC CCL 155)、同 U266 (ATCC TIB 196)、同 KPM2、同 KPC-32、形質細胞腫由来 ARH-77 (ATCC CRL 1621)などを用いることができる。

上記細胞を PBS (-)で洗浄した後、FACS 緩衝液 (2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有 PBS (-))で25μg / mlに希釈した抗体あるいはコントロール抗体 100μlを加え、氷温化 30 分インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、25μg / mlの FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM, Becton Dickinson 製) 100μlを加え、氷温化 30 分間インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、600μlあるいは1mlの FACS 緩衝液に懸濁し、FACScan (Becton Dickinson 製) で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

スクリーニング方法

HM1.24 抗原の発現増強剤をスクリーニングするには、例えば、無刺激の状態で HM 1.24 抗原を発現していないか、あるいは少なく発現している細胞を用いて F C M 解析にて測定することができる。例えば、実施例に記載の細胞を被検物質と 1 ~ 2 日インキュベートし、ついで一次抗体としてマウス抗ヒト HM1.24 抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG 抗体により染色する。最後に、細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞の FITC 蛍光強度を測定すればよい。

また、前記の間接法による染色ではなく、細胞を高濃度の免疫グロブリンで処理し、Fc レセプターをブロックした後に FITC 標識した抗ヒト HM1.24 抗体を用いた直接法による染色により F C M 分析することもできる。

また、HM1.24 プロモーター配列を用いたレポーター遺伝子アッセイにより HM1.24 抗原の発現増強剤をスクリーニングすることができる。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼを用いることができる。HM1.24 プロモーター配列をレポーター遺伝子の上流に含むプラスミドを構築し、ついで、細胞に形質転換した後、得られた細胞を被検物質と 1 ~ 2 日培養し、回収された細胞を F C M 解析することで、HM1.24 抗原の発現を増強する薬剤をスクリーニングすることができる。

細胞傷害活性

A D C C 活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞傷害活性として、例えば、A D C C 活性を有する抗体である。

本発明において骨髄腫細胞に対する A D C C 活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球を分離し、エフェクター細胞 (Effector cell : E) として調製する。

また、標的細胞 (Target cell : T) としては、RPMI 8226 (ATCC CCL 155), U266 (ATCC TIB 196), KPM2, KPC-32, ARH-77 (ATCC CRL 1621)などを ⁵¹Cr により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞に A D C C 活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%の N P - 40 を用いることができる。細胞傷害活性 (%) は、(A - C) / (B - C) × 100 で計算することができる。なお、A は抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、B は N P - 40 により遊離された放射活性 (cpm)

10

20

30

40

50

)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性(cpm)である。

細胞傷害活性の増強

ADC活性のような細胞傷害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域(C領域)としてC、特にC1、C3を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。

例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化(Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY(1994)12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化(Smith, R. I. F. et al., J. Immunology(1995)154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現(Shuford, W. et al., Science(1991)252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化(Caron, P. C. et al., J. Exp. Med.(1992)176, 1191-1195, Shopes, B., J. Immunology(1992)148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化(Wolff, E. A. et al., Cancer Res.(1993)53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入(Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol.(1991)21, 2379-2384)が挙げられる。

これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

患者の治療

本発明の態様のひとつは、HM1.24抗原の発現量を増強する薬剤と抗HM1.24抗体を患者に投与することにより、骨髄腫、好ましくは多発性骨髄腫を治療する方法に関する。HM1.24抗原の発現量を増強する薬剤は好ましくはインターフェロン またはインターフェロン である。インターフェロンと抗HM1.24抗体は、一緒に投与してもよいし、別個に投与してもよい。後者の場合には、まず、インターフェロンを投与し、96時間以内に抗HM1.24抗体を投与することがこのましい。インターフェロン投与と抗HM1.24抗体投与の間隔は、インターフェロン投与によってHM1.24抗原の発現量が増強されている限り制限はないが、好ましくは96時間以内であり、より好ましくは72時間、さらに好ましくは48時間以内である。患者の臨床応答に応じてインターフェロンと抗HM1.24抗体を複数回、交互に投与することも本発明の範囲内である。投与経路は、血流中に直接投与されることが望ましく、静脈内投与あるいは動脈内投与が好ましい。持続的に投与することも可能であり、点滴静脈内投与でもよい。

本発明の他の態様は、インターフェロン またはインターフェロン と抗HM1.24抗体を含有する骨髄腫の治療剤に関する。本発明の治療剤は、従来、インターフェロンや抗体製剤に用いられてきた薬学的に許容しうるビヒクリ、例えば、生理食塩水または5%デキストランを通常の安定化剤や賦形剤と一緒に含有することができる。

本発明の他の態様では、骨髄腫を有する患者を治療するためのキットであって、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物と、インターフェロン またはインターフェロン との併用療法に関する記載を含む指示書とからなるキットを提供する。

本発明の他の態様では、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する、骨髄腫を有する患者を治療するための医薬組成物であって、インターフェロン またはインターフェロン と併用するための医薬組成物を提供する。

実施例

実施例1.インターフェロンによる骨髄腫細胞におけるHM1.24

抗原発現量の増強

ヒト骨髄腫細胞株U266(ATCC TIB 196)および多発性骨髄腫患者の骨髄由来の骨髄腫細胞を10%ウシ胎児血清(Whittaker Bioproducts

10

20

30

40

50

, Inc., Walkersville, MD, USA) を含む RPMI 1640 培地 (Sigma, St Louis, MO, USA) を用い、5% 炭酸ガス培養器中、37 度培養した。マウス抗 HM1.24 抗体を生産するハイブリドーマは、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1-1-3) に寄託番号 FERM BP-5233 (寄託日 1995年4月27日) として寄託されている。

骨髄腫細胞 ($1 \times 10^5 / \text{ml}$) を 1000U/ml の天然型インターフェロン- γ (大塚製薬、東京) 存在下又は非存在下に 48 時間培養し、HM1.24 抗原 (それをコードする塩基配列を配列番号: 1 に示す) の変化をフローサイトメトリーで測定した。細胞を 0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma, St Louis, MO, USA) と 0.02% アジ化ナトリウムを添加したリン酸緩衝液 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) で洗浄後、ヒト免疫グロブリン (3mg/ml 、ミドリ十字、大阪) を加えた PBS ($100 \mu\text{l}$) に浮遊させ、4 度で 15 分間、反応させた。

その後、 $2 \mu\text{l}$ の FITC-ヒト IgG1 (1mg/ml) 又は FITC-抗 HM1.24 抗体 (1mg/ml) を加え、4 度で 60 分間、染色した。患者骨髄腫細胞を用いた場合、骨髄腫細胞の同定には $20 \mu\text{l}$ の PE-anti-CD38 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を加え、二重染色を行った。染色後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% パラホルムアルデヒド (和光純薬、大阪) を含む PBS 中で保存した。その後、フローサイトメーター (EPICS XL, Coulter, Hialeah, FL, USA) を用い、HM1.24 抗原の発現を解析した。

その結果、骨髄腫細胞株 U266 (図 1) および患者骨髄腫細胞 (図 2) は無刺激の状態で HM1.24 抗原を発現しており、インターフェロン- γ の刺激により、HM1.24 抗原の発現量はさらに増加した。

インターフェロン- γ は骨髄腫細胞の HM1.24 抗原の発現をさらに増強させ、骨髄腫細胞へ結合する抗 HM1.24 抗体の数を増加させた。抗 HM1.24 抗体による治療の抗腫瘍効果は、結合する抗体数に比例することから、骨髄腫患者において、インターフェロン- γ を投与した後に抗 HM1.24 抗体治療を行うことは、抗体による治療効果を増強し、より有効性を高める治療になると期待される。

実施例 2. レポーター遺伝子解析による HM1.24 抗原の発現機能の

解析

抗原の発現誘導が HM1.24 プロモーター領域により調節されているかどうか調べるために、プロモーター領域でのレポーター遺伝子解析を行った。

HM1.24 プロモーター領域の遺伝子 (配列番号: 3) は PCR クローニングにより得た。ヒト末梢血単核細胞より DNAzol reagent (GIBCO) を用い、ゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA を鋳型として、プライマー HM2k (aaaaggtaaccagctgtctttctgtctgtcc) (配列番号: 4)、及び BST2B (atagtcatacgaagtagatgccatccag) (配列番号: 5) を用い、Takara Taq (宝酒造、大津) を用い Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) にて PCR (94 1 min, 55 1 min, 72 1 min, 30 cycles) を行った。

得られた約 2 kb の断片を制限酵素 KpnI 及び BgIII (宝酒造) にて処理し、レポータージーンプラスミド pGL3-basic (Promega, WI, USA) の KpnI - BgIII サイトに DNA ligation kit ver. II (宝酒造) を用いてクローニングし、コンピテント E. coli JM109 (ニッポンジーン) を形質転換した。形質転換した大腸菌を $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 培地にて 37 度培養し、QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にてプラスミドを調製した。

得られたプラスミド HM-2k / GL3 を制限酵素 KpnI 及び XhoI にて処理し、kilo-sequence用 deletion kit (宝酒造) にて deletion clone を作製し、転写開始点上流 - 493 bp までを含むプラスミド HM-493 / GL3 を得た。また HM-2k / GL3 を制限酵素 KpnI 及び AfIII にて処理し

10

20

30

40

50

、上記方法にてdeletion cloneを作製し、転写開始点上流 - 151 bp 又は - 77 bp までを含む、それぞれHM-151/GL3 及びHM-77/GL3を得た。

細胞へのプラスミド導入はPolyethyleneimine-Transferrinfection Kit (Tf-PEI-Kit) (Bender MedSystems, Vienna, Austria)、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。細胞株を 50 μM Deferrioxamine、10% FBS を含む RPMI-1640 にて一晩培養した。導入するプラスミドを Tf-PEIとの複合体にするため、終濃度 20 μg/ml のレポータージーンプラスミド、0.4 μg/ml のpRL-SV40、1 μg/ml Tf-PEI 試薬の混合液を作製し、室温で 20 分間インキュベートした。5 × 10⁵ 細胞 / ml の細胞を Tf-PEI・プラスミド混合液の 3 倍容加え、4 時間 37 °C にてインキュベートし、培地にて洗浄後、2 × 10⁵ 細胞 / ml の濃度で 1 wellあたり 100 μl を 96 ウイル平底プレートで培養した。

IFN-α を終濃度 0, 10, 100、又は 1000 U/ml となるよう添加し、37 °C 2 日間培養した。細胞を PBS (-) にて洗浄後、20 μl の Passive Lysis Buffer にて溶解し、6 μl を C96 White Polysorp Fluorounic plate (Nunc) にアプライした。Luminoskan (Labsystems) にて基質液 30 μl、測定時間 10 秒にて Firefly および Renilla それぞれの発光強度を測定した。測定値は、Firefly / Renilla にて補正後、コントロール (medium) を 1 として相対活性を求めた。

その結果、上流 2 kb p 及び 4.93 kb p とともに IFN-α 濃度依存的にレポーターのルシフェラーゼ活性が上昇しており、プロモーター領域の転写活性上昇が抗原の発現誘導を引き起こすことを確認した (図 3)。

さらに、転写開始点上流 151 bp 又は 77 bp のレポータープラスミドを用いた結果では、上流 151 bp のレポータープラスミドでは IFN-α 刺激によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方上流 77 bp のレポータープラスミドでは IFN-α 刺激による活性の変化は認められなかった (図 4)。77 ~ 151 bp の領域には GAS element, ISRE に相同意の高い配列が存在し、IFN-α 刺激に応答して活性化する転写調節因子であることから、IRF ファミリーの転写調節因子が活性に関与していることが示された。

実施例 3. インターフェロンによる骨髄腫細胞におけるHM1.24

抗原発現量の増強

実施例 1 に記載の方法により、1000 U/ml の天然型インターフェロン (R&D System 社) を用いて解析した。その結果、骨髄腫細胞株 U266 (図 5) および患者骨髄腫細胞 (図 6) において、インターフェロンと同様に、HM1.24 抗原の発現量の増大が観察された。

実施例 4. IRF-2 の HM1.24 プロモーター領域への結合

HM1.24 プロモーター領域に結合する転写因子を同定するために、HM1.24 プロモーター領域をプローブとした Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) を次のように行い、結合因子として IRF-2 を同定した。

(1) 核抽出物の調製

骨髄腫細胞 U266-B1 (ATCC-TIB196) を 10% FBS (HyClone) を含む RPMI-1640 培地 (GIBCO-BRL) にて 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。インターフェロン (IFN-α) (Pepro Tech EC) による細胞への刺激を行うため、培地中に IFN-α を終濃度 1000 U/ml となるように添加し、添加後 30 分、2 時間、4 時間及び 8 時間の細胞を回収した。細胞を冷 PBS (-) に懸濁、1,000 rpm にて遠心して上清を捨て、10 mM Tris, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ 溶液に懸濁した。

氷中に5分間静置後に再度遠心し、上清を捨てた。10 mM Tris, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.4 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄に細胞を懸濁した。ガラス製ホモジエナイザーを用いて細胞を氷上でホモジエナイズし、6000 g 3分間遠心し、上清を捨てた。抽出緩衝液(20%グリセロール、20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 mg/ml アプロチニン、5 mg/ml ロイペプチド)に細胞を懸濁し、氷中に20分間静置した。12000 g 10分間遠心し、上清を回収した。

(2) 標識プローブの調製

プローブとして、HM1.24プロモーター領域においてGAS(IFN-活性化部位: GASコンセンサス配列はtttncnnnaa(配列番号: 8))、ISRE(IFN-刺激応答因子: ISREコンセンサス配列はngaaanngaaact(配列番号: 9))とホモロジーのある配列(tttccccagaa(配列番号: 10)およびggaacttgaaaact(配列番号: 11)を含むISRE2を作製した。すなわち、オリゴDNA ISRE-F2(aattttctgggaaaactgaaaactgaaaaacct(配列番号: 12))及びISRE-R2(aatttaggtttcagtttcagtttccccaga(配列番号: 13))を混合し、アニールさせ2本鎖DNAプローブISRE2とした。

また、オリゴDNA adp-1(catggcatctacttctgtatgactatgtcagagtgc(配列番号: 14))及びadp-2(catgggcactctgcataatgtcatacgaaatgtgc(配列番号: 15))を混合し、アニールさせunrelatedプローブadpとした。プローブの標識はBand Shift Kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用い、その標準プロトコールに準じて行った。すなわち、上記にて作製した2本鎖DNA 50 ngを[-³²P]dATP(20 μCi)(Amersham Pharmacia Biotech)を含む反応液中でKlenow断片のポリメラーゼ反応を37、1時間行った。反応終了した溶液を2倍に希釈後Nick Spin Column(Amersham Pharmacia Biotech)にかけ、1600 rpm、4分間遠心して回収した溶液を標識プローブとした。

(3) IFN-による刺激により產生された結合因子の経時変化

Band Shift Kit(Amersham pharmacia biotech, NJ, USA)の標準プロトコールに従って以下の操作を行った。前記(1)において経時的に調製した抽出物5 μgにキット添付の10×結合緩衝液(100 mM Tris-HCl(pH 7.5), 500 mM NaCl, 5 mM DTT)2 μl, 50%グリセロール4 μl, 1%NP-40 1 μl、及び1 μlのpoly(dI-dC)·poly(dI-dC)を加え、前記(2)で調製した³²P標識ISRE-2プローブ2 μlを添加し、水を加えて全量を20 μlとした後、この反応混合物を室温にて20分間インキュベートし、前記抽出物中に存在する可能性のある結合因子と前記³²P標識ISRE-2プローブとの結合を許容した。

反応液18 μlに10×染色液(Kitに添付)2 μlを加え、1×Tris-グリシン緩衝液(25 mM Tris, 190 mMグリシン、1 mM EDTA, pH 8.1)中、7.5%アクリルアミドゲル上で電気泳動し、電気泳動後、ゲルを濾紙にはりつけて蛋白質を濾紙に移行させた。ゲルドライヤーにて乾燥した濾紙をX線フィルムに感光させ、シグナルを検出した。

比較のため、抽出物を添加しない反応液[(NEC-)]、インターフェロンにより刺激しないで培養した細胞培養物からの抽出物を添加した反応液[0 h]、8時間の培養液の抽出物に標識プローブの代りに未標識ISRE2プローブ50 ngを添加した反応液[8 h(+cold)]、及び8時間の培養後の抽出液にunrelatedプローブadpを50 ng添加した反応液[8 h(+cold unrelated)]を用意し、上記を同様に処理してシグナルの検出を行った。

10

20

30

40

50

結果を図7に示す。この図7から明らかな通り、HM1.24プロモーターの一部に相当する2本鎖DNAと結合する物質が、インターフェロン刺激下で培養したU266-B1細胞中に経時的に増加した。

(4) 各種抗体との反応による転写因子の同定

前記(1)に記載したようにして、骨髄腫細胞U266-B1(ATCC-TIB196)を1000U/mlのインターフェロン- γ の存在下で8時間培養し、抽出物を調製した。Band Shift Kit(Amercham Pharmacia Biotech)の標準プロトコールに従って次の操作を行った。すなわち、5μgの抽出物に抗体2μgを添加し、室温にて15分間インキュベートし、抽出液/抗体反応液を得た。前記キット添付の10×結合緩衝液2μl、50%グリセロール4μl、1%NP-40

1μl及び1μlのPoly(dI-dC)・Poly(dI-dC)に、前記抽出液/抗体反応液2μl及び前記(2)で調製した標識プローブ2μlを添加し、水を加えて全量を20μlとした後、この反応混合物を室温にて20分間インキュベートした。

この反応混合物を、前記(3)に記載したようにして電気泳動にかけ、シグナルの検出を行った。

上記の抗体として、次の抗体(いずれも、Santa Cruz Biotechnologyより)を使用した。

抗-ヒトSTAT1 p84/p91(E-23)：(説明)ウサギポリクローナル抗体(SC-346X)

抗-ヒトSTAT2(C-20)：ウサギポリクローナル抗体(SC-476X)

抗-マウスSTAT3(K-15)：ウサギポリクローナル抗体(SC-483X)

抗-ヒトISGF-3 P48(C-20)：ウサギポリクローナル抗体(SC-496X)

抗-ヒトIRF-1(C-20)：ウサギポリクローナル抗体(SC-497X)

抗-ヒトIRF-2(C-19)：ウサギポリクローナル抗体(SC-498X)

抗-マウスICSAT(M-17)：ヤギポリクローナル抗体(SC-6059X)

また、対照として、インターフェロンの刺激なしに培養した細胞の抽出物を用いた反応液[0h]；1000U/mlのインターフェロン- γ 刺激下で8時間培養した細胞の抽出物を添加し、抗体を添加しない反応液[8h]；標識ISRE2プローブの代りに未標識ISRE2プローブ50ngを添加した反応液[8h(+cold)]；及び標識ISRE2プローブの代りに未標識のdpプローブ50ngを添加した反応液[8h(+unrelated cold)]を用意し、上記の同様に処理した。

結果を図8に示す。図8から明らかな通り、インターフェロン- γ の刺激下で培養した細胞からの抽出物中の標識ISRE2プローブと結合する成分は抗-IRF-2抗体とのみ結合し、HM1.24プロモーターに結合してそれを活性化する因子は、転写因子IRF-2であることが示された。

実施例5. IRF-2によるHM1.24プロモーター活性化の確認

IRF-2共発現によるHM1.24プロモーター活性への影響をU266細胞を用いたレポータージーンアッセイにより測定し、実際にIRF-2がHM1.24プロモーターの転写活性化作用を持つことを明らかにした。以下の実験では、骨髄腫細胞株U266-B1(ATCC-TIB196)を用いた。細胞は、10%FBS(GIBCO BRL)を含むRPMI-1640培地(GIBCO)(以下medium)により、5%CO₂incubatorにて培養した。

(1) HM1.24プロモーター領域を含むプラスミドの構築

HM1.24プロモーター領域の遺伝子はPCR cloningにより得た。ヒト末梢血単核細胞よりDNAzol reagent(GIBCO)を用い、ゲノムDNAを調製した。得られたゲノムDNAを鋳型として、プライマーHM2k(aaaggtaaccagctgtctttctgtctgtcc)(配列番号:16)、BST2B(atatgtcatacgaagtagatgccatccag)(配列番号:17)を用い、Takara Taq(宝酒造、大津)を用いThermal Cycler 480(P

10

20

30

40

50

erkin Elmer, CA, USA)にてPCR(94 1分間、55 1分間、72 1分間、30サイクル)を行った。

得られた約2kbの断片を制限酵素KpnI, BgIII(宝酒造)にて処理し、レポータージーンプラスミドpGL3-basic(Promega, WI, USA)のKpnI, BgIIIサイトにDNA ligation kit ver, II(宝酒造)を用いてクローニングし、コンピテントE. coli JM109(ニッポンジーン)を形質転換した。形質転換した大腸菌を100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地にて37培養し、QIAGEN plasmid maxi kit(QIAGEN, Hilden, Germany)にてプラスミドを調製した。

得られたプラスミドHM-2k/GL3を制限酵素KpnI, XbaIにて処理し、kit lo-sequence用deletion kit(宝酒造)にて欠失クローンを作製し、転写開始点上流-491bpまでを含むプラスミドHM-491/GL3を得た。またHM-2k/GL3を制限酵素KpnI, AfIIIにて処理し、上記方法にて欠失クローンを作製し、転写開始点上流-151bpまでを含むHM-151/GL3、を得た。

さらにHM-2k/GL3を鋳型としてプライマー10S(tttcggtacctaattaaatccccatgtgcctg)(配列番号:18)およびGLプライマー2(ctttatgttttggcgcttccaa)(配列番号:19)を用い、Takara Taq(宝酒造、大津)を用いThermal Cycler 480(Perkin Elmer, CA, USA)にてPCR(94 1分間、55 1分間、72 1分間、30サイクル)を行った。得られた断片を制限酵素KpnI, BgIII(宝酒造)にて処理し、レポータージーンプラスミドpGL3-basic(Promega, WI, USA)のKpnI, BgIIIサイトにligation high(東洋紡)を用いてクローニングし、コンピテントE. coli JM109(ニッポンジーン)をtransformした。

形質転換した大腸菌を100μg/mlのアンピシリンを含むLB培地にて37培養し、QIAGEN plasmid maxi kit(QIAGEN, Hilden, Germany)にてプラスミドを調製した。こうして転写開始点上流125bpまでを含むHM-125/GL3を得た。またHM-2k/GL3を鋳型としてプライマーHMP700(aaaggtagccagagtttacccatggtagtccatgg)(配列番号:20)およびGLプライマー2を用い、同様の手順にてPCRを行い、pGL3-basicのKpnI, BgIIIサイトに断片を導入することにより、転写開始点上流約700bpまでを含むHM-700/GL3を得た。

さらにHM-2k/GL3を鋳型としてプライマーHMP700および11A'(caggaggataatttaggtaccgaaaagagaggtagggcttt)(配列番号:21)を用い、KODポリメラーゼ(東洋紡)を用いThermal Cycler 480(Perkin Elmer, CA, USA)にてPCR(98 15秒、65 2秒、74 30秒、25サイクル)を行った。得られた断片をZero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing ver. B(Invitrogen)を用いて、pCR4 Blunt-TOPO vectorに挿入した。得られたプラスミドを制限酵素KpnIにて処理し、およそ550bpの断片を回収し、HM-125/GL3のKpnIサイトにligation highを用いて導入した。こうして転写開始点上流-125~-145付近を欠失したdISRE/GL3を得た。

(2) IRF-2発現プラスミドの構築

IRF-2発現プラスミドは以下のように作製した。interferon-(1000U/ml)にて刺激後8時間経過したU266細胞より、TRIZOL試薬(GIBCO-BRL)を用いて全RNAを抽出した。First-strand cDNA Synthesis kit(Pharmacia)を用い、得られたRNAを鋳型、Not I-d(T)₁₈をプライマーとして逆転写反応を37 1時間行った。得られたcDN

Aを鑄型、IRF2-F2(ttgtatggtagcgtagaaaaaagc)（配列番号：22）、IRF2-R2(cagctagttcacatatactcgcc)（配列番号：23）をプライマーとしてLA-Taq（宝酒造）を用いてPCR（94 45秒、60 45秒、72 60秒、40サイクル）を行った。

得られたPCR反応液を鑄型、IRF2-F1(agagggtaccatggccggggaaaggatgcg)（配列番号：24）、IRF2-R1(agtcggtagccatggctttaaactgctttgacgcggg)（配列番号：25）をプライマーとしてKODポリメラーゼ（東洋紡）を用いて再度PCR（94 45秒、60 45秒、72 60秒、30サイクル）を行った。得られた断片を制限酵素KpnIにて処理し、発現プラスミドpTracer-CMV(Invitrogen)のKpnIサイトに 10 ligation high（東洋紡）を用いて導入し、IRF-2発現プラスミドpIRF-2/Tracerを得た。

(3) レポーター遺伝子活性の測定

細胞へのプラスミド導入はPolyethylenimine-Transferrinfection Kit(Tf-PEI-Kit)(Bender MedSystem, Vienna, Austria)を、ルシフェラーゼアッセイはDual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いた。細胞株を50 μM Defferrrioxamine, 10% FBSを含むRPMI-1640にて一晩培養した。導入するプラスミドをTf-PEIとの複合体にするため、終濃度20 μg/mlのレポータージーンプラスミド、20 μg/mlのpIRF-2/TracerまたはpTracer-CMV, 0.4 μg/mlのpRL-SV40, 1 μg/ml Tf-PEI reagentの混合液を作製し、室温で20分間インキュベートした。

5 × 10⁵細胞/mlの細胞をTf-PEI plasmid混合液の3倍容加え、4時間37にてインキュベートし、培地にて洗浄後、2 × 10⁵細胞/mlの濃度で1ウェルあたり100 μlを96ウェル平底プレートで培養した。IFN- を終濃度0, 1000U/mlとなるよう添加し、37 2日間培養した。細胞をPBS(-)にて洗浄後、20 μlのPassive Lysis Bufferにて溶解し、6 μlをC96 White Polysorp Fluoroununc plate(Nunc)にアプライした。Luminoskan(Labsystems)にて基質液30 μl、測定時間10秒にてFirefly, Renillaそれぞれの発光強度を測定した。測定値はFirefly/Renillaにてトランスフェクション効率の補正を行い相対活性を求めた。

(4) 結果

HM1.24プロモーター-レポーター-プラスミドとIRF-2発現プラスミドをU266細胞に導入し、レポーター活性を測定した(図9)。その結果、IRF-2結合サイトであるISREモチーフ配列を含む-700および-151で、IRF-2共発現によりルシフェラーゼ活性が上昇した。一方ISRE配列を欠失したdISRE/GL3ではIRF-2共発現によるルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった。以上の結果よりIRF-2はHM1.24プロモーターのISRE領域に結合し、その転写活性を増強することが示された。

(5) IRF-2の強制発現によるHM1.24抗原の発現増強の確認

IRF-2によるHM1.24抗原の発現量の変化は、IRF-2発現プラスミド(pIRF-2/Tracer)またはコントロールプラスミド(pTracer/CMV)をU266細胞に上記方法にて導入し、1~2日間培養した後、細胞を回収し、一次抗体としてマウス抗ヒトHM1.24抗体にて染色する。細胞を洗浄し、さらに二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体により染色する。細胞を洗浄したのち、フローサイトメータにより細胞のFITC蛍光強度を測定する。IRF-2発現プラスミド導入細胞では、コントロールプラスミド導入細胞に比較してFITC強度の高い細胞が多く存在することを確認する。特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関 40 50

寄託機関 名 称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1)表示：Escherichia coli DH5

(pRS38-pUC19)

寄託番号：FERM BP-4434

寄託日：1993年10月5日

(2)表示：Mouse-mouse hybridoma

HM1.24

寄託番号：FERM BP-5233

寄託日：1995年4月27日

10

(3)表示：Escherichia coli DH5

(pUC19-RVHr-AHM-g 1)

寄託番号：FERM BP-5643

寄託日：1996年8月29日

(4)表示：Escherichia coli DH5

(pUC19-1.24H-g 1)

寄託番号：FERM BP-5644

寄託日：1996年8月29日

(5)表示：Escherichia coli DH5

(pUC19-RVLa-AHM-gk)

20

寄託番号：FERM BP-5645

寄託日：1996年8月29日

(6)表示：Escherichia coli DH5

(pUC19-1.24L-gk)

寄託番号：FERM BP-5646

寄託日：1996年8月29日

【配列表】

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

< 1 2 0 > Agent for enhancing expression of HM1.24 comprising as an active component interferon α

< 1 3 0 > H757

< 1 6 0 > 5 10

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 1073

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Nucleotide sequence coding for HM1.24 protein antigen 20

< 4 0 0 > 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1	5
---	---

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly 30

10	15	20	25
----	----	----	----

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30	35	40
----	----	----

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu 40

45	50	55
----	----	----

cg_g g_c a_t g_t g_a g_t c_g a_a g_t c_t a_c c_t c_t g_a a_a g_a g_g 241
 Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu
 60 65 70
 ct_g a_c g_a g_c c_a g_a g_g t_{tt} c_a g_a t_{tt} g_t g_a g_c c_a g_g g_c g_c 289
 Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala
 75 80 85 10
 a_c t_g c_a a_c c_a c_t g_t a_t g_g c_t a_t g_t g_c t_{cc} c_t g_a t_{tt} g_c a_g a_g 337
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
 90 95 100 105
 a_a g_g c_c c_a g_g a_a a_a g_t g_a g_g c_{tt} g_a g_g a_t c_a c_t 385
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
 110 115 120 20
 a_c t_{ta} a_a c_a t_a a_a g_{tt} c_{ag} g_ac_g t_{ct} g_c a_g g_t g_g c_{ga} c_{tg} 433
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
 125 130 135
 a_g a_g a_g a_a c_a c_{ag} g_{tc} t_{ta} a_g c_{gt} a_g a_t c_{gc} g_{ac} a_a g_g a_g t_{ac} 481
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
 140 145 150 30
 t_{ac} c_{cc} a_{gc} t_{cc} c_{ag} g_{ac} t_{cc} a_{gc} t_{cc} g_{ct} g_{cg} g_{cg} c_{cc} c_{ag} c_{tg} c_{tg} 529
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ala Ala Pro Gln Leu Leu
 155 160 165
 a_{tt} g_{tg} c_{tg} c_{tg} g_{gc} c_{tc} a_{gc} g_{ct} c_{tg} c_{tg} c_{ag} t_{ga} g_{at} c_{cc} c_{ag} g_{ga} 575
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
 170 175 180 40
 a_g c_t g_g c_a c_a t_c t_t g_g a_g g_g t_c c_g t_c t_t g_a c_{at} t_c t_t g_a t_c 635
 t_c a_t c_a g_{tt} c_c t_g a_g c_{gg} g_{tc} a_t g_{gg} g_{ca} a_c a_c g_{gt} t_{ag} c_g g_{gg} g_{ag} g_{ac} c_{cg} 695
 g_{ga} a_{gg} g_{cc} t_c t_g g_g a_c g_g g_{gg} g_{gg} g_{cc} a_g t_c t_g g_g g_{gt} c_{ac} 755

agtccgggttg acccagggtc gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815
 tcttgcgtcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt gggggcatg tgctgcctgt 875
 tgttatgggt ttttttgcg ggggggttg ctttttctg gggtcttga gctccaaaaaa 935
 aataaacact tccttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
 aaaattcggg cggccgccc 1013

< 2 1 0 > 2 10

< 2 1 1 > 180

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Homosapiens

< 2 2 3 > Amino acid sequence of HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly 20

1 5 10 15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35 40 45

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg 30

50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

65 70 75 80

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

85 90 95

40 Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

100 105 110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130

135

140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165

170

175

10

Ala Leu Leu Gln

180

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2016

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homosapiens

20

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene coding for HM1.24 protein antigen

< 4 0 0 > 3

actaaaagtctctgatatgc agaaaataatgcataagctgtttctgtc tgccctct 60

ctctctctctgcctcggtgc ccaaggcaggaaaggcccccc tggccatggg acacgtgacc 120

cacatgacct tacatcatatggagatgac tcacacttttaccctgccc ctggcttt 180

30

gtatccaata aataacagca cagccagaca ttccggccataccagtcttccgcattt 240

ctggtagtgg tccccgggc ccagctgtctttttatctttcgatcttgcgttttt 300

ttttcacact ctctcgatgc cgcacacagg gagagaccca ctgaccctgttgggttc 360

cctacagtaa tttaaaggaa aagagcaaca aactttcggtttgcaggcttggactgttt 420

acagctgcaa aatttagaga ggacatcaat ctattattatccacatttttacgtgggaa 480

40

aatcaatgtt aagagaggaa attcatttgc ccagaggatgc accaccctgg cctccatgtt 540

gcaattcatg caattgtat ttccgacactgtcccaaact aaccctaaatgttgcaggcc 600

agaacagtgc tgctcaaata agtcagcttacgtaaataag tcaggcaatgttgcgtgttt 660

tgcacctgga gtcctggcca ggctggtaggtccctctcc tggacaatgttgcgtgttt 720

aatttcagc aagatcatct cccacagctt gtaattggc tcttggttct aagtgatttt 780
 tttgtttatt ggttaagag atggatccc actctatcac ccaggcttga gtgccgtggc 840
 acaatcatag ctcgctgcag cctcaaactc ctgggctcga gtgatcctcc tgccctcagcc 900
 tcccagcctc agcctgggac cacaggcatg taccaccatg cctggctcta agtggcttta 960
 atggggcctt tctgagggat gttggagtca gggcctgggg ggagttcccc aggccttctg 1020
 ggaggcctgg gctctggact tgacctcgcc tactgtctgg ccctgctgaa aagaaaaaaa 1080 10
 aacatggaaa tggcagacct aacagaatct gggctgtggt caggatgtgg ctgaagaagc 1140
 cacaagaaaa acatgcagtc cccttcagc ggtcatgccc agcagttggg tgccgataat 1200
 gggcctgatt tcctgttagga agccctggct ctcttggcca catggacagt gtctgaggct 1260
 ggcctgtta ttcccctttc cagatgaaga aacaggctca gagagtttac ctggatcct 1320
 ggagtccag gagcacttt tctggaagta ggagcttggt tcctgcaggt gccaagacag 1380
 agaccgacat tttttgttgg ctgggtcggt ctcccgattt tcagctggct ccagtctcac 1440 20
 ctgttgcctca cacaccctcc atgtctccca tagtcccctc ggtggggaca gaggcactgg 1500
 atgaagccct gctcgtcacc acagagacac ctgaacacaa aaaccagtcc ctggggtcag 1560
 acccaggccc cgcccccaga cccaggccct gcctcactc caccacgcaa ctgtgcaacc 1620
 tcagttccc caggtggaga ccggaccaac aatgatggcc tctgcctt caggtcatag 1680
 tacagatgaa tacaggctgg cacggcttag gcactcagta acacacggca gaggcacagg 1740
 gacttaagat ggagtgtccc aggcagccac agttggctgg cacccagttt ggaaggccc 1800 30
 aaggccttt aaagcagggt gaaaaaaa gcccacctcc tttctggaa actgaaactg 1860
 aaaacctaataat taatcctctg cctgttaggtg cctcatgcaa gagctgctgg tcagagcact 1920
 tcctggaact tgctattggc caggacgtt cctatgctaa taaagggtg gcccgtagaa 1980
 gattccagca ccctccccta actccaggcc agactcctt cagctaaagg ggagatctgg 2040
 atg gca tct act tcg tat gac 2061 40
 Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp

< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > Primer HM2K 10
< 4 0 0 > 4
aaaggtagcca gctgtctttc tgtctgtcc 29
< 2 1 0 > 5
< 2 1 1 > 78
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence 20
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > Primer BST2B
< 4 0 0 > 5
atagtcatac gaagtagatg ccatccag 28 30
< 2 1 0 > 6
< 2 1 1 > 2144
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Homosapiens
< 2 2 3 > Nucleotide sequence coding for IRF-2 protein 40
< 4 0 0 > 6
aactgacggg ctttcatttc catttcacac acccttagcaa cacttatacc ttgcggaaatt 60
gtattggtag cgtaaaaaaaaa gcacactgag agggcaccat gccgggtggaa aggatgcgca 120
tgccggccgtg gctggaggag cagataaact ccaacacgat cccggggctc aagtggctta 180

acaaggaaaa gaagatttt cagatcccct ggaatgcattc ggcttagacat gggtagggatg 240
tggaaaaaga tgcaccactc ttttagaaacc gggcaatcca tacagggaaag catcaaccag 300
gagtagataa acctgtatccc aaaacatgga aggcgaattt cagatgcgcc atgaattcct 360
tgcctgatat tgaagaagtc aaggataaaa gcataaagaa aggaaataat gccttcaggg 420
tctaccgaat gctgccccta tcagaacggc cttctaagaa aggaaagaaa ccaaagacag 480
aaaaagaaga caaagttaag cacatcaagc aagaaccagt tgagtcatct ctggggctta 540 10
gtaatggagt aagtgtatctt tctcctgagt atgcggtcct gacttcaact ataaaaaaatg 600
aagtggatag tacggtaac atcatagtt taggacagtc ccatctggac agcaacattg 660
agaatcaaga gattgtcacc aatccgcccag acatttgcca agttgttagag gtgaccactg 720
agagcgacga gcagccggc agcatgagcg agctctaccc tctgcagatc tccccgtgt 780
tttcctatgc agaaagcgaa acgactgata gtgtgcccag ccatgaagag agtgcggagg 840
ggcggccaca ctggcggaaag aggaatattg aaggcaaaca gtacctcagc aacatgggga 900 20
ctcgaggctc ctacctgctg cccggcatgg cgtccttcgt cacttccaac aaaccggacc 960
tccaggtcac catcaaagag gagagcaatc cggtgccctta caacagctcc tggccccctt 1020
ttcaagacct cccctttct tcctccatga ccccagcata cagcagcagt cggccagacc 1080
gggagacccg gcccagcgtc atcaagaaaa catcgatcat caccaggcc cgcgtcaaga 1140
gctgttaagc ctctgactct ccgcgggtgt tttttttttt tttttttttt 1200
ttttttgtat tttttttttt tctctctgac acctatttta gacaaatcta agggaaaaag 1260 30
ccttgacaat agaacattga ttgctgtgtc caactccagt acctggagct tctcttaac 1320
tcaggactcc agccattgg tagacgtgtg tttcttagagc ctgctggatc tcccagggt 1380
actcactcaa gttcaaggac caacaaggc agtggaggtg ctgcattgcc tgcggtaag 1440
gccagcaagg tggagtggat gcctcagaac ggacgagata atgtgaacta gctggaaattt 1500
tttattcttg tgaatatgtt cataggcagc actagcgaca ttgcagtctg cttctgcacc 1560
ttatcttaaa gcacttacag ataggcccttc ttgtatctt gctctatctc acagcacact 1620 40
cagcaaaaaa ttctctgccc attccccage ctcttttctt atcccatccc atcccatccc 1680
atcccatccc atcccatccc gctttttcc tacttttctt tccctcaaag ctccattcc 1740
acatccggag gagaagaagg aaatgaattt ctctacagat gtcccatttt cagactgctt 1800

taaaaaaaaat ccttctaattc tgctatgctt gaatgccacg cggtacaaag gaaaaagtt 1860
 catggaaata ttatgcaaatttccagattt gaagacaaaa atactctaatttcttaaccaga 1920
 gcaagctttt ttatttttta tacagggaa tattttattt aaggtaaaat tctaaataaa 1980
 atataattgt ttttatctt ttctacagca aatttataat ttttaagattt cttttcttgg 2040
 ttatcagcag ttgttattac atccttgg cacatttttt ttttaattttg taaaggtgaa 2100
 aaaagctttt atgagctcat ctagcaatca gatttccttg tgga 2144 10
 < 2 1 0 > 7
 < 2 1 1 > 349
 < 2 1 2 > PRT
 < 2 1 3 > Homosapiens
 < 2 2 3 > Amino acid sequence of IRF-2 protein
 < 4 0 0 > 7 20
 Met Pro Val Glu Arg Met Arg Met Arg Pro Trp Leu Glu Glu Gln Ile
 1 5 10 15
 Asn Ser Asn Thr Ile Pro Gly Leu Lys Trp Leu Asn Lys Glu Lys Lys
 20 25 30
 Ile Phe Gln Ile Pro Trp Met His Ala Ala Arg His Gly Trp Asp Val
 35 40 45 30
 Glu Lys Asp Ala Pro Leu Phe Arg Asn Arg Ala Ile His Thr Gly Lys
 50 55 60
 His Gln Pro Gly Val Asp Lys Pro Asp Pro Lys Thr Trp Lys Ala Asn
 65 70 75 80
 Phe Arg Cys Ala Met Asn Ser Leu Pro Asp Ile Glu Glu Val Lys Asp
 85 90 95 40
 Lys Ser Ile Lys Lys Gly Asn Asn Ala Phe Arg Val Tyr Arg Met Leu
 100 105 110

Pro Leu Ser Glu Arg Pro Ser Lys Lys Gly Lys Pro Lys Thr Glu

115 120 125

Lys Glu Asp Lys Val Lys His Ile Lys Gln Glu Pro Val Glu Ser Ser

130 135 140

Leu Gly Leu Ser Asn Gly Val Ser Asp Leu Ser Pro Glu Tyr Ala Val

145 150 155 160 10

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

165 170 175

Val Val Gly Gln Ser His Leu Asp Ser Asn Ile Glu Asn Gln Glu Ile

180 185 190

Val Thr Asn Pro Pro Asp Ile Cys Gln Val Val Glu Val Thr Thr Glu

195 200 205 20

Ser Asp Glu Gln Pro Val Ser Met Ser Glu Leu Tyr Pro Leu Gln Ile

210 215 220

Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ala Glu Ser Glu Thr Thr Asp Ser Val Pro

225 230 235 240

Ser Asp Glu Glu Ser Ala Glu Gly Arg Pro His Trp Arg Lys Arg Asn

245 250 255

Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Leu Ser Asn Met Gly Thr Arg Gly Ser Tyr

260 265 270

Leu Leu Pro Gly Met Ala Ser Phe Val Thr Ser Asn Lys Pro Asp Leu

275 280 285

Gln Val Thr Ile Lys Glu Glu Ser Asn Pro Val Pro Tyr Asn Ser Ser

290 295 300

Trp Pro Pro Phe Gln Asp Leu Pro Leu Ser Ser Ser Met Thr Pro Ala

305 310 315 320

30

40

Ser Ser Ser Ser Arg Pro Asp Arg Glu Thr Arg Ala Ser Val Ile Lys

325

330

335

Lys Thr Ser Asp Ile Thr Gln Ala Arg Val Lys Ser Cys

340

345

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 9

10

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-gamma activated siile (GAS) consensus Sequence

20

ttncnnnaa

9

< 2 1 0 > 9

< 2 1 1 > 13

30

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > IFN-alpha stismulated response element (ISRE) consensus Sequence

40

< 4 0 0 > 9

ngaaanngaa act

13

< 2 1 0 > 10

< 2 1 1 > 9
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 > 10
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 10
ttcccagaa 9
< 2 1 0 > 11
< 2 1 1 > 13
< 2 1 2 > DNA 20
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 11 30
ggaaaactgaa act 13
< 2 1 0 > 12
< 2 1 1 > 29
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence 40
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > ISRE-F2 probe

< 4 0 0 >	12	
aatttctggg aaactgaaaae tgaaaacct		29
< 2 1 0 >	13	
< 2 1 1 >	29	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	10
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	ISRE-F2 probe	
< 4 0 0 >	13	
aatttagttt tcagtttcag tttcccaga		29
< 2 1 0 >	14	20
< 2 1 1 >	37	
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		
< 2 2 1 >		30
< 2 2 2 >		
< 2 2 3 >	adp-1 probe	
< 4 0 0 >	14	
catggcatct acttcgtatg actattgcag agtgcc		37
< 2 1 0 >	15	
< 2 1 1 >	36	40
< 2 1 2 >	DNA	
< 2 1 3 >	Artificial Sequence	
< 2 2 0 >		

< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > adp-2 probe
< 4 0 0 > 15
catggcact ctgcaatgt catacgaagt agatgc 36
< 2 1 0 > 16 10
< 2 1 1 > 29
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 > 20
< 2 2 3 > Primer HM2k
< 4 0 0 > 16
aaaggtacca gctgtcttc tgtctgtcc 29
< 2 1 0 > 17
< 2 1 1 > 28
< 2 1 2 > DNA 30
< 2 1 3 > Artificial Sequence
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
< 2 2 2 >
< 2 2 3 > BST2B 40
< 4 0 0 > 17
atagtcatac gaagtagatg ccatccag 28
< 2 1 0 > 18
< 2 1 1 > 28

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer 10S 10

< 4 0 0 > 18

tttcggtaacc taattaatcc tctgcctg 28

< 2 1 0 > 19

< 2 1 1 > 23

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence 20

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > GL Primer 2

< 4 0 0 > 19

ctttatgttt ttggcgtctt cca 23 30

< 2 1 0 > 20

< 2 1 1 > 30

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 > 40

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > Primer HMP700

< 4 0 0 > 20

aaaggta	cca gagttac	ctt ggtatcc	ttgg	30
< 2 1 0 >	21			
< 2 1 1 >	39			
< 2 1 2 >	DNA			
< 2 1 3 >	Artificial Sequence			
< 2 2 0 >				10
< 2 2 1 >				
< 2 2 2 >				
< 2 2 3 >	Primer 11A'			
< 4 0 0 >	21			
cagaggat	ta attaggtacc	gaaagagagg	tggc	39
< 2 1 0 >	22			20
< 2 1 1 >	24			
< 2 1 2 >	DNA			
< 2 1 3 >	Artificial Sequence			
< 2 2 0 >				
< 2 2 1 >				
< 2 2 2 >				30
< 2 2 3 >	Primer IRF2-F2			
< 4 0 0 >	22			
ttgtattg	gt agcgtgaaaa	aagc		24
< 2 1 0 >	23			
< 2 1 1 >	24			40
< 2 1 2 >	DNA			
< 2 1 3 >	Artificial Sequence			
< 2 2 0 >				
< 2 2 1 >				

< 2 2 2 >
 < 2 2 3 > Primer IRF2-R2
 < 4 0 0 > 23
 cagctagttc acattatctc gtcc 24
 < 2 1 0 > 24
 < 2 1 1 > 30 10
 < 2 1 2 > DNA
 < 2 1 3 > Artificial Sequence
 < 2 2 0 >
 < 2 2 1 >
 < 2 2 2 >
 < 2 2 3 > Primer IRF2-F1 20
 < 4 0 0 > 24
 agagggtacc atgccggtgg aaaggatgcg 30
 < 2 1 0 > 25
 < 2 1 1 > 30
 < 2 1 2 > DNA
 < 2 1 3 > Artificial Sequence 30
 < 2 2 0 >
 < 2 2 1 >
 < 2 2 2 >
 < 2 2 3 > Primer IRF2-R1
 < 4 0 0 > 25 40
 agtcgggtacc ttaactgctc ttgacgcggg 30

【図面の簡単な説明】

図1は、インターフェロン の非存在下(上)は存在下(下)で培養した骨髄腫細胞株U266を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図2は、インターフェロン の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した患者骨髄腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図3は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポーター 50

プラスミドにより形質転換したU 2 6 6 細胞をインターフェロン の非存在下又は種々の濃度での存在下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

図4は、HM1.24抗原をコードする遺伝子のプロモーター領域の内、転写開始点から151bp上流まで、又は77bp上流までを挿入したレポータープラスミドにより形質転換されたU 2 6 6 細胞又はHEL細胞を、インターフェロン (1000U/ml) の存在下で培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した結果を示すグラフである。

図5は、インターフェロン の非存在下(上)は存在下(下)で培養した骨髄腫細胞株U 2 6 6 を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図6は、インターフェロン の非存在下(上)又は存在下(下)で培養した患者骨髄腫細胞を、標識としてヒトIgG(対照)又は抗HM1.24抗体を用いてフローサイトメトリーにより分析した結果を示す。

図7は、U 2 6 6 培養細胞にIFN- α を添加することにより産生されHM1.24プロモーター領域に結合する転写因子の量の経時的变化を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-)は核抽出物添加せず。0hはIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。0.5~8hはIFN- α (1000U/ml) 刺激後それぞれの時間経過した核抽出物を添加。+coldは未標識ISRE2プローブ50ng添加、+cold unrelatedは未標識adp配列50ng添加。

図8は、HM1.24プロモーターに結合する転写因子を、各種の抗体を用いて同定した結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。NE(-)は核抽出物添加せず。0hはIFN- α 刺激なしの核抽出物を添加。8hはIFN- α (1000U/ml) 刺激後8hの核抽出物を添加。+coldは未標識ISRE2プローブ50ng添加。+cold unrelatedは未標識adp配列50ng添加。抗体はそれぞれ2 μ g添加。

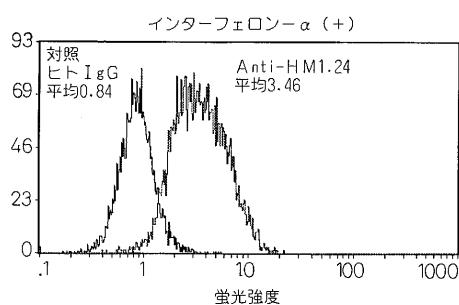
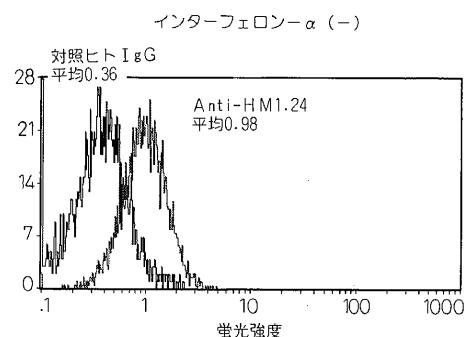
図9は、HM1.24プロモーターレポータープラスミドとIRF-2発現プラスミドとをU 2 6 6 細胞に導入し、レポーター活性を測定した場合の結果を示すグラフである。

10

20

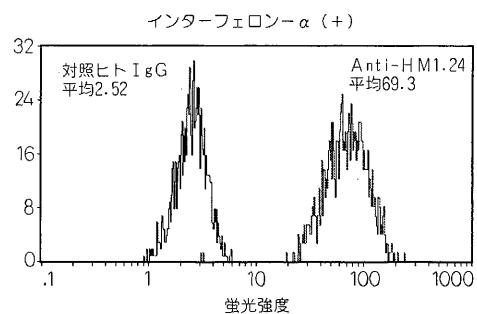
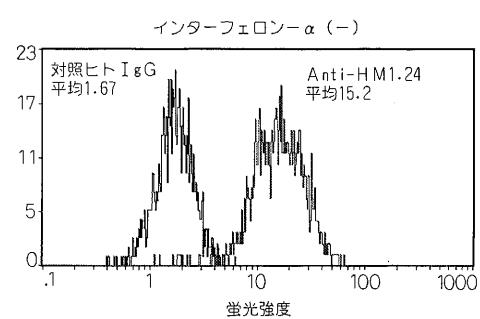
【図1】

Fig.1



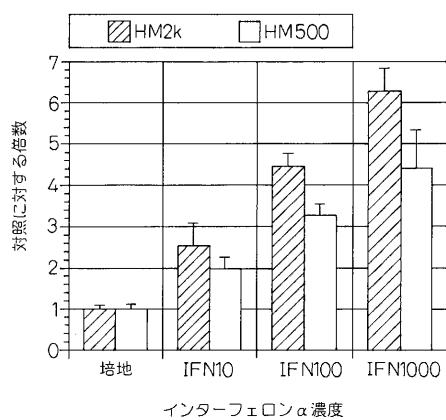
【図2】

Fig.2



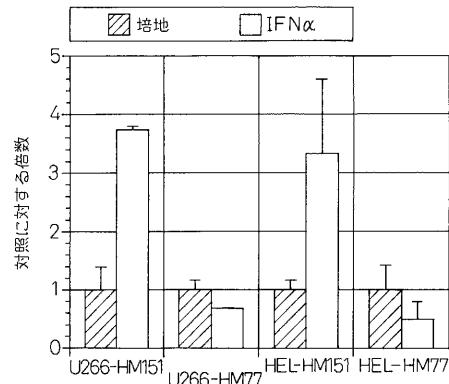
【図3】

Fig.3



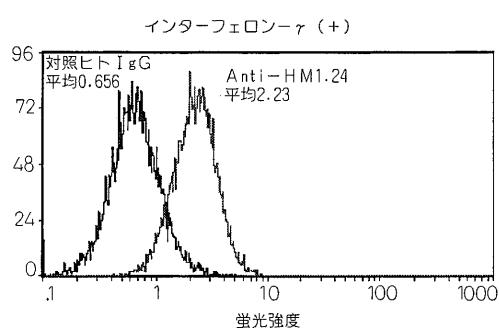
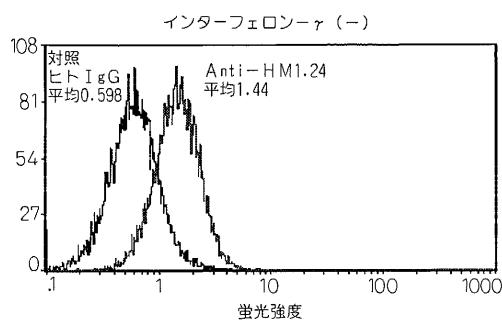
【図4】

Fig.4



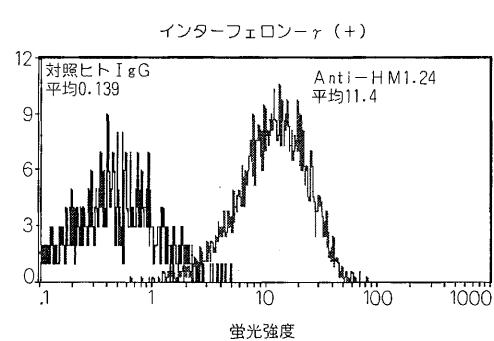
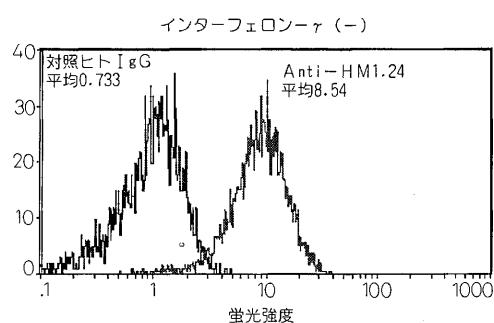
【図5】

Fig.5



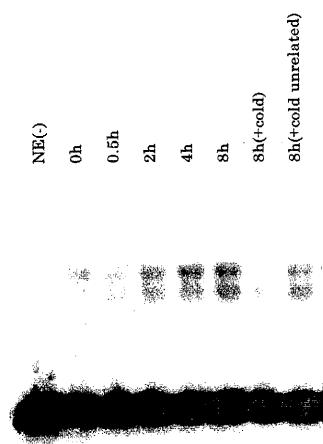
【図6】

Fig.6



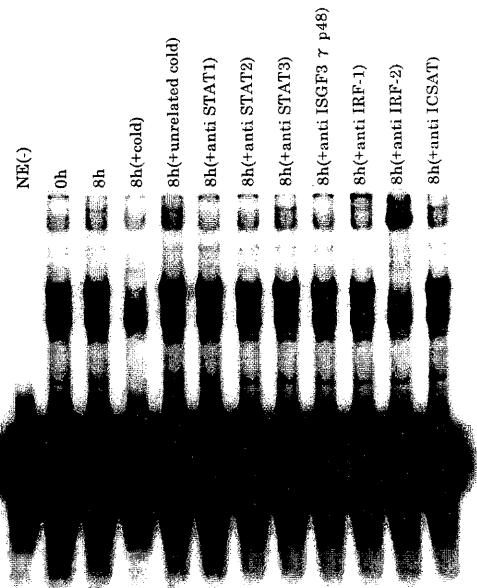
【図7】

Fig.7



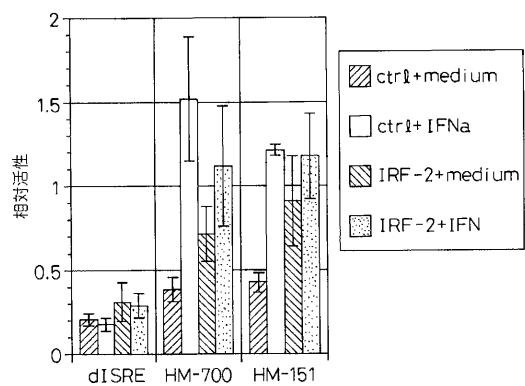
【図8】

Fig.8



【図9】

Fig.9



フロントページの続き

(72)発明者 尾崎 修治
徳島県徳島市南庄町 3 丁目 8

(72)発明者 若原 裕二
静岡県御殿場市駒門 1 丁目 135 番地 中外製薬株式会社内

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 国際公開第 99/018997 (WO, A1)
BLOOD, 1999年, Vol.93, No11, p.3922-30
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999年, Vol.258, p.583-591
Cancer Letters, 1999年, Vol.139, No.1, p.67-73

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/21

A61K 38/00

A61P 19/00

A61P 35/00

A61P 43/00

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq